



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

ELENICE MARTINS BRASIL

**Óleos essenciais de *Lippia* spp em carpa koi *Cyprinus carpio*: atividade antiparasitária,
hematologia, histologia e desempenho zootécnico**

FLORIANÓPOLIS

2019

Elenice Marins Brasil

**Óleos essenciais de *Lippia* spp em carpa koi *Cyprinus carpio*: atividade antiparasitária,
hematologia, histologia e desempenho zootécnico**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora
em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Laterça Martins

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Brasil, Elenice Martins
Óleos essenciais de *Lippia* spp em carpa koi
Cyprinus carpio: atividade antiparasitária,
hematologia, histologia e desempenho zootécnico /
Elenice Martins Brasil ; orientador, Maurício Laterça
Martins, 2019.
133 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Aquicultura. 3. Fitoterápico.
4. Parasito. 5. Histologia. I. Martins, Maurício
Laterça . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
III. Título.

Elenice Martins Brasil

Óleos essenciais de *Lippia* spp em carpa koi *Cyprinus carpio*: atividade antiparasitária, hematologia, histologia e desempenho zootécnico

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Mauricio Laterça Martins, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Aimê Rachel Magenta Magalhães, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Cargnin Ferreira, Dr.
Instituto Federal de Santa Catarina

Profa. Monica Yumi Tsuzuki, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é **a versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Profa. Dra. Leila Hayashi
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Mauricio Laterça Martins
Orientador

Florianópolis, 12 de julho de 2019.

Dedico este trabalho a todos os ribeirinhos e agricultores, que não tiveram a oportunidade de cursar o ensino superior. Em especial aos moradores da comunidade São Francisco Rio Arari, Itacoatiara-AM.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o criador de tudo que existe no mundo, pois sem sua bênção nada seria possível.

Ao meu orientador, Dr. Maurício Laterça Martins, que tem contribuído com minha formação com paciência, serenidade, dedicação e amizade por todos estes anos.

À Dra. Edsandra Campos Chaga, pela amizade e comprometimento, e pelo fornecimento de material biológico.

Aos meus familiares, Heliton Edney M. Brasil, Raimundo M. Brasil, Nicolau Pereira de Souza, Elieth M. Brasil, Ermice M. Brasil, Ervira M. Brasil, Helia M. Brasil, Aglair M. Brasil, Mariza de Oliveira Brasil e aos demais primos e primas.

Ao meu pai Nelson Campos e família pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao amigo, Marcio Quara, pela amizade de vários anos e, principalmente, pela colaboração neste trabalho.

Ao Rafael Olike, por toda a paciência, companhia e parceria nos momentos bons e ruins durante mais esta etapa da minha vida.

Aos amigos do laboratório, Lucas Cardoso, Leyciane, Elizabeth, Cleize Sales, Willian e Jeanderson, pela amizade e companheirismo, e pelas inúmeras amostras analisadas dos experimentos. Sem a colaboração de vocês, seria difícil a realização deste trabalho.

Às minhas cunhadas, Walcineche B. Martins e Elenilce C. M. Mota, pelo apoio e incentivo incondicional.

Aos amigos de outros laboratórios, Vanessa Rocha, Marcia, Filipe, Helem, Sergio, Fabio, Rosa.

Aos meus amigos de longas jornadas, Dr. Cristhian Amado Castro Perez, Dr. Esau, pela amizade, principalmente nas horas mais difíceis.

Às amigas de vários anos, Patrica Preste, Cassia, Aline Alcantara.

Ao amigo Guilherme da Costa Assis, proprietário da Fazenda Vale dos Bettas pela amizade e credibilidade em permitir que eu realizasse o experimento em sua propriedade, bem como seus familiares que me recepcionaram com todo o carinho durante a minha estadia na fazenda.

Ao Dr. Rodrigo Santos, pela colaboração no experimento, coleta de material e amizade.

Aos meus pais de coração, Lindalva Fernandes Pereira e Fernando Jorge Príncipe Pereira, pela amizade e incentivo incondicional por todos esses anos.

Às minhas irmãs de coração, Lindomara Pereira, Lindinalva, Fernanda, Linalva Nascimento e família, que, perto ou distante, continuam fazendo parte da minha caminhada. Especialmente a Lina Maria F. Príncipe Pereira, pela amizade, compreensão e hospedagem em sua casa, durante toda as minhas idas e vindas entre as cidades.

Aos meus filhos do coração Ramon Brasil, Bárbara Ananda F. Pereira, Eva da Silva Mota e Eloane da Silva Mota.

Ao Clemilton Mota Martins pela companhia e parceria nos momentos bons e ruins durante mais esta etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e, em especial, ao Laboratório de Patologia de Organismo Aquáticos (AQUOS), pela oportunidade e infraestrutura.

Aos meus anjos na terra, a Sra. Maria Inês de Oliveira Pereira, Maria de Fátima (Fatinha) e Suzana, que durante toda a minha graduação e mestrado não me deixaram passar por nenhuma necessidade, pois sempre que fiquei sem dinheiro elas me davam comida para que eu não passasse fome e tivesse a oportunidade de estudar.

Aos funcionários do setor de Patologia de Organismo Aquáticos, Kekas.

Ao Carlito, secretário do curso de Pós-Graduação em Aquicultura pela simpatia, amizade, paciência e dedicação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura (PPGAQI-UFSC), e seu corpo docente, pela oportunidade, ensinamentos e aprendizagem.

À Capes, pela concessão da bolsa de Doutorado, CNPq (CNPq 306635/2018-6) e EMBRAPA Amazônia Ocidental (MP2) pelo auxílio financeiro.

Finalmente, o meu muito obrigado a todos aqueles que, contribuíram de forma direta e/ou indireta para a realização deste trabalho.

Tribos dos Andirás
Tribos dos Caiapós
Tribo dos Carajás

Vamos acender a fogueira
E fazer valer o tratado de paz
Vamos acender a fogueira
E fazer valer o tratado de paz

Somos filhos do sol
Somos filhos da mata
Nosso povo é de fé, de fé
Nossa gente é pacata
Somos do São José

Não mate a mata seu moço
Deus Tupã disse que não
Defenderemos o verde
Com arcos e flechas
Tacapes nas mãos
(Zé Paulo, 1994)

RESUMO

Atualmente há grande procura por produtos de origem vegetal na ração na aquicultura como alternativa de tratamento contra enfermidades, aumentando o interesse por fitoterápicos. Neste trabalho, avaliou-se a atividade antiparasitária *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* e *Lippia sidoides* contra monogenoides de carpa koi e seu desempenho zootécnico em tanques-rede. Os óleos foram obtidos das folhas por meio de hidrodestilação e os principais compostos químicos de *L. sidoides* foram timol (72,2%), p-cimeno (8,15%) e (E)-cariofileno (4,9%). Em *L. origanoides* o p-cimeno (37%), carvacrol (14%), γ -terpineno (11,6%) e o linalol (6%). Já em *L. alba* foi a carvona (58,2%), limoneno (19,2%) e germacreno D (3,8%). Os ensaios *in vitro* foram realizados isoladamente e combinados a partir de misturas binárias (1:1) e terciárias (1:1:1) das três espécies de *Lippia*, nas concentrações 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹ e dois grupos controle, um com álcool de cereais e outro com água do tanque. Para o desempenho zootécnico foi utilizado o óleo de *L. sidoides* nas concentrações 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1% do óleo na ração, em triplicata, com 20 animais por tanque-rede, alimentados por 60 dias. Os melhores resultados obtidos no ensaio *in vitro* contra os monogenoides foram para *L. sidoides* (40 mg.L⁻¹ em 8 min), seguido de *L. origanoides* (40 mg.L⁻¹ em 25 min) e *L. alba* (40 mg.L⁻¹ em 4 h). No teste *in vitro*, os maiores valores de ganho de peso, taxa de eficiência proteica e taxa de crescimento específico foram registrados nos animais não suplementados e alimentados com 0,25% do óleo de *L. sidoides* na ração. Não houve diferença no crescimento, consumo de ração médio individual e conversão alimentar aparente. Não houve diferença na taxa de prevalência, intensidade média, abundância média, dominância média relativa entre os tratamentos. Nas análises histológicas, o tecido renal apresentou dilatação dos capilares na concentração de 1,0% do óleo de *L. sidoides* em 60 dias de alimentação e o coração apresentou infiltrado eosinofílico no mesmo período. Os parâmetros hematológicos não foram alterados com as adições do óleo. Conclui-se que, o óleo de *L. sidoides* foi eficaz no teste *in vitro* contra os monogenoides nas concentrações de 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹. Já no teste *in vivo*, as concentrações 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0%, não foram eficazes contra os parasitos, além disso a concentração de 1,0% causou alterações histológicas nos peixes em 60 dias. Recomenda-se a utilização de até 0,75% de *L. sidoides* sem causar risco ou dano celular aos peixes.

Palavras-chave: Aquicultura. Fitoterápico. Parasito. Hematologia. Histologia.

ABSTRACT

There is currently a great demand for products of plant origin in aquaculture feed as an alternative treatment for diseases, increasing the interest in herbal medicines. In this work, the *in vitro* antiparasitic activity of the essential oils of *Lippia alba*, *Lippia origanoides* and *Lippia sidoides* against koi carp monogenoids and their zootechnical performance in net cages were evaluated. The oils were obtained from the leaves by hydrodistillation and the main chemical compounds of *L. sidoides* were thymol (72.2%), p-cymene (8.15%) and (E) -cariophyllene (4.9%). In *L. origanoides* p-cymene (37%), carvacrol (14%), γ -terpinene (11.6%) and linalol (6%). In *L. alba* it was carvone (58.2%), limonene (19.2%) and germacrene D (3.8%). *In vitro* assays were performed alone and combined from binary (1:1) and tertiary (1:1:1) mixtures of the three *Lippia* species at concentrations 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹ and two control groups, one with cereal alcohol and the other with tank water. For the zootechnical performance was used the oil of *L. sidoides* in the concentrations 0.0; 0.25; 0.50; 0.75 and 1% of the oil in the diet, in triplicate, with 20 animals per net tank, fed for 60 days. The best results obtained from the *in vitro* monogenoid assay were for *L. sidoides* (40 mg L⁻¹ in 8 min), followed by *L. origanoides* (40 mg L⁻¹ in 25 min) and *L. alba* (40 mg L⁻¹ in 4 h). In the *in vitro* test, the highest values of weight gain, protein efficiency rate and specific growth rate were recorded in non-supplemented animals and fed 0.25% of *L. sidoides* oil in the diet. There was no difference in growth, average individual feed intake and apparent feed conversion. There was no difference in prevalence rate, mean intensity, mean abundance, relative mean dominance between treatments. In the histological analysis, the renal tissue showed dilatation of the capillaries at a concentration of 1.0% of *L. sidoides* oil in 60 days of feeding and the heart presented eosinophilic infiltrate in the same period. The hematological parameters were not changed with the oil additions. It was concluded that *L. sidoides* oil was effective in the *in vitro* test against monogenoids at concentrations of 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹. In the *in vivo* test, the concentrations 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0% were not effective against the parasites, and the concentration of 1.0% caused histological changes in fish in 60 days. The use of up to 0.75% *L. sidoides* is recommended without risk or cellular damage to fish.

Keywords: Aquaculture. Phytotherapeutic. Parasite. Hematology. Histology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Óleos essenciais de *Lippia* spp. em carpa koi (*Cyprinus carpio*): efeito antiparasitário *in vitro* e *in vivo* suplementado na ração

Figura 1 - Composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (A), *Lippia organoides* (B) e *Lippia alba* (C)..... 68

CAPÍTULO II: Óleos essenciais de *Lippia* spp. em carpa koi (*Cyprinus carpio*): efeito antiparasitário *in vitro* e *in vivo* suplementado na ração

Figura 1 - Composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*..... 98

Figura 2 - Alterações histológicas em carpa koi após 30 e 60 dias de suplementação com óleos de *L. sidoides*..... 98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. Óleos essenciais de *Lippia spp.* em carpa koi (*Cyprinus carpio*): efeito antiparasitário *in vitro* e *in vivo* suplementado na ração.

Tabela 1 - Teste *in vitro* com níveis crescentes dos óleos essenciais, isolados e combinados, de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* e *Lippia sidoides* nas concentrações 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg L⁻¹, controle água do tanque e controle álcool de cereais 69

Tabela 2 - Parâmetros zootécnicos (média ± desvio padrão) de carpa koi alimentada com dietas suplementadas com diferentes concentrações de óleos essenciais de *Lippia sidoides*. GP: ganho de peso, CP: comprimento padrão, TEP: taxa de eficiência proteica, CMRI: consumo de ração médio individual, CCA: conversão alimentar aparente, TCE: taxa de crescimento específico, TS: taxa de sobrevivência 70

Tabela 3 - Índices parasitológicos (média ± desvio padrão) de monogêneas de carpas koi em tanques-rede, alimentado com dietas suplementadas com 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1% de óleo essencial de *Lippia sidoides* 71

Tabela 4 - Índices parasitários de tricodinídeos (média ± desvio padrão) na carpa koi suplementada com diferentes concentrações, controle (0,00); 0,25%; 0,5%; 0,75% e 1% do óleo de *Lippia sidoides* em tanques-rede 71

CAPÍTULO II. Parâmetros histopatológicos e hematológicos de carpa koi (*Cyprinus carpio*) alimentada com dieta contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*

Tabela 1 - Parâmetros histológico de brânquia (média ± desvio padrão) de carpa koi alimentada com dietas suplementadas com diferentes concentrações de óleos essenciais de *Lippia sidoides* 99

Tabelas 2 - Avaliação histologia do baço (média ± desvio padrão) da carpa koi suplementada com diferentes concentrações 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 % de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração 100

Tabela 3 - Avaliação histológica do intestino (média \pm desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 % de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.. 100

Tabela 4 - Análise histológica do fígado (média \pm desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 % de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração..... 101

Tabela 5 - Avaliação histologia do rim (média \pm desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 % de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração..... 102

Tabela 6 - Intensidade de alterações histológicas do coração (média \pm desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 % de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.103

Tabela 7 - Intensidade de alterações histológicas do intestino (média \pm desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 % de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.. 104

Tabela 8 - Parâmetros sanguíneo (média \pm desvio padrão) da carpa k6oi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 % de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 CARPA KOI <i>CYPRINUS CARPIO</i>	18
1.2 PEIXES ORNAMENTAIS E TANQUES-REDE.....	19
1.3 DOENÇAS PARASITÁRIAS NA AQUICULTURA: TRICODINÍDEOS E MONOGENOIDES	20
1.4 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS NA AQUICULTURA	23
1.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS PLANTAS.....	26
1.6 ÓLEOS ESSENCIAIS	28
1.7 ÓLEOS ESSENCIAIS NO BRASIL	29
1.8 ÓLEOS ESSENCIAIS NA AQUICULTURA	31
1.8.1 Gênero <i>Lippia</i> spp.....	33
1.8.2 <i>Lippia alba</i>.....	34
1.8.3 <i>Lippia origanoides</i>.....	35
1.8.4 <i>Lippia sidoides</i>.....	36
1.9 FITOBIÓTICOS E POSSÍVEIS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E HEMATOLÓGICAS	37
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.1.2 Objetivos Específicos.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 OBTENÇÃO DOS PEIXES E LOCAL DOS EXPERIMENTOS	42
3.2 OBTENÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	42
3.2.1 Teste <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>Lippia alba</i>, <i>Lippia origanoides</i> e <i>Lippia sidoides</i> utilizados isoladamente e combinados.....	43
3.2.2 Teste <i>in vivo</i> com o óleo de <i>Lippia sidoides</i> suplementado na ração.....	44
3.2.2.1 Preparo das dietas experimentais	44
3.2.2.2 Ensaio em tanques-rede.....	44

3.2.2.3 Parâmetros zootécnicos	45
3.2.2.4 Análise parasitológica	45
3.2.2.5 Análise hematológica	46
3.2.2.6 análise histológica.....	46
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
FORMATAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE	47
CAPITULO I.....	48
<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> antiparasitic action of essential oils of <i>Lippia</i> spp. in koi carp (<i>Cyprinus carpio</i>) fed supplemented diets.....	48
Abstract	49
Introduction	50
Material and methods	52
Biological material	52
Chemical composition of the essential oils	52
<i>In vitro</i> test of the essential oils of <i>Lippia alba</i>, <i>Lippia origanoides</i> and <i>Lippia sidoides</i> separately and in combination.....	53
<i>In vivo</i> test with <i>Lippia sidoides</i> essential oil supplemented in the diet	54
<i>In vivo</i> assay in net cages.....	55
Growth performance parameters.....	55
Parasitological analysis	56
Statistical analysis	56
Results	56
Chemical composition of the essential oils	56
<i>In vitro</i> test of the essential oils of <i>Lippia alba</i>, <i>Lippia origanoides</i> and <i>Lippia sidoides</i> separately and in combination.....	57
<i>In vivo</i> test with essential oil of <i>Lippia sidoides</i>.....	57
Discussion	58
Chemical composition of the essential oils of <i>Lippia</i> spp.	58
<i>In vitro</i> analysis of the essential oils of <i>Lippia</i> spp. against monogeneans of koi carp	59
<i>In vivo</i> test with essential oil of <i>Lippia sidoides</i>.....	60
Conclusion	64
References	64

CAPÍTULO II	80
Parâmetros histopatológicos e hematológicos de carpa koi (<i>Cyprinus carpio</i>) alimentadas com ração suplementada com óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	80
Resumo	81
1. Introdução	82
2. Material e métodos	84
2.1 Material biológico	84
2.2 Obtenção e composição química dos óleos essenciais	84
2.4 Teste <i>in vivo</i> com o óleo de <i>Lippia sidoides</i> suplementado na ração	85
2.4.1 Preparo das dietas experimentais	85
2.4.2 Ensaio em tanques-rede	85
2.5. Coleta e análises sanguíneas	86
2.6. Análise histológica	86
3. Análise estatística	87
4. Resultados	87
4.1. Composição química do óleo essencial da <i>Lippia sidoides</i>	87
4.2. Análise histológica	87
4.3. Parâmetros hematológicos	87
5. Discussão	87
5.1. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	87
5.2 Análise histológica	88
5.3 Parâmetros hematológicos	90
6. Conclusão	93
Referências	94
4 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	113

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CARPA KOI *Cyprinus carpio*

A carpa comum, *Cyprinus carpio*, é uma espécie da Eurásia. Acredita-se que tenha sido a primeira espécie de peixe domesticada destinado ao consumo, o que ocorreu cinco séculos antes da era cristã (SVÅSAND *et al.*, 2007). Fenotipicamente, essa espécie apresenta o corpo alongado, fusiforme e coloração dourada (marrom-amarelada) (BALON, 1995). Devido ao potencial zootécnico e resistência à variação da temperatura, a sua criação era, e ainda é amplamente difundida (VROMANT *et al.*, 2004).

Historicamente, as carpas foram criadas de forma extensiva em consórcio com os arrozais. No início do século XIX, produtores de arroz da cidade de Niigata notaram as primeiras mutações nessa espécie, aparecendo as cores vermelho, branco e amarelo claro. Em meados do referido século foram iniciados os cruzamentos entre esses indivíduos mutantes, originando a carpa Nishikigoi, ou koi, variedade caracterizada pela diversidade de cores e padrões (TANIGUCHI *et al.*, 1986).

A carpa koi é cultivada em muitos países, devido ao seu valor econômico e tolerância a grandes variações nos parâmetros de qualidade da água, sobrevivendo, por exemplo, a uma ampla faixa de temperatura, entre 12 e 30 °C (GOOLISH; ADELMAN, 1984). A espécie é considerada altamente prolífica, apresentando facilidade na reprodução, êxito na larvicultura e tem hábito alimentar onívoro. Segundo Tempero *et al.* (2006), a carpa koi atinge maturidade sexual em 13 meses para fêmeas e 2 anos e 7 meses para os machos, produzindo cerca de 1 milhão de ovos anualmente, com uma taxa de fertilidade de 90%. Em ambientes de cultivo, o melhor desempenho alimentar ocorre quando são alimentadas com ração contendo em torno de 35% de proteína (BASHIR; PATIL; GANAI, 2010).

No Brasil, a carpa colorida é a segunda espécie exótica de peixes ornamental mais vendida, estando atrás apenas do peixe dourado *Carassius auratus*. As regiões Sudeste e Sul são as que apresentam maior cultivo e, junto com outros criadores comerciais de peixes ornamentais, movimentam um mercado de mais de R\$ 700 milhões ao ano (HARAKAWA, 2009; MAGALHÃES; JACOBI, 2010).

1.2 PEIXES ORNAMENTAIS E TANQUES-REDE

Os peixes ornamentais no Brasil ocupam a quarta posição de grupo animal de estimação presentes nas residências dos brasileiros, totalizando 18 milhões de animais, perdendo posição no ranking apenas para os cães, gatos e aves (ABINPET, 2018). Os maiores volumes de peixes ornamentais comercializados no Brasil são oriundos de cultivos em fazendas. O estado de Minas Gerais é o maior produtor e abastece os mercados do Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MAGALHÃES; JACOBI, 2010; CARDOSO, BALIAN, 2018). A atividade contabiliza uma média de 12 milhões de unidades por ano, vendidas no Estado, o que evidencia o grande potencial que a atividade tem para se tornar referência mundial em peixes ornamentais. Além disso, o valor unitário dos animais cresceu mais de 700% nos últimos anos e o Brasil dispõe de muitos espaços para o cultivo em diferentes estados (RAMOS, 2016).

De acordo com levantamento realizado em 2012, estima-se que existam 4,8 mil criadores comerciais de peixes ornamentais no Brasil, sendo que 80% deles ficam na zona rural, onde os tanques de cultivo se espalham em áreas com extensão entre 3000 e 10000 m². Nas áreas das cidades, os cultivos são mais modestos, com no máximo 200 m² (RAMOS, 2016). Em geral, as pisciculturas de peixes ornamentais são diversificadas e podem ter cultivos em instalações tecnificadas, rudimentares, semi-intensivas, intensivas, com recirculação de água, em tanques com dimensão de 1 a 2 m³ construídos com lona, caixas d'água, geladeiras velhas, concreto e até mesmo em baldes, bacias e garrafas pet. Entretanto, o sistema de cultivo mais empregado na criação de peixe ornamental brasileiro é o viveiro externo, que pode abrigar pequenos tanques com diferentes espécies (FARIA *et al.*, 2016; VIDAL JR, 2006). Outros sistemas de cultivo praticados na criação de peixes ornamentais são as gaiolas e os tanques-rede. Estes dois métodos de produção podem ser inseridos dentro de viveiros de terra ou pequenas represas. Além disso, é possível usar somente um viveiro para alojar diversas espécies ou peixes de tamanhos diferentes, maximizando o uso da área e diversificando a produção. Esse sistema também facilita muito a despesca. No entanto, são mais praticados para cultivo de peixes ornamentais nos países asiáticos (FARIA *et al.*, 2016; RIBEIRO; FERNANDES, 2008).

Tanques-rede são estruturas flutuantes utilizadas para criação de peixes em altas densidades de estocagem, caracterizado como sistema de criação intensivo. Podem ser confeccionados com redes ou telas, em diferentes tamanhos e formatos, sendo o quadrado um dos mais indicados, pela facilidade de manejo nas estruturas e troca de água no ambiente. Além

disso, é umas das tecnologias de produção que mais cresce no mundo (MENDES; CARVALHO, 2016; TANIGUCHI; KATO; TARDIVO, 2014).

Os tanques-rede dispõem de dimensões diferenciadas e são mensurados em volume, levando em consideração o comprimento, largura e profundidade. Existem no mercado atualmente inúmeras variedades de estruturas de tanques-rede, sendo os mais utilizados os tanques-rede de: 1,0 m altura x 1,0 m comprimento x 1,30 m largura; 2,0 m altura x 2,0 m comprimento x 1,0 m largura e 3,0 m altura x 3,0 m comprimento x 2,0 m largura. Estes tanques são usados para fins de recria, engorda e como seleção de peixes para venda. Vale ressaltar que quanto maior o volume do tanque, maior será o investimento em estrutura e mão-de-obra (GOMES *et al.*, 2004; PEREIRA; CARNEIRO; ANDRADE, 2009). Além disso, tanques-rede de pequeno volume dispõem de maior renovação de água em relação aos tanques de grande volume. Esta troca de água é formada pela movimentação dos peixes no interior dos tanques-rede, sustentando assim, maiores densidades de peixes e rentabilidade aos produtores (BEVERIDGE, 2008; MENDES; CARVALHO, 2016; TANIGUCHI; KATO; TARDIVO, 2014).

A criação de peixes nestes sistemas apresenta algumas vantagens financeiras de investimento iniciais na implantação. Dentre as vantagens estão o aproveitamento de ambientes aquáticos já existentes como rios, mar, grandes reservatórios, açudes, canais de irrigação, que não podem ser explorados com o cultivo de peixes soltos; maior rapidez para a sua implantação e expansão; permitam o cultivo de diferentes espécies; maior troca de água; menores custos de implantação, que podem variar de 60 a 70 % mais baratos em relação aos cultivos em tanque escavado; alta produtividade; melhor gerenciamento e controle; redução do manejo dos peixes; facilidade na despesca com pouca mão de obra e o fato de serem técnica e economicamente viáveis em praticamente qualquer escala (AYROZA; FURLANETO; AYROZA, 2005; KUBTIZA, 1999; MEDEIRO, 2019). Em contrapartida, há desvantagens como dependência de alimento completo e dificuldade no tratamento e controle de doenças (FRASCA-SCORVO *et al.*, 2012).

1.3 DOENÇAS PARASITÁRIAS NA AQUICULTURA: TRICODINÍDEOS E MONOGENOIDES

Os modernos sistemas de cultivo de peixes são pautados na obtenção de lucros e, para isso, os animais são alocados em sistemas intensivos, com elevada densidade de estocagem e

frequentemente são expostos a agentes estressores, o que pode propiciar o surgimento de doenças e conseqüentemente perdas econômicas. Vários agentes patogênicos estão inseridos na produção nacional, com destaque para os protozoários *Trichodina* spp. e os platelmintos da classe Monogenea (JERÔNIMO *et al.*, 2016; MACIEL *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017).

Em estudo realizado por Santos *et al.* (2017), avaliando a diversidade de parasitas nos peixes ornamentais cultivados nas pisciculturas do estado de Santa Catarina, foram observados os índices parasitológicos de tricodinídeos e monogenoides no cultivo de carpa koi.

Os tricodinídeos são organismos que se movimentam por meio de cílios. Sua fixação ocorre geralmente na superfície do corpo, brânquias e nadadeiras, parasitando tanto peixes de água doce quanto marinha. Por outro lado, algumas espécies de *Trichodina* são consideradas endoparasitos, podendo ser encontradas no intestino e bexiga natatória dos peixes (PORTZ *et al.*, 2013).

Os tricodinídeos são facilmente observados por apresentarem formato circular de sino achatado, além de possuírem um macronúcleo em forma de ferradura. Medem em geral de 20 a 180 µm de diâmetro, e quando são encontrados aderidos em seus hospedeiros exibem um formato de disco adesivo. Sua estrutura esquelética é organizada em círculos e disposta de denticulos, e alimenta-se de matéria orgânica presente na água (KUBTIZA; KUBTIZA, 1999; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

Os protozoários tricodinídeos se reproduzem por fissão binária e são considerados monoxenos, ou seja, seu ciclo de vida é realizado em um único hospedeiro. Sua forma de propagação nos peixes é horizontal e pode ser por contato com água contaminada com o parasito, contato direto, além de apetrechos contaminados usados nas pisciculturas (MARTINS *et al.*, 2015; MACHADO, 2015; MACIEL *et al.*, 2018).

Estes organismos podem estar presentes normalmente nos sistemas de cultivo, mas se houver acúmulo de resíduos orgânicos nos tanques de produção, sua população aumenta. Por isso, quanto maior a densidade de estocagem dos peixes, maior a possibilidade de infestação (KUBTIZA; KUBTIZA, 1999). Quando os peixes são acometidos por estes parasitos, passam a apresentar uma leve camada cinzenta-azulada na superfície do corpo, excesso de muco, letargia e se raspam no substrato ou parede do tanque devido a ação abrasiva do disco adesivo, que destrói as células epiteliais pelo movimento rotativo dos cílios. Quando a infestação é intensa, ela causa irritação na pele e lesões no corpo, que servem de porta de entrada a outros organismos patogênicos. Além disso, podem ocasionar engrossamento do epitélio branquial, levando os peixes a asfixia e mortalidade (KUBTIZA; KUBTIZA, 1999). A mortalidade pode

atingir valores elevados se não houver nenhum tratamento, principalmente em peixes mais jovens (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

Os tricodinídeos possuem distribuição mundial em pisciculturas. No Brasil, os primeiros estudos sobre a ocorrência de *Trichodina* sp. em piscicultura iniciaram na década de 1990. O primeiro estado brasileiro a relatar a ocorrência de mortalidade foi São Paulo (CECCARELLI *et al.*, 1990). As primeiras mortalidades de peixes associadas aos tricodinídeos foram registradas no tambaqui, *Colossoma macropomum*, com uma taxa de mortalidade de 83%, seguida do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, dos híbridos (♀ *P. mesopotamicus* × ♂ *C. macropomum*) e da carpa capim, *Ctenopharyngodon idella*, com 17 % (CECCARELLI *et al.*, 1990). Em Santa Catarina, foram identificadas algumas espécies de *Trichodina* em peixes ornamentais, dentre as quais *Trichodina reticulata*, identificada no kinguio (*Carassius auratus*) (MARTINS *et al.*, 2012). Piazza *et al.* (2006) identificaram *Trichodina acuta* na molinésia negra (*Poecilia sphenops*) e no betta (*Betta splendens*). *Trichodina heterodontata* foi identificada em espécies de plati (*Xiphophorus maculatus*, *Xiphophorus maculatus*), espada (*Xiphophorus helleri*), espada sangue (*Xiphophorus helleri*), tetra rosa (*Gymnocorymbus ternetzi*) e carpa koi (*Cyprinus carpio*) (SANTOS *et al.*, 2017).

Por outro lado, Monogenea é uma ampla classe de parasitos, dentro da qual foram descritas mais de 4.000 espécies, comumente encontrados em peixes de água doce e salgada e variadas temperaturas de água.

Algumas espécies podem movimentar-se pelo corpo do hospedeiro, utilizando o haptor, órgão de fixação especializado, que possui ganchos ou grampos de fixação, que lhes permitem fixar-se ao hospedeiro, e assim, parasitam distintos órgãos, como pele, brânquias, fossas nasais, sistema urogenital e celoma, alimentando-se de muco e células (KUBTIZA; KUBTIZA, 1999; REED *et al.*, 2009).

Morfologicamente, os monogenóides apresentam corpo alongado, ovoidal ou circular, medindo entre 1 mm e 3 cm de comprimento. Em ambientes confinados, a incidência de monogenóides é maior, pois a transmissão entre indivíduos é principalmente por contato direto e este parasito tem um ciclo de vida monóxeno. Vale ressaltar que os adultos são hermafroditas. Entretanto a autofecundação é rara (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008; REED *et al.*, 2009).

Peixes infestados podem se tornar letárgicos, nadam próximos à superfície, apresentam apetite reduzido, raspando o corpo contra a parede do tanque na tentativa de remover os parasitos. Com isso, acabam perdendo escamas, gerando lesões epiteliais que

podem, em última instância, ocasionar infecções secundárias por fungos e bactérias. Quando as brânquias são atingidas pelo parasito, elas apresentam edemas e coloração pálida, restringindo a captação de oxigênio dissolvido, o que pode resultar no comportamento de “boquejar” (REED *et al.*, 2009).

As famílias de monogenea Gyrodactylidae e Dactylogyridae são as mais comuns em peixes, sendo encontradas tanto em peixes cultivados (SANTOS *et al.*, 2017) quanto de ambiente natural (TAVARES-DIAS; LEMOS; MARTINS, 2010).

A família Gyrodactylidae é vivípara e os parasitos adultos carregam embriões desenvolvidos (idênticos ao adulto), que por sua vez carregam os filhotes da geração seguinte, estratégia reprodutiva que permite a rápida multiplicação, especialmente em sistemas fechados. Já os Dactylogyridae são ovíparos e eliminam os ovos na coluna d'água (REED *et al.*, 2009).

1.4 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS NA AQUICULTURA

Durante muitos anos, a utilização de agentes antimicrobianos na aquicultura se tornou uma prática comum, pois estes compostos possuem ampla função atuando tanto no controle de doenças, devido a sua ação bactericida e bacteriostática, como promotor de crescimento. Entretanto, essa prática tem causado outros problemas, como o aparecimento de patógenos resistentes aos antimicrobianos, depressão do sistema imune dos peixes e resíduos no ambiente (DAWOOD; KOSHIO, 2016).

Os antimicrobianos atuam de diferentes formas, conforme a complexidade da molécula. Em bactérias Gram positivas, atuam inibindo a síntese de constituintes da parede celular, peptidoglicanos e beta-lactâmicos. Já em bactérias Gram negativas, ocorre a inibição de mecanismos cruciais para desenvolvimento celular, como a síntese de proteína bacteriana e DNA (NIKAIDO, 2009; ROMERO; FEIJOÓ; NAVARRETE, 2012).

Como promotor de crescimento, o antibiótico atua diretamente na microbiota intestinal, reduzindo a quantidade de microrganismos patogênicos responsáveis pela produção de substâncias tóxicas e inflamações intestinais (DIBNER; RICHARDS, 2005).

Vale ressaltar que os antibióticos atuam de forma geral nas bactérias, sendo assim danoso para diversas espécies. Diante dessa inespecificidade, a utilização de antimicrobianos na aquicultura é regulamentada por órgãos específicos. No Brasil, quatro produtos comerciais antibacterianos são licenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso na piscicultura. Esses medicamentos são à base de oxitetraciclina (1 produto),

florfenicol (2 produtos) e bacitracina de zinco (1 produto). Todos eles são registrados para utilização na forma de premix, no caso, para serem misturados na ração e fornecidos ao animal por via oral. Atualmente na piscicultura brasileira, essas drogas possuem um papel importante no controle de enfermidades infecciosas que ocorrem nas espécies cultivadas, causadas por patógenos como *Streptococcus agalactiae*, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*), *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila*, entre outros (LEAL; OLIVEIRA; FIGUEIREDO, 2017).

Além dos antibióticos utilizados na aquicultura, existem outros fármacos disponíveis no mercado e que estão sendo utilizados na prevenção, controle e tratamento de doenças bacterianas, fúngicas e parasitárias. Estes produtos são encontrados nas mais diferentes classes químicas, dentre eles incluem-se: o sulfóxido de albendazol (ONAKA; MARTINS; MORAES, 2003), cloreto de sódio e formalina (SILVA *et al.*, 2009), sal comum (KUBITZA, 2007), cloramina-T (GAIKOWSKI; LARSON; GINGERICH, 2008), sulfato de cobre, (DARWISH; MITCHELL; STRAUS, 2012), hidróxido de cobre (ZHOU *et al.*, 2017b), sulfato de cobre (YUAN *et al.*, 2019), permanganato de potássio (FARMER *et al.*, 2014), formalina comercial, permanganato de potássio, verde de malaquita (CARNEIRO; SCHORER; MIKOS, 2005), percarbonato de sódio (FORWOOD *et al.*, 2014), mebendazol (CHAGAS *et al.*, 2016), triclorfon, praziquantel e phoxim (ZHANG *et al.*, 2014), ácido tricloroisocianúrico e glutaraldeído (ZHOU *et al.*, 2017a), praziquantel em combinação com ivermectina, pamoato de pirantel e fenbendazol (MORALES-SERNA *et al.*, 2018).

Apesar da disponibilidade e benefícios desses produtos, alguns estudos têm provado que alguns fármacos podem ser nocivos a determinadas espécies se aplicados em diferentes concentrações. Entre os químicos que causam toxicidade aos peixes estão o praziquantel em forma de banho em doses altas para o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (ONAKA; MARTINS; MORAES, 2003). O sulfato de cobre e a formalina foram tóxicos para peixes ornamentais *Hemigramus* sp., causando mortalidade de até 100 % quando utilizado 0,25 mL.L⁻¹ (PAIXAO *et al.*, 2013), cloreto de sódio a 10,0 g.L⁻¹ e formalina a 1:80.000 em forma de banho, causou elevada mortalidade em larvas de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*, (SILVA *et al.*, 2009), o sal comum elevou a glicose plasmática e aumentou os níveis de cloreto plasmático em tambaqui (CHAGAS *et al.*, 2012). Os fármacos carbamazepina, ácido fenofibríco, propranolol, trimetoprim e sulfametoxazol causaram alterações morfológicas como deformidades da coluna vertebral e edemas no saco vitelínico das larvas do peixe-zebra, *Danio rerio*, (MADUREIRA *et al.*, 2011). Ainda para esta espécie, os fármacos mais tóxicos foram fenbendazol, albendazol

e flumetrina que causaram, mortalidade, má formação dos embriões, movimentos reduzidos e aumento da frequência cardíaca (CARLSSON *et al.*, 2013).

O permanganato de potássio causou efeito tóxico agudo em alevinos de tilápia-do-Nilo, efeitos tóxicos crônicos em organismos não-alvo e efeitos deletérios na cadeia alimentar do ecossistema aquático (FRANÇA *et al.*, 2011). O permanganato de potássio e formalina, após 72 h de aplicação, causou perda de equilíbrio e mortalidade dos peixes da espécie “rabbitfish” *Siganus rivulatus* (NASSER *et al.*, 2017).

O metabólito p-cloroanilina (PCA) isolado e o diflubenzuron provocaram mortalidade em tilápia-do-Nilo (GAIKOWSKI; LARSON; GINGERICH, 2008). O clorpirifós é altamente tóxico causando lesões patológicas nas brânquias e na retina do olho, afetando as funções respiratória, degeneração das células, danos no epitélio e fusão das células fotorreceptoras em robalo asiático, *Lates calcarifer*, (MARIGOUDAR *et al.*, 2018).

Com o objetivo de reduzir os danos causados pela utilização de antibióticos e diferentes fármacos na aquicultura, a utilização de aditivos alimentares vegetais tornou-se alternativa para promover o crescimento e redução de doenças, além de agir como imunostimulante. Por definição, aditivos alimentares são “quaisquer substâncias adicionadas intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais” (BRASIL, 1997).

Nesta classe, estão incluídos os probióticos, prebióticos, simbióticos e fitobióticos. Probiótico é um “suplemento alimentar constituído de microrganismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal” (FULLER, 1989). Prebióticos, segundo Ringø *et al.* (2010), são ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro, selecionando o crescimento e/ou a atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon. Já os simbióticos são uma mistura de prebióticos e probióticos que beneficiam o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou ativando o metabolismo de um ou de um número limitado de bactérias (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Por sua vez, os fitobióticos são compostos naturais derivados de plantas incorporados a dietas que melhoram a produtividade animal, atuando como antioxidantes, antimicrobianos, analgésicos, antiparasitários, anticoccidianos, promotores de crescimento, estimulando o apetite e secreção de bile além de beneficiar a atividade enzimática digestiva (CRISTEA *et al.*, 2012). Sua utilização na aquicultura é ampla e vem sendo empregada no controle de doenças infecciosas como observado por Fujimoto, Costa e Ramos (2012). A utilização de sementes de abóbora e mamão é indicada para o controle de nematoides e monogenoides de lambari,

Astyanax bimaculatus, Cruz (2005). O extrato aquoso das folhas de nim, *Azadirachta indica*, é utilizada para o controle de monogenóides de pacu, *P. mesopotamicus*. Chitmanat, Tongdonmuan e Nunsong (2005) comprovaram a eficácia do extrato do alho, *Allium sativum*, para o controle de *Trichodina* spp. de tilápia-do-Nilo.

Os fitobióticos também são indicados como promotores de crescimento e imunostimulantes. Maniat, Ghotbeddin e Rajabzadeh-Ghatrami (2014) afirmaram que o alho promoveu melhor crescimento do ciprinídeo, *Mesopotamichthys sharpeyi*. Lima *et al.* (2015) observaram maior crescimento de piauçu, *Leporinus macrocephalus* alimentados com dietas contendo alho, *Allium sativum* e canela, *Cinnamomum verum*. Antache *et al.* (2014) afirmaram que o gengibre, *Zingiber officinale* e *Rosmarinus officinalis* melhoraram o status fisiológico de tilápia-do-Nilo por meio de alterações hematológicas.

1.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS PLANTAS

Desde os primórdios das civilizações, o poder medicinal das plantas já era conhecido, sendo utilizadas na prevenção e no tratamento de doenças. Os primeiros registros são datados de 4.000 a.C em textos sumérios, com a utilização da papoula. Esta planta também era bastante utilizada por civilizações do Egito, Mesopotâmia e Pérsia (LUQMAN, 2011). Antes do descobrimento da América, essa prática também era utilizada. Civilizações do altiplano andino utilizavam a folha de coca há mais de 8 mil anos, como anestésico (BARRETO, 2013). No Brasil, os índios se beneficiam do poder anti-inflamatório de algumas plantas como caju, *Anacardium occidentale*, maracujá, *Passiflora* sp. e mandioca, *Manihot esculenta*, como descrito por Sousa (1971).

As plantas sintetizam inúmeros metabólitos, classificados em primários e secundários. Os metabólitos primários são utilizados para o crescimento e reprodução, sendo essencial para a síntese de compostos estruturais, celulose e lignina, além de proteínas, lipídeos e açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais (GARCIA; CARRIL, 2009). São sintetizados por vias conhecidas como a glicolítica, ciclo do ácido cítrico e β -oxidação de ácidos graxos. Já os metabólitos secundários são formados a partir do metabolismo primário, porém, a sua função é a defesa da planta, atrativo para polinizadores e proteção contra estresse abiótico, como raios UV, mudanças de temperaturas, entre outros. São formados por quatro vias de biossíntese: via do acetato malonato, do ácido mevalônico (MEV), do metileritritol fosfato (MEP) e do ácido chiquímico, formando os três principais grupos de metabólitos

secundários: terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas (REZENDE *et al.*, 2016).

Os terpenoídeos compõem a maior classe dos compostos secundários, havendo mais de 22 mil compostos descritos (TAIZ; ZEIGER, 2006). São produzidos pelas plantas como defesa natural a animais, patógenos, predadores e competidores (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007) a partir do acetilcoenzima A (acetil-CoA) ou de intermediários glicolíticos (REZENDE *et al.*, 2016). Quimicamente, são hidrocarbonetos insaturados que apresentam diferenças estruturais entre si, porém, são formados por uma estrutura básica, composta por cinco carbonos (C₅H₈), chamados de isopreno. Os terpenos são classificados conforme a unidade de isopreno e a ciclização da molécula em acíclico, cíclico e bicíclico (FELIPE; BICAS, 2017).

Devido à característica lipofílica da molécula, o modo de ação dos terpenos em combater os agentes invasores é causando lesões e desequilíbrio osmótico nas células dos patógenos. Além disso, são tóxicos e atuam como solvente natural (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007).

Na aquicultura, estudos demonstram o efeito benéfico dos terpenos, apresentando efetividade no controle de *Aeromonas hydrophila* (PACHANAWAN; PHUMKHACHORN; ATTANACHAIKUNSOPON, 2008), na promoção do crescimento (SALEM; ABDEL-GHANY, 2018) de tilápia-do-Nilo e na prevenção e controle de monogenoides em carpas (ZORAL *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos compõem um grupo de mais de 10 mil substâncias produzidas pelas plantas que apresentam propriedades antioxidantes, protetoras contra predadores, inibem o crescimento de plantas competidoras (alelopatia), além de contribuir para as características sensoriais, como sabor, odor e coloração (TAIZ; ZEIGER, 2006). São caracterizados pela presença de um anel aromático que comporta um ou mais grupos hidroxila e suas estruturas podem variar desde uma simples molécula fenólica até a de um polímero complexo de elevado peso molecular (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). A ação antioxidante dos compostos fenólicos está na capacidade de eliminar os radicais livres, os átomos de doação de hidrogênio ou os elétrons, ou os cátions metálicos quelatados (CAI *et al.*, 2006).

Em estudo *in vitro*, Rauha *et al.* (2000) avaliaram a ação antimicrobiana de 13 compostos fenólicos e observaram que todos possuíam algum efeito sobre as bactérias. Em peixes, esses compostos também apresentam ação antimicrobiana. Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2007) testaram o efeito antimicrobiano de flavonoides isolados das folhas de

Psidium guajava em bactérias comumente causadoras de patologias em peixes como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* e *Vibrio salmonicida*, apresentando efeito bacteriostático em todas as bactérias testadas.

A atividade antiparasitária dos compostos fenólicos também foi evidenciada por Goto *et al.* (2015), que sugeriram que o composto fenólico extraído da *Sophora flavescens* é eficiente contra o protozoário ciliado *Cryptocaryon irritans*.

Com relação ao nitrogênio, este elemento está presente em uma grande quantidade de metabólitos secundários, chamados de alcaloides. São sintetizados a partir de aminoácidos comuns e quimicamente definidos como aminas cíclicas que possuem anéis heterocíclicos contendo nitrogênio (ROBERTS, 2013). Segundo Ziegler e Facchini (2008), as plantas produzem aproximadamente 12 mil diferentes alcaloides que possuem atividades farmacêuticas e estimulantes. Yang, Ye e Li (2007) avaliaram o efeito antimicrobiano de quatro alcaloides (berberina, jatrorrizina, palmitina e coptisina) contra 19 espécies de bactérias e concluíram que todas as substâncias estudadas apresentaram ação antibacteriana, configurando-os como de amplo espectro.

1.6 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de plantas são compostos complexos de substâncias voláteis, líquidas, lipofílicas e geralmente odoríferas, sendo extraídos de várias partes dos vegetais, tais como cascas, caule, frutos, sementes e principalmente de folhas (HARBONE, 1989; TRAESEL *et al.*, 2011).

A história dos óleos essenciais dispõe de várias versões em relação à data exata que se iniciou a extração. Estudos recentes indicam que a data mais provável da extração ocorreu a 2.000 a.C pelos povos hindus, que utilizavam plantas aromáticas do gênero *Cymbopogon* sp. (capim limão e citronela) para obtenção de álcoois aromáticos. Essa prática também era realizada pelos povos egípcios que obtinham os óleos por meio da destilação e utilizados em massagens, proteção da pele, embalsamento de corpos dos mortos e para perfumar o ambiente (AZAMBUJA, 2017). No ano de 2.700 a.C, há relatos da utilização de óleo essencial pelos chineses para fins terapêuticos ou para rituais religiosos, descrito no livro interno de medicina do imperador chinês (GNATTA *et al.*, 2016).

Apesar do conhecimento das antigas civilizações acerca dos benefícios dos óleos essenciais, somente em 1937 que os estudos foram intensificados, como a descoberta pelo químico francês Maurice René de Gattefossé, que ao sofrer queimadura nas mãos, imergiu-as acidentalmente em um tanque com líquido contendo óleo essencial de lavanda, *Lavandula angustifolia* e observou, no decorrer dos dias, a cicatrização completa da pele. Após esse incidente, o químico passou a realizar pesquisas sobre as atividades terapêuticas dos óleos essenciais, uma vez que, na época tinham apenas utilidade odorizante e cosmética (HUDSON, 1997; SERAFINI *et al.*, 2002).

1.7 ÓLEOS ESSENCIAIS NO BRASIL

O início da exploração dos óleos essenciais no Brasil, se deu em 1925 após a decadência na exploração das árvores franco-guianense, que reduziu a oferta de óleos essenciais no mercado (ALMEIDA, 2016). Um dos primeiros produtos a ser explorado foi o pau-rosa, *Aniba rosaeodora*, uma árvore da Amazônia, cuja essência possui um aroma agradável. Outras plantas exploradas no mesmo período foram o capim limão, *Cymbopogon citratus*, eucalipto, *Eucalyptus globulus*, menta, *Mentha piperita*, laranja, *Citrus sp.*, canela, *Cinnamomum verum* e sassafrás, *Sassafras albidum* (TRANCOSO, 2013).

Porém, antes da indústria de óleos essenciais iniciar suas atividades no Brasil, estudos já eram implementados, como os realizados pelo farmacêutico alemão Theodor Peckolt, que chegou ao Brasil em 1847 e publicou cerca de 170 trabalhos referentes à composição química de vários óleos essenciais da flora brasileira (AZAMBUJA, 2017).

Ao final da década de 1930, com a ocorrência da segunda Guerra Mundial, a indústria do óleo nacional passou a ser mais expressiva, pois afetou o comércio europeu obrigando as empresas da região buscarem novos fornecedores (AZAMBUJA, 2017; SANTOS, 2011), sendo iniciado o cultivo de vegetais para a extração do óleo, tais como, sassafrás, menta, eucalipto e laranja. Desta forma o mercado obteve maior variedade de óleos essenciais (AZAMBUJA, 2017).

Em 1942, a produção brasileira de óleos essenciais foi de 40 toneladas e em 1970, a produção saltou para 2.500 toneladas. Após 1975, a atividade extrativista entrou em declínio, refletindo assim negativamente no volume de produção para a exportação. Esta redução se deu pela ausência de replantio dos vegetais anteriormente explorados, associado ao não manejo das culturas. Com a redução das árvores disponíveis para o extrativismo, a consequência foi inclui-

las na lista de espécies em risco de extinção e sua exploração passou a ser controlada (AZAMBUJA, 2017; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Atualmente, o Brasil produz inúmeras espécies de plantas aromáticas destacando-se entre os quatro maiores produtores mundiais de óleos essenciais, junto com a Índia, China e Indonésia. A posição brasileira na produção de óleos essenciais, deve-se principalmente aos óleos essenciais dos cítricos, adquiridos de subprodutos da indústria de sucos (SNA, 2017). O óleo essencial de laranja é extraído do pericarpo do fruto e tem sido empregado nas indústrias alimentícias, perfumaria, materiais de limpeza e produtos farmacêuticos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Além destas finalidades, os óleos vegetais estão sendo empregados no Brasil e no mundo nas diferentes atividades humanas e animais.

Na agricultura, estudos demonstram excelentes resultados no controle de pragas e doenças agrícolas como observado por Ootani *et al.* (2016) que, ao utilizarem os óleos essenciais de citronela, *Cymbopogon nardus*, e eucalipto-cidrô, *Eucalyptus citriodora*, relataram inibição de fungos, *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp. e *Penicilium* sp., das sementes de feijão (Carioca, Caupi, Jalo e Preto).

Em outras espécies vegetais esse efeito também é observado, como a redução na doença da manga, antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) com a utilização dos óleos essenciais de gengibre e canela, *Cinnamomum zeylanicum* (SEFU; SATHEESH; BERECHA, 2015), observou-se um efetivo controle de fungos, *Colletotrichum musae* em banana devido ao uso de óleo de manjericão, *Ocimum basilicum* (IDRIS; IBRAHIM; FORSIDO, 2015) e redução da bactéria, *Xanthomonas vesicatoria*, causadora da doença da mancha branca do tomate, *Solanum lycopersicum* pelo óleo essencial de cravo da Índia, *Syzygium aromaticum* (LUCAS *et al.*, 2012).

Na medicina veterinária, os óleos essenciais dos vegetais estão sendo testados na saúde e bem-estar dos animais. Dentro deste contexto, encontram-se atividades comprovadas de 50 a 99% de mortalidade da larva do carrapato-vermelho-do-cão, *Rhipicephalus sanguineus*, com óleo essencial de copaíba-do-cerrado, *Copaifera langsdorfii* (FERNANDES *et al.*, 2018). De acordo com Gazim *et al.* (2011), o óleo de *Tetradenia riparia*, foi letal em 50 a 100% para larva do carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus* e o óleo essencial de capim limão, *Cymbopogon citratus*, resulta em 100% de mortalidade das fêmeas de carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (SANTOS; VOGEL, 2012).

Na produção animal, estudos indicam efeitos benéficos da inclusão dos óleos essenciais no controle de doenças. Na suinocultura, a utilização dos óleos essenciais de orégano,

Origanum vulgare e alecrim, *Rosmarinus officinalis* foram eficazes no controle dos sinais clínicos da diarreia neonatal em leitões entre o primeiro e oitavo dia de vida (ROSSI *et al.*, 2015). A inclusão dos óleos essenciais de marmeleiro, *Croton sonderianus*, erva-cidreira, *Melissa officinalis* e alfavaca, *Ocimum gratissimum*, na ração, apresentaram efeito positivo no controle da diarreia dos leitões, sem acarretar prejuízos no desempenho dos animais (SILVA *et al.*, 2012).

Para a criação de aves, Santurio *et al.* (2007), avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, *Origanum vulgare*, tomilho, *Thymus vulgaris* e canela contra 60 amostras de *Salmonella enterica*, todas isoladas de carcaças de aves, e obtiveram atividade inibitória no orégano, tomilho e canela. Os óleos essenciais de eucalipto, *Eucalyptus* spp, e hortelã-pimenta, *Mentha piperita*, foram eficazes no controle do protozoário *Eimeria* spp. em frangos de corte. Além disso, auxiliou na melhoria da produção zootécnica, na redução das lesões e contagem de oocistos intestinais (BARBOUR *et al.*, 2015).

A suplementação de óleo essencial de orégano nas concentrações 250 e 500 mg.kg⁻¹ de ração em ambos os níveis melhorou a digestibilidade da proteína bruta em frangos de corte (BASMACIOĞLU MALAYOĞLU *et al.*, 2010). A inclusão do óleo essencial de tomilho aumentou a concentração de imunoglobulina A (IgA), estimulou atividade fagocitária no sangue e melhorou a integridade da barreira intestinal de frangos de corte (PLACHA *et al.*, 2014). A adição do óleo essencial da aroeira-vermelha, *Schinus terebinthifolius*, na ração de frango de corte melhorou o ganho de peso dos animais e a superfície intestinal (SILVA *et al.*, 2011). Desta forma, estudos tem mostrado a importância e os benefícios dos óleos essenciais na produção dos diferentes grupos de animais.

1.8 ÓLEOS ESSENCIAIS NA AQUICULTURA

Os óleos essenciais de várias plantas têm apresentado diferentes atividades biológicas já comprovadas na aquicultura. Além disso, os óleos apresentam algumas vantagens importantes em relação a outros produtos tradicionalmente utilizados nos sistemas de cultivo (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009). Dentre as vantagens estão: baixo custo na aquisição, são biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade quando aplicados corretamente e baixo impacto ambiental, são eficazes contra diferentes microrganismos patogênicos dos peixes. Estes compostos vegetais estão sendo testados como sedativos, anestésicos, imunoestimulante natural, melhoradores do desempenho zootécnico, antimicrobianos,

antiparasitários e antifúngicos, podendo ser aplicados por via oral e por banho terapêutico, para fins de tratamento profilático ou preventivos em animais aquáticos (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

Estudos indicam efeito potenciais sedativos e anestésicos de alguns óleos essenciais, como o óleo de manjeriço, *Ocimum basilicum* e capim limão, *Cymbopogon flexuosus* (LIMMA-NETTO; SENA; COPATTI, 2016), alfavaca-cravo, *Ocimum gratissimum* (RIBEIRO *et al.*, 2016), cravo, *Eugenia caryophyllata* (MATULOVIC; OSHIRO, 2016) manjeriço, *Ocimum basilicum*, melaleuca, *Melaleuca alternifolia* (CORREIA, 2015).

Outra forma de emprego dos óleos na aquicultura é a inclusão na ração atuando como promotores de resposta imunológica. Baba *et al.* (2016) suplementaram dietas de tilápia-de-Moçambique, *Oreochromis mossambicus* com óleo essencial de limão, *Citrus limon*, por 60 dias e após o desafio com *Edwardsiella tarda*, concluíram que o óleo atuou como imunostimulante natural aumentando a sobrevivência em até 63%.

Valladão *et al.* (2019) observaram que o óleo essencial de tomilho, não apresentou efeitos negativos ou tóxicos para tilápia-do-Nilo e estimulou os componentes celulares da resposta imune inespecífica. Efeito similar foi observado por Valladão *et al.* (2017) ao suplementarem dietas de tilápia com os óleos essenciais de hortelã-pimenta e árvore do chá, *Melaleuca alternifolia*.

Como promotores de crescimento, estudos evidenciam os efeitos positivos das inclusões dos óleos essenciais para várias espécies. Talpur (2014) observou redução na mortalidade e melhorias na sobrevivência, ganho de peso e a taxa de conversão de alimentar de robalo asiático, *Lates calcarifer* alimentados com dietas contendo hortelã-pimenta. Acar *et al.* (2015) afirmaram que o óleo essencial extraído da casca de laranja doce, *Citrus sinensis* atua como promotor de crescimento, aumenta a imunidade e melhora a resistência da tilápia-de-Moçambique contra *Streptococcus iniae*. Ferreira (2012) relatou também que ração contendo óleo de orégano melhorou o ganho de peso e crescimento do lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae*. Ngugi, Oyoo-Okoth e Muchiri, (2017) constataram que o óleo de manjeriço melhorou significativamente a conversão alimentar e crescimento da tilápia-do-Nilo e o óleo de gengibre aumentou a sobrevivência em 100%, após desafio com *Streptococcus agalactiae* (BRUM *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais também possuem atividade bactericida reduzindo a mortalidade dos peixes após desafio experimental. O óleo de orégano, *Origanum onites* apresentou efeito antimicrobiano contra a bactéria, *Lactococcus garvieae* em truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* em teste *in vivo* (DILER *et al.*, 2016); o óleo de gengibre, *Zingiber officinale* foi eficaz

contra *S. agalactiae* em tilápia-do-Nilo (BRUM *et al.*, 2017). Silva *et al.* (2019) avaliaram a eficácia *in vivo* na ração do óleo de hortelã-pimenta, *M. piperita* contra *S. agalactiae*. O óleo de casca de limão, *Citrus limon* na ração foi eficaz contra *E. tarda* em tilápia-de-Moçambique (BABA *et al.*, 2016).

Como antiparasitário em peixes, o óleo de alfavaca, *O. gratissimum*, foi testado em tilápia-do-Nilo contra monogenoides, (MENESES *et al.*, 2018); o óleo de hortelã-pimenta também foi eficaz contra monogenoides de tilápia-do-Nilo (HASHIMOTO *et al.*, 2016); o óleo de *Lippia sidoides* atuou como antiparasitário contra monogenoides de tambaqui (SOARES *et al.*, 2017). Os óleos de *M. alternifolia*, *M. piperita* e copaíba, *Copaifera duckei* foi eficaz contra monogenoide de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (COSTA *et al.*, 2017); o óleo de alho, *Allium sativum* foi eficaz contra *Trichodina* e *Gyrodactylus* em tilápia (EL-GALIL; ABOELHADID, 2012).

O óleo da árvore-do-chá, *M. alternifolia* foi testada contra do *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá, *Rhamdia quelen* (BALDISSERA *et al.*, 2017); os óleos de *L. angustifolia*, *M. alternifolia* e *M. piperita*, foram eficazes e causaram inchaço, vacuolização e lise do ectoparasito *I. multifiliis* de pacu (VALLADÃO *et al.*, 2016); óleo de pimenta longa, *Piper hispidinervum*, foi testado contra o acantocéfalo, *Neoechinorhynchus buttnerae* de tambaqui (SIMAS *et al.*, 2016); já o óleo de pimenta-de-macaco, *Piper aduncum* foi eficaz contra nematoide parasito de pirarucu, *Arapaima gigas* (CORRAL *et al.*, 2018). Outros óleos vegetais que têm se destacado em atividades biológicas, são os do gênero *Lippia*.

1.8.1 Gênero *Lippia* spp.

Pertencente à família Verbenaceae, o gênero *Lippia* foi descrito por Linnaeus em 1753, sendo constituído por uma grande variedade de ervas e arbustos, com cerca de 200 exemplares, distribuídos na América do Sul, América Central e na África tropical. Destas, 120 espécies são encontradas no Brasil, em maiores números na cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (OLIVEIRA *et al.*, 2007; SOARES; TAVARES-DIAS, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2018).

Uma característica do gênero são as propriedades medicinais já comprovadas associadas principalmente à presença de compostos fenólicos nos metabólitos secundários (SINGULANI *et al.*, 2012). Entretanto, a composição do óleo essencial pode variar entre os exemplares, por fatores como estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade

de água circulante, resultante da precipitação, fatores geográficos e climáticos (AGUIAR *et al.*, 2008).

As plantas constituintes desse gênero apresentam potente atividade antioxidante (DELACORTE SINGULANI *et al.*, 2012), antifúngica (FUNARI *et al.*, 2012), anti-helmíntica (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2008), antiprotozoária (ESCOBAR *et al.*, 2010) e, anticarcinogênica (GOMIDE *et al.*, 2013). Na aquicultura, esse gênero é amplamente estudado, apresentando efeito positivo como antimicrobiano (SOUZA *et al.*, 2017) e antiparasitário (VALENTIM, 2017). Dentre as espécies deste gênero com diferentes atividades biológicas já comprovadas estão a *Lippia alba*, *Lippia origanoides* e *Lippia sidoides*.

1.8.2 *Lippia alba*

Popularmente conhecida como erva cidreira, a *L. alba* é um arbusto aromático que pode atingir até 1,7 m de altura, encontrado, em várias partes do mundo, como nas Américas, Índia e Austrália (HENNEBELLE *et al.*, 2008a).

Em sua composição, apresenta compostos químicos que a torna apreciável na medicina popular. Segundo Silva *et al.* (2006), o óleo essencial da *L. alba* é constituído por vários compostos químicos, sendo os mais representativos e com maior percentual de rendimento está o citral (70,6-79,0%), e em menores quantidades linalol (1,7-2,2%), geraniol (0,8-2,9%), nerol (0,5-2,5%) e β -mirceno (0,3-2,6%). Ressalta-se que a composição do óleo essencial é variável conforme fatores bióticos e local de cultivo. Gomes *et al.* (2019), ao analisarem a composição do óleo essencial dessa espécie em distintas estações do ano, observaram maiores concentrações de fenilpropanoídeos (acteosídeo) no inverno e maiores concentrações de flavonoides, em especial o tricuronídeo-7-O-diglucinato no verão.

Estudos demonstram o efeito benéfico da *L. alba* na saúde humana, apresentando atividade antibacteriana (NOGUEIRA *et al.*, 2007) e antifúngica (MESA-ARANGO *et al.*, 2009), antiviral (OCAZIONEZ *et al.*, 2010), além de atuar no sistema nervoso como sedativo (HENNEBELLEB *et al.*, 2008b), analgésico, anti-inflamatório (VIANA *et al.*, 1998) e antioxidante (HENNEBELLEB *et al.*, 2008b).

Na produção animal, especialmente na aquicultura, estudos evidenciam o efeito benéfico da *L. alba* para diversos fins. Como anestésico, Cunha *et al.* (2010) estudaram a eficácia deste óleo essencial como agente anestésico e redutor de estresse e concluíram que a *L. alba* induziu anestesia e inibiu o aumento nos níveis plasmáticos de cortisol. Resultado

semelhante foi observado por Heldwein *et al.* (2014), associando este efeito à presença do monoterpeno linalool.

Por outro lado, a atividade antiparasitária e os possíveis efeitos tóxicos da *L. alba* foram estudados por Soares *et al.* (2016). Neste estudo, foram investigados os efeitos antiparasitários *in vivo* e *in vitro* do óleo essencial e as alterações hematopoiéticas e histopatológicas em tambaqui. Foram estudados em teste *in vitro*, os efeitos de 160, 320, 640, 1280 e 2560 mg.L⁻¹ do óleo essencial contra as espécies de monogenoídeos, *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri*, presentes nas brânquias deste peixe, ocorrendo a morte dos parasitos em apenas 20 min de exposição, nas concentrações mais altas. Já no estudo *in vivo*, foram realizados banhos com 100 e 150 mg.L⁻¹ do óleo essencial de *L. alba*, por 30 min, apresentando eficácia de 40,7% e 50,3%, respectivamente quando desafiados contra *I. multifiliis*. No entanto, para monogenoídeos, houve eficácia de apenas 14% nos peixes expostos a 100 mg.L⁻¹ do óleo essencial. Estes pesquisadores também observaram alterações histológicas nos tecidos estudados, como hiperplasia, fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento epitelial, ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema, necrose, proliferação de células mucosas, clorídricas e hipertrofia lamelar.

O efeito genotóxico do óleo essencial de *L. alba* foi avaliado por Kampke *et al.* (2018) em tilapia-do-Nilo onde observaram que até a exposição de 300 mg.L⁻¹ não causou danos ao DNA.

Saccol *et al.* (2013), com o objetivo de avaliar o efeito no crescimento, parâmetros metabólicos, sanguíneos e biomarcadores de estresse oxidativo da adição do óleo essencial de *L. alba* em *Rhamdia quelen*, expuseram os animais a 0.25, 0.5, 1.0 e 2.0 mL de óleo essencial kg⁻¹ de dieta durante 60 dias. Não foram observadas alterações nos parâmetros sanguíneos ou melhorias no crescimento. Entretanto, reduziu a peroxidação lipídica nos tecidos e aumentou as reservas de glicogênio e lactato, atuando como um antioxidante tecidual.

1.8.3 *Lippia origanoides*

A *L. origanoides* é uma espécie nativa da América Tropical, encontrada no México, Guatemala, Cuba e região Amazônica, o que inclui o Brasil, Guiana, Venezuela e Colômbia. No Brasil ela é conhecida na região norte como salva-de-marajó e alecrim-d'angola e orégano, no México (PASCUAL *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Quanto à composição do seu óleo essencial, Oliveira *et al* (2007) afirmaram que o carvacrol e o timol compõem em maior proporção, com 38,6% e 18,5%, respectivamente. Entretanto, especula-se que essa composição seja variável conforme a localização. Vicuña; Stashenko; Fuentes, (2010) ao analisarem a composição do óleo essencial de plantas endêmicas da Colômbia encontraram uma contração de timol entre 34,5 % e carvacrol de 25,8%.

O efeito biológico *L. origanoides* foi evidenciado, atuando como anti-inflamatório (COSTA *et al.*, 2017a), antimicrobiano (SARRAZIN *et al.*, 2015) e antioxidante (STASHENKO *et al.*, 2008).

Em peixes, a *L. origanoides* também apresentou efeito benéfico. Soares *et al.* (2017) avaliaram em testes *in vitro* e *in vivo*, os efeitos histopatológicos, antiparasitários e hematopatológicos do óleo essencial de *L. origanoides* em tambaqui. Assim como as outras espécies de *Lippia*, ela apresenta atividade antiparasitária, entretanto, causa alterações histológicas e hematológicas.

1.8.4 *Lippia sidoides*

O alecrim pimenta, *L. sidoides*, é uma planta aromática endêmica do Brasil, encontrada principalmente na região nordeste. O óleo essencial extraído dessa espécie é majoritariamente rico em timol (56,67%) e carvacrol (16,73%). Apresenta também outros compostos como p-cimeno (7,13%), aromadendrina (2,79%), cineol (2,09%), elemeno (2,28%), dentre outros que apresentam concentrações menores que 2%. Devido à alta concentração de timol, a *L. Sidoides* apresenta um alto poder antimicrobiano, demonstrando eficiência na inibição do crescimento de *Streptococcus* sp. e *Candida albicans* (BOTELHO *et al.*, 2007), larvicida (CARVALHO *et al.*, 2003), anti-helmíntico (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007), antifúngico (SIQUEIRA *et al.*, 2011), além de ter propriedades anti-inflamatórias (MONTEIRO *et al.*, 2007).

Na aquicultura, Hashimoto *et al.* (2016) avaliaram a ação antiparasitária da *L. sidoides* contra os monogenoides *Cichlidogyrus tilápia*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis* e concluíram que o óleo essencial dessa espécie apresentou efeito sobre os parasitos estudados. Entretanto, apesar do efeito benéfico, os autores não indicaram o seu uso devido a alterações hematológicas observadas.

Soares *et al.* (2017) avaliaram a atividade antiparasitária *in vivo* e *in vitro* do óleo essencial de *L. sidoides* contra os monogenoides *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium*

janauachensis e *Mymarothecium boegeri* das brânquias de *C. macropomum* tambaqui, além de investigar os possíveis efeitos tóxicos. Estes pesquisadores concluíram que baixas concentrações do óleo essencial apresentam atividade antiparasitária. Com tudo, esse óleo causa severas alterações nas brânquias, como hiperplasia e fusão do epitélio branquial lamelar, vasodilatação, descolamento do epitélio lamelar e aneurisma lamelar, ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose. Também foram observadas alterações sanguíneas, como redução no número de eritrócitos, bem como nos valores de hematócrito e hemoglobina.

Estudos foram realizados com os compostos fitoquímicos isolados de *L. sidoides*. Aanyu, Betancor e Monroig (2007) avaliaram o efeito do composto timol na nutrição de tilápia e concluíram que a suplementação dietária de até 500 ppm não melhorou o crescimento dos animais ou regulou os genes selecionados nas principais vias responsáveis pelos efeitos promotores de crescimento dos compostos fitogênicos. Resultado semelhante foi observado por Giannenas *et al.* (2012) ao suplementarem dietas de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* com 1 g kg⁻¹ de carvacrol e timol.

1.9 FITOBIÓTICOS E POSSÍVEIS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E HEMATOLÓGICAS

Como elucidado, alguns fitobióticos possuem efeito bactericida, inseticida, fungicida, entre outros, muito embora, isso não significa que sejam atóxicos ou que eliminem o patógeno. Assim, os testes de bioensaios laboratoriais são importantes ferramentas para determinar a eficácia da substância no animal infectado ou ainda avaliar seus efeitos adversos sobre o animal saudável (LOMBARDI, 2004). Em geral, durante estes testes são avaliadas a sobrevivência ou a mortalidade dos organismos, alterações comportamentais e as respostas ao estresse, observadas pelas alterações hematológicas, bioquímicas, histológicas, parasitológicas ou de genotoxicidade (FERREIRA, 2004; QUEIROZ, 2012; VIANA *et al.*, 2012).

O estresse é definido como um conjunto de respostas fisiológicas do organismo frente a uma situação desagradável ou ameaçadora (URBINATI; CARNEIRO, 2004). Seus efeitos podem ser divididos em respostas primárias, secundárias e terciárias. Na resposta primária, ocorre o aumento das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteroide ou cortisol no plasma. A resposta secundária é caracterizada pelas alterações metabólicas, hematológicas e osmorregulatórias. Na resposta terciária, ocorre a redução na taxa de crescimento e da

reprodução e diminuição da resistência às doenças (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; URBINATI; CARNEIRO, 2004).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são ferramentas importantes em testes com diferentes produtos, como fitoterápicos, pois auxiliam na compreensão sobre o estado de saúde do animal e permitem avaliar as reações que os produtos químicos ou fitoterápicos desencadeiam nos peixes (ASADI *et al.*, 2012; SARAVANAN *et al.*, 2011).

Vários trabalhos têm demonstrado que a utilização de alguns produtos com finalidade terapêutica tem desencadeado respostas características de estresse fisiológico. Monteiro (2012) observou aumento dos níveis de glicose no tambaqui no teste de toxicidade com extrato de mastruz, *Chenopodium ambrosioides*. Dube e Mali (2012) encontraram alterações nos níveis de proteínas totais de “spotted snakehead” *Channa punctatus* alimentados com extrato aquoso do alho, enquanto Palanisamy *et al.* (2011) observaram redução do número de eritrócitos e na concentração de hemoglobina de *Channa striata* alimentados com extrato de *Cleistanthus collinus*. O extrato de nim, *Azadirachta indica*, aumentou os níveis de cortisol e, conseqüentemente, de glicose plasmática em tilápia-do-Nilo (WINKALER *et al.*, 2007). Alterações hematológicas foram observadas em tilápia-do-Nilo com o uso do óleo essencial de *L. sidoides* (HASHIMOTO *et al.*, 2016).

Outra ferramenta importante na avaliação do estado de saúde dos animais comumente utilizada em aquicultura é a histologia que, em geral, avalia diferentes células e tecidos a fim de esclarecer o funcionamento dos órgãos. Nesse sentido, a histopatologia permite inferir sobre as doenças dos animais, por meio da compreensão funcional dos órgãos, células, nutrição e diagnóstico de patologia dos peixes (CAVICHILLO, 2009; FERREIRA *et al.*, 2016; HONORATO *et al.*, 2014). Dentre os principais órgãos avaliados nas análises histopatológicas em peixes estão o tegumento, bexiga natatória, trato digestório, olhos, brânquias, intestino, rim, coração, fígado e baço (BRUM *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2003).

As brânquias são essenciais para a saúde e a sobrevivência dos peixes, atuando na absorção de oxigênio, liberação de dióxido de carbono, resíduos nitrogenados e na osmorregulação. O tecido branquial é também responsável pelo equilíbrio ácido-base e funções sensoriais na degustação dos alimentos. Com isso, suas estruturas são frágeis e sujeitas a variações ambientais e aos fitoterápicos (BALDISSEROTTO, 2002; BRUM *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2017). Constantemente são encontradas alterações branquiais como edema, hiperplasia, necrose, hipertrofia, fusão das lamelas secundárias, descamação epitelial, telangiectasia e descolamento epitelial, situações que podem afetar o desenvolvimento e a

sobrevivência dos peixes (CAMPOS; MORAES; MORAES, 2011; CAVICHIOLO, 2009; SILVA, 2004). Algumas das alterações são causadas por parasitos e acarretam a modificação do epitélio das lamelas primárias e secundárias dos filamentos branquiais, alterando a função respiratória dos peixes (NALDONI, 2009; VELLOSO *et al.*, 2012). Alguns poluentes podem causar o comprometimento funcional das brânquias e, por consequência, prejudicar a própria sobrevivência dos animais (LEONARDO *et al.*, 2001). Além disso, dieta com inclusões de lipídios vegetais na ração de peixe também podem causar diferentes tipos de alterações nas brânquias, que variam de moderada a severa (BRUM *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2017; YADAV *et al.*, 2015).

O intestino, tem como função, completar a digestão de lipídios e proteínas, que foi iniciada pelo estômago, além de fazer a absorção da água, íons, nutrientes, aminoácidos e carboidratos (BALDISSEROTTO, 2002; RAŠKOVIĆ *et al.*, 2011). Neste órgão também podem ser encontrados parasitos, tais como os helmintos, que causam lesões inflamatórias moderadas nos locais de fixação. Em alguns casos, provocam lesões mais severas, dependendo da intensidade parasitária, como hemorragias e inflamação, resultando em alterações na função gastrointestinal (ALVAREZ-PELLITERO; PALENZUELA; SITJ-BOBADILLA, 2008; FERREIRA *et al.*, 2014).

O rim, é composto por elementos hematopoiéticos, fagocitários, endócrinos e excretorios. Sua função primária nos peixes é a regulação osmótica de água e sais (MACIEL *al.*, 2012; MORRISON, 2007). Além disso, sua porção hematopoiética tem papel importante na remoção de partículas estranhas, células e agentes infecciosos provenientes do corpo (SILVA, 2004; SÖNMEZ *et al.*, 2015; YANONG, 2003).

O coração é um órgão muscular que bombeia sangue saturado de dióxido de carbono em fluxo único para a região anterior do peixe (BALDISSEROTTO, 2002). O coração presente nos peixes é tubular em “S” e exibe-se em quatro cavidades de contração sequenciais: o seio venoso, o átrio, o ventrículo e o bulbo arterial (PIEPERHOFF *et al.*, 2014; POUGH *et al.*, 2003; TAYLOR; LEITE; SKOVGAARD, 2010).

O fígado é a maior glândula do corpo dos peixes e é responsável por executar diversas atividades vitais e fisiológicas dos animais. Dentre as funções estão, a biotransformação e a síntese de metabolismo (COSTA *et al.*, 2012; FEIST *et al.*, 2015). Além destas funções, o fígado também é o órgão encarregado pela produção da bile, síntese de proteína (albumina, fibrinogênio, protrombina), metabolismo de lipídios e carboidratos. O fígado promove a desintoxicação de produtos endógenos e exógenos como diferentes tipos de toxinas, drogas,

metais pesados, pesticidas, entre outros (CAMARGO; MARTINEZ, 2007; PARIS-PALÁCIOS; BIAGIANTI-RISBOURG; GENTEN, 2000; ROTTA, 2003; SILVA, 2004). Por ser um órgão associado à detoxificação de substâncias, observam-se alterações como atrofia ou hipertrofia celular, migração dos núcleos para periferia, vacuolização intensa e focos de necrose, além de infiltração de gordura, congestão nos sinusóides e fibrose (CAVICHIOLO, 2009; PERESSIN; SILVA, 2015). Outra função importante atribuída ao fígado, é servir como indicador do estado nutricional e fisiológico dos peixes (BOMBONATO *et al.*, 2007; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009; YIGIT *et al.*, 2017) e estar envolvido na produção de anticorpos durante a fase larval (ROTA, 2003).

O baço é um dos principais órgãos envolvidos na resposta imunológica nos peixes, além de concentrar a filtração de antígenos, hemocaterese e estocagem de eritrócitos. Em algumas espécies, o baço é o principal órgão hematopoiético (KIRON, 2012; MACIEL *et al.*, 2012; MORRISON, 2007). O órgão é composto por vasos sanguíneos elipsoides com competência para fagocitose, por numerosos eritrócitos e tecido hematopoiético onde se podem observar eritroblastos, eritrócitos, linfócitos e macrófagos. São frequentemente observados centros de melanomacrófagos próximos aos vasos sanguíneos (ROTTA, 2003; SARAIVA, 2006).

Nos últimos anos, todos estes órgãos e tecidos dos peixes estão sendo avaliados para fins de diagnosticar alterações nos tecidos dos animais, após banho terapêutico com óleos essenciais contra parasitos (COSTA *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2017), em processo anti-inflamatório associado a parasitos de peixes (BALDISSERA *et al.*, 2017b ;CORRÊA; BASTO; CECCARELLI, 2015), estresse oxidativo de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (BALDISSERA *et al.*, 2017a), na toxicidade aguda de óleo essencial (MALHEIRO *et al.*, 2016), em dieta com princípio ativo de planta após desafio com bactéria *A. hydrophila* (ANUSHA *et al.*, 2014; AMALA *et al.*, 2018), avaliação quanto ao grau de infecção por bactéria (MARTINS *et al.*, 2008), exposição a vírus (DONG *et al.*, 2017; FATHI *et al.*, 2017; JAEMWIMOLA *et al.*, 2018; SENAPINA *et al.*, 2018) e, dietas suplementadas com alho para o “guppy” *Poecilia reticulata* (FRIDMAN; ZILBERG, 2014).

Alterações histológicas também podem ser observadas em peixes alimentados com dietas contendo fitobióticos. Ibidunni, Olubodun e Ikililu (2018) afirmaram que a suplementação dietária de babosa, *Aloe barbadensis* causou distúrbios histopatológicos e alterações pancreáticas em bagre, *Clarias gariepinus*. Brum *et al.* (2018) afirmaram que altas concentrações de óleo essencial de majericão e gengibre causaram alterações no tecido de

tilápia-do-Nilo. Sönmez *et al.* (2015) observaram congestão, necrose ou degeneração em amostras de fígado e rim de truta alimentados com alto teor de óleo 1,8-cineole, carvacrol ou pulegone.

Neste sentido, faz-se necessária a realização de trabalhos avaliando a eficácia dos óleos essenciais adicionados à dieta de peixes para o controle de parasitos, indicadores fisiológicos e histopatológicos, visando contribuir com uma produção de peixes mais saudáveis e livres de doenças, fortalecendo assim, a criação brasileira de peixes ornamentais, mais segura e livre de resíduos químicos no ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o tratamento natural, mais saudável de peixes ornamentais brasileiros.

2.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a concentração antiparasitária *in vitro* dos óleos essenciais de *L. alba*, *L. organoides* e *L. sidoides*;
- b) Determinar a prevalência da carga parasitária da carpa koi *Cyprinus carpio* alimentada com o ração suplementada com o óleo essencial de *L. sidoides* em tanques-redes;
- c) Avaliar o desempenho zootécnico da carpa koi *Cyprinus carpio* alimentada com ração suplementada com o óleo essencial de *L. sidoides* em tanques-rede;
- d) Avaliar os parâmetros hematológicos da carpa koi *Cyprinus carpio* alimentada com ração suplementada com o óleo essencial de *L. sidoides* em tanques-rede;
- e) Avaliar os parâmetros histopatológicos da carpa koi *Cyprinus carpio* alimentada com ração suplementada com o óleo essencial de *L. sidoides* em tanques-rede.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS PEIXES E LOCAL DOS EXPERIMENTOS

As carpas koi *Cyprinus carpio* utilizadas nos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram adquiridas da piscicultura Vale dos Bettas, localizada no Município de Biguaçu no estado de Santa Catarina. Os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos na própria fazenda. Para o ensaio *in vitro* foram utilizadas carpas com peso médio de $3,61 \pm 0,56$ g e comprimento padrão de $4,71 \pm 0,54$ cm. O ensaio *in vivo* foi realizado em tanques-rede de 1,0 x 1,0 x 1,30 m com 0,5 cm de abertura de malha, instalados em uma represa com aproximadamente 1 hectare de área total. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC 1440100217).

3.2 OBTENÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram obtidos a partir das folhas das plantas cultivadas e processadas no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus-AM, Brasil, localizado em Manaus, Amazonas. Após a coleta das folhas pela manhã, elas foram secas em estufa de circulação contínua de ar à 45 °C por 48 h e em seguida foi realizada a extração dos óleos essenciais pelo processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (MATOS, 1996, SILVEIRA *et al.*, 2012).

A composição química dos óleos de *L. alba*, *L. origanoides* e *L. sidoides* foi determinada pelo método de cromatografia em fase gasosa com equipamento Agilent 6890, e detector seletivo de massas Agilent 5973N. A separação dos componentes foi realizada em uma coluna capilar HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com temperatura de 60° a 240 °C, com variação de 3 °C min⁻¹. Foi injetado 1,0 microlitro de uma solução contendo 1% de cada óleo no divisor de fluxo na proporção de (1:100) e mantido a 25 0°C. A quantificação relativa (%) dos componentes dos óleos foi realizada em cromatógrafo a gás Agilent 6890N, que foi equipado com um detector de ionização por chama, mantido a 280°C, e por uma coluna capilar HP5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 micrômetro) com a utilização de hidrogênio (1,5 mL. min⁻¹) como gás carreador. A identificação dos constituintes de cada óleo foi realizada por comparação de espectro de massas obtido por biblioteca de espectros Wiley 6th edition e por comparação do índice de retenção calculado de cada componente com dados da literatura. O cálculo do índice

foi realizado por injeção de uma série de n-alcenos nas mesmas condições analíticas empregadas para os demais óleos (Adams, 2007).

3.2.1 Teste *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* e *Lippia sidoides* utilizados isoladamente e combinados

Inicialmente, testou-se *in vitro* os três óleos nas concentrações 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0% para determinar qual dos óleos teria mais eficácia contra os monogenóides para posterior utilização no experimento *in vivo*. Verificou-se que nestas concentrações testadas não era possível determinar a eficácia de cada um dos três óleos testados, pois os parasitos morriam instantaneamente. Dessa forma, foram reduzidas as concentrações para 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹ baseado na literatura (MALHEIROS *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2017a).

Para os testes *in vitro*, as carpas koi foram capturadas aleatoriamente, anestesiadas com óleo de cravo (75 mg.L⁻¹) e eutanasiadas para coleta dos arcos branquiais e confirmação da presença do parasito com a utilização de microscópio de dissecação (Carl Zeiss Suzhou co., modelo Square 3-B). Após a confirmação, foi realizada a preparação das soluções dos óleos das três espécies de *Lippia*. Os óleos essenciais foram diluídos em álcool de cereais para uma solução estoque de 10% e logo em seguida foram preparadas as concentrações de uso nas seguintes proporções e tratamentos: controle água do tanque dos peixes, controle álcool de cereais, *L. alba* (10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹), *L. origanoides* (10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹), *L. sidoides* (10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹), *L. alba* + *L. origanoides* (1:1 a 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹), *L. alba* + *L. sidoides* (1:1 a 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹), *L. origanoides* + *L. sidoides* (1:1 a 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹), *L. alba* + *L. origanoides* + *L. sidoides* (1:1:1 a 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹).

Os tratamentos foram realizados em triplicata em microplaca de seis poços contendo um filamento branquial parasitado por poço. As placas foram observadas a cada 15 min para quantificação do número de parasitos mortos e observação comportamental dos parasitos, sendo considerados mortos os parasitos com ausência de movimento quando estimulados com agulha. Nas concentrações contendo 10 e 20 mg.L⁻¹ dos óleos de *Lippia* foi observada paralização dos parasitos nos primeiros 20 min de exposição, seguidos de uma recuperação dos movimentos após 50 min, portanto, para a confirmação efetiva da mortalidade, os organismos foram estimulados com agulha por até 5 h após o início do experimento.

3.2.2 Teste *in vivo* com o óleo de *Lippia sidoides* suplementado na ração

3.2.2.1 Preparo das dietas experimentais

O óleo essencial de *L. sidoides* foi selecionado para o ensaio *in vivo* por apresentar o melhor resultado nos testes *in vitro*, sendo adicionado à dieta comercial que já vinha sendo utilizada no próprio cultivo da carpa, com 50% de proteína bruta.

O óleo essencial de *Lippia sidoides* foi adicionado em uma ração comercial com 50% de proteína bruta, à qual os peixes já estavam adaptados. O óleo essencial nas concentrações 0,0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0% foi inicialmente pesado com auxílio de uma balança digital e posteriormente diluído em álcool de cereais na proporção 100 g de álcool por quilo de ração. O mesmo procedimento de pesagem foi efetuado para a ração comercial contendo 50% de proteína bruta, destinada à adição dos óleos para o experimento. O óleo com suas respectivas concentrações foi adicionado em um pulverizador manual e aspergido nas rações, que passaram por secagem por 24 h em temperatura ambiente e, posteriormente, foram armazenadas em freezer (-20 °C) até o dia da sua utilização de acordo com Dairiki *et al.* (2013).

3.2.2.2 Ensaio em tanques-rede

Foram utilizadas 300 carpas com peso médio e desvio padrão de $3,56 \pm 0,68$ g provenientes do mesmo açude, onde foram distribuídos 20 peixes por tanque-rede de 1 x 1 x 1,30 com 0,5 cm de abertura de malha. O desenho experimental constituiu-se de cinco tratamentos, em triplicata: controle (ração comercial sem adição de óleo essencial), 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0% do óleo de *Lippia sidoides*. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9 a.m. e 4 p.m.) por um período de 60 dias.

Durante o período experimental, a qualidade da água manteve-se nos seguintes valores: oxigênio dissolvido ($6,08 \pm 1,55$ mg.L⁻¹) temperatura ($20,50 \pm 0,88$ °C), pH ($5,40 \pm 0,82$), condutividade elétrica ($40,73 \pm 6,52$ µS cm⁻³) e sólidos totais ($19,25 \pm 4,20$ mg.L⁻¹) medidos com multiparâmetro Hanna instrumento (HI 9828), amônia total ($0,58 \pm 0,27$ mg.L⁻¹) e nitrito (0 mg.L⁻¹) medidos com kit comercial da marca Alcon pet® e a transparência ($24,17 \pm 1,83$ cm) medida com disco de Secchi.

No início e ao final de 30 e 60 dias foram realizadas biometrias de todos os peixes para o cálculo de desempenho zootécnico e coletadas amostras de cinco peixes por unidade experimental para as análises parasitológicas e hematológicas.

3.2.2.3 Parâmetros zootécnicos

Os cálculos de ganho de peso diário, taxa de eficiência proteica, consumo médio de ração individual, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico e taxa de sobrevivência foram analisados (FRACALOSSO; CYRINO, 2012) utilizando as fórmulas:

- Ganho de peso (g) = peso médio final (g) - peso médio inicial (g).
- Taxa de eficiência proteica (TEP) = Ganho de peso (g) / Proteína bruta ingerida (g).
- Consumo médio de ração individual (CMRI) = Quantidade de ração fornecida (kg)/Número de peixes.
- Conversão alimentar aparente (CAA) = CMRI / [(Peso médio final(g) – Peso médio inicial(g))].
- Taxa de crescimento específico (TCE) = $100 \times (\ln \text{ peso médio final} - \ln \text{ peso médio inicial}) / \text{tempo}$.
- Taxa de sobrevivência (TS) = $100\% \times (\text{número final de peixes} / \text{número inicial de peixes})$.

3.2.2.4 Análise parasitológica

Cinco peixes por unidade experimental foram anestesiados em solução de óleo de cravo (75 mg.L^{-1}) e eutanasiados por secção cerebral para a coleta dos arcos branquiais e raspado de muco. Os arcos branquiais foram inicialmente banhados em água a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e fixados em álcool 70%. O raspado de muco foi fixado em álcool 70% e analisado em microscópio. A quantificação de parasitos seguiu o método de JERÔNIMO *et al.* (2012b) e a taxa de prevalência, intensidade média e abundância média de parasitos foram calculadas de acordo com BUSH *et al.* (1997).

Os monogenoídeos encontrados no experimento foram preparados em meio de Hoyer's entre lâmina e lamínula para estudo das estruturas esclerotizadas como complexo copulatório, barra do háptor, ganchos e âncoras (EIRAS *et al.*, 2010), e identificados de acordo com MUELLER; VAN CLEAVE (1932) e KULWIEC (1927). Para os tricodinídeos foi utilizado o

método de KLEIN (1958) de impregnação com nitrato de prata e identificados segundo PÁDUA *et al.* (2012), VALLADÃO *et al.* (2013) e DOVE; O'DONOGHUE (2005).

3.2.2.5 *Análise hematológica*

A coleta de sangue foi realizada com cinco peixes de cada tanques-rede em 30 e 60 dias de experimento. Os peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg.L^{-1}), e em seguida o sangue foi coletado por punção do vaso caudal, utilizando seringas de 1 mL contendo EDTA (10%). O sangue coletado foi destinado às análises de contagem total de eritrócitos determinada em câmara de Neubauer utilizando após diluição 1:200 em solução de Dacie, contagem total de leucócitos e diferencial de leucócitos realizada em extensões sanguíneas, após serem previamente coradas com May-Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW) segundo Tavares-Dias e Moraes (2003). A concentração de glicose plasmática foi determinada com glicosímetro portátil Accu-Chek® Advantage (Roche Diagnóstica, Brasil).

3.2.2.6 *Análise histológica*

Os mesmos peixes utilizados na coleta de sangue, foram eutanasiados por secção medular para a realização da coleta de fragmentos das brânquias, intestinos, rim, baço, coração e fígado. Estes fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10%, para observação de possíveis alterações nos tecidos causadas pela adição das diferentes concentrações do óleo de *L. sidoides* na dieta. Em seguida, todos os fragmentos dos órgãos passaram por desidratação em séries de etanol, e seguidamente em xilol, sendo embebidas em parafina a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram confeccionados cortes transversais de $5 \mu\text{m}$ de espessura dos órgãos. Os cortes foram corados em hematoxilina e eosina e foi realizada a montagem das lâminas, as quais foram analisadas em microscópio de contraste de interferência diferencial (DIC) (ZEISS, Axio Imager A.2, Göttingen, Alemanha). As alterações histológicas nas brânquias, rim, baço, fígado, coração e intestino foram avaliadas semi-quantitativamente, atribuindo valores de acordo com o grau de severidade das lesões: 0 (ausência de lesão), 1 (leve, correspondendo a $<25\%$ da área do tecido), 2 (moderada, de 25% a 50% da área do tecido) e 3 (severa, $>50\%$ da área do tecido) de acordo com método modificado de Schwaiger *et al.* (1997).

No intestino, adicionalmente, foram avaliadas as características morfométricas como: quantidade, comprimento e largura dos vilos, número de células caliciformes, medidas do

perímetro e área dos vilos, determinadas com auxílio de microscópio de contraste de interferência diferencial (DIC) (ZEISS, Axio Imager A.2, Göttingen, Alemanha).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as diferenças entre as médias foi utilizada a ANOVA ao nível de significância de 0,05. Antes das análises, os dados passaram por teste de normalidade e homocedasticidade, sendo que os dados expressos em porcentagem foram normalizados aplicando-se a transformação angular. Quando necessário, foi utilizado o teste Tukey para a determinação de diferenças entre as médias. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Software 4.03 (Inc. 2236 Avenida de la Playa La Jolla, CA 92037, USA).

FORMATAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE

Esta tese está dividida em dois capítulos, compostos em forma de artigo científico. O Capítulo I refere-se ao artigo aceito no periódico “Brazilian Journal of Veterinary Pathology”, e o Capítulo II destinado à submissão ao periódico “Aquaculture”. Os capítulos estão formatados de acordo com as normas de seus respectivos periódicos.

CAPITULO I

***In vitro* and *in vivo* antiparasitic action of essential oils of *Lippia* spp. in koi carp (*Cyprinus carpio*) fed supplemented diets**

Elenice Martins Brasil^{1*}, Aline Brum Figueredo^{1,2}, Lucas Cardoso¹, Marcio Quara de Carvalho Santos³, Elisabeth de Aguiar Bertaglia¹, William Eduardo Furtado¹, Jeanderson da Silva Viana⁵, Francisco Célio Maia Chaves⁴, José Luiz Pedreira Mouriño¹, Maurício Laterça Martins¹

^{1*}AQUOS – Aquatic Organisms Health Laboratory, Department of Aquaculture, School of Agricultural Sciences (CCA), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

²Department of Fisheries Engineering and Biological Sciences, Santa Catarina State University (UDESC), R. Cel. Fernandes Martins, 270, 88790-000, Laguna, Santa Catarina, Brazil.

³Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas (IFAM), Campus Coari, Estrada Coari Itapéua, Km 2 s/n, Itamaraty, 69460-000, Coari, Amazonas, Brazil.

⁴Embrapa Western Amazonia, Rod. AM 10, km 29 s/n, 69010-970, Manaus, Amazonas, Brazil.

⁵Laboratory of Biology and Cultivation of Freshwater Fish, Federal University of Santa Catarina, Aquaculture Department, Rod. Francisco Thomaz dos Santos 3532, Florianópolis, Santa Catarina, 88066-260, Brazil.

***Corresponding author:** Elenice Martins Brasil. AQUOS – Aquatic Organisms Health Laboratory, Department of Aquaculture, School of Agricultural Sciences (CCA), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

This study evaluated the *in vitro* antiparasitic activity of the essential oils of *Lippia alba*, *L. organoides* and *L. sidoides* against monogenean parasites of koi carp *Cyprinus carpio* and its zootechnical performance in net cages. The oils were obtained from the leaves by hydro distillation, and the chemical composition was evaluated via gas chromatography. *In vitro* assays were performed with each essential oil separately and combined in binary (1:1) and tertiary (1:1:1) mixtures with the *Lippia* species at 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹ and two control groups (grain alcohol and tank water). To determine zootechnical performance, *L. sidoides* oil was added to the feed at 0.00 (control), 0.25, 0.50, 0.75 and 1%, in triplicate and with 20 fish per net cage fed for 60 days. The best results *in vitro* against monogeneans were observed for *L. sidoides* (40 mg L⁻¹ in 8 min), followed by *L. organoides* (40 mg L⁻¹ in 25 min) and *L. alba* (40 mg L⁻¹ in 4 h). Reductions in weight gain, protein efficiency rate and specific growth rate were observed in diets containing 0.75% of *L. sidoides* oil in comparison to the control and the 0.25% diet. There were no significant differences in growth, individual mean feed intake, apparent feed conversion and parasitological indices. Based on our results, 0.25% *L. sidoides* oil showed the best zootechnical performance, but was not effective against koi carp parasites *in vivo*.

Keywords: Fish farming, phytotherapies, efficacy, ectoparasites.

1 Introduction

2 Koi carp (*Cyprinus carpio*) is the most widely cultured ornamental fish species in the
3 world and the second best-selling exotic species in Brazil after the goldfish (*Carassius auratus*).
4 The southeastern and eastern regions have the highest farming volumes of koi carp, and along
5 with the marketing of other ornamental fish species, they move more than R\$ 700 million per
6 year (50, 74). Despite the economic importance of koi carp, studies on the parasitic issues and
7 the use of essential oils in the diet as antiparasitic treatment are still scarce. Fish health is a
8 constant concern of ornamental fish farmers, and the Ministry of Fisheries has launched
9 manuals of good management practices, as chronic stress and fish losses in the farms occur
10 mainly in intensive systems with high stocking densities (88, 13). Among intensive culture
11 systems in net tanks, floating structures have an advantage regarding the easy catching of the
12 fish and the possibility of growing several species at different stocking densities. However,
13 intensive systems with high stocking densities can cause stress to animals, because the closer
14 physical contact among fish can facilitate the proliferation of diseases caused by parasites such
15 as monogeneans, cestodes and trichodinids (68, 56). The most common monogeneans found in
16 the gills and skin of koi carp are dactylogyrids (12). In the state of Santa Catarina, Brazil, two
17 species have been identified, *Dactylogyrus extensus* Mueller et Van Cleave, 1932 and
18 *Dactylogyrus minutus* Kulwiec, 1927 (71). Trichodinids are globally distributed and mainly
19 parasitise the body surface and gills of fish. Some species can be endoparasites and cause
20 serious lesions that can serve as a gateway for other pathogenic agents such as bacteria (42, 84).
21 Regarding the trichodinid species reported in koi carp, *Trichodina mutabilis* Kazubski and
22 Migala, 1968 (46) and *Trichodina* sp. (71) have already been identified in the state of Santa
23 Catarina. These parasites reproduce rapidly under conditions such as poor water quality, high
24 stocking density and immunosuppressed hosts, which are most susceptible to severe

25 infestations, and can cause mortality in all fish life stages (27), necessitating strict control in
26 farming systems.

27 Fish farmers control parasites by using chemicals such as praziquantel, mebendazole
28 and levamisole (55), but the continuous and inadequate use of these products can result in
29 serious environmental contamination, pathological changes in fish, risks to human health and
30 resistance of the pathogens to the active principles of chemotherapeutic agents (64). These
31 factors have stimulated the search for alternatives to minimise these negative effects. Within
32 this context, certain plant-based products are effective in the prevention, control and treatment
33 of bacterial and parasitic diseases in fish (44, 38). Studies have shown that some plants have
34 antiparasitic properties for fish and other animals (87, 82).

35 Among the plant species studied for therapeutics are those from the family
36 Verbenaceae, with emphasis on the genus *Lippia*, which presents diverse biological activities
37 and is used for the treatment of respiratory diseases, menstrual disorders and as analgesics and
38 sedative in humans (40, 39, 18). This genus is native to Brazil and can tolerate various types of
39 environments, grows rapidly and is rich in essential oils, with yields varying from 2.44 to 4.4%
40 (92, 89). Among the species with therapeutic importance are bushy matgrass (*Lippia alba*),
41 oregano (*Lippia origanoides*) and pepper rosemary (*Lippia sidoides*), whose essential oils have
42 antimicrobial, anticancer, antifungal, antiparasitic and anaesthetic activities (57, 7, 53, 38).

43 *Lippia alba* has antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila* (79), fungicidal
44 action against *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum gypseum*
45 (19), besides acting as stress reducer in the transport of silver catfish *Rhamdia quelen* juveniles
46 (7) and as an anaesthetic for *R. quelen* (33, 80, 78). *Lippia origanoides* has antimicrobial
47 activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* (5) and
48 *Aeromonas hydrophila* (51), fungicidal action against *Aspergillus fumigatus* (10) and
49 antiparasitic effect against monogeneans from tambaqui *Collossoma macropomum* (77).

50 *Lippia sidoides* presents fungicidal action against *Candida* spp. (30), antimicrobial
51 activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (17) and *Aeromonas hydrophila* (51)
52 and antiparasitic activity against monogeneans from tambaqui *C. macropomum* and tilapia
53 *Oreochromis niloticus* (38, 77). In view of the positive results regarding the use of these
54 essential oils, this study aimed to evaluate the efficacy of the essential oils from *L. alba*, *L.*
55 *origanoides* and *L. sidoides* against monogenean and trichodinid parasites in koi carp. We
56 evaluated both *in vitro* and *in vivo* effects after dietary supplementation, verifying their impacts
57 on zootechnical performance.

58 **Material and Methods**

59 **Biological material**

60 Koi carp (*Cyprinus carpio*) used for *in vitro* and *in vivo* assays were obtained from
61 “Vale dos Bettas” fish farm located in the municipality of Biguaçu, Santa Catarina State,
62 Southern Brazil. *In vitro* and *in vivo* assays were performed in this farm. For *in vitro* assays,
63 parasites were collected from carps with mean weight of 3.61 ± 0.56 g and standard length
64 4.71 ± 0.54 cm. The *in vivo* assay was performed in 1.0 x 1.0 x 1.30 m net tanks with 0.5 cm
65 mesh opening, installed in a pond with approximately 1 hectare of total area. All animal
66 procedures were approved by the Ethic Committee on Animal Use of Federal University of
67 Santa Catarina (CEUA/UFSC 1440100217).

68 **Chemical composition of the essential oils**

69 The essential oils were obtained from the leaves of plants cultivated and processed in
70 the Medicinal Plants and Phytochemistry Laboratory of EMBRAPA Western Amazon,
71 Manaus- AM, Brazil. After the leaves were collected in the morning, they were dried in a
72 continuous circulation oven at 45°C for 48 h and then the extraction of the essential oils was
73 performed by hydro distillation process in a Clevenger type apparatus (56, 70).

74 The chemical composition of the oils from *L. alba*, *L. origanoides* and *L. sidoides* was
75 determined by gas chromatographic method with Agilent 6890 equipment and selective mass
76 detector Agilent 5973N. The separation of the components was performed on a capillary
77 column HP5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) with temperature of 60°C to 240°C and variation
78 of 3°C m^{-1} . 1.0 microliter of a solution containing 1% of each oil was injected into the flux
79 splitter in the ratio of 1: 100 and maintained at 250°C. The relative quantification (%) of the
80 components of the oils was carried out in gas chromatograph Agilent 6890N, which was
81 equipped with a flame ionization detector, maintained at 280°C, and by an HP5 capillary
82 column (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) with the use of hydrogen (1.5 mL min^{-1}) as carrier gas.
83 The identification of the constituents of each oil was performed by comparing the mass spectra
84 obtained by Wiley 6th edition spectra library and by comparing the calculated retention index
85 of each component with literature data. The calculation of the index was performed by injecting
86 a series of n-alkanes in the same analytical conditions used for the other oils (3).

87 ***In vitro* test of the essential oils of *Lippia alba*, *Lippia origanoides* and *Lippia sidoides***
88 **separately and in combination**

89 Initially, the three oils were tested *in vitro* at concentrations of 0.25; 0.5; 0.75 and 1.0%
90 to determine its effectiveness against monogenean parasites, for later testing *in vivo*. In these
91 concentrations it was not possible to determine the oils efficacy, since the parasites died
92 instantly. Thus, the experimental concentrations were changed for 10, 20, 40, 60, 80 and 100
93 mg L^{-1} based on similar studies in the literature (72, 50).

94 For *in vitro* tests, koi carps were randomly captured, anesthetized with clove oil (75 mg
95 L^{-1}) and euthanized by medullar section for gill arches collection and confirmation of the
96 presence of monogenean parasites with a dissecting microscope (Carl Zeiss Suzhou co., model
97 Square 3-B). After confirming the presence of parasites, solutions from the oils of the three
98 species of *Lippia* were prepared. The essential oils were diluted in grain alcohol to a stock

99 solution of 10% and soon thereafter the concentrations in the following proportions and
100 treatments were prepared: control with water from fish tank, control with cereal alcohol, *L. alba*
101 (10, 20, 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹), *L. origanoides* (10, 20, 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹), *L.*
102 *sidoides* (10, 20, 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹), *L. alba* + *L. origanoides* (1:1 to 10, 20, 40, 60, 80
103 and 100 mg L⁻¹), *L. alba* + *L. sidoides* (1:1 to 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹), *L. origanoides*
104 + *L. sidoides* (1:1 to 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹), *L. alba* + *L. origanoides* + *L. sidoides*
105 (1:1:1 to 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹).

106 The treatments were performed in triplicate in a six well microplate containing a
107 parasitized gill filament per well. The plates were observed every 15 min for quantification of
108 dead parasites and behavioral observations, with parasite death confirmed by absence of
109 movement when stimulated with a needle. At concentrations of 10 and 20 mg L⁻¹ of *Lippia* oils,
110 parasite immobilization was observed in the first 20 min of exposure, followed by a recovery
111 of the movements after 50 min, therefore, for effective confirmation of mortality, the parasites
112 were stimulated with a needle for up to 5 h after the start of the experiment.

113 ***In vivo* test with *Lippia sidoides* essential oil supplemented in the diet**

114 The essential oil of *Lippia sidoides* was selected for the *in vivo* assay because it
115 presented higher efficacy against parasites *in vitro*. The essential oil was added to a commercial
116 diet already used in the farm, containing 50% crude protein. The essential oil at concentrations
117 0.25; 0.5; 0.75 and 1.0% was diluted in grain alcohol and added to the feed at the proportion
118 100 g of alcohol per kg. The oil was weighed with the aid of a digital scale. The essential oil
119 with its respective concentrations was placed in a hand sprayer and sprinkled on the feed, which
120 was left to dry for 24 hours at room temperature and then stored in a freezer until the day of its
121 use (21).

122 ***In vivo* assay in net cages**

123 Three hundred carps from the same pond with mean weight of 3.56 ± 0.68 g were
 124 distributed in 1 x 1 x 1.30 m net tanks with 0.5 cm mesh opening. The experimental design
 125 consisted of five treatments, in triplicate: control (commercial feed without addition of essential
 126 oil), 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0% of *Lippia sidoides* essential oil. The fish were fed twice a day (9
 127 a.m. and 4 p.m.) for 60 days. During this period, water quality parameters remained at the
 128 following values: dissolved oxygen 6.08 ± 1.55 mg L⁻¹, temperature 20.50 ± 0.88 °C, pH
 129 5.40 ± 0.82 , electrical conductivity 40.73 ± 6.52 μ S cm⁻³ and total suspended solids 19.25 ± 4.20
 130 mg L⁻¹ measured with multiparameter instrument (Hanna HI 9828), total ammonia 0.58 ± 0.27
 131 mg L⁻¹ and nitrite 0 mg L⁻¹ measured with commercial colorimetric kit (Alcon pet®) and
 132 transparency 24.17 ± 1.83 cm measured with Secchi disk. At the beginning of the experiment
 133 and at the times of 30 and 60 days, biometrics of all the fish were performed for the calculation
 134 of zootechnical indexes and samples of six fish per experimental unit were collected for
 135 parasitological analysis.

136 **Growth performance parameters**

137 The calculations of daily weight gain, protein efficiency rate, mean individual feed
 138 intake, apparent feed conversion, specific growth rate and survival rate were performed using
 139 the formulas (30):

140 Weight gain (g) = mean final weight (g) – mean initial weight (g).

141 Protein efficiency rate (PER) = weight gain (g) / ingested crude protein (g).

142 Mean Individual Feed Intake (MIFI) = provided feed (kg)/number of fish

143 Apparent feed conversion (AFC) = MIFI / [(mean final weight (g) – mean initial weight (g)].

144 Specific Growth Rate (SGR) = $100 \times (\ln \text{ mean final weight} - \ln \text{ mean initial weight}) / \text{time}$

145 Survival Rate (SR) = $100\% \times (\text{final number of fish} / \text{initial number of fish})$.

146 **Parasitological analysis**

147 Six fish per experimental unit were anesthetized in clove oil solution (75 mg L⁻¹) and
148 euthanized by brain section for collection of the branchial arches and mucus scraping. Gill
149 arches were initially bathed in water at 55°C and then fixed in 70% ethanol. Mucus scraping
150 was fixed in 70% ethanol and analyzed under microscope.

151 The quantification of parasites was calculated using the prevalence rate, mean intensity
152 (41) and average parasite abundance (14). The monogeneans found in the experiment were
153 mounted in Hoyer's medium between glass slide and cover slip for observation of sclerotized
154 structures such as copulatory complex, horseradish bar, hooks and anchors (26), and identified
155 according to (58) and (45). For trichodinids, the Klein method of silver impregnation (43) was
156 applied for parasite identification (60, 77, 24).

157 **Statistical analysis**

158 To evaluate the differences among the means, ANOVA was applied with significance
159 level of 0.05. Before the analysis, the data were tested for normality and homoscedasticity, and
160 the data expressed as percentage were normalized by applying angular transformation. When
161 necessary, Tukey test applied to confirm differences among means. Statistical analyzes were
162 performed on GraphPad 4.03 software (La Jolla, CA, USA).

163 **Results**

164 **Chemical composition of the essential oils**

165 The results of the analysis of the chemical composition of *L. sidoides*, *L. organoides*
166 and *L. alba* are shown in Figure 1. For *L. sidoides*, 100% of the chemical components were
167 quantified and 99.4% identified. The compounds with the highest percentages were thymol
168 (72.2%), p-cymene (8.15%) and (E)-caryophyllene (4.9%). In *L. organoides*, 100% of the
169 compounds were quantified, and the most abundant ones were identified as p-cymene (37%),
170 carvacrol (14%), γ -terpinene (11.6%) and linalool (6%). In *L. alba*, 100% of the compounds

171 were quantified, and 97.9% of the compounds were identified. The major constituents were
172 carvone (58.2%), limonene (19.2%) and D-germacrene (3.8%).

173 ***In vitro* test of the essential oils of *Lippia alba*, *Lippia organoides* and *Lippia sidoides***
174 **separately and in combination**

175 The best result was assumed as the lowest concentration that killed monogenean
176 *Dactylogyrus minutus* and *Dactylogyrus extensus* within the shortest time. Best results were
177 obtained with *L. sidoides* and *L. organoides* assessed separately, while the worst results were
178 observed in the treatments containing only *L. alba* essential oil (Table 1). The treatments that
179 presented 100% mortality with the lowest essential oil concentration within the shorted time
180 were as follows: *L. sidoides* ($\geq 40 \text{ mg L}^{-1}$ in 8 min), *L. organoides* ($\geq 60 \text{ mg L}^{-1}$ in 9 min) and
181 *L. alba* + *L. organoides* ($\geq 60 \text{ mg L}^{-1}$ in 12 min).

182 In addition, in solutions containing concentrations of essential oils above 20 mg L^{-1} , the
183 monogenean parasites presented continuous contortions, followed by alterations in the body
184 shape and the appearance of oedema, vacuolisation of internal structures and rupture of the
185 internal membrane. There was a temporary neutralisation of parasite movements, even with
186 needle stimulation, after the first 20 min of exposure to essential oils at concentrations of 10
187 and 20 mg L^{-1} and recovery of the movements after 50 min of the experiment in all treatments,
188 with subsequent parasite mortality.

189 ***In vivo* test with essential oil of *Lippia sidoides***

190 In the present study, the monogeneans *Dactylogyrus minutus* and *Dactylogyrus*
191 *extensus* and the trichodinids *Trichodina reticulata* Hirschmann et Partsch, 1955, *Trichodina*
192 *heterodentata* Duncan, 1977 and *Trichodina* sp. were identified. There was no fish mortality in
193 any of the treatments; however, reductions in weight gain, protein efficiency rate and specific
194 growth rate were observed in fish fed diets containing 0.75% of essential oil from *L. sidoides*
195 in comparison to the control group and the animals fed a diet containing 0.25% of essential oil.

196 The other parameters did not present significant differences ($p > 0.05$) among treatments (Table
197 2).

198 Regarding parasitological analysis, there was a prevalence of 83.33 to 55.56% of
199 monogeneans in concentrations of 0.25 and 0.50% of the oil in the diet after 60 days of
200 supplementation. Among the trichodinids, the prevalence was 100 and 66.67% at
201 concentrations of 0.25 and 1.0% of the oil in the diet in 60 days. Parasitological indices such as
202 prevalence, mean abundance, mean dominance and mean intensity of the identified groups did
203 not show significant differences ($p > 0.05$) among treatments, both at 30 and 60 days (Tables 3
204 and 4).

205 **Discussion**

206 **Chemical composition of the essential oils of *Lippia* spp.**

207 In this study, different species of the genus *Lippia* presented different major
208 compounds, corroborating other authors (76), who also found variations in the content and
209 chemical composition of the essential oils of the same plant species. These variations in the
210 chemical composition of *Lippia* may be related to soil type, environmental factors, collection
211 period, seasonal variation and month (73, 37).

212 Analyses of the chemical composition of *L. sidoides* oil indicated that thymol and p-
213 cymene are the major chemical components. These results corroborate those obtained in other
214 studies (21, 28, 51, 77), which, although obtaining different percentage values, also listed
215 thymol and p-cymene as the most abundant components in the essential oil of this species.
216 Studies with isolated thymol have proven its antimicrobial activity. A comparison between the
217 antimicrobial activity of *Lippia sidoides* oil and its major compound, thymol, against bacteria
218 (*Streptococcus aureus*, *S. mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri*, *Enterobacter*
219 *cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) was
220 performed, and there were no differences in antimicrobial effects between essential oil and

221 isolated thymol, evidencing that it is the component responsible for the antimicrobial activity
222 (86). Thymol alone, at a concentration of 10 mg mL⁻¹, has antibacterial activity against *S.*
223 *mutans* (13).

224 In *L. origanoides* oil, p-cymene was the most abundant compound, followed by
225 carvacrol and γ -terpinene. These results differ from those obtained in other studies (51, 4), who
226 found a higher proportion of carvacrol (41.1-49.7%), with p-cymene being the second most
227 abundant compound. Isolated carvacrol from *L. origanoides* showed antifungal activity against
228 *A. fumigatus* and *A. flavus* (10), and p-cymene from the same plant was effective against
229 *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* (28). In *L. alba* essential oil, the major compounds
230 were carvone and limonene. Carvone ranged from 54.5 to 61.7% and limonene from 17.5 to
231 23.1%, similar to previous results (39, 76). Isolated carvone has antifungal, antimicrobial, anti-
232 quorum sensing, insecticidal and insect-repellent properties (66, 11, 67).

233 ***In vitro* analysis of the essential oils of *Lippia* spp. against monogeneans of koi carp**

234 Essential oil of *L. sidoides* showed 100% efficacy *in vitro* against Koi carp
235 monogeneans at 40 mg L⁻¹ for 8 min. This dose was lower than those used in other effective
236 treatments against monogenean parasites from other fish species (50, 72). A 100% efficacy *in*
237 *vitro* for *L. sidoides* essential oil was observed against monogeneans from tambaqui after 10
238 min exposure to 320 mg L⁻¹, while those exposed to 160 mg L⁻¹ showed total mortality only
239 after 1 h (76). Other studies report 100% mortality of the monogeneans *Cichlidogyrus tilapiae*
240 Paperna, 1960, *Cichlidogyrus thurstonae* Ergens, 1981, *Cichlidogyrus halli*, Price and Kirk,
241 1967 and *Scutogyrus longicornis* Paperna and Thurston, 1969 from Nile tilapia with *L. sidoides*
242 oil at 160 mg L⁻¹ for 60 s. (38). One hundred efficacy was found for *Melaleuca alternifolia* and
243 *Mentha piperita* essential oils against monogeneans from pacu *Piaractus mesopotamicus* at 400
244 mg L⁻¹ and for *Copaifera duckei* oleoresin at 100 mg L⁻¹ after 60 min (20).

245 In the present study, oedema, vacuolisation and lysis of monogenean parasites were
246 produced by essential oils from all *Lippia* species at concentrations of 40, 60, 80 and 100 mg
247 L⁻¹. Similar observations have been reported in other studies (20) with copaiba (*C. duckei*)
248 oleoresin, which produced swelling and lysis of the monogenean parasites from *P.*
249 *mesopotamicus*, suggesting that its mode of action affected the cell membrane permeability.
250 The same effect occurred with oils from *Lavandula angustifolia*, *Melaleuca alternifolia* and
251 *Mentha piperita*, resulting in signs of swelling, vacuolisation, lysis and death of trophonts of
252 *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 from pacu *P. mesopotamicus* (85). Swelling and lysis
253 have also been reported in studies with trophonts of *I. multifiliis* from grass carp
254 (*Ctenopharyngodon idella*), which showed transparent bubbles in the plasma membrane,
255 damage to the cytoplasm, loss of membrane integrity and death after exposure to cynatratoside-
256 C extracted from *Cynanchum atratum* root (35). These effects, classified as permeabilisation of
257 the cellular membrane, were observed in the protozoan parasite *I. multifiliis* from the gills of
258 the channel catfish *Ictalurus punctatus* when exposed to pentagalloylglucose, extracted from
259 *Galla chinensis* (90). The temporary neutralisation of parasites at concentrations of 10 and 20
260 mg L⁻¹ in all treatments may be related to the anaesthetic action exerted by *L. alba*, *L.*
261 *origanoides* and *L. sidoides* (70, 76). Thus, this result serves as an alert for a careful use of
262 *Lippia* essential oils for *in vitro* tests against monogeneans, since this neutralising effect may
263 mask the result over the mortality time of the parasites. Therefore, cautious monitoring of the
264 exposure time of organisms to solutions that present compounds with anaesthetic potential is
265 recommended.

266 ***In vivo* test with essential oil of *Lippia sidoides***

267 Monitoring zootechnical performance during *in vivo* tests with phytotherapies is
268 fundamental to verify if the tested product has some anti-nutritional factors which could result
269 in impaired growth and survival. In the present study, fish fed 0.75% essential oil showed

270 reductions in zootechnical performance compared to control fish; however, those fed 1%
271 essential oil did not demonstrate such results. Regarding growth, some studies have shown
272 positive effects of essential oil in the diet. For example, dietary supplementation with essential
273 oil from clove basil (*Ocimum gratissimum*) was tested for Nile tilapia over a period of 55 days
274 and resulted in higher weight gain at the lowest concentration tested (0.5%) (14). The inclusion
275 of 0.1% essential oil from sweet orange (*Citrus sinensis*) in the diet of tilapia over a period of
276 90 days also resulted in increased weight gain (2). On the other hand, there were no differences
277 in weight gain for tilapia fed essential oil from lemon (*Citrus limon*) peel for 60 days (8)
278 Similarly, tilapia fingerlings fed microencapsulated essential oils from oregano, cinnamon,
279 rosemary and pepper extract for 69 days showed no difference in growth and apparent feed
280 conversion (16).

281 In the present study, *L. sidoides* oil did not influence parasite load after 60 days. For
282 trichodinids, there was a prevalence of 100 and 66.67%, a mean intensity of 6.33 and 9.89 at
283 concentrations of 0.25 and 1.0% of *L. sidoides* essential oil, respectively. In the form of
284 therapeutic baths, 3 ppt of garlic oil showed 74% efficacy after 1 h exposition against
285 *Trichodina* in Nile tilapia and 100% efficacy using crude garlic and Indian almond extracts at
286 800 ppm 2 days after treatment; however, the parasites reappeared after two weeks (1). The
287 aqueous extract from *Artemisia vulgaris* at 800 mg L⁻¹ of garlic for 5 days was effective against
288 *Trichodina* sp. and *Aeromonas hydrophila* in tilapia (62).

289 In the present study, the parasitological indices of koi carp fed 0.25; 0.5; 0.75 and 1%
290 *L. sidoides* essential oil were similar to those of the control at 30 days of feeding. There was no
291 reduction in the parasitic load of the fish in the experimental period, with a prevalence of
292 72.22% and a mean intensity of 1.91 at the concentration of 1%, while the control had a
293 prevalence of 66.67% and a mean intensity of 2.06.

294 Throughout the experimental period, the highest and lowest parasite prevalence values
295 were 83.33 to 55.56%, with mean intensities of 8.27 to 4.72 at concentrations of 0.25 and 0.50%
296 of the oil, evidencing that *L. sidoides* essential oil was not effective at the concentrations tested
297 for monogeneans (Table 3).

298 Similarly, in studies with pufferfish *Takifugu rubripes* fed peppermint and cinnamon
299 oils at 2.5 g kg⁻¹ for 20 days, there was no effect on parasitism by *Heterobothrium okamotoi*
300 Ogawa, 1991, (41). Ineffectiveness was also identified regarding dietary supplementation with
301 ginger extract against *Gyrodactylus turnbulli* Harris, 1986, in *Poecilia reticulata* (49). In this
302 study, both the control and treatments had similar results regarding parasitological indices.

303 Different from the present study, in other studies, phytotherapeutics in the diet have
304 shown positive results against monogeneans. Garlic extract at 50 and 150 mL kg⁻¹ in the diet of
305 *Lates calcarifer* reduced the prevalence and intensity of *Neobenedenia* sp (59). Studies using a
306 hydroalcoholic extract of propolis and an aqueous extract of *Aloe* (1:1) at 0.5, 1 and 2% for 15
307 and 21 days in Nile tilapia found a reduction in the prevalence and mean intensity of gill
308 monogeneans (Dactylogyridae) (24). Dietary supplementation with 10 and 20% dry garlic
309 powder reduced the prevalence of dactylogyrid monogeneans in *P. reticulata* (32), and an
310 aqueous rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract in the diet of *Cyprinus carpio* for 10, 20 and
311 30 days reduced the mean intensity of parasitism by the monogenean *D. minutus* after 20 days
312 of treatment (93). It is possible that in the present study, the tested doses of *L. sidoides* essential
313 oil were not high enough to eliminate parasites, and that higher concentrations would be
314 required. In another study, grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) co-infected with *D.*
315 *ctenopharyngodonid* and *I. multifiliis* were fed 4% *Astragalus membranaceus*, *Allium sativum*,
316 *Morus alba* and *Glycyrrhiza uralensis* and treated with baths containing ginger extract at 4 mg
317 L⁻¹, reaching 100% effectiveness at 28 days of treatment (34).

318 On the other hand, *L. sidoides* essential oil may work better as a dietary
319 immunostimulant, which could be confirmed with a bacterial challenge, because, although not
320 reducing parasitism, there was no fish mortality, even with a prevalence of 100%, which
321 reinforces its possible use as immunostimulant. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed
322 0.001% essential oil from *Ducrosia anethifolia* for 60 days and challenged with *Yersinia*
323 *ruckeri*, the oil showed a high effectiveness, improving the immune response and preventing
324 fish mortality (23). Diets supplemented with 0.05% essential oil from oregano (*Origanum*
325 *heracleoticum*) reduced the mortality of catfish *Ictalurus punctatus* challenged with *A.*
326 *hydrophila* by 60% (91). Dietary treatment is the preferred way for the administration of
327 therapeutic products to fish, allowing treatment of fish of all sizes and in all life stages and
328 preventing mortality. As there is no need to capture individuals, stress and injuries are largely
329 avoided, and in addition, other diseases can be treated simultaneously, resulting in lower costs
330 and increased immune responses and resistance to diseases (48, 14).

331 *Dactylogyrus minutus* and *D. extensus*, observed in this study parasitising koi carp
332 gills, are generally found in these organs and can also occur in the nasal cavities of fish (65).
333 This corroborates the findings of other studies with koi carp, where *D. minutus* was the most
334 abundant parasite in the gill filaments of this fish (26, 71). In the present study, *T. reticulata*, *T.*
335 *heterodentata* and *Trichodina* sp. were identified on the body surface of koi carp (54), while in
336 another study, *T. reticulata* was identified for the first time in Brazil, parasitising the skin of *C.*
337 *auratus*, which belongs to the same family as the koi carp (71). The species of *Trichodina* are
338 not specific for koi carp, with *T. reticulata* occurring in *C. carpio* (25) and *T. heterodentata* in
339 the common carp *C. carpio* (9) and in the piauçu *Leporinus macrocephalus* (84). *Trichodina*
340 *heterodentata* has also been reported in *Rhinella pombali* tadpoles (29). Trichodinids are the
341 parasitic agents that most affect fish worldwide (43); they are generally found in the skin and
342 gills, where they cause itching, irritation and other clinical signs. In outbreaks of these parasites,

343 fish present necrosis of the epidermis and erosion of the fins. Carps with immunosuppression
344 or disease may be more affected by trichodinids (68), which serves as a justification for future
345 studies to check the effects of the essential oils on the immune response, and consequently, on
346 disease resistance.

347 **Conclusion**

348 The essential oil from *L. sidoides* was effective *in vitro* against monogenean parasites
349 at concentrations of 40, 60, 80 and 100 mg L⁻¹. However, it was not effective in the *in vivo* test
350 against koi carp parasites at 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0% in the diet. No improvement of the
351 zootechnical performance of the fish was found. Further studies are recommended with other
352 doses to verify its potential to increase disease resistance by enhancing the immune response,
353 as well as the use of the oil in therapeutic baths to reduce parasitism.

354 **Acknowledgements**

355 This study was financed in part by the Coordination of Improvement of Higher
356 Education Personnel, Brazil (CAPES) - Finance Code 001. The authors thank CAPES for PhD
357 scholarship to E.M. Brasil and National Council for Scientific and Technological Development
358 (CNPq) for Research Grant to M.L. Martins (CNPq 305869/2014-0, 306635/2018-6) and J.L.P.
359 Mouriño (CNPq 308292/2014-6).

360 **References**

1. Abd El-Galil MAA, Aboelhadid SM. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Vet Parasitol.* 2012; 185 (2): 57-63. 1
2. Acar Ü, Kesbiç OS, Yılmaz S, Gültepe N, Türker A. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 2015; 437: 282-286.

3. Adams RP. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation; 2007. 804 p.
4. Almeida RR, Damasceno ETS, Carvalho SYB, Carvalho GSG, Gontijo LAP, Lima Guimarães LG. Chitosan nanogels condensed to ferulic acid for the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth encapsulation. *Carb Polym.* 2018; 188(1): 268-275.
5. Andrade VA, Almeida AC, Souza DS, Colen KGF, Macêdo AA, Martins ER, Fonseca FSA, Santos RL. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. *Pesq Vet Bras.* 2014; 34: 1153-1161.
6. Azambuja CR, Mattiazzi J, Riffel APK, Finamor IA, Oliveira Garcia L, Heldwein C. G, Llesuy SF. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture* 2011; 319(1-2): 156-161.
7. Baba E, Acar Ü, Öntaş C, Kesbiç OS, Yılmaz S. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 2016; 465(1):13-18.
8. Basson L, Van JG. *Trichodina* ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of wild and cultured freshwater fishes in Taiwan, with notes on their origin. *Syst Parasitol.* 1994; 28 (3): 197-222.
9. Betancur-Galvis L, Zapata B, Baena A, Bueno J, Ruíz-Nova CA, Stashenko E, Mesa-Arango AC. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia. *Salud* 2011; 43 (2): 141-148.
10. Boonruang K, Kerddonfag N, Chinsirikul W, Mitcham EJ, Chonhencho V. Antifungal effect of poly (lactic acid) films containing thymol and R- (-)-carvone against anthracnose pathogens isolated from avocado and citrus. *Food Control* 2017; 78(1): 85-93.
11. Borji H, Naghibi A, Nasiri MR, Ahmadi A. Identification of *Dactylogyrus* spp. and other parasites of common carp in northeast of Iran. *J Paras Dis.* 2012; 36(2): 234-238.

12. Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA, Montenegro, Heukelbach DJ, Rao VS, Brito GAC. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(3): 349-356.
13. Brum A, Pereira AS, Owatari MS, Chagas EC, Chaves FCM, Mouriño JLP, Martins ML. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 2017; 468(1): 235-243.
14. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol.* 1997; 83(4): 575-583.
14. Campagnolo R, Fresccia A, Bergmann RR, Meurer F, Bombardelli RR, Meurer FF, Bombardelli RA. Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia-do-Nilo. *Rev Bras Saúde Prod Anim.* 2013; 14 (3): 565-573.
15. Castro CE, Ribeiro, JM, Diniz TT, Almeida AC, Ferreira LC, Martins ER, Duarte ER. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 2011. *Rev Bras Plantas Med* 2011; 13 (3): 293-297.
16. Conde R, Corrêa VSC, Carmona F, Contini SHT, Pereira AMS. Chemical composition and therapeutic effects of *Lippia alba* NE Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. *Phytomedicine* 2011; 18(14): 1197-1201.
17. Costa DCM, Vermelho AB, Almeida CA, Dias EPDS, Cedrola SML, Arrigoni-Blank MDF, Alviano CS, Alviano DS. Inhibitory effect of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes. *J Enz Inhib Med Chem.* 2014; 29 (1): 12-17.

18. Costa JC, Valladão GMR., Pala G, Gallani SU, Kotzent S, Crotti AEM, Fracarollic L, Mangabeirada JJ, Silva Pilarski F. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture* 2017; 471(1): 72-79.
19. Costa JGM, Rodrigues FFG, Silva EC, Mota MR, Santos NKA, Cardoso, ALH, Lemos TLG. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Ver Bras Farmacog.* 2005; 15 (4): 304-309.
20. Dairiki JK, Majolo C, Chagas EC, Chaves FCM, Oliveira MR, Morais IDS. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. Manaus (AM). 2013. 8 p. ISSN 1517- 2449.
21. Dehghan F, Vazirzadeh A, Soltanian S, Karami A, Akhlaghi M. Mortality rate and immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Yersinia ruckeri* subsequent to feeding on diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. *Int J Aquat Biol.* 2016; 4 (5): 340-344.
22. Dotta G, Brum A, Jeronimo GT, Maraschin M, Martins ML. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Braz. J Vet Parasitol.* 2015; 24 (1): 66-71.
23. Dove ADM, O'Donoghue Peter J. *Trichodinids* (Ciliophora: Trichodinidae) from Native and Exotic Australian Freshwater Fishes. *Acta Protozool.* 2005; 44 (2): 51-60.
24. Dzika E, Dzikowec M, Hoffmann RW. Description of the development of the attachment and copulatory apparatus of *Dactylogyrus extensus* from *Cyprinus carpio* var. koi. *Parasitol Inst SAS.* 2009; 46(1): 39 - 44.
25. Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil. 1st ed. Maringá: Clichetec; 2010. 333p.

26. Escobar P, Leal SM, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105 (2): 184-190.
27. Fernandes NM, Sartini B, Dias RJP, D'Agosto M. Quantitative study of *Trichodina heterodontata* (Ciliophora: Mobilis) infrapopulations infesting tadpoles of a Brazilian endemic toad *Rhinella pombali* (Anura: Bufonidae). Zoologia. 2011; 28 (6): 777-783.
28. Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, Kerntopf MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Tomé AR, Queiroz MGR, Nascimento NRF, Sidrim JJC, Rocha MFG. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. J Antimicrob Chemoth. 2007; 59(5): 934-940.
29. Fracalossi DM, Cyrino JEP. Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1st ed. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática; 2012. 375p.
30. Fridma S, Sinai T, Zilberg D. Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). Vet Parasitol. 2014; 203(1-2): 51-58.
31. Fu YW, Wang B, Zhang QZ, Xu DH, Lin DJ, Yang XY, Zhu SQ, Pan JY, Deng Q, Liu YM, Zhou SY. Combined effects of Chinese medicine feed and ginger extract bath on co-infection of *Ichthyophthirius multifiliis* and *Dactylogyrus ctenopharyngodonid* in grass carp. Parasitol Res. 2017; 116 (7):2017-2025.
32. Fu YW, Zhang QZ, Xu D, Liang, JH, Wang B. Antiparasitic Effect of Cynatratoside C from *Cynanchum atratum* against *Ichthyophthirius multifiliis* on Grass Carp. J Agric Food Chem. 2014; 62 (29): 7183-7189.

33. Gomes AF, Almeida MP, Leite MF, Schwaiger S, Stuppner H, Halabalaki M, Amaral JG, David JM. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. Food Chem. 2019; 273 (1): 186-193.
34. Hashimoto GSO, Neto FM, Ruiz ML, Acchile M, Chagas EC, Chaves, FCM, Martins ML. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. Aquaculture 2016; 450 (1): 182-186.
35. Hatano VY, Torricelli AS, Giassi ACC, Coslope LA, Viana MB. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R) (-)-carvone in the elevated T-maze. Braz J Med Biol Res. 2012; 45 (3): 238-243.
36. Heinzmann BM, Barro FMC. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) n. e. brown (verbenaceae). Saúde 2007; 33 (1): 43-48.
37. Heldwein CG, Silva LDL, Gai EZ, Roman C, Parodi TV, Bürger ME, Baldisserotto B, Flores EMM, Heinzmann BM. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). Vet Anaesth Analog. 2014; 41(6): 621-629.
38. Hirazawa N, Ohtaka T, Hata K. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. Aquaculture 2000; 188 (1-2): 1-13.
39. Jerônimo GT, Marchiori NC, Pádua SB, Neto JD, Pilarski F, Ishikawa MM, Martins ML. *Trichodina colisae* (Ciliophora: Trichodinidae): new parasite records for two freshwater fish species farmed in Brazil. Braz J Vet Parasitol. 2012; 21(4): 366-371.
40. Jerônimo GT, Tavares-Dias M, Martins, ML, Ishikawa MM. Manual para coleta de parasitos em peixes de cultivos. Brasília (DF). Embrapa; 2012. 36p.

41. Jiang C, Wu ZQ, Liu L, Liu GL, Wang GX. Synergy of herbal ingredients combination against *Dactylogyrus* spp. In an infected goldfish model for monogenean management. *Aquaculture* 2014; 433(1): 115-118.
42. Klein BM. The dry silver method and its proper use. *J Protozool.* 1958; 5(2): 99-103.
43. Kritsky DC, Heckmann R. Species of *Dactylogyrus* (Monogeneoidea: Dactylogyridae) and *Trichodina mutabilis* (Ciliata) infesting koi carp, *Cyprinus carpio*, during mass mortality at a commercial rearing facility in Utah, USA. *Comp Parasitol.* 2002; 69(2): 217-218.
44. Kulwiec Z. Untersuchungen an Arten des Genus *Dactylogyrus* Diesing. *Bull. Acad. Polonaise Sci. Lett.* 1927; 2(1): 113-144.
45. Leibowitz MP, Chettri JK, Ofir R, Zilberg D. Treatment development for systemic *Tetrahymena* sp. infection in guppies, *Poecilia reticulata* Peters. *J. Fish Dis.* 2010; 33(6): 473-480.
46. Levy G, Zilberg D, Paladini G, Fridman, S. Efficacy of ginger-based treatments against infection with *Gyrodactylus turnbulli* in the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Vet Parasitol.* 209 (3-4): 235-241.
47. Magalhães ALB, Jacobi CM. E-commerce of freshwater aquarium fishes: potential disseminator of exotic species in Brazil. *Acta Sci.* 2010; 32 (3): 243-248.
48. Majolo C, Rocha SIB, Chagas EC, Chaves FCM, Bizzo HR. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res.* 2017; 48 (5): 2380-2387.
49. Malheiros DF, Maciel PO, Videira MN, Tavares-Dias M. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture* 2016; 455(1): 81-86.

50. Marco CA, Teixeira E, Simplício A, Oliveira C, Costa J, Feitosa J. Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Chilean J Agric Res. 2012; 72 (1): 157-160.
51. Martins ML, Marchiori N, Roumbedakis K, Lami F. *Trichodina nobilis* Chen, 1963 and *Trichodina reticulate* Hirschmann et Partsch, 1955 from ornamental freshwater fishes in Brazil. Braz J Biol. 2012; 72 (2): 281-286.
52. Martins ML, Mouriño JLP, Chagas EC, Silva BC, Fujimoto RY, Pádua SB. Ectoparasitários na aquicultura. In: Baldisserotto B, Gomes LC, Heinzmann BM, Cunha MA. Farmacologia aplicada à aquicultura. Santa Maria: Editora da UFSM, 2017. p. 127-181.
53. Martins ML, Cardoso L, Furtado, WE, Tancredo KR, Lehmann NB, Figueiredo AB, Steckert LD, Silva KAG, Padua SB, Ferreira TH. Histopathology guide for freshwater fish. 1st ed. Florianópolis: Editora da UFSC; 2018. 62p.
54. Mattos SH, Innecco R, Marco CA, Araújo AV. Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. Banco do Nordeste do Brasil 2007; 1 (1): 61-63.
55. Matos F.J.A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil - Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown (Verbenaceae). Parte II - Farmacoquímica. Rev Bras Farmácia 1996; 77: 137-141.
56. Militz TA, Southgate PC, Carton AG, Hutson KS. Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in aquaculture. Aquaculture 2013; 408-409: 95-99.
57. Mueller JF, Van Cleave HJ. Parasites of Oneida Lake fishes. Part II. Descriptions of new considerations, especially, concerning the trematoda family Heterophyidae. Roosevelt Wild Life Ann. 1932; 111(2): 79-137.

58. Noor El Deen AIE, Mohamed RA. Application of some medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Report and Opinion. 2009; 12 (17): 1.
59. Pádua SB, Martins ML, Carraschi SP, Cruz C, Ishikawa MM. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae): a new parasite for *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae). Zootaxa 2012, 3422: 62-68.
60. Pahor-Filho E, Júnior JP, Pilarski F, Urbinati EC. Levamisole reduces parasitic infection in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Aquaculture 2017; 470: 123-128.
61. Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM. Doenças de peixes. Profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3rd ed. Maringá: EDUEM; 2008. 305p.
62. Peixoto MG, Costa-Júnior LM, Blank AF, Lima AS, Menezes TSA, Santos DA, Alves PB, Cavalcanti SCH, Bacci L, Arrigoni-Blank MF. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. Vet Parasitol. 2015; 210: 118-122.
63. Porfírio EM, Melo HM, Pereira AMG, Cavalcante TTA, Gomes GA, Carvalho MG, Costa RA, Júnior FEAC. *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. Scient. World J. 2017. 2017(1): 1-7.
64. Portz L, Antonucci AM, Ueda BH, Dotta G, Guidelii G, Roumbedakis K, Martins ML, Carniel MK, Tavechio WLG. Parasitos de peixes de cultivo e ornamentais. In: Pavanelli GC, Takemoto RM, Eiras JC, editor. Parasitologia de peixes de água doce do Brasil. Maringá: Eduem. p. 85-114.
65. Salbego J, Maia JLS, Toni C, Rodrigues ASS, Sousa EMO, Silva LVF, Mourão, RHV, Barata LES, Heinzmann BM, Baldisserotto B. Anesthesia and sedation of map treefrog (*Hypsiboas geographicus*) tadpoles with essential oils. Ciênc Rur. 2017; 47 (11): 1-6.

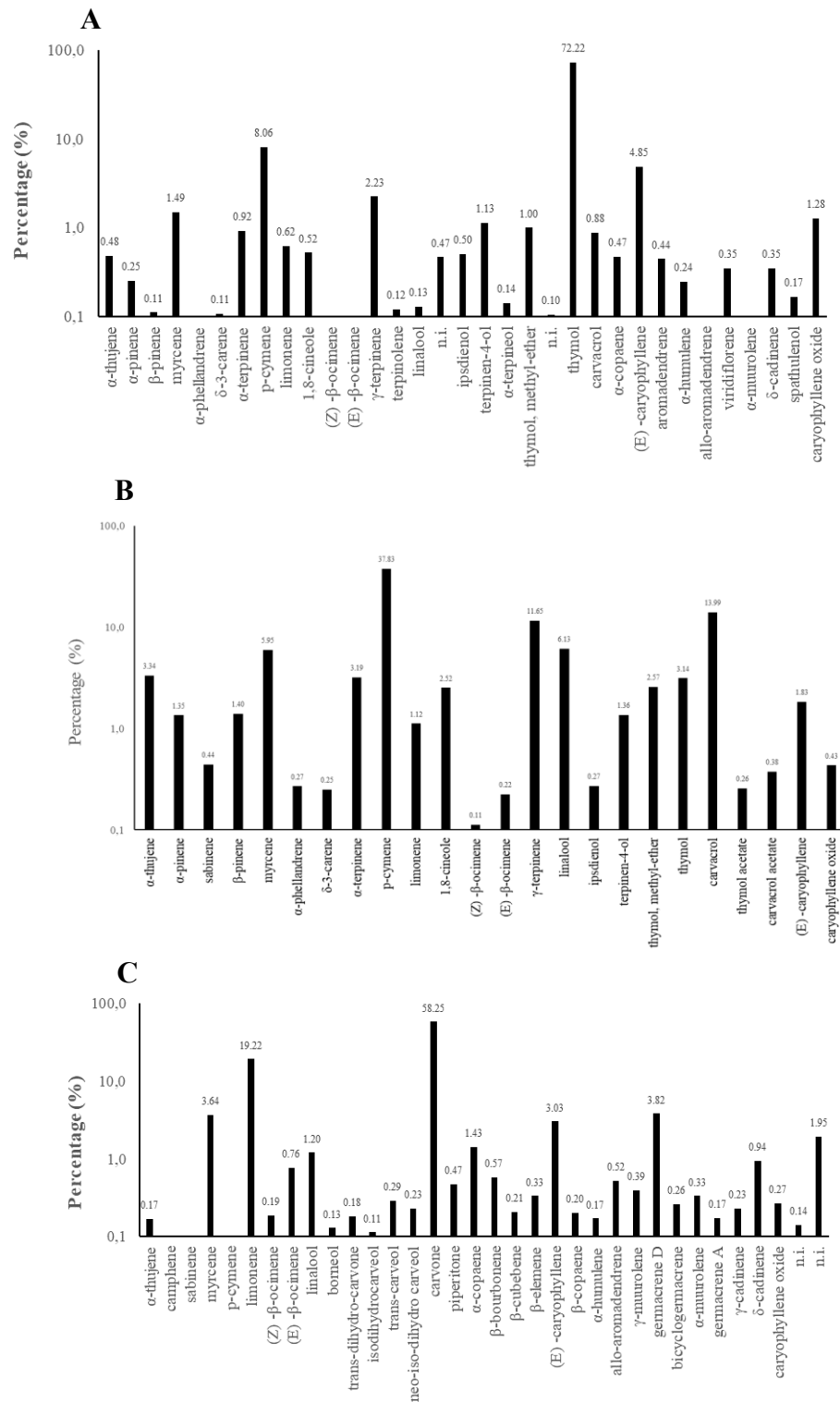
66. Santos MA, Jerônimo GT, Cardoso L, Tancredo KR, Medeiros PB, Ferrarezi, JV, Gonçalves ELT, Assis GC, Martins ML. Parasitic fauna and histopathology of farmed freshwater ornamental fish in Brazil. *Aquaculture* 2017; 470: 103-109.
67. Sarrazin SLF, Silva LA, Assunção APF, Oliveira RB, Calao VYP, Silva R, Stashenko EE, Maia JGS, Mourão RHV. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Molecules* 2015; 20(2): 1860-1871.
68. Secex - Sistema de Análise de Informações do Comércio Exterior. Exportação e importação em geral. Brasília (DF). Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Comex Stat. 2018 Dec. Available from: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>.
69. Silveira JC, Busato NV, Costa AOS, Junior EFC. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. *Enc Biosf.* 2012; 8 (15): 2038-2052.
70. Soares BV, Tavares-Dias M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia* 2013; 3 (1): 109-123.
71. Soares BV, Neves LR, Ferreira DO, Oliveira MSB, Chaves FCM, Chagas EC, Gonçalves RA, Tavares-Dias M. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Vet Parasitol.* 2017; 234: 49-56.
72. Souza CF, Baldissera MD, Bianchini AE, Silva EG, Mourão RHV, Silva LVF, Schmidt D, Heinzmann BM, Baldisserotto B. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiol Biochem.* 2018; 44(1): 21-34.
73. Sutili FJ, Lima Silva L, Gressler LT, Battisti EK, Heinzmann BM, Vargas AC, Baldisserotto B. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish. *J Appl Microbiol.* 2015; 119 (1): 47-54.

74. Toni C, Becker AG, Simões LN, Pinheiro CG, Lima Silva L, Heinzmann BM, Caron BO; Baldisserotto B. Fish anesthesia: Effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiol Biochem*. 2014; 40 (3): 701-714.
75. Valentim DSS, Duarte JL, Oliveira AEMFM, Cruz RAS, Carvalho JCT, Conceição EC, Fernandes CP, Tavares-Dias M. Nanoemulsion from essential oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows in vitro efficacy against monogeneans of *Collossoma macropomum* (Pisces: Serrasalmidae). *J Fish Dis*. 2018; 41 (3): 443-449.
76. Valladão GMR, Pádua SB, Gallani SU, Menezes-Filho RN, Dias-Neto J, Martins ML, Ishikawa MM, Pilarski F. *Paratrichodina africana* (Ciliophora): a pathogenic gill parasite in farmed Nile tilapia. *Vet Parasitol*. 2013; 197(3-4): 705-710.
77. Valladão GMR, Giannecchini LG, Martins ML, Pádua SBD. *Trichodina modesta*: an exotic ciliate in the neotropical region parasitizing an unusual host. *Braz J Vet Parasitol*. 2015; 24 (2): 162-167.
78. Valladão GMR, Gallani SU, Ikefuti VC, Cruz C, Levy-Pereira N, Rodrigues MVN, Pilarski, F. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *J Fish Dis*. 2016; 39 (10): 1143-1152.
79. Veras NH, Rodrigues FFG, Botelho MA, Menezes IRA, Coutinho HDM, Costa JGM. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the thymol. *Arab J Chem*. 2017; 10 (2): 2790-2795.
80. Wing-Keong, Ng, Wang, Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture* 2011; 314 (1-4): 122-131.

81. Xu D, Shoemaker CA, Martins ML, Pridgeo JW, Klesiu PH. Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium *Edwardsiella ictaluri* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Microb.* 2012; 158 (1-2): 216-219.
82. Yamamoto PY. Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. [dissertação]. [Campinas]: Instituto agrônômico-USP; 2006. 90 p.
83. Zhang Q, Xu De-Hai, Klesius PH. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Gallachinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Parasitol.* 2013; 198 (1-2): 45-53.
84. Zheng ZL, Tan JYW, Liu HY, Zhou XH, Xiang X, Wang KY. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 2009; 292: 214-218.
85. Zoghbi MGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MHL, Maia JGS. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon. *Flav Frag J.* 1998; 13 (1): 47-48.
86. Zoral MA, Futami K, Endo M, Maita M, Katagiri T. Anthelmintic activity of *Rosmarinus officinalis* against *Dactylogyrus minutus* (Monogenea) infections in *Cyprinus carpio*. *Vet Parasitol.* 2017; 247: 1-6.

361

LEGENDS AND TABLES



362 **Figure 1:** Chemical composition of the essential oils from *Lippia sidoides* (A), *Lippia*
 363 *organoides* (B) and *Lippia alba* (C).

364 **Table 1:** *In vitro* test with crescent levels of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia origanoides* and *Lippia*
 365 *sidoides*, separately and in combination, at 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg L⁻¹, with water control and grain alcohol
 366 control.

Concentration of essential oils (mg L ⁻¹)	Mortality time	Initial number of parasites	Final number of dead parasites	Mortality rate (%)
Water control	3 h 57 min	23	23	100.00
Alcohol control	5 h 29 min	19	15	78.95
<i>L. alba</i>				
10	4 h 47 min ^{a*#}	19	16	84.21
20	4 h 48 min ^{a*}	29	27	93.10
40	4 h 24 min ^{a*}	38	29	76.32
60	4 h 12 min ^{a*}	32	25	78.13
80	3 h 17 min ^{b*}	25	23	92.00
100	3 h 12 min ^{b*}	30	30	100.00
<i>L. origanoides</i>				
10	2 h 24 min ^a	19	19	100.00
20	1 h 45 min ^a	16	16	100.00
40	25 min ^b	18	18	100.00
60	9 min ^c	18	18	100.00
80	7 min ^c	20	20	100.00
100	5 min ^c	18	18	100.00
<i>L. sidoides</i>				
10	2 h 58 min ^a	20	20	100.00
20	1 h 26 min ^b	17	17	100.00
40	8 min ^c	25	25	100.00
60	6 min ^c	19	19	100.00
80	7 min ^c	24	24	100.00
100	5 min ^c	17	17	100.00
<i>L. alba + L. origanoides</i>				
10	4 h 27 min ^{a*}	28	21	75.00
20	4 h 53 min ^{a*}	25	16	64.00
40	4 h 5 min ^{a*}	21	12	57.14
60	12 min ^b	23	23	100.00
80	11 min ^b	20	20	100.00
100	8 min ^b	22	22	100.00
<i>L. alba + L. sidoides</i>				
10	4 h 6 min ^{a*}	16	4	25.00
20	4 h 6 min ^{a*}	24	14	58.33
40	2 h 23 min ^b	17	17	100.00
60	20 min ^c	21	21	100.00
80	19 min ^c	30	30	100.00

100	6 min ^d	16	16	100.00
<i>L. origanoides</i> + <i>L. sidoides</i>				
10	4 h 38 min ^{a*}	18	12	66.67
20	4 h 37 min ^{a*}	18	9	50.00
40	4 h 26 min ^{a*}	47	22	46.61
60	1h 3 min ^b	26	26	100.00
80	8 min ^c	31	31	100.00
100	6 min ^c	22	22	100.00
<i>L. alba</i> + <i>L. origanoides</i> + <i>L. sidoides</i>				
10	4 h 17 min ^{a*}	14	12	85.71
20	4 h 12 min ^{a*}	15	13	86.67
40	3 h 16 min ^b	27	27	100.00
60	32 min ^c	43	43	100.00
80	10 min ^d	26	26	100.00
100	9 min ^d	39	39	100.00

367 * Identical to water control # Identical to alcohol control. Different letters indicate significant
 368 difference (p<0.05) among concentrations in the same treatment, by Tukey's test.

369 **Table 2:** Zootechnical parameters (mean±standard deviation) from koi carp fed supplemented diets with different
 370 concentrations of *Lippia sidoides* essential oil. WG: weight gain, SL: standard length, PER: protein efficiency rate,
 371 MIFI: mean individual feed intake, AFC: apparent feed conversion, SGR: specific growth rate, SR: survival rate.

Concentration of essential oil of <i>Lippia sidoides</i>						
Parameters	Control	0.25%	0.50%	0.75%	1.0%	<i>p</i>
WG	3.79±0.44 ^a	3.89±0.31 ^a	2.67±0.29 ^{ab}	2.38±0.70 ^b	3.23±0.56 ^{ab}	0.011
SL (cm)	3.54±0.18	3.48±0.22	3.29±0.57	3.26±0.32	3.61±0.65	0.812
PER	0.92±0.13 ^a	0.94±0.10 ^a	0.67±0.08 ^{ab}	0.58±0.17 ^b	0.80±0.13 ^{ab}	0.020
MIFI	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.294
AFC	0.02±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00	0.069
SGR	6.32±0.73 ^a	6.48±0.52 ^a	4.45±0.48 ^{ab}	3.97±1.16 ^b	5.38±0.93 ^{ab}	0.011
SR (%)	100	100	100	100	100	-

372 WG: weight gain, SL: standard length, PER: protein efficiency rate, MIFI: mean individual feed
 373 intake, AFC: apparent feed conversion, SGR: specific growth rate, SR: survival rate. Different
 374 letters indicate significant difference among treatments by Tukey's test (p<0.05).

375 **Table 3:** Parasitological indexes (mean \pm standard deviation) of monogeneans from koi carp in net tanks, fed
 376 control and supplemented diets with 0.25%, 0.5%, 0.75% and 1% of essential oil from *Lippia sidoides*.

		30 Days				60 Days			
TR	IS	P (%)	MA	MD	MI	P (%)	MA	MD	MI
0.00	M	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	66.67	1.44 \pm 1.01	0.05 \pm 0.03	2.06 \pm 1.29	72.22	2.56 \pm 1.58	0.15 \pm 0.09	3.42 \pm 1.77
0.25	M	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	66.68	3.22 \pm 1.82	0.82 \pm 1.16	3.38 \pm 1.84	83.33	6.89 \pm 2.83	0.21 \pm 0.08	8.27 \pm 3.40
0.50	M	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	61.11	3.50 \pm 6.06	0.06 \pm 0.1	4.20 \pm 7.27	55.56	2.56 \pm 1.66	0.09 \pm 0.06	4.72 \pm 1.39
0.75	M	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	61.48	1.67 \pm 1.74	0.06 \pm 0.06	2.22 \pm 1.95	66.67	3.83 \pm 2.20	0.09 \pm 0.05	5.40 \pm 1.31
1.00	M	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	72.22	2.11 \pm 0.91	0.06 \pm 0.02	1.91 \pm 0.62	77.78	3.83 \pm 2.58	0.17 \pm 0.11	5.58 \pm 3.45

377 Treatment (TR), prevalence (P%), mean abundance (MA), mean dominance (MD), mean
 378 intensity (MI), infestation site (IS), gills (G), mucus from body surface (M).

379 **Table 4:** Parasitological indexes (mean \pm standard deviation) of trichodinids from koi carp in net tanks, fed control
 380 and supplemented diets with 0.25%, 0.5%, 0.75% and 1% of essential oil from *Lippia sidoides*.

		30 Days				60 Days			
TR	IS	P (%)	MA	MD	MI	P (%)	MA	MD	MI
0.00	M	88.89	9.17 \pm 3.24	0.28 \pm 0.1	10.08 \pm 1.72	77.78	2.83 \pm 2.36	0.17 \pm 0.14	3.35 \pm 2.72
	G	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	M	83.33	4.61 \pm 0.75	0.18 \pm 0.03	5.56 \pm 0.21	88.89	3.61 \pm 1.41	0.11 \pm 0.04	4.00 \pm 1.24
	G	0	0	0	0	0	0	0	0
0.50	M	83.33	34.89 \pm 42.06	0.24 \pm 0.11	16.87 \pm 7.91	100	6.06 \pm 2.27	0.23 \pm 0.08	9.89 \pm 6.09
	G	0	0	0	0	0	0	0	0
0.75	M	77.78	7.78 \pm 6.01	0.27 \pm 0.21	9.37 \pm 6.64	100	9.28 \pm 6.09	0.23 \pm 0.15	9.28 \pm 6.09
	G	0	0	0	0	0	0	0	0
1.00	M	94.44	8.56 \pm 4.58	0.25 \pm 0.13	8.98 \pm 4.33	66.67	3.67 \pm 2.72	0.16 \pm 0.12	6.33 \pm 6.04
	G	0	0	0	0	0	0	0	0

381 Treatment (TR), prevalence (P%), mean abundance (MA), mean dominance (MD), mean
 382 intensity (MI), infestation site (IS), gills (G), mucus from body surface (M).

CAPÍTULO II

1 **Parâmetros histopatológicos e hematológicos de carpa koi (*Cyprinus carpio*) alimentadas** 2 **com ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides***

3 Elenice Martins Brasil^{a*}, Aline Brum Figueredo^a, Lucas Cardoso^a, Guilherme da Costa Assis^b,
4 Elisabeth de Aguiar Bertaglia^a, Leyciane Tayana de Souza Silva^a, Karen Roberta Tancredo^a,
5 Leonardo Schorcht Porto Ferreira^c, Marcelo Roseo de Oliveira^c, Edsandra Campos Chagas^c,
6 Maurício Laterça Martins^a.

7 ^aLaboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos. Departamento de Aquicultura,
8 Centro de Ciências Agrárias (CCA). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod.
9 Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. *e-mail: nicebrasil@hotmail.com

10 ^bFazenda Vale dos Bettas, Rua Rod. Pref. João Brasil de Azevedo s/n, Biguaçu, SC, Brasil.

11 ^cLaboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce - Lapad, Departamento de
12 Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina
13 (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

14 ^dEmbrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM 10, km 29 s/n, 69010-970, Manaus, AM, Brasil.

15 “Highlights”

16 - Óleo essencial de *Lippia sidoides*, e seu efeito sobre os órgãos da carpa koi mantida em tanque-
17 rede.

18 - Influência da ração suplementada com óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre o rim e coração
19 da capa koi.

20 - Ação do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre a hematologia da carpa koi em tanques-rede
21 por 30 e 60 dias.

22 **Resumo**

23 Os óleos essenciais vêm sendo estudados por promoverem respostas ao sistema imunológico,
24 crescimento, estimulante da mucosa do intestino, fígado e pâncreas para melhor absorção de
25 nutrientes. No entanto, são poucos os estudos voltados aos possíveis efeitos histológicos e
26 hematológicos em peixes ornamentais. Este estudo avaliou os efeitos da inclusão do óleo de
27 *Lippia sidoides* aspergidos na ração sobre os parâmetros hematológicos e histopatológicos da
28 carpa koi *Cyprinus carpio*. O óleo foi obtido pelo método de hidrodestilação e seus constituintes
29 químicos identificados por cromatografia acoplada a espectrofotômetro de massa. As dietas
30 foram preparadas com a inclusão de 0,0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0% do óleo de *L. sidoides* na ração,
31 em triplicata. Um total de 300 carpas com peso médio inicial de $3,56 \pm 0,68$ g foram distribuídas
32 aleatoriamente em 15 tanques-rede e alimentadas duas vezes ao dia. Ao final de 30 e 60 dias de
33 alimentação, foram retirados cinco peixes por unidade experimental para análise histológica e
34 hematológica. A análise histopatológica do tecido renal apresentou dilatação dos capilares na
35 concentração de 1,0% do óleo de *L. sidoides* aos 60 dias de alimentação, em relação a 0,0, 0,25,
36 0,50, 0,75%. O coração apresentou maior infiltração eosinofílica no período de 60 dias em
37 relação a 30 dias. Os parâmetros hematológicos não foram alterados em nenhuma das
38 concentrações do óleo. Os principais compostos químicos identificados no óleo de *L. sidoides*
39 foram o timol (72,2%), *p*-cimeno (8,15%) e (*E*)-cariofileno (4,9%). Concluiu-se que a
40 suplementação dietária com óleo essencial de *Lippia sidoides* até 1% por 30 dias é seguro e não
41 causa alterações deletérias na carpa koi.

42 **Palavras-chave:** peixe ornamental, fitoterápico, tanque-rede, dieta, hematologia

43 **Abstract**

44 Essential oils have been studied for promoting immune system responses, growth, intestinal
45 mucosal stimulant, liver and pancreas for better nutrient absorption. However, there are few

46 studies on the possible histological and hematological effects on ornamental fish. This study
47 evaluated the effects of inclusion of sprayed *Lippia sidoides* oil on the diet on the hematological
48 and histopathological parameters of koi *Cyprinus carpio* carp. The oil was obtained by
49 hydrodistillation method and its chemical constituents identified by chromatography coupled
50 to mass spectrophotometer. The diets were prepared with the inclusion of 0.0; 0.25; 0.5; 0.75
51 and 1.0% of *L. sidoides* oil in the diet, in triplicate. A total of 300 carps with initial average
52 weight of 3.56 ± 0.68 g were randomly distributed in 15 net tanks and fed twice a day. After 30
53 and 60 days of feeding, five fish were removed per experimental unit for histological and
54 hematological analysis. Histopathological analysis of renal tissue showed dilatation of the
55 capillaries at a concentration of 1.0% of *L. sidoides* oil at 60 days of feeding, compared to 0.0,
56 0.25, 0.50, 0.75%. The heart presented greater eosinophilic infiltration in 60 days compared to
57 30 days. Hematological parameters were not altered at any of the oil concentrations. The main
58 chemical compounds identified in *L. sidoides* oil were thymol (72.2%), p-cymene (8.15%) and
59 (E) caryophyllene (4.9%). It was concluded that dietary supplementation with *Lippia sidoides*
60 essential oil up to 1% for 30 days is safe and does not cause deleterious changes in koi carp.
61 **Key words:** ornamental fish, phytotherapeutic, net cage, diet, hematology.

62 1. Introdução

63 O interesse por peixes ornamentais tem sido crescente e contínuo no Brasil e no mundo.
64 De acordo com dados da INFOFISH international (2016), em 2014, Singapura ocupava a
65 liderança no ranking em exportação de peixes ornamentais, faturando no referido ano US\$
66 69,32 milhões, sendo considerada a capital do pescado ornamental do mundo, contribuindo com
67 cerca de 20% da oferta total. Até hoje, continua sendo o principal centro de comércio na Ásia,
68 seguida pelo Japão (US \$ 41,34 milhões), mantendo estável a participação no mercado devido
69 ao seu nicho de carpas koi *Cyprinus carpio*. Em terceiro lugar, destaca-se a República Checa
70 com fornecimentos US \$ 32,0 milhões, seguida pela Tailândia (US \$ 23,31 milhões), Malásia
71 (US \$ 22,62 milhões), Indonésia (US \$ 21,54 milhões), Israel (US \$ 19,04 milhões), Brasil (US
72 \$ 18,52 milhões), Sri Lanka (US \$ 13,1 milhões) e Colômbia (US \$ 12,3 milhões).

73 Neste mercado, diversas espécies estão sendo cultivadas e comercializadas. Dentre as
74 espécies mais cultivadas no Brasil estão as exóticas, por apresentarem algumas vantagens, tais
75 como, rusticidade ao manejo, tolerância a variações de temperatura, domínio do processo
76 reprodutivo em cativeiro, adaptação a vários sistemas de cultivo e aceitação de diversos itens

77 alimentares, o que facilita sua criação por parte de profissionais e robistas (ABINPET, 2018;
78 Faria et al., 2016 Giannecchini et al., 2012; Rothbard et al., 2010).

79 Entre os peixes exóticos cultivados no Brasil que apresentam tais características estão
80 as carpas koi (*Cyprinus carpio*), que possuem grande demanda e elevado valor comercial
81 ocupando a segunda posição entre os peixes ornamentais mais cultivados e comercializados no
82 mercado nacional (Magalhães e Jacobi, 2010; Secex, 2016). Apesar das carpas possuírem
83 facilidade em aceitar alimentos exógenos, ainda não se tem relato de estudos com óleo essencial
84 de *Lippia sidoides* na ração, avaliando as possíveis alterações hematológicas e histologia dos
85 órgãos da carpa koi, uma vez que os óleos essenciais têm apresentado bons resultados na
86 aquicultura (Dehghan et al., 2016; Ngugi et al., 2017; Silva et al., 2019; Zheng et al., 2009).

87 Os óleos essenciais de plantas são compostos complexos de substâncias voláteis,
88 líquidas, lipofílicas e geralmente odoríferas, sendo extraídos de várias partes dos vegetais, tais
89 como cascas, caule, frutos, sementes e principalmente de folhas (Harbone, 1984; Traesel et al.,
90 2011; ISSO 9235, 2013). Estes compostos vegetais estão sendo testados em animais aquáticos
91 em formas de banho terapêutico, tratamento profilático, redutor de estresse (Teixeira et al.,
92 2018), anestésicos, sedativos e na alimentação (Hashimoto et al., 2016; Souza et al., 2018; Toni
93 et al., 2014). Na nutrição, os óleos vegetais estão sendo utilizados para melhorar o desempenho
94 zootécnico (Hassaan e Soltan, 2016), aumentar a imunidade dos animais (Dehghan et al., 2016;
95 Vazirzadeh et al., 2017), reduzir a mortalidade frente a infecções bacterianas (Acar et al., 2015;
96 Gulec et al., 2013), como imunomoduladores (Ngugi et al., 2017;) e como tratamentos
97 terapêuticos para diversos patógenos na aquicultura (Acar et al., 2015; Baba et al., 2017; Santos
98 et al., 2017; Silva et al., 2019).

99 Dentre os vegetais ricos em óleos essenciais e com diversas atividades biológicas está
100 o gênero *Lippia*. Este gênero é de origem brasileira e tem tolerância a vários tipos de ambientes.
101 Além de crescimento vegetativo rápido, é rico em óleos essenciais, com rendimento que pode
102 variar de 2,44 a 4,4% (Yamamoto, 2006; Zoghbi et al., 1998). Das inúmeras espécies deste
103 gênero, se destaca a *Lippia sidoides*, conhecido como alecrim-pimenta, esta espécie detém
104 diversas atividades biológicas comprovadas, como antifúngica contra *Candida* spp. (Fontenelle
105 et al., 2007). Na aquicultura, o óleo tem sido avaliado como antibacteriano contra as bactérias
106 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Castro et al., 2011), *Aeromonas hydrophila* (Majolo
107 et al., 2017) e como antiparasitário contra monogenoídeos de tambaqui, *Colossoma*
108 *macropomum* e tilápia, *Oreochromis niloticus* (Hashimoto et al., 2016; Soares et al., 2017).

109 Apesar das diferentes formas de aplicação dos óleos vegetais nos animais aquáticos,
110 pouco se conhece sobre seus efeitos sobre os parâmetros hematológicos e histológicos após
111 incorporação na ração de peixes ornamentais.

112 Os parâmetros hematológicos são ferramentas úteis para diferentes diagnósticos na
113 aquicultura, sendo estes empregados para diversas espécies e com várias finalidades, inclusive
114 para avaliar possíveis mudanças causadas pela utilização de fitoterápicos (Brum et al., 2017;
115 Ranzani-Paiva et al., 2013; Chagas et al., 2016; Silva et al., 2019). Dentre as alterações
116 analisadas estão o aumento ou redução no número de basófilos, leucócitos, monócitos,
117 neutrófilos, hematócrito, eritrócitos (RBC) e concentração de hemoglobina corpuscular média
118 (Harikrishnan et al., 2012; Jerônimo et al., 2014; Oliveira et al., 2018; Panjvini et al., 2016).

119 Para peixes ornamentais, a histologia e a hematologia têm sido pouco empregadas e o
120 número de estudos são reduzidos. Dada a relevância destas análises e a importância do uso dos
121 óleos essenciais como promotores de crescimento e tratamento de enfermidades na criação de
122 peixes ornamentais, se faz necessário conhecer os eventuais efeitos adversos e o
123 estabelecimento de doses-limites para o uso seguro destas substâncias. Dessa forma, o objetivo
124 deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação na ração com óleo essencial de *Lippia*
125 *sidoides* sobre os parâmetros hematológicos e histológicos de carpa koi.

126 **2. Material e Métodos**

127 **2.1 Material biológico**

128 As carpas koi com peso médio de $3,56 \pm 0,68$ g e comprimento padrão de $4,71 \pm 0,54$ cm
129 foram adquiridas da piscicultura Vale dos Bettas, localizada no município de Biguaçu, no
130 estado de Santa Catarina. O ensaio *in vivo* foi desenvolvido na própria fazenda, realizado em
131 tanques-rede de 1,0 x 1,0 x 1,30 m com 0,5 cm de abertura de malha, instalados em uma represa
132 com aproximadamente 1 hectare de área total. Todos os procedimentos com os animais foram
133 aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC 1440100217).

134 **2.2 Obtenção e composição química dos óleos essenciais**

135 O óleo essencial foi obtido a partir das folhas de plantas cultivadas e processadas no
136 Laboratório de Plantas Mediciniais e Fitoquímica da EMBRAPA Amazônia Ocidental,
137 localizado em Manaus, Amazonas. Após a coleta das folhas pela manhã, elas foram secas em
138 estufa de circulação contínua de ar à 45°C por 48 h e em seguida foi realizada a extração do
139 óleo essencial pelo processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Silveira et al.,
140 2012; Matos, 2007).

141 A composição química do óleo de *L. sidoides* foi determinada pelo método de
142 cromatografia em fase gasosa com equipamento Agilent 6890, e detector seletivo de massas
143 Agilent 5973N. A separação dos componentes foi realizada em uma coluna capilar HP5-MS
144 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com temperatura de 60° a 240°C, com variação de 3°C min⁻¹. Foi
145 injetado 1,0 µL de uma solução contendo 1% de cada óleo no divisor de fluxo na proporção de
146 (1: 100) e mantido a 250 °C. A quantificação relativa (%) dos componentes dos óleos foi
147 realizada em cromatógrafo a gás Agilent 6890N, que foi equipado com um detector de
148 ionização por chama, mantido a 280 °C, e por uma coluna capilar HP5 (30 m x 0,32 mm x 0,25
149 µm) com a utilização de hidrogênio (1,5 mL.min⁻¹) como gás carreador. A identificação dos
150 constituintes de cada óleo foi realizada por comparação de espectro de massas obtido por
151 biblioteca de espectros Wiley 6th edition e por comparação do índice de retenção calculado de
152 cada componente com dados da literatura. O cálculo do índice foi realizado por injeção de uma
153 série de n-alcenos nas mesmas condições analíticas empregadas para os demais óleos (Adams,
154 2007).

155 **2.4 Teste *in vivo* com o óleo de *Lippia sidoides* suplementado na ração**

156 **2.4.1 Preparo das dietas experimentais**

157 O óleo essencial de *Lippia sidoides* foi adicionado em uma ração comercial com 50%
158 de proteína bruta, à qual os peixes já estavam adaptados. O óleo essencial nas concentrações
159 0,0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0% foi inicialmente pesado com auxílio de uma balança digital e
160 posteriormente diluído em álcool de cereais na proporção 100 g de álcool por quilo de ração. O
161 mesmo procedimento de pesagem foi efetuado para a ração comercial contendo 50% de
162 proteína bruta, destinada à adição dos óleos para o experimento. O óleo com suas respectivas
163 concentrações foi adicionado em um pulverizador manual e aspergido nas rações, que passaram
164 por secagem por 24 h em temperatura ambiente e, posteriormente, foram armazenadas em
165 freezer (-20 °C) até o dia da sua utilização de acordo com Dairiki et al. (2013).

166 **2.4.2 Ensaio em tanques-rede**

167 Foram utilizadas 300 carpas com peso inicial médio de $3,56 \pm 0,68$ g, provenientes do
168 mesmo açude, as quais foram distribuídas homoganeamente em tanques-rede de 1 x 1 x 1,30
169 m, com 0,5 cm de abertura de malha. O desenho experimental constituiu-se de cinco
170 tratamentos, em triplicata: controle (ração comercial sem adição de óleo essencial), 0,25, 0,50,
171 0,75 e 1,0% do óleo de *Lippia sidoides*. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia (9:00
172 a.m. e 4:00 p.m.) por um período de 60 dias. Ao final de 30 e 60 dias foram realizadas coletas
173 de amostras de cinco peixes por unidade experimental para as análises hematológicas e

174 histológicas. Durante o período experimental, a qualidade da água manteve-se nos seguintes
175 valores: oxigênio dissolvido $6,08 \pm 1,55 \text{ mg.L}^{-1}$, temperatura $20,50 \pm 0,88 \text{ }^\circ\text{C}$, pH $5,40 \pm 0,82$,
176 condutividade elétrica $40,73 \pm 6,52 \text{ } \mu\text{S.cm}^{-3}$ e sólidos totais $19,25 \pm 4,20 \text{ mg.L}^{-1}$, medidos com
177 multiparâmetro Hanna instrument (HI 9828), amônia total $0,58 \pm 0,27 \text{ mg.L}^{-1}$ e nitrito 0 mg.L^{-1}
178 medidos com kit comercial da marca Alcon pet[®] e a transparência $24,17 \pm 1,83 \text{ cm}$ medida com
179 disco de Secchi.

180 **2.5. Coleta e análises sanguíneas**

181 A coleta de sangue foi realizada com cinco peixes de cada tanques-rede em 30 e 60 dias
182 de experimento. Os peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg.L^{-1}), e em seguida o sangue
183 foi coletado por punção do vaso caudal, utilizando seringas de 1 mL contendo EDTA (10%). O
184 sangue coletado foi destinado às análises de contagem total de eritrócitos determinada em
185 câmara de Neubauer utilizando após diluição 1:200 em solução de Dacie, contagem total de
186 leucócitos e diferencial de leucócitos realizada em extensões sanguíneas, após serem
187 previamente coradas com May-Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW) segundo Tavares-Dias e
188 Moraes (2003). A concentração de glicose plasmática foi determinada com glicosímetro portátil
189 Accu-Chek[®] Advantage (Roche Diagnóstica, Brasil).

190 **2.6. Análise histológica**

191 Os mesmos peixes utilizados na coleta de sangue, foram eutanasiados por secção
192 medular para a realização da coleta de fragmentos das brânquias, intestinos, rim, baço, coração
193 e fígado. Estes fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10% tamponada com pH
194 6,8-7,4 para observação de possíveis alterações nos tecidos causadas pela adição das diferentes
195 concentrações do óleo de *L. sidoides* na dieta. Em seguida, todos os fragmentos dos órgãos
196 passaram por desidratação em séries de álcool etanol, e seguidamente em xilol, sendo
197 embebidas em parafina a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram confeccionados cortes transversais de $5 \text{ } \mu\text{m}$ de espessura
198 dos órgãos, os mesmos foram corados em hematoxilina e eosina e foi realizada a montagem das
199 lâminas, as quais foram analisadas em microscópio de contraste de interferência diferencial
200 (DIC) (ZEISS, Axio Imager A.2, Göttingen, Alemanha). As alterações histológicas nas
201 brânquias, rim, baço, fígado, coração e intestino foram avaliadas semi-quantitativamente,
202 atribuindo valores de acordo com o grau de severidade das lesões: 0 (ausência de lesão), 1 (leve,
203 correspondendo a $<25\%$ da área do tecido), 2 (moderada, de 25% a 50% da área do tecido) e 3
204 (severa, $>50\%$ da área do tecido) de acordo com método modificado de Schwaiger et al. (1997).

205 No intestino, adicionalmente, foram avaliadas as características morfométricas como:
206 quantidade, comprimento e largura dos vilos, número de células caliciformes, medidas do

207 perímetro e área dos vilos, determinadas com auxílio de microscópio de contraste de
208 interferência diferencial (DIC) (ZEISS, Axio Imager A.2, Göttingen, Alemanha).

209 **3. Análise estatística**

210 Os resultados dos parâmetros hematológicos e histopatológicos foram inicialmente
211 submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Levene. As
212 comparações entre os tratamentos, os tempos amostrais e a interação entre tratamento e tempo
213 foram verificadas mediante análise de variância com dois fatores (two way ANOVA) seguida
214 deteste de Tukey. Em todos os testes estatísticos empregados, foi admitido nível de
215 significância de 5%.

216 **4. Resultados**

217 **4.1. Composição química do óleo essencial da *Lippia sidoides***

218 Os resultados das análises de composição química da *L. sidoides* estão representados na
219 Fig. 1. Foram quantificados 100% dos componentes químicos e destes, 99,4% foram
220 identificados, tendo como maiores percentuais os compostos: timol (72,2%), p-cimeno (8,15%)
221 e (E)-cariofileno (4,9%).

222 **4.2. Análise histológica**

223 Não foram observadas alterações histopatológicas nas brânquias, baço, intestino e
224 fígado das carpas koi alimentadas com as rações contendo óleo de *L. sidoides*. Entretanto, foi
225 observado aumento significativo na dilatação dos capilares do tecido renal nos peixes
226 alimentados com ração contendo 1,0% do óleo de *L. sidoides* por 60 dias (Fig.2. A e B). Todos
227 os grupos experimentais apresentaram elevação significativa na intensidade de infiltrado
228 eosinofílico no tecido cardíaco ao final de 60 dias de suplementação (Fig.2. C e D), em
229 comparação ao período de 30 dias (Tabelas 1 a 6).

230 Não foram observadas alterações morfométricas intestinais nos peixes alimentados com
231 óleo essencial de *Lippia sidoides* ao final de 30 e 60 dias (Tabela 7).

232 **4.3. Parâmetros hematológicos**

233 Os parâmetros hematológicos de carpas koi alimentadas com rações contendo óleo de
234 *L. sidoides* não apresentaram alterações significativas ao final de 30 e 60 dias (Tabela 8).

235 **5. Discussão**

236 **5.1. Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides***

237 As análises de composição química do óleo de *L. sidoides* indicaram timol e p-cimeno
238 como os componentes químicos majoritários. Estes resultados corroboram os obtidos por Costa
239 et al. (2005), Hashimoto et al. (2016), Majolo et al. (2017), Marco et al. (2012), Oliveira et al.

240 (2014), e Soares et al. (2017), que, embora tenham obtido valores percentuais diferentes,
241 também elencaram timol e p-cimeno como os componentes mais abundantes no óleo essencial
242 desta espécie. Estudos realizados com o composto timol isolado têm comprovado o aumento
243 no desempenho de crescimento, na atividade antioxidante e na resistência a patógenos em bagre
244 do canal (*Ictalurus punctatus*) em dieta com 5% de timol por oito semanas de alimentação
245 (Zheng et al., 2009). Além disso, a combinação de 1 g kg⁻¹ de timol e 1g kg⁻¹ de carvacrol na
246 ração por um período de 56 dias de alimentação, reduziu o óxido nítrico, melhorou a eficiência
247 alimentar e aumentou a capacidade de proteção antioxidante em truta arco-íris (*Oncorhynchus*
248 *mykiss*) em 5 dias de armazenamento refrigerado (Giannenas et al., 2012). Estudos com o
249 composto timol isolado têm comprovado sua atividade antimicrobiana, como o realizado por
250 Veras et al. (2017), que compararam a atividade antimicrobiana do óleo de *L. sidoides* e o seu
251 composto majoritário, o timol, contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*
252 *mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus*
253 *faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* observando que não houve diferença no
254 efeito antimicrobiano entre óleo e timol evidenciando que o timol é o responsável pela atividade
255 antimicrobiana. Botelho et al. (2007) também observaram que o timol isolado, na concentração
256 10 mg mL⁻¹, apresentou atividade antibacteriana *in vitro* contra *S. mutans*. O timol e o carvacrol
257 tiveram sua eficácia antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, sendo observada inibição
258 total das bactérias (Lambert et al., 2001).

259 **5.2 Análise histológica**

260 A análise histopatológica é uma ferramenta importante para a compreensão funcional
261 das células nos órgãos, para o diagnóstico patológico e do estado nutricional dos peixes (Brum
262 et al., 2018).

263 O rim é um dos principais órgãos de metabolismo da maioria dos tóxicos. A
264 concentração do agente tóxico e o período de exposição determinam a gravidade do dano nesse
265 órgão (Tabarraei et al., 2019). Nos rins, as alterações causadas pela adição de óleos essenciais
266 na ração são escassos. No presente estudo, o tecido renal da carpa koi apresentou grave
267 dilatação dos capilares, na concentração de 1,0% do óleo de *L. sidoides* em 60 dias de
268 alimentação, em relação às concentrações de 0,00, 0,25%, 0,50% e 0,75 %. Desta forma, a
269 concentração 1% do óleo não é recomendado na dieta da carpa koi. Entretanto, não foram
270 encontrados estudos com dilatação dos capilares com óleo essenciais.

271 Comparando com dieta formulada deficiente em ácidos graxos essenciais para juvenis
272 de dourada (*Sparus aurata*) contendo apenas 0,5% de gordura, após 9 semanas, houve elevada

273 dilatação dos capilares dos rins e espessamento das paredes dos capilares, porém, foi relatado
274 como condições irregulares ou fora do comum dos glomérulos (Montero et al., 2004). Além
275 disso, essas alterações podem ser encontradas em diferentes nefropatias, como por exemplo
276 toxicidade com o poluente diclorodifeniltricloroetano (DDT), que causou dilatação dos
277 capilares dos rins do peixe-tigre (*Hydrocynus vittatus*), e estas alterações, foram associadas a
278 distúrbios circulatórios e alterações regressivas (McHugh et al., 2011). Em carpas (*Labeo*
279 *rohita*), coletadas em águas contendo resíduos de metais como cromo (Cr), manganês (Mn),
280 níquel (Ni), chumbo (Pb) e sólidos suspensos totais, por 15, 30 e 60 dias, observou-se aumento
281 do glomérulo, levando a redução de espaço de Bowman, oclusão da luz tubular, degeneração
282 hialina e dilatação dos capilares. Essas alterações causaram necrose tubular e disfunção do
283 órgão (Kaur e Dua, 2016).

284 O termo “doença eosinofílica” é usado para descrever um quadro em que há infiltração
285 de eosinófilos em vários tecidos, como por exemplo, baço, intestino, fígado, rim e coração, o
286 que leva à disfunção dos órgãos afetados, podendo ser letal (Balla et al., 2010; Feist et al.,
287 2015). Em peixes, esta condição está associada ao parasitismo por nematoides e bactérias
288 (Figuera et al., 2004; Pedrosa, 2009; Romano et al., 2012). Neste estudo houve aumento nos
289 infiltrados eosinofílicos no coração das carpas no período de 60 dias em relação a 30 dias de
290 dieta com o óleo de *L. sidoides*. Embora tenha ocorrido maior infiltrado eosinofílico, estes
291 valores estão abaixo dos classificados como lesão leve. Denotando assim, que a lesão observada
292 não causa danos aos peixes estando próximo aos valores encontrados para tilápia-do-Nilo
293 (*Oreochromis niloticus*), alimentada com 1,5% de óleos essenciais de gengibre e manjerição
294 por um período de 55 dias (Brum et al., 2018).

295 O intestino e o fígado são os órgãos mais importantes na digestão e absorção dos
296 nutrientes da ração. Dessa forma, monitorar os efeitos nocivos sobre o fígado e intestino, é uma
297 das formas de avaliação dos diferentes nutrientes, e dos ingredientes de origem vegetal na ração
298 (Moldal et al., 2014; Rašković et al., 2011). Dieta com inclusão de 2,5 a 3,0 mL.kg⁻¹ de óleo de
299 orégano turco (*Origanum onites*), por 180 dia na dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*),
300 causou necrose nos hepatócitos (Yigit et al., 2017). No presente estudo, o intestino e fígado da
301 carpa koi não sofreram alterações com as concentrações de óleo de *L. sidoides* testadas,
302 demonstrando assim, que as concentrações utilizadas não causaram lesões a estes órgãos.
303 Alterações histopatológicas no intestino podem variar dependendo da espécie e alimentos
304 utilizados nos experimentos (Rašković et al., 2011).

305 O baço é um dos principais órgãos do sistema imunológico dos peixes, isto porque, ele
306 concentra e filtra antígenos, onde ocorre a hemocaterese e estoca eritrócitos. Para algumas
307 espécies, o baço é o principal órgão hematopoiético (Kiron, 2012). Nesta pesquisa, o baço não
308 foi alterado com as diferentes concentrações do óleo de *L. sidoides*, sugerindo assim, que o óleo
309 pode ser usado na ração da carpa koi sem prejudicar o funcionamento deste órgão. O mesmo
310 resultado também foi relatado por Yigit et al. (2017), com a inclusão de 0, 0,125, 1,5, mL kg⁻¹
311 de óleo de orégano-turco, *Origanum onites*, por 90 dias na dieta de truta arco-íris,
312 *Oncorhynchus mykiss*.

313 Dietas com diferentes inclusões de vegetais na ração de peixe têm demonstrado
314 diferentes tipos de alterações nas brânquias, que variam de moderadas a severas (Brum et al.,
315 2018; Costa et al., 2017). Neste estudo não foram observadas alterações nas brânquias nas
316 diferentes concentrações de óleo de *L. sidoides* testadas, evidenciando que o óleo de *L. sidoides*
317 não causou nenhum efeito deletério ao tecido branquial.

318 A morfologia intestinal reflete a condição de saúde dos peixes, e está relacionada à
319 capacidade de assimilação de nutrientes e funções imunológicas (Brum et al., 2018; Nicholson
320 et al., 2012), portanto, o monitoramento histológico deste órgão torna-se necessário (Rašković
321 et al., 2011). No presente estudo, os exames morfométricos do intestino não mostraram
322 quaisquer alterações patológicas em nenhum dos tratamentos com óleo de *L. sidoides*.
323 Resultado similar foi relatado por Valladão et al. (2019), que fez inclusão do óleo de tomilho
324 (*Thymus vulgaris*) na ração da tilápia, *Oreochromis niloticus*, nas concentrações de 0,1; 0,5 e
325 1% por 15 dias, sem que houvesse alterações na morfologia intestinal ou no número de células
326 caliciformes.

327 **5.3 Parâmetros hematológicos**

328 A redução dos valores de glicose no sangue dos peixes tratados com fitoterápicos é
329 apontada como um indicativo de estresse não específico dos animais (Ngugi et al., 2017).
330 Estudo realizado por Hashimoto et al. (2016) com 20 mg.L⁻¹ de óleo de *L. sidoides* aumentou
331 os valores de glicose, indicando estresse para a tilápia, *Oreochromis niloticus*. No presente
332 estudo, os valores de glicose não foram alterados com a inclusão do óleo da *L. sidoides* na ração
333 da carpa koi, indicando que não houve estresse dos animais ao consumir a ração com óleo. Estes
334 resultados são consistentes com os estudos realizado por Saccol et al. (2013), onde os níveis de
335 glicose plasmática não foram afetados com a inclusão de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mL.kg⁻¹ do óleo
336 essencial de *Lippia alba* na dieta do jundiá (*Rhamdia quelen*) por 60 dias. Dieta contendo óleo
337 de orégano, *Origanum sp.*, também não influenciou os níveis de glicose plasmática do tetra,

338 (*Astyanax altiparanae*) (Ferreira et al., 2014). Similarmente, o óleo essencial de *Aloysia*
339 *triphylla* nas concentrações 0,25 e 2,0 mL.kg⁻¹ na dieta de jundiás, *R. quelen*, não alterou os
340 níveis de glicose aos 60 dias (Zeppenfeld et al., 2016).

341 Pesquisas estão comprovando a eficácia da inclusão dos óleos essenciais na dieta dos
342 peixes, já que eles têm a capacidade de aumentar ou manter inalterados os valores
343 hematológicos dos animais, como uma forma de proteção e defesa contra diferentes
344 enfermidades (Fadeifard et al., 2018). Em um estudo realizado com tilápia-do-Nilo,
345 *Oreochromis niloticus*, exposta a três banhos com 20 mg.L⁻¹ do óleo essencial de *L. sidoides*,
346 por 10 min, com intervalo de 24 h entre os tratamentos, observou-se redução no número de
347 eritrócitos, trombócitos e aumento no número de neutrófilos e glicose. Para o tambaqui,
348 (*Colossoma macropomum*), 20 mg.L⁻¹ de óleo essencial de *L. sidoides*, diminuiu o número de
349 eritrócitos e causou alterações severas e danos irreversíveis nas brânquias (Soares et al., 2017).
350 Neste estudo, os parâmetros hematológicos de carpas koi alimentadas com óleo de *L. sidoides*,
351 não apresentaram alterações ao final de 30 e 60 dias, indicando que as concentrações do óleo
352 não causaram efeitos nocivos para os peixes. Resultado semelhante ao do presente estudo foi
353 relatado no estudo de Valladão et al. (2017), no qual não foram observadas alterações nos
354 parâmetros hematológicos em tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, alimentada com 100 e 250 mg.kg⁻¹
355 de óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) por 60 dias. Os autores sugeriram o uso
356 do óleo como aditivo na ração devido ao seu potencial benéfico na saúde dos peixes e nos
357 parâmetros imunológicos, mesmo em baixas concentrações. Da mesma forma, dietas com
358 inclusão de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g.Kg⁻¹ de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) não
359 causaram alterações nos parâmetros hematológicos do bagre (*Rhamdia* sp.) em 89 dias (Cararo
360 et al., 2017).

361 Neste estudo, número de monócitos não diferiram entre os tempos amostrados e as
362 diferentes concentrações do óleo de *L. sidoides*. Sugere-se que a suplementação dietária com
363 óleo de *L. sidoides* não causou efeito negativo ou inflamatório à carpa koi. Estudo realizado
364 com inclusão de 1%, 2% e 3% de extrato aquoso de hortelã pimenta por 60 dias na dieta do
365 peixe-branco (*Rutilus frisii kutum*) não alterou o número de monócitos (Adel et al., 2015). Dieta
366 suplementada com óleo essencial de *L. alba* (4 mL.kg⁻¹ de ração) não alterou o número de
367 monócitos em tilápia-do-Nilo após indução de aerocistite por injeção de carragenina
368 (Rodrigues-Soares et al., 2018). Tilápias-do-Nilo não mostraram alteração no número destas
369 células, em 50 dias após alimentação com óleo essencial de menta, *Mentha piperita*, em
370 diferentes concentrações (0,075%, 0,125%, 0,25%), não mostraram alteração no número destas

371 células (Silva et al., 2019). Tambaqui, *C. macropomum*, alimentado por 30 dias com dietas
372 contendo diferentes concentrações (0,5% 1,0% e 1,5%) de óleo essencial de hortelã-pimenta,
373 *Mentha piperita*, também não apresentou alteração no número destas células (Ribeiro et al.,
374 2016).

375 No presente estudo, o número de trombócitos não se alterou com a inclusão do óleo de
376 *L. sidoides* na ração da carpa koi, sugerindo que o óleo não causou distúrbio aos peixes.
377 Resultado semelhante foi evidenciado por Brum et al. (2017), com inclusão de 0,5% 1,0% e
378 1,5% de óleos essenciais de manjerição, (*Ocimum gratissimum*) e gengibre (*Zingiber officinale*)
379 na ração de tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, após 55 dias de alimentação.

380 Os peixes suplementados com a ração contendo o óleo de *L. sidoides* não apresentaram
381 alterações no número de linfócitos. Estudo com óleo essencial de *L. alba* suplementada com 4
382 mL.kg⁻¹ de ração em tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, após indução de aerocistite com carragenina
383 não alterou o número de linfócitos após 45 dias de suplementação (Rodrigues-Soares et al.,
384 2018). Resultado semelhante foi evidenciado por Silva et al. (2019), com inclusão de 0,075%,
385 0,125% e 0,25% de óleo de hortelã-pimenta, *M. piperita*, na ração de tilápia durante 50 dias de
386 alimentação. A suplementação com 1 g.kg⁻¹ do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)
387 na ração de tilápia-de-barriga-vemelha (*Tilapia zillii*) também não alterou o número destas
388 células (Mabrok e Wahdan, 2018).

389 Neste estudo, o número de neutrófilos não foi alterado com a inclusão do óleo de *L.*
390 *sidoides*. Considerando a estabilidade no número de neutrófilos, pode-se afirmar que não houve
391 indução de qualquer resposta relacionada a inflamação ou estresse nos animais que receberam
392 a dieta suplementada com óleo de *L. sidoides*. Estudos de Rodrigues-Soares et al. (2018) não
393 mostraram alterações no número de neutrófilos em tilápias-do-Nilo, *O. niloticus*, alimentadas
394 com óleo essencial de *Lippia alba* na concentração 4 mL.kg⁻¹ durante 45 dias. Silva et al. (2019),
395 também, não observaram alteração no número de neutrófilos em tilápias-do-Nilo, *O. niloticus*,
396 alimentadas durante 50 dias com 0,075%, 0,125% e 0,25% de óleo de hortelã-pimenta, *M.*
397 *piperita*.

398 No presente trabalho, os valores de eritrócitos não foram alterados com inclusão de *L.*
399 *sidoides* na dieta, sendo possível concluir que, o óleo não causou estresse aos peixes.
400 Corroborando com o presente estudo, a inclusão de 0,5; 1,0; 1,5% do óleo de hortelã-pimenta,
401 *M. piperita* na dieta de tambaqui também não alterou os valores de eritrócitos após 30 dias de
402 alimentação em um estudo de Ribeiro et al. (2016). Dietas com inclusão de 0,001 e 0,01% de
403 óleo essencial de *Ducrosia anethifolia* para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não alteraram

404 os valores de eritrócitos após oito semanas de tratamento (Vazirzadeh et al., 2017).
405 Similarmente, a inclusão de 0,25 e 2,0 mL kg⁻¹ de óleo essencial de cidrão de árvore *Aloysia*
406 *triphylla* na ração do jundiá, *R. quelen*, durante 21 dias não alterou os valores destas células
407 (Santos et al., 2017).

408 A explosão respiratória de leucócitos está relacionada à liberação de citocinas e à
409 resposta inflamatória em peixes (Rieger e Barreda, 2011). Neste estudo, os leucócitos não foram
410 alterados nos tempos amostrados, indicando que o óleo não causou nenhuma resposta
411 inflamatória aos peixes. Da mesma forma, após administração de dieta com 1% de extrato de
412 babosa (*Aloe vera*), durante oito semanas para truta arco-íris, *O. mykiss*, não foram observadas
413 diferenças significativas nos valores de eritrócitos e leucócitos, e os autores sugeriram que a
414 suplementação com 1% na dieta possa ter aumentado a atividade do sistema imunológico inato
415 nos peixes (Haghighi et al. 2014). Dieta com inclusão de 1,5 e 10 mg.kg⁻¹ de babosa, *A. vera*,
416 na ração por até 4 semanas não aumentou o número de leucócitos de carpa (*Labeo rohita*), no
417 entanto, os autores relataram aumento destes parâmetros nos peixes posteriormente infectados
418 com o fungo *Aphanomyces invadans*, após 6 semanas de experimento (Davi et al., 2019).
419 Estudos têm revelado que, peixes alimentados com diferentes inclusões de óleos essenciais em
420 suas dietas, não mostraram alterações em parâmetros hematológicos. Entretanto, as alterações
421 hematológicas ocorrem quando estes peixes são desafiados com algum patógeno, como reação
422 natural do sistema imunológico à presença do organismo invasor, porém, esta resposta pode ser
423 incrementada pelo uso de produtos terapêuticos (Cunha et al., 2018; Santos et al., 2017). O
424 efeito de estimular as defesas somente na presença do patógeno é uma característica
425 fundamental aos produtos imunomoduladores. Entretanto, neste estudo o desafio não era o
426 objetivo do trabalho, uma vez que foi desenvolvido dentro de uma produção de peixes
427 ornamentais. A finalidade era melhorar a condição de saúde dos animais ao longo do período
428 de alimentação.

429 **6. Conclusão**

430 Conclui-se, que as concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0% do óleo de *L. sidoides* não
431 provocaram alterações nos parâmetros histológicos e hematológicos no período de 30 dias. As
432 concentrações de 0,25; 0,50; e 0,75% do óleo de *L. sidoides* mostraram similaridade na
433 histologia e hematologia no período de 60 dias, sugerindo que os peixes não foram afetados
434 com a inclusão do óleo na ração nestes períodos e concentrações. Portanto, o uso desta
435 substância mostrou-se segura para carpa koi no período e dose recomendados. Sugerem-se

436 estudos adicionais para verificar a eficácia do óleo em forma de banho contra parasitos e em
437 testes de suplementação dietária seguida de desafio com bactéria patogênica.

438 **Agradecimentos**

439 Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
440 de Nível Superior, do Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Os autores agradecem à
441 CAPES pela bolsa de doutorado da EM Brasil e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento
442 Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Pesquisa M. L Martins (CNPq 305869 / 2014-
443 0, 306635 / 2018-6).

444 **Referências**

- 445 ABINPET. 2018. Dados de Mercado. Associação Brasileira da Indústria de produtos para
446 Animais de Estimação. Mercado pet Brasil.
- 447 Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N., Türker, A., 2015. Evaluation of the effects of
448 essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia
449 (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*.
450 *Aquaculture* 437, 282-286.
- 451 Adams, R.P., 2007. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass
452 spectrometry. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- 453 Adel, M., Amiri, A.A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., Esteban, M.A., 2015. Effects of dietary
454 peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and
455 hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish*
456 *& Shellfish Immunol.* 45, 841-847.
- 457 Araujo, D.M., Pezzato, A.C., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Nakagome, F.K., 2011. Hematologia
458 de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. *Pesq.*
459 *Agropec. Bras.*46, 294-302.
- 460 Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., 2016. Evaluation of *Citrus limon* peels
461 essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis*
462 *mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 465, 13-18.
463 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.023>.

- 464 Balla, K.M., Lugo-Villarino, G., Spitsbergen, J.M., Stachura, D.L., Hu, Y., Bañuelos, K.,
465 Romo-Fewell, O., Aroian, R.V., Traver, D., 2010. Eosinophils in the zebrafish: prospective
466 isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants. *Blood* 116,
467 19. doi 10.1182/blood-2010-03-267419.
- 468 Borges, R.S., Keita, H., Ortiz, B.L.S., Sampaio, T.I.S., Ferreira, I.M., Lima, E.S., Silva, M.J.A.,
469 Fernandes, C.P., Oliveira, A.E.M.F.M., Conceição, E.C., Rodrigues, A.B.L., Filho,
470 A.C.M.P., Castro, A.N., Carvalho, J.C.T., 2018. Anti-inflammatory activity of
471 nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: *in vitro* and in zebrafish studies.
472 *Inflammoph* 26, 1057-1080. doi.org/10.1007/s10787-017-0438-9.
- 473 Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos,
474 F.J.A., Montenegro, Heukelbach, D., J., Rao, V.S., Brito, G.A.C., 2007. Antimicrobial
475 activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral
476 pathogens. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 40, 349-356. doi.org/10.1590/S0100-
477 879X2007000300010.
- 478 Brum, A., Cardoso, L., Chaga, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2018.
479 Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge
480 with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 490, 98-107.
481 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.040>.
- 482 Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P.,
483 Martins, M.L., 2017. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia
484 (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*
485 468, 235-243.
- 486 Cararo, L.M., Sado, R.Y., Muelbert, B., Borba, M.R., 2017. Evaluation of oregano essential oil
487 as a growth promoter and resistance stimulator against *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa,
488 Ciliophora) in silver catfish juveniles, *Rhamdia* sp. (Siluriformes, Heptapteridae). *Semina:
489 Ciên. Agr, Londr.* 38, 3871-3886.
- 490 Castro, C.E., Ribeiro, J.M., Diniz, T.T., Almeida, A.C., Ferreira, L.C., Martins, E.R., Duarte,
491 E.R., 2011. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil
492 against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Plan. Med.* 13, 293-297.

- 493 Chagas, E.C., Araújo, L.D., Martins, M.L., Gomes, L.C., Malta, J.C.O., Varella, A. B.,
494 Jerônimo, G.T., 2016. Mebendazole dietary supplementation controls Monogenoidea
495 (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish
496 *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* 464, 185-189.
- 497 Chen, Guan-Ru., Sun, Lian-Tien., Lee, Yan-Horn., Chang, Ching-Fong., 1996. Characteristics
498 of Blood in Common Carp, *Cyprinus carpio*, Exposed to Low Temperatures, *J. Appl. Aquac.*
499 5, 21-31. doi: 10.1300/J028v05n03_03.
- 500 Costa, J.C., Valladão, G.M.R., Pala, G., Gallan, S.U., Kotzent, S., Crotti, A.E.M., Fracaroli,
501 L., Silva, J.J.M., Pilarski, F., 2017. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for
502 treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture* 471, 72-
503 79.
- 504 Costa, J.G.M., Rodrigues, F.F.G., Silva, E.C., Mota, M.R., M.L; Santos, N.K.A.; Cardoso.
505 A.L.H.; Lemos, T.L.G., 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis*
506 *martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Rev.*
507 *Bras. Farmacol.* 15, 304-309.
- 508 Cunha, J.A., Scheeren, C.Á., Fausto, V.P., Melo, L.D.W., Henneman, B., Frizzo, C.P., Vaucher,
509 R.A., Vargas, A.C., Baldisserotto, B., 2018. The antibacterial and physiological effects of
510 pure and nanoencapsulated *Origanum majorana* essential oil on fish infected with
511 *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* 124, 116-121. [https://doi.org/10.1016/j.micpath.](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.040)
512 2018.08.040.
- 513 Dairiki, J.K., Majolo, C., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Oliveira, M. R., Morais, I.D.S., 2013.
514 Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes, in: *Circular Técnica*,
515 42. Embrapa Amaz. Ocid., Manaus, Amazonas (8 p.).
- 516 Dehghan, F., Vazirzadeh, A., Soltanian, S., Karami, A., Akhlaghi, M., 2016. Mortality rate and
517 immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Yersinia ruckeri*
518 subsequent to feeding on diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. *Int. J.*
519 *Aquat. Biol.* 4, 340-344.
- 520 Dehghan, F., Vazirzadeh, A., Soltanian, S., Karami, A., Akhlaghi, M., 2016. Mortality rate and
521 immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Yersinia ruckeri*

- 522 subsequent to feeding on diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. Int. J.
523 Aquat. Biol. 4, 340-344.
- 524 Devi, G., Harikrishnan, R., Paray, B.A., Al-Sadoon, M.K., Hoseinifar, S.H., Balasundaram, C.,
525 2019. Effects of aloe-emodin on innate immunity, antioxidant and immune cytokines
526 mechanisms in the head kidney leucocytes of *Labeo rohita* against *Aphanomyces invadans*.
527 Fish Shellfish Immunol. 87, 669-678.
- 528 Fadeifard, F., Raissy, M., Jafarian, M., Boroujeni, H. R., Rahimi, M., & Faghani, M., 2018.
529 Effects of black seed (*Nigella sativa*), ginger (*Zingiber officinale*) and cone flower
530 (*Echinacea angustifolia*) on the immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.
531 Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 70, 199-204. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8489>.
- 532 Faria, P.M.C., Ribeiro, K., Almeida, C.F., Santos, F.W.M., Santos, R. F.B., 2016. Aquicultura
533 Ornamental: um mercado promissor. Rev. Pan. Aquicult. 26, 24-37.
- 534 Feist, S.W., Stentiford, G.D., Kent, M.L., Santos, A. R., Lorance, P., 2015. Histopathological
535 assessment of liver and gonad pathology in continental slope fish from the northeast Atlantic
536 Ocean. Mar. Environ. Res. 106, 42-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.02.004>.
- 537 Ferreira, P.M.F., Nascimento, L.S., Dias, D.C., Moreira, D.M.V., Salaro, A.L., Freitas, M.B.D.,
538 2014. Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax*
539 *altiparanae*. J. World Aquac. Soc. 45, (1). doi: 10.1111/jwas.12094.
- 540 Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G., Barros, C.S.L., 2004. Síndrome hipereosinofílica
541 idiopática associada à doença eosinofílica disseminada em um cão. Ciên. Rur. 34, 939-942.
- 542 Fontenelle, R.O.S., Morais, S.M., Brito, E.H.S., Kerntopf, M. R., Brilhante, R. S. N., Cordeiro,
543 R.A., Tomé, A.R., Queiroz, M.G.R., Nascimento, N.R.F., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G.,
544 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil
545 from *Lippia sidoides*. Cham. J. Antimicrob. Chemoth. 59, 934-940.
- 546 Giannecchini, L.G., Massago, H., Fernandes, J.B.K., 2012. Effects of photoperiod on
547 reproduction of Siamese fighting fish *Betta splendens*. Rev. Bras. Zootec. 41, 821-826.
- 548 Giannenas, I., Triantafyllou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T.,
549 Karagouni, E., 2012. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol

- 550 containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of
551 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350, 26-32.
- 552 Gulec, A.K., Danabas, D.; Ural, M.; Seker, E.; Arslan, A.; Serdar, O., 2013. Effect of mixed
553 use of thyme and fennel oils on biochemical properties and electrolytes in rainbow trout as
554 a response to *Yersinia ruckeri* infection. *Acta. Vet. Brno.* 82,297-302. doi: 10.
555 2754/avb201382030297.
- 556 Haghghi, M., M. Sharif Rohani, M. Samadi, M. Tavoli, M. Eslami, and R. Yusef., 2014. Study
557 of effects Aloe vera extract supplemented feed on hematological and immunological indices
558 of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 2, 2143-2154.
- 559 Harbone, J.B., 1984. *Phytochemical methods. A guide modern techniques of plant analysis.*
560 Second edition, Chapman and hall. Londres new York. doi: 10.1007/978-94-009-5570-7.
- 561 Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, Moon-Soo., 2012. Effect of *Inonotus obliquus*
562 enriched diet on hematology, immune response, and disease protection in kelp grouper,
563 *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 344-349, 48-53.
- 564 Hashimoto, G. S.O., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Aquile, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C. M.,
565 Martins, M.L., 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against
566 monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*
567 450, 182-186.
- 568 Hassaan, M.S.; Soltan, M.A., 2016. Evaluation of essential oil of fennel and garlic separately
569 or combined with *Bacillus licheniformis* on the growth, feeding behaviour, hemato-
570 biochemical indices of *Oreochromis niloticus* (L.) Fry. *J. Aquac. Res. Dev.* 7, 422.
571 doi:10.4172/2155-9546.1000422.
- 572 Houston, A. H.; Dobric, N. Kahurananga, R., 1996. The nature of hematological response in
573 fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to stimulated winter, spring and
574 summer conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 4, 339-347.
- 575 Infofish international 4/2016. The global trade in ornamental Fish. www.infofish.org. (acesso
576 em 22 de junho de 2019).

- 577 ISO 9235, 2013. International Organization for Standardization. Aromatic natural raw
578 materials-Vocabulary. <https://www.iso.org/standard/51017.html> (acesso em 27 de junho de
579 2019).
- 580 Jerônimo, G.T., Pádua, SB., Bampi, D., Gonçalves, E.L.T, Garcia, P., Ishikawa, M.M. Martins,
581 M.L., 2014. Haematological and histopathological analysis in South American fish
582 *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). Braz. J. Biol. 74, 4,
583 1000-1006.
- 584 Kaur, R., Dua, A., 2016. Induction of histopathological lesions in renal tissue of the fish *Labeo*
585 *rohita* upon exposure to municipal wastewater of Tung Dhab Drain, Amritsar, India. Turk.
586 J. of Zool. 40, 645-654. doi:10.3906/zoo-1511-33.
- 587 Kiron, V., 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care.
588 Anim. Feed Sci. and Tech. 173, 111-133. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015.
- 589 Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum
590 inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.
591 J. Appl. Microbiol. 91 (3), 453-462.
- 592 Mabrok, M.A.E., Wahdan, A., 2018. The immune modulatory effect of oregano (*Origanum*
593 *vulgare* L.) essential oil on tilápia *zillii* following intraperitoneal infection with *Vibrio*
594 *anguillarum*. Aquac. Int. 26, 1147-1160. doi.org/10.1007/s10499-018-0274-y.
- 595 Magalhães, A.L.B., Jacobi, C.M., 2010. E-commerce of freshwater aquarium fishes: potential
596 disseminator of exotic species in Brazil. Acta Sci. 32, 243-248.
- 597 Majolo, C., Rocha, S.I.B., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R., 2017. Chemical
598 composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas*
599 *hydrophila*. Aquac. Res. 48, 2380-2387.
- 600 Marco, C.A., Teixeira, E., Simplício, A., Oliveira, C., Costa, J., Feitosa, J., 2012. Chemical
601 composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Chilean J.
602 Agric. Res. 72, 157-160.

- 603 Mattos, S.H., Innecco, R., Marco, C.A., Araújo, A.V., 2007. Plantas medicinais e aromáticas
604 cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. Banco do Nordeste do Brasil,
605 1, 61-63.
- 606 McHugh, K.J., Smit, N.J., Van Vuren, J.H.J.; Van Dyk, J.C., Bervoets, L., Covaci, A., Wepener,
607 V., 2011. A histology-based fish health assessment of the tigerfish, *Hydrocynus vittatus*
608 from a DDT-affected area. Phys. Chem. Ear. 36, 895-904.
- 609 Moldal, T., Løkka, G., Wiik-Nielsen, J., Austbø, L., Torstensen, B., Rosenlund, G., Dale, O.B.,
610 Kaldhusdal, M., Koppang, E.O., 2014. Substitution of dietary fish oil with plant oils is
611 associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Vet.
612 Res. 10:60.
- 613 Montero, D., Socorro, J., Tor, L., Caballero, M. J., Robaina, L.E., Vergara, J.M., Izquierdo,
614 M.S., 2004. Glomerulonephritis and immunosuppression associated with dietary essential
615 fatty acid deficiency in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., juveniles. J. Fish Dis. 27, 297-
616 306.
- 617 Morales, A. E.; Cardenete, G.; Abellán, E.; García-Rejón, L., 2005. Stress-related physiological
618 responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). Aquac. Res. 36,
619 1, 33-40.
- 620 Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Muchiri, M., 2017. Effects of dietary levels of essential oil (EO)
621 extract from bitter lemon (*Citrus limon*) fruit peels on growth, biochemical, haemato-
622 immunological parameters and disease resistance in Juvenile *Labeo victorinus* fingerlings
623 challenged with *Aeromonas hydrophila*. Aquac. Res. 48, 2253-2265.
- 624 Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S., 2012.
625 Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. Scien, 336, 1262-1267.
- 626 Oliveira, M.L.M., Bezerra, B.M.O., Leite, L.O., Girão, V.C.C., Nunes-Pinheiro, D.C.S., 2014.
627 Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham. Essential oil induces cutaneous
628 inflammatory response but does not delay wound healing process. J. Ethnoph. 153, 283-289.
- 629 Oliveira, S.R.N., Oliveira, M.A.S., Brandão, F.R., Majolo, C., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C.,
630 2018. Toxicity of *Lippia organoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*)

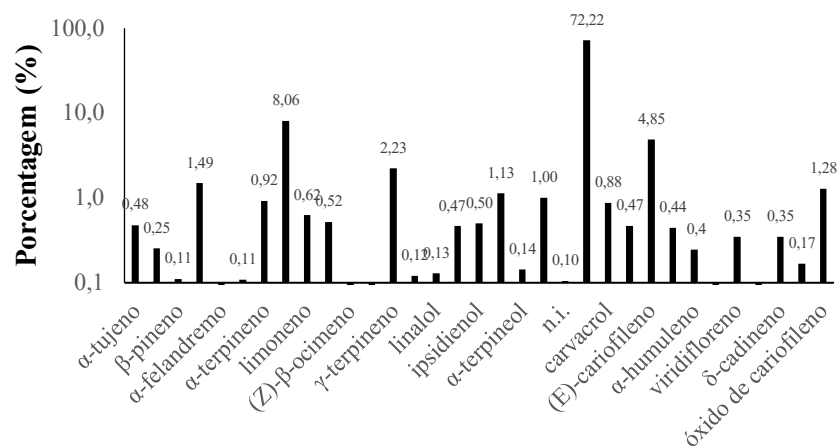
- 631 and its effect against *Aeromonas hydrophila*. Bol. Inst. Pesca 44 (2), 346. Doi:
632 10.20950/1678-2305.2018.346.
- 633 Panjvini, F., Abarghuei, S., Khara, H., Parashkoh, H.M., 2016. Parasitic infection alters
634 haematology and immunity parameters of common carp, *Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758.
635 J. Parasit Dis. 40 (4), 1540-1543.
- 636 Pedrosa, V.F., 2009. Lesões anatomopatológicas associadas à ocorrência de bacterioses em
637 tilápias (*Oreochromis niloticus*) de diferentes sistemas de cultivo em Pernambuco/Brasil.
638 Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Recursos Pesqueiros e
639 Aquicultura. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- 640 Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavare-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise
641 hematológica em peixes. Eduem, Maringá.
- 642 Rašković, B.S., Stanković, M.B., Marković, Z.Z., Poleksić, V.D., 2011. Histological methods
643 in the assessment of diferente feed effects on liver and intestine of fish. J. of Agricul. Sci. 56
644 (1), 87-100. doi: 10.2298/JAS1101087R.
- 645 Ribeiro, S.C., Castelo, A.S., Silva, B.M.P., Cunha, A.S., Proietti Júnior, A.A., Oba-Yoshioka,
646 E.T., 2016. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum*
647 (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita*
648 (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. Acta Amaz. 46 (1), 99-106.
- 649 Riegera, A.M., Barreda, D.R., 2011. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. Dev. Comp.
650 Immunol. 35, 1238-1245. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.009>.
- 651 Rodrigues-Soares, J.P., Jesus, G.F.A., Gonçalves, E.L.T., Moraes, K.N., Chagas, E.C., Chaves,
652 F.C.M., Belo, M.A.A., Jatobá, A., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2018. Induced
653 aerocystitis and hemato-immunological parameters in Nile tilapia fed supplemented diet
654 with essential oil of *Lippia alba*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 55, (1), 1-12, 201. doi:
655 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.136717.
- 656 Romano, L., Tesser, M.B., Sampaio, L.A., Abreu, P.C., 2012. Yersiniose em *Trachinotus*
657 *marginatus* (pampo). Diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. Arq. Bras. Med.
658 Vet. Zootec. 64, 4, 909-915.

- 659 Rothbard, Shmuel., Biton, I., Kulikovski, Z., 2010. Breeding, production and marketing of
660 golden tench (*Tinca tinca* (L.)) in Gan Shmuel Fish Breeding Center, Israel. Rev. Fish Biol.
661 Fisher. 20, 367-373. doi 10.1007/s11160-009-9132-3.
- 662 Saccol, E.M.H., Uczay, J.; Pês, T.S., Finamor, I.A., Ourique, G.M., Riffel, A.P.K., Schmidt,
663 D., Caron, B.O., Heinzmann, B.M., Llesuy, S.F., Lazzari, R., Baldisserotto, B., Pavanato,
664 M.A., 2013. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver
665 catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response.
666 Aquaculture 416-417, 244-254.
- 667 Santos, A.C., Sutili, F.J., Heinzmann, B.M., Cunha, M.A., Brusque, I.C.M., Baldisserotto, B.,
668 Zeppenfeld, C.C., 2017. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood
669 response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immunol.
670 62, 213-216. doi: 10.1016/j.fsi.2017.01.032.
- 671 Schwaiger et al., 1997. J. Schwaiger, R. Wande, S. Adm, M. Pawert, W. Honnen, R. Tribskorn
672 The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant related stress in fish. J. Aquat.
673 Ecosyst. Stress. Recov. 6, 75-86.
- 674 Secex -Sistema de Análise de Informações do Comércio Exterio., 2016. AliceWeb.
675 <http://www.aliceweb.gov.br> (accessed 26 June 2018).
- 676 Silva, L.T.S., Pereira, U.P., Oliveira, H.M., Brasil, E.M., Pereira, S.A., Chagas, E.C., Jesus,
677 G.F.A., Cardoso, L., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2019. Hemato-immunological and
678 zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge
679 with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 506, 205-211.
680 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.035>.
- 681 Silveira, J.C., Busato, N.V., Costa, A.O.S., Junior, E.F.C., 2012. Levantamento e análise de
682 métodos de extração de óleos essenciais. Enciclop. Biosf. 8 (15), 2038-2052.
- 683 Silveira, U.S., Lagato, P.V.R., Pontes, E.C., 2009. Fatores estressante em peixes. Verist. Eletr.
684 Nutr. 6, 4, 1001-1017.
- 685 Soares, B.V., Neves, L.R., Ferreira, D.O., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C.,
686 Gonçalves, R.A., Tavares-Dias, M., 2017. Antiparasitic activity, histopathology and

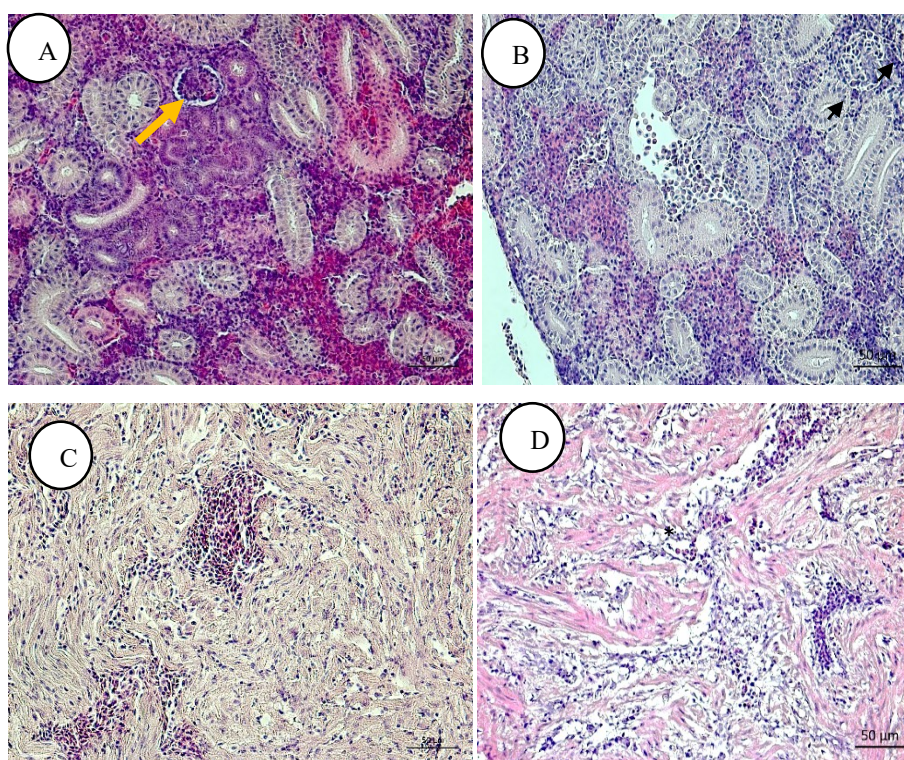
- 687 physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia*
688 *sidoides* (Verbenaceae). Vet. Par. 234, 49-56.
- 689 Souza, C.F., Baldissera, M.D., Bianchini, A.E., Silva, E.G., Mourão, R.H.V., Silva, L.V.F.,
690 Schmidt, D.; Heinzmann, B.M.; Baldisserotto, B., 2018. Citral and linalool chemotypes of
691 *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side
692 effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). Fish Physiol. Biochem.
693 44, 21-34.
- 694 Tabarraei, H., Hassan, J., Mosavi, S.S., 2019. Determination of LD50 of some essential oils
695 and histopathological changes in short-term exposure to one of them in rainbow trout
696 (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicol. Res. Applic. 3, 1-7. doi: 10.1177/2397847318820719.
- 697 Tavares-Dias, M. e Moraes, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. 1ª ed. São Paulo,
698 Ribeirão Preto.
- 699 Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli*
700 Bouleger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em pesque e pague de franca, São Paulo,
701 Brasil. Bioscience 19 (1), 103-110.
- 702 Teixeira, R.R., Souza, R.C., Sena, A.C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Copatti, C.E.,
703 2018. Essential oil of *Aloysia triphylla* is effective in Nile tilapia transport. Bol. Inst. Pesca
704 44 (1), 17-24. doi: 10.20950/1678-2305.2018.263.
- 705 Toni, C., Becker, A.G., Simões, L.N., Pinheiro, C.G., de Lima Silva, L., Heinzmann, B. M.,
706 Caron, B.O; Baldisserotto, B., 2014. Fish anesthesia: Effects of the essential oils of
707 *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish
708 (*Rhamdia quelen*). Fish Physiol. Biochem. 40, 701-714.
- 709 Traesel, C. K., Lopes, S.T.A., Wolkmer, P., Schmidt, C., Santurio, J.M., Alves, S.H., 2011.
710 Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos
711 de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. Cienc. Rur. 41 (2), 278-284.
- 712 Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pala, G., Jesus, R.B., Kotzent, S., Costa, J.C., Silva, T. F.A.,
713 Pilarski, F., 2017. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system
714 and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. Aquac. Res. 48, 5640-5649.

- 715 Valladão, G.M.R.; Gallani, S.U.; Kotzent, S.; Assane, I.M.; Pilarski, F., 2019. Effects of dietary
716 thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and
717 microbiota of Nile tilapia. *Aquac. Int.* 1-13.
- 718 Vazirzadeh, A., Dehghan, F., Kazemeini, R., 2017. Changes in growth, blood immune
719 parameters and expression of immune related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)
720 in response to diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. *Fish & Shellfish*
721 *Immunol.* 69, 164-172.
- 722 Veras, N.H., Rodrigues, F.F.G., Botelho, M.A., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Costa,
723 J.G.M., 2017. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by
724 essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the thymol. *Arab. J. Chem.* 10, 2790-2795.
725 doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.030.
- 726 Yamamoto, P.Y., 2006. Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos
727 essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Dissertação de mestrado. Instituto agronômico-
728 USP, Campinas. Agricultura tropical e subtropical. Curso de pós-graduação em agricultura
729 Tropical e subtropical. p.90.
- 730 Yigit, N.O., Diler, O., Koca, S.B., Gormez, O., 2017. Effect on histology and nutrient
731 digestibility of supplemented *Origanum onites* essential oil to rainbow trout diets
732 (*Oncorhynchus mykiss*). *Ind. J. Pharm. Educ. Res.* 51 (3), S262-S267. doi:
733 10.5530/ijper.51.3s.26.
- 734 Zapata, A.; Diez, B.; Cejalvo, T.; Gutiérrez-De frías, C.; Cortés, A., 2006. Ontogeny of the
735 immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 126-136.
- 736 Zeppenfeld, C.C.Z., Saccol, E.M.H., Pês, T.S., Salbego, J., Koakoski, G., dos Santos, A.C.,
737 Heinzmann, B.M., da Cunha, M.A., Barcellos, L.J.G., Pavanato, Caron, M.A., B.O.,
738 Baldisserotto, B., 2016. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* -
739 Stress and antioxidant parameters. *Aquac. Nutr.* 23, 1362-1367. doi: 10.1111/anu.12511.
- 740 Zheng, Z., Tan, J.Y., Liu, H., Zhou, X., Xiang, X., Wang, K., 2009. Evaluation of oregano
741 essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance
742 against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 292,
743 214-218.

- 744 Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Santos, A.S., Silva, M.H.L., Maia, J.G.S., 1998. Essential
745 oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon. Flav. and
746 Fragranc. J. 13, 47-48.



747 **Figure 1:** Composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (A).



748 **Figura 2:** Alterações histológicas em carpa koi após 30 e 60 dias de suplementação com óleos de *Lippia sidoides*.
 749 A: Tecido renal sem alterações glomérulo em 30 dias (seta); B: Tecido renal com dilatados dos capilares em 1,0%
 750 do óleo em 60 dias (cabeça de seta); C: Tecido cardíaca sem alteração em 30 dias; D: Tecido cardíaca com
 751 infiltrado eosinofílico em 60 dias de tratamento (asterisco). Coloração: HE, Barra: 50 μ m.

752 **Tabela 1:** Avaliação histologia do rim (média \pm desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75
 753 e 1,00% de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.

	Parâmetros	Tratamentos				
		Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%
30 dias	Degeneração granular	2,00 ± 0,00	1,67 ± 0,29	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
	Hipertrofia celular	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Hipertrofia nuclear	1,17 ± 0,29	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Vacuolização celular	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Dilatação da luz tubular	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Tubulos em regeneração	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Rompimento celular	1,17 ± 0,29	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Degeneração hialina	0,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Oclusão da luz tubular	0,67 ± 0,58	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00	0,33 ± 0,58	0,67 ± 0,58
	Degeneração tubular	0,17 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Novo néfrons	1,17 ± 0,76	0,67 ± 0,29	0,67 ± 0,58	0,33 ± 0,58	0,50 ± 0,50
	Dilatação dos capilares	1,50 ± 0,87 ^a	1,33 ± 0,29 ^a	1,33 ± 0,58 ^a	1,33 ± 0,58 ^a	1,67 ± 0,58 ^a
	Espessamento do endotélio	1,67 ± 0,58	1,33 ± 0,29	2,00 ± 0,00	1,33 ± 0,58	1,67 ± 0,58
	Aumento vol. glomerular	1,67 ± 0,58	0,67 ± 1,15	0,67 ± 0,58	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,00
	Redução espaço de Bowman	1,50 ± 0,87	1,00 ± 0,00	1,00 ± 1,00	2,33 ± 0,58	0,83 ± 0,29
	Presença de hemácia	2,00 ± 0,00	1,67 ± 0,58	1,33 ± 0,58	1,33 ± 0,58	1,17 ± 0,76
	Extravasamento de sangue	1,33 ± 0,58	1,33 ± 0,29	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,17 ± 0,76
	Melamacrófago	0,67 ± 0,58	0,33 ± 0,58	0,67 ± 0,58	1,00 ± 0,00	1,50 ± 0,87
	Infiltrado linfocitário	1,33 ± 1,53	1,00 ± 0,00	0,67 ± 1,15	2,00 ± 1,00	1,17 ± 0,76
	Bolas hialina	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,58	1,67 ± 1,53	0,67 ± 0,58	0,50 ± 0,50
Infiltrado eosinofílicos	1,00 ± 1,00	1,00 ± 1,73	0,00 ± 0,00	1,33 ± 1,15	1,50 ± 0,50	
60 dias	Degeneração granular	1,50 ± 0,50	2,00 ± 0,00	1,83 ± 0,29	1,83 ± 0,29	2,00 ± 0,00
	Hipertrofia celular	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Hipertrofia nuclear	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Vacuolização celular	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Dilatação da luz tubular	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Tubulos em regeneração	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Rompimento celular	1,17 ± 0,29	1,83 ± 0,29	1,33 ± 0,58	1,50 ± 0,50	1,00 ± 0,00
	Degeneração hialina	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Oclusão da luz tubular	0,67 ± 0,58	1,00 ± 0,00	0,83 ± 0,29	0,83 ± 0,29	1,00 ± 0,00
	Degeneração tubular	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Novo néfrons	0,83 ± 0,76	1,67 ± 0,58	1,00 ± 0,00	1,17 ± 0,29	1,33 ± 0,58
	Dilatação dos capilares	1,83 ± 0,29 ^{ab}	1,33 ± 0,58 ^a	1,33 ± 0,58 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	3,00 ± 0,00 ^b
	Espessamento do endotélio	1,83 ± 0,29	1,67 ± 0,58	1,50 ± 0,50	1,83 ± 0,29	1,67 ± 0,58
	Aumento do volume glomerular	1,33 ± 0,29	1,50 ± 0,50	1,33 ± 0,58	1,33 ± 0,29	1,67 ± 0,58
	Redução espaço de Bowman	2,17 ± 0,76	2,17 ± 0,76	1,50 ± 0,50	1,67 ± 1,04	2,00 ± 1,75
	Presença de hemácia	1,00 ± 0,00	1,33 ± 0,58	1,17 ± 0,29	1,17 ± 0,29	1,00 ± 0,00
	Extravasamento de sangue	0,83 ± 0,29	1,00 ± 1,00	1,17 ± 0,29	1,00 ± 0,00	0,67 ± 0,58
	Melamacrófago	1,00 ± 1,00	1,33 ± 0,58	1,50 ± 0,50	1,67 ± 0,15	1,00 ± 0,00
	Infiltrado linfocitário	2,00 ± 0,00	2,50 ± 0,50	2,00 ± 0,00	1,67 ± 0,76	2,67 ± 0,58
	Bolas hialina	1,50 ± 1,50	1,33 ± 0,58	1,33 ± 1,53	1,33 ± 1,15	1,00 ± 0,00
Infiltrado eosinofílicos	1,67 ± 0,76	2,67 ± 0,58	1,17 ± 0,29	1,83 ± 1,04	2,00 ± 0,00	

755 **Tabela 2:** Intensidade de alterações histológicas do coração (média ± desvio padrão) da carpa koi, suplementada
756 com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.

	Parâmetros	Tratamentos				
		Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%
30 dias	Esteatose cardíaca	1,33 ± 0,58	1,50 ± 0,87	1,17 ± 0,29	1,67 ± 0,58	1,67 ± 1,15
	Congestão	1,33 ± 1,53	1,83 ± 0,29	0,00 ± 0,00	1,67 ± 1,53	0,00 ± 0,00
	Necrose	0,00 ± 0,00	0,83 ± 1,04	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,87	0,67 ± 1,15
	Infiltrado linfocitário	0,67 ± 0,58	0,83 ± 0,29	1,00 ± 0,00	0,67 ± 0,76	1,33 ± 0,58
	Infiltrado eosinofílico	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
60 dias	Esteatose cardíaca	1,67 ± 1,15	1,67 ± 0,29	0,67 ± 0,58	1,33 ± 0,58	1,67 ± 1,15
	Congestão	2,17 ± 1,04	1,33 ± 0,29	1,00 ± 1,00	1,50 ± 0,50	1,17 ± 0,76
	Necrose	0,33 ± 0,58	1,00 ± 0,87	0,00 ± 0,00	0,83 ± 1,04	0,00 ± 0,00
	Infiltrado linfocitário	1,83 ± 0,29	2,00 ± 0,50	1,00 ± 0,00	1,50 ± 1,32	1,50 ± 0,50
	Infiltrado eosinofílico	0,67 ± 0,29 ^b	0,67 ± 0,28 ^b	0,67 ± 0,58 ^b	0,71 ± 0,28 ^b	0,83 ± 0,29 ^b

757 Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

758 **Tabela 3:** Avaliação histológica do intestino (média ± desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50;
759 0,75 e 1,00% de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ação.

	Parâmetros	Tratamentos				
		Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%
30 dias	Vacuolização	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Infiltrado linfocitário	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Infiltrado eosinofílico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Melanomacrofago	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Deslocamento da submucosa	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
60 dias	Vacuolização	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Infiltrado linfocitário	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Infiltrado eosinofílico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Melanomacrofago	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Deslocamento da submucosa	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

760 **Tabela 4:** Análise histológica do fígado (média ± desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75
761 e 1,00% de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.

	Parâmetros	Tratamentos				
		Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%
30 dias	1	8,33 ± 12,34	0,00 ± 0,00	20,83 ± 7,22	12,50 ± 12,50	8,33 ± 14,43
	2	54,17 ± 19,09	41,67 ± 19,09	62,50 ± 12,50	75,00 ± 0,00	79,17 ± 19,09
	3	75,00 ± 12,50	67,00 ± 25,46	91,67 ± 14,43	87,50 ± 21,65	70,83 ± 14,45
	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	AB	1,50 ± 1,00	1,33 ± 0,58	1,50 ± 0,50	0,17 ± 0,29	0,83 ± 0,76
	C	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

CGV	1,67 ± 0,76	1,17 ± 0,29	1,83 ± 0,29	2,00 ± 1,00	1,17 ± 0,29
CP	1,50 ± 0,50	1,00 ± 0,50	1,50 ± 0,50	1,83 ± 0,76	1,00 ± 1,00
CS	1,17 ± 0,29	1,00 ± 0,50	1,00 ± 0,00	1,17 ± 0,29	1,17 ± 0,76
CVS	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DNH	1,33 ± 0,29	1,67 ± 0,58	1,00 ± 0,50	0,83 ± 0,29	1,00 ± 0,50
DS	0,83 ± 0,29	0,67 ± 0,58	1,00 ± 0,00	0,67 ± 0,58	0,67 ± 0,29
IE	0,17 ± 0,29	0,17 ± 0,29	0,50 ± 0,50	0,17 ± 0,29	0,00 ± 0,00
IL	0,50 ± 0,50	1,33 ± 0,58	1,00 ± 0,00	0,51 ± 0,50	1,00 ± 0,00
HH	1,50 ± 0,50	1,67 ± 0,29	1,33 ± 0,76	0,83 ± 0,29	0,50 ± 0,50
H N H	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
M A	1,67 ± 1,26	1,33 ± 1,04	1,17 ± 1,04	1,17 ± 1,04	0,83 ± 0,76
Mi	1,67 ± 1,26	2,33 ± 0,76	0,50 ± 0,50	0,67 ± 0,58	0,67 ± 0,29
N	1,33 ± 1,04	1,83 ± 0,29	1,00 ± 1,00	1,00 ± 0,50	1,33 ± 0,76
NP	0,50 ± 0,50	0,33 ± 0,29	0,33 ± 0,58	0,33 ± 0,29	0,50 ± 0,50
NC	1,00 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,83 ± 0,29	1,00 ± 0,00
NCX	1,00 ± 0,00	1,67 ± 0,29	1,00 ± 0,00	0,83 ± 0,29	0,83 ± 0,29
PNH	0,67 ± 0,58	1,00 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,29
PNAP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	12,50 ± 12,50	4,17 ± 7,22	4,17 ± 7,22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	75,00 ± 12,50	58,33 ± 14,43	54,17 ± 31,46	75,00 ± 0,00	79,17 ± 7,22
3	73,33 ± 25,17	79,17 ± 7,22	70,83 ± 19,09	50,00 ± 25,00	87,50 ± 21,65
4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
AB	0,00 ± 0,00	1,17 ± 0,76	0,67 ± 1,15	0,17 ± 0,29	0,67 ± 0,58
C	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CGV	1,17 ± 0,76	1,17 ± 0,29	1,83 ± 1,26	1,33 ± 0,58	1,33 ± 0,58
CP	0,67 ± 0,29	1,17 ± 0,29	1,83 ± 0,76	0,83 ± 0,29	1,50 ± 0,50
CS	1,17 ± 0,29	1,17 ± 0,29	1,00 ± 0,50	1,00 ± 0,50	1,00 ± 0,00
CVS	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DNH	1,00 ± 0,00	1,50 ± 0,50	1,33 ± 0,58	1,00 ± 0,00	0,83 ± 0,29
DS	0,67 ± 0,58	1,00 ± 0,50	0,33 ± 0,58	0,83 ± 0,29	0,00 ± 0,00
IE	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,50	0,67 ± 0,29	0,17 ± 0,29	0,00 ± 0,00
IL	1,17 ± 0,76	1,00 ± 0,50	0,83 ± 0,29	1,00 ± 0,00	0,67 ± 0,58
HH	0,83 ± 0,29	1,50 ± 0,50	1,50 ± 0,87	1,00 ± 0,00	0,67 ± 0,58
H N H	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
M A	1,17 ± 1,04	1,17 ± 0,30	0,83 ± 0,76	0,50 ± 0,50	0,83 ± 0,76
Mi	0,50 ± 0,50	1,33 ± 0,76	1,33 ± 1,53	0,33 ± 0,58	1,33 ± 1,53
N	1,17 ± 0,29	1,67 ± 0,58	1,33 ± 0,58	1,00 ± 0,00	1,17 ± 0,76
NP	0,67 ± 0,58	0,50 ± 0,50	0,50 ± 0,87	0,67 ± 0,29	0,17 ± 0,29
NC	1,17 ± 0,29	1,00 ± 0,00	1,50 ± 0,50	0,67 ± 0,58	0,50 ± 0,50
NCX	1,17 ± 0,29	1,00 ± 0,00	1,17 ± 0,29	0,83 ± 0,29	0,67 ± 0,58
PNH	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,29	0,17 ± 0,29	0,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00
PNAP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

60 dias

762 Legenda das abreviaturas: 1 (Aspecto cordonal), 2 (Uniformidade no tamanho das células e núcleos), 3(Pâncreas
763 com ácinos íntegros e grânulos de zimogênio), 4 (Ductos biliares), AB (Aspecto balonoso nos hepatócitos), C
764 (Colestase); CGV (Congestão nos grandes vasos), CP (Congestão no pâncreas), CS (Congestão nos sinusoides),
765 CVS (Congestão da veia porta), DNH (Deslocamento do núcleo dos hepatócitos), DS (Dilatação dos sinusoides),
766 IE (Infiltrado eosinofílico), IL (Infiltrado linfocitário), HH (Hipertrofia dos hepatócitos), HNH (Hipotrofia do
767 núcleo dos hepatócitos), Ma (Macroesteatose), Mi (Microesteatose), N (Necrose), NP (Núcleo com picnose), NC
768 (Núcleo com cariólise), NCx (Núcleo com cariorrexe), PNH (Perda de núcleo dos hepatócitos), PNAP (Perda de

769 núcleo nos ácinos pancreáticos). Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre
770 os tratamentos.

Tabela 5: Avaliação histológica do baço (média \pm desvio padrão) da carpa koi suplementada com diferentes concentrações 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.

	Parâmetros	Tratamentos				
		Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%
30 dias	Integridade da polpa branca média	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
	Integridade da polpa vermelha	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
	Integridade da Cápsula fibrosa DP	100,00 \pm 0,00	91,67 \pm 11,79	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
	Centros de melanomacrófagos	1,50 \pm 0,71	0,67 \pm 0,47	0,50 \pm 0,41	0,85 \pm 0,85	0,83 \pm 0,24
	Melanomacrófagos	0,83 \pm 0,24	0,33 \pm 0,47	1,00 \pm 0,82	1,00 \pm 0,82	1,00 \pm 0,00
	Necrose	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	Infiltrado eosinofílico	0,17 \pm 0,24	0,00 \pm 0,00	0,33 \pm 0,47	0,00 \pm 0,00	0,50 \pm 0,00
	Infiltrado linfocitário	0,17 \pm 0,24	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,33 \pm 0,47	0,17 \pm 0,24
60 dias	Integridade da polpa branca média	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
	Integridade da polpa vermelha	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
	Integridade da cápsula fibrosa DP	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	83,33 \pm 23,57	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
	Centros de melanomacrófagos	1,33 \pm 0,47	0,83 \pm 0,24	1,33 \pm 1,25	1,17 \pm 0,24	1,83 \pm 0,85
	Melanomacrófagos	1,00 \pm 0,00	0,83 \pm 0,24	0,83 \pm 0,85	0,67 \pm 0,47	1,33 \pm 0,47
	Necrose	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	Infiltrado eosinofílico	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,33 \pm 0,47	0,00 \pm 0,00	0,33 \pm 0,47
	Infiltrado linfocitário	1,00 \pm 0,82	0,17 \pm 0,24	0,00 \pm 0,00	0,17 \pm 0,24	0,50 \pm 0,41

771 Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

772

773 **Tabela 6:** Parâmetros histológico de brânquias (média \pm desvio padrão) de carpa koi alimentada com dietas
 774 suplementadas com diferentes concentrações de óleos essenciais de *Lippia sidoides*.

Parâmetros	Tratamentos				
	Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%
A	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
CL	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
CVC	0,50 \pm 0,41	0,83 \pm 0,62	1,00 \pm 0,71	0,67 \pm 0,47	0,17 \pm 0,24
DVC	0,50 \pm 0,41	1,00 \pm 0,71	1,00 \pm 0,71	0,67 \pm 0,47	0,50 \pm 0,71
DEJ	1,67 \pm 0,24	1,83 \pm 0,24	1,67 \pm 0,24	1,33 \pm 0,94	1,33 \pm 0,47
DLS	0,33 \pm 0,47	0,83 \pm 0,24	0,50 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,50 \pm 0,71
DSV	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
EJ	1,50 \pm 0,41	1,67 \pm 0,47	1,67 \pm 0,24	1,00 \pm 0,82	1,67 \pm 0,47
30 dias ELC	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
FLS	0,83 \pm 0,62	0,33 \pm 0,24	0,83 \pm 0,47	0,67 \pm 0,94	0,33 \pm 0,47
HI	2,17 \pm 0,85	1,83 \pm 0,24	1,67 \pm 0,24	2,00 \pm 0,82	1,67 \pm 0,47
HLS	1,83 \pm 0,62	2,00 \pm 0,71	1,50 \pm 0,00	1,67 \pm 0,94	1,83 \pm 0,62
HCC	1,50 \pm 0,41	1,17 \pm 0,24	1,00 \pm 0,00	2,00 \pm 0,82	1,50 \pm 0,41
IE	2,17 \pm 0,24	2,50 \pm 0,71	2,33 \pm 0,47	2,00 \pm 1,41	2,17 \pm 0,24
IL	1,83 \pm 0,62	1,83 \pm 1,03	1,50 \pm 0,00	1,67 \pm 1,25	2,33 \pm 0,47
N	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
T	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
A	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
CL	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
CVC	0,33 \pm 0,47	0,50 \pm 0,41	0,50 \pm 0,71	0,17 \pm 0,24	1,17 \pm 0,24
DVC	0,33 \pm 0,47	0,50 \pm 0,41	1,33 \pm 0,94	0,67 \pm 0,24	0,83 \pm 0,62
DEJ	1,33 \pm 0,47	1,33 \pm 0,47	1,67 \pm 0,47	1,67 \pm 0,47	1,33 \pm 0,47
DLS	0,33 \pm 0,47	0,33 \pm 0,47	0,00 \pm 0,00	0,17 \pm 0,24	0,33 \pm 0,47
DSV	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
EJ	1,50 \pm 0,41	1,17 \pm 0,24	1,67 \pm 0,47	1,67 \pm 0,47	1,33 \pm 0,47
60 dias ELC	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
FLS	0,17 \pm 0,24	1,00 \pm 0,41	0,67 \pm 0,94	1,17 \pm 0,62	0,83 \pm 0,24
HI	1,83 \pm 0,24	1,50 \pm 1,08	1,83 \pm 0,24	2,33 \pm 0,47	1,83 \pm 0,24
HLS	1,17 \pm 0,85	1,00 \pm 0,71	0,83 \pm 0,85	1,50 \pm 0,41	1,83 \pm 0,85
HCC	0,67 \pm 0,47	1,00 \pm 0,00	1,17 \pm 0,62	1,17 \pm 0,62	0,83 \pm 0,85
IE	2,33 \pm 0,47	2,50 \pm 0,41	2,67 \pm 0,47	2,83 \pm 0,24	2,67 \pm 0,47
IL	2,67 \pm 0,47	2,50 \pm 0,41	1,67 \pm 0,62	2,17 \pm 0,85	2,67 \pm 0,47
N	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
T	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

775 Legenda das abreviaturas: A (Aneurisma); CL (congestão das lamelas); CVC (Congestão do veio central); DVC
 776 (Dilatação do veio central); DEJ (Descolamento do epitélio justalamelar); DELS (Descolamento do epitélio da
 777 lamela secundária); DSV (Dilatação do seio venoso); EJ (Edema justalamelar); ELC (Epitélio lamelar corrugado);
 778 FLS (Fusão das lamelas secundárias); HI (Hiperplasia interlamelar); HLS (Hiperplasia da lamela secundária);
 779 HCC (Hipertrofia das células caliciformes); IE (Infiltrado eosinofílico); IL (Infiltrado linfocitário); N (Necrose);
 780 T (Telangiectasia). Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os
 781 tratamentos.

782 **Tabela 7:** Intensidade de alterações morfológicas do intestino (média \pm desvio padrão) da carpa koi, suplementada
 783 com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.

Parâmetros	Tratamentos					
	Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%	
30 dias	VC	207,24 \pm 69,90	254,59 \pm 98,03	233,41 \pm 57,48	233,00 \pm 19,45	174,54 \pm 61,83
	LV	95,89 \pm 23,63	98,00 \pm 19,37	88,65 \pm 12,28	99,00 \pm 8,54	94,18 \pm 4,98
	NCC	16,29 \pm 8,37	19,3 \pm 18,66	16,55 \pm 3,47	13,56 \pm 4,49	11,39 \pm 6,17
	ATV	1011213,39 \pm 117507,62	748117,04 \pm 283817,21	924244,80 \pm 298963,96	1229649,41 \pm 491044,07	991072,22 \pm 459161,27
	VC	246,30 \pm 30,19	220,79 \pm 68,28	269,43 \pm 52,31	208,87 \pm 31,70	210,09 \pm 40,07
60 dias	LV	100,88 \pm 17,43	94,04 \pm 8,85	110,97 \pm 23,87	95,51 \pm 20,89	133,65 \pm 16,47
	NCC	14,26 \pm 1,71	10,87 \pm 5,62	24,93 \pm 16,39	14,40 \pm 3,01	14,31 \pm 4,76
	ATV	1459004,79 \pm 563249,74	1011638,39 \pm 749840,25	1011638,39 \pm 749840,25	886624,13 \pm 358260,14	1395155,14 \pm 728523,29

784 Legenda das abreviaturas: VC=Comprimentos dos vilos (μ m), LV=Largura dos vilos (μ m), NCC= N^o das Células
 785 caliciforme, ATV=Área total dos vilos (μ m). Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey
 786 ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

787 **Tabela 8:** Parâmetros sanguíneo (média \pm desvio padrão) da carpa koi, suplementada com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00%
 788 de óleos essenciais de *Lippia sidoides* na ração.

Períodos Parâmetros	Tratamentos					
	Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%	
30 dias	Glicose (mg/dL)	21,08 \pm 5,36	19,60 \pm 3,19	16,12 \pm 3,10	16,00 \pm 1,28	16,82 \pm 1,16
	Monócitos (10 ³ células/ μ L)	40,44 \pm 2,66	31,10 \pm 6,37	52,29 \pm 15,15	35,35 \pm 9,91	38,23 \pm 6,18
	Trombócitos (10 ³ células/ μ L)	1,68 \pm 1,54	2,02 \pm 0,79	1,28 \pm 1,08	3,36 \pm 3,02	2,06 \pm 0,70
	Linfócitos (10 ³ células/ μ L)	56,56 \pm 13,53	61,23 \pm 4,70	73,40 \pm 20	71,27 \pm 3,92	69,42 \pm 22,43
	Neutrófilos (10 ³ células/ μ L)	0,14 \pm 0,24	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	Eritrócitos (10 ⁶ células/ μ L)	1,29 \pm 0,15	1,32 \pm 0,08	1,53 \pm 0,35	1,41 \pm 0,14	1,34 \pm 0,19
	Leucócitos totais (10 ³ células/ μ L)	48,57 \pm 8,00	45,83 \pm 4,04	62,77 \pm 15,33	53,75 \pm 3,49	53,82 \pm 8,7
	Glicose (mg/dL)	16,00 \pm 1,78	22,60 \pm 2,59	15,79 \pm 3,71	15,03 \pm 2,91	16,85 \pm 3,10
	Monócitos (10 ³ células/ μ L)	41,38 \pm 22,25	42,38 \pm 29,18	63,92 \pm 10,01	50,25 \pm 10,29	51,34 \pm 26,47
	Trombócitos (10 ³ células/ μ L)	0,54 \pm 0,24	0,50 \pm 0,61	1,42 \pm 1,64	0,27 \pm 0,27	0,26 \pm 0,24
60 dias	Linfócitos (10 ³ células/ μ L)	89,23 \pm 60,18	96,67 \pm 30,09	106,24 \pm 10,90	91,78 \pm 3,77	88,69 \pm 17,9
	Neutrófilos (10 ³ células/ μ L)	5,44 \pm 5,48	3,22 \pm 2,45	4,99 \pm 2,81	2,25 \pm 1,12	2,94 \pm 2,76
	Eritrócitos (10 ⁶ células/ μ L)	1,30 \pm 0,13	1,70 \pm 0,45	2,02 \pm 0,53	1,81 \pm 0,24	1,57 \pm 0,46
	Leucócitos totais (10 ³ células/ μ L)	68,15 \pm 43,17	74,34 \pm 30,39	87,00 \pm 10,12	71,42 \pm 6,48	75,37 \pm 26,91

789 Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo de *L. sidoides* foi eficaz no teste *in vitro* contra monogenoides nas concentrações de 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹. Já no teste *in vivo*, as concentrações 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00%, não foram eficazes contra os parasitos. Além disso, a concentração de 1,00% ocasionou alterações histológicas no período de 60 dias, suplementados na ração. Portanto, recomenda-se a utilização de até 0,75% de *L. sidoides*, utilizados na ração.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AANYU, Margaret.; BETANCOR, Mónica B.; MONROIG, Oscar. Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile. **Comp. Comparative Biochemistry and Physiology**, 138, 405-415.

ABINPET. **Dados de Mercado. Associação Brasileira da Indústria de produtos para Animais de Estimação**. Mercado pet Brasil, 2018.

ACAR, Ümit. *et al.* Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture**, v. 437, p. 282-286, 2015.

AGUIAR, Jaciana. S. *et al.* Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436-440, 2008.

ALMEIDA, Milene. C. *et al.* Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 725, 2018.

ALMEIDA, Neuler André. Óleos essenciais e desenvolvimento sustentável na Amazônia: uma aplicação da matriz de importância e desempenho. **Reflexões Econômicas**, v. 2, n. 2, p.136-158, 2016.

ALVAREZ-PELLITERO, Pilar.; PALENZUELA, Oswaldo.; SITJA-BOBADILLA, Adriana. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). **Parasitology International**, v. 57, p. 110-120, 2008.

AMALA, M. N. A. *et al.* A case of natural co-infection of Tilapia Lake Virus and *Aeromonas veronii* in a Malaysian red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality. **Aquaculture**, v. 485, p.12-16, 2018.

ANTACHE, Alina. *et al.* The influence of some phytobiotics on haematological and some biochemical indices at *Oreochromis niloticus*-Linnaeus, 1758. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 47, n. 1, p. 192-199, 2014.

ANUSHA, Paulraj. *et al.* Protection of ornamental gold fish *Carassius auratus* against *Aeromonas hydrophila* by treating *Ixora coccinea* active principles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p. 485-493, 2014.

ASADI, M. Shahin. *et al.* Effects of watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on selected immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Open Veterinary Journal**, v. 2, n. 1, p. 32-39, 2012.

AYROZA, Daercy Maria Monteiro de Rezende; FURLANETO, Fernanda de Paiva Badiz; AYROZA, Luiz Marques Silva. Regulamentação do acesso territorial aos tanques-rede em área de preservação permanente - APP, no Estado de São Paulo. **Panorama da Aquicultura**, n. 90, p. 63-65, 2005.

AZAMBUJA, Wagner. Óleos essenciais: O início de sua história no Brasil. Disponível em: <https://www.oleosessenciais.org/oleos-essenciais-o-inicio-de-sua-historia-no-brasil>. Acesso em: 4 de março de 2019. 2017.

BABA, Esin. *et al.* Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture**, v. 465, p. 13-18, 2016.

BALASUNDRAM, Nalasundram; SUNDRAM, Kalyana; SAMMAN, Samir. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BALDISSERA, M. D. *et al.* *Melaleuca alternifolia* essential oil prevents oxidative stress and ameliorates the antioxidant system in the liver of silver catfish (*Rhamdia quelen*) naturally infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. **Aquaculture**, v. 480, p. 11-16, 2017a.

BALDISSERA, Matheus. D. *et al.* The adenosinergic system, not the cholinergic system, exerts an antiinflammatory profile in lymphatic immune organs of fish naturally infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. **Aquaculture**, v. 476, p. 119-124, 2017b.

BALDISSEROTTO, Bernardo. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002.

BALON, Eugene. K. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. **Aquaculture**, v. 129, n. 1-4, p. 3-48, 1995.

BARBOUR, Elie. K. *et al.* Control of eight predominant *Eimeria* spp. involved in economic coccidiosis of broiler chicken by a chemically characterized essential oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 583-591, 2015.

- BARRETO, Ivan. Farias. The use of coca leaves in traditional communities: perspectives in health, society, and culture. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 20, n. 2, p. 627-641, 2013.
- BASHIR, Khalid.; PATIL, S.; GANAI, Abdul. Majeed. Effect of formulated feeds with different protein levels on performance of Koi carp (*Cyprinus carpio* var. koi). **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 10, n. 2, p. 195-200, 2010.
- BASMACIOĞLU MALAYOĞLU Hatice. *et al.* Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. **British Poultry Science**, v. 51, p. 67-80, 2010.
- BEVERIDGE, Malcolm. C. M. **Cage aquaculture**. 2a ed. Oxford: Fishing News Books, 2008.
- BIZZO, Humberto. R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BOMBONATO, Maria Tereza Siqueira. *et al.* Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 81-85, 2007.
- BOTELHO, M. A. *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificações e emprego. Acesso em: 29 de março, 2019. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.
- BRUM, A. *et al.* Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 468, p. 235-243, 2017.
- BRUM, Aline Ferreira. *et al.* Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490, p. 98-107, 2018.
- CAI, Yi-Zhong. *et al.* Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 25, p. 2872-2888, 2006.
- CAMARGO, Marina M. P.; MARTINEZ, Cláudia. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.

CAMPOS, Cristiane Meldau.; MORAES, Julieta Rondoni. Engrácia.; MORAES, Flávio. Ruas. Histopathology of gills of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) infested by monogenean and myxosporea, caught in aquidauana river, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 67-70, 2011.

CAMURÇA-VASCONCELOS, Ana Lourdes Fernandes. *et al.* Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, Ana Lourdes Fernandes. *et al.* Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 1-2, p. 167-170, 2008.

CARDOSO, Pedro Henrique Magalhães.; BALIAN, Simone de Carvalho. **Manual técnico de controle sanitário para peixes ornamentais: criação e implementação de programas de autocontrole com base no sistema APPCC / São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo**, p. 165, 2018.

CARLSSON, Gunnar. *et al.* Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 126, n. 15, p. 30-41, 2013.

CARNEIRO, Paulo. César. Falanghe.; SCHORER, Marianne.; MIKOS, Jorge Daniel. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.1, p. 99-102, 2005.

CARVALHO, Ana Fontenele Urano. *et al.* Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

CAVICHIOLO, Fabiana. Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. *In: TAVARES – DIAS, M. (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá. Embrapa Amapá, p. 602-606, 2009.

CECCARELLI, P. S. *et al.* Observações sobre a ocorrência de parasitos no CEPTA entre 1983 e 1990. **Boletim Técnico do Cepta**, v. 3, p. 43-55, 1990.

CHAGAS, Edsandra Campos. *et al.* Efeito do cloreto de sódio sobre as respostas fisiológicas e controle de helmintos Monogenóides em tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Act Amazonica**. v. 42, n. 3, p. 439-444, 2012.

CHAGAS, Edsandra Campos. *et al.* Mebendazole dietary supplementation controls Monogenoidea (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Aquaculture**, v. 464, p. 185-189, 2016.

CHITMANAT, Chanagun.; TONGDONMUAN, Kitiwan.; NUNSONG, Wichan. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 359-364, 2005.

CORRAL, Amanda Curiel Trent. *et al.* Control of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. **Aquaculture**, v. 494, p. 37-44, 2018.

CORRÊA, Lincon. L. *et al.* Hematological and histopathological changes in *Hoplias malabaricus* from the São Francisco River, Brazil caused by larvae of *Contracaecum* sp. (Nematoda, Anisakidae). **Helminthologia**, v. 52, n. 2, p. 96-103, 2015.

CORREIA, Alcinéa Malzete. **Uso dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia* e *Ocimum basilicum* como anestésicos e analgésicos em peixes-palhaços *Amphiprion clarkii***. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 2015.

COSTA, Gerlane de Medeiros. *et al.* Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 947-950, 2012.

COSTA, Jaqueline Custódio. *et al.* *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 471, p. 72-79. 2017.

COSTA, Patrícia Silva. *et al.* Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 44, p. 158-171, 2017a.

CRISTEA, Victor. *et al.* The use of phytobiotics in aquaculture. **Lucrări Științifice-Seria Zootehnie**, v. 57, p. 250-255, 2012.

CRUZ, Claudinei da. **Aspectos toxicológicos de paration metílico e de extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e eficácia no controle de monogenea *Dactylogyridae*, 96 f, 2005**. Tese (Doutorado em Aquicultura de Águas Continentais) - Centro de aquicultura da UNESP.Câmpus de Jaboticabal Jaboticabal, 2005.

CUNHA, Mauro Alves da. *et al.* Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 403-406, 2010.

DARWISH, Ahmed M.; MITCHELL, Andrew.; STRAUS, David L. Evaluation of a 4-h static copper sulphate treatment against experimental infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture Research**, v. 43, p. 688-695, 2012.

DAWOOD, Mahmoud A. O; KOSHIO, Shunsuke. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 454, p. 243-251, 2016.

SINGULANI, Junya de Lacorte. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 27, p. 4416-4422, 2012.

DIBNER, Julia. J.; RICHARDS, James. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.

DILER, Ozgur. *et al.* Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 844-851, 2016.

DONG, Ha Thanh. *et al.* Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. **Aquaculture**, v. 476, p. 111-118, 2017.

DUBE, K.V.; MALI R. P. Toxic effect of aqueous extract of garlic on protein content in fish *Channa punctatus*. **International Journal of Biomedical and Advance Research 690 IJBAR**, 03, 9, 2012.

EL-GALIL, Mohamed Abd A.; ABOELHADID, Shawky M. Trials for the control of Trichodinosis and Gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 57-63, 2012.

ESCOBAR, Patrícia. *et al.* Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FARIA, Paulo Mário Carvalho. *et al.* Aquicultura Ornamental: um mercado promissor. **Panorama da Aquicultura**, edição. 154, 30, 2016.

FARMER, Bradley. D. *et al.* Comparative effects of copper sulfate or potassium permanganate on channel catfish concurrently infected with *Flavobacterium columnare* and *Ichthyobodo necator*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 26, n. 1, p. 71-83, 2014.

FATHI, Mohamed. *et al.* Identification of tilapia lake virus in Egypt in Nile tilapia affected by 'summer mortality' syndrome. **Aquaculture**, v. 473, p. 430 - 432, 2017.

FEIST, Stephen. *et al.* Histopathological assessment of liver and gonad pathology in continental slope fish from the northeast Atlantic Ocean. **Marine Environmental Research**, v. 106, p. 42-50, 2015.

FELIPE, Lorena O.; BICAS, Juliano L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nov na Esc**, v. 39, n. 2, p. 120-30, 2017.

FERNANDES, Fernando de Freitas. *et al.* Avaliação do potencial larvicida da copaíba-do-cerrado e do saboeiro para controle do carrapato-vermelho-do-cão. **Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas: trabalhando ensino, pesquisa e extensão**. São Luiz. MA: Editora UEMA, p. 25-35, 2018.

FERREIRA, Celma M. Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática. *In:* Ranzani-Paiva, M. J. T.; Takemoto, R. M.; Lizama, M.de los A. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora São Paulo, 2004. p. 273-284.

FERREIRA Celma M. *et al.* Características histomorfométricas do intestino de juvenis de tambaqui após uso de probiótico na dieta e durante transporte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1258-1264, 2014.

FERREIRA, Pollyanna M.F. *et al.* Intestinal and liver morphometry of the yellow tail tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n.2, p. 911-922, 2016.

FORWOOD, James Michael. *et al.* Evaluation of treatment methods using sodium percarbonate and formalin on Australian rainbow trout farms. **Aquacultural Engineering**, v. 63, p. 9-15, 2014.

FRANÇA, Jakeline. G. *et al.* Toxicity of the therapeutic potassium permanganate to tilapia *Oreochromis niloticus* and to non target organisms *Ceriodaphnia dubia* (microcrustacean cladocera) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (green microalgae). **Aquaculture**, v. 322, n. 21, p. 249-254, 2011.

FRASCA-SCORVO, Célia Maria D. *et al.* Piscicultura em tanques rede em represas rurais. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 9, n. 1, 2012.

FRIDMAN, Sophie; SINAI, Tamar; ZILBERG, Dina. Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 51-58, 2014.

FUJIMOTO, Rodrigo Y.; COSTA, Helrik C. da.; RAMOS, Fabrício M. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 5-10, 2012.

FULLER, R A. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FUNARI, Cristiano Soleo. *et al.* Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2086-2094, 2012.

GAIKOWSKI, Mark P.; LARSON, Wendi. J.; GINGERICH, William. H. Survival of cool and warm freshwater fish following chloramine-T exposure. **Aquaculture**, v.75, n. 1-4, 31 p. 20-25, 2008.

GARCÍA, Adolfo Ávalos.; CARRIL, Elena Pérez-Urria. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2009.

GAZIM, Zilda Cristiane. *et al.* Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari; Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 129, p.175-17, 2011.

GERSHENZON, Jonathan.; DUDAREVA, Natalia. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408, 2007.

GIANNENAS, Ilias. *et al.* Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 350, p. 26-32, 2012.

GIBSON, Glenn. R.; ROBERFROID, Marcel. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GNATTA, Juliana. Rizzo. *et al.* Aromaterapia e enfermagem: concepção histórico-teórica. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 1, p. 127-133, 2016.

GOMES, Angélica Ferraz. *et al.* Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food Chemistry**, v. 273, p. 186-193, 2019.

GOMES, Levy de Carvalho. *et al.* Efeito do volume do tanque-rede na produtividade de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 111 - 113, 2004.

GOMIDE, Mayana da S. *et al.* The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 895-902, 2013.

GOOLISH, Edward M.; ADELMAN, Ira R. Effects of ration size and temperature on the growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 36, n. 1-2, p. 27-35, 1984.

GOTO, Tsuyoshi *et al.* Antiparasitic effect of matrine and oxymatrine (quinolizidine alkaloids) on the ciliate *Cryptocaryon irritans* in the red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 437, p. 339-343, 2015.

HARAKAWA, Marianna Tiemi. **Aquicultura em Santa Catarina: a influência do clima nos diferentes tipos de cultivos**, 38 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. p. 38.

HARBORNE, Jeffrey Barry. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. Springer science e business media, 1998.

HASHIMOTO, Gabriela Sayuri de Oliveira *et al.* Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 450, p. 182-186, 2016.

HELDWEIN, Clarissa G. *et al.* Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, n. 6, p. 621-629, 2014.

HENNEBELLE^a, Thierry *et al.* Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

HENNEBELLE^b, Thierry *et al.* Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 22, n. 2, p. 256-258, 2008.

HONORATO, Cláudia A. *et al.* Histologia do fígado de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado. **Pesquisas Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 64-68, 2014.

HUDSON, Clare Maxwell. Aromaterapia e massagem. Editora Vitória régia, 1997.

IBIDUNNI, Adegbesan Sherifat; OLUBODUN, Obasa Samuel; IKILILU, Abdulraheem. Growth performance, haematology and histopathology of African catfish (*Clarias gariepinus*) fed varying levels of *Aloe barbadensis* leaves. **Journal of Fisheries**, v. 6, n. 1, p. 553-562, 2018.

IDRIS, Fekiya Mohammed; IBRAHIM, Ali Mohammed; FORSIDO, Sirawdink Fikreyesus. Essential oils to control *Colletotrichum musaei* *in vitro* and *in vivo* on banana fruits. **American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 15, n. 3, p. 291-302, 2015.

JAEMWIMOL, Phitchaya *et al.* Susceptibility of important warm water fish species to tilapia lake virus (TiLV) infection. **Aquaculture**, v. 497, p. 462-468, 2018.

JERÔNIMO, Gabriela Tomas *et al.* Parasitological assessment in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*), with uncommon occurrence of Monogenea parasites. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 179-186, 2016.

KAMPKE, Edgar Hell *et al.* Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 163-171, 2018.

KAUR, Rajbir; DUA, Anish. Induction of histopathological lesions in renal tissue of the fish *Labeo rohita* upon exposure to municipal wastewater of Tung Dhab Drain, Amritsar, India. **Turkish Journal of Zoology**, 40, p.645-654, 2016.

KIRON, Viswanath. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 111-133, 2012.

KUBITZA, Fernando. A versatilidade do sal na piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, setembro de 2007.

KUBTIZA, Fernando.; KUBTIZA, Ludmilla M. M. **Principais parasitose e doenças dos peixes cultivados**. Ed. Ver. Jundiaí, p. 96, 1999.

LEAL, Carlos A. G.; OLIVEIRA, Thais F.; FIGUEIREDO, Henrique C. P. Antibacterianos na Piscicultura: Erros, Acertos e Riscos – Parte 1. **Panorama da Aquicultura**, p.14-23, 2017.

LEONARDO, Jussara Maria Leite Oliveira *et al.* Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 863-870, 2001.

LIMA, Kauana Santos de *et al.* Performance and hematological variables of piavuçu whose diets were supplemented with phytobiotic and probiotic additives. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, 2015.

LIMMA-NETTO, Jose Dantas; SENA, Artur Cedraz; COPATTI, Carlos Eduardo. Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the seda-tion, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* Female). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 727-733, 2016.

LOMBARDI, Julio Vicente. Fundamentos de toxicologia aquática. **Sanidade de organismos acuáticos**. Livraria Varela Editora. São Paulo, p. 263-272, 2004.

LUCAS, Gilvaine Ciavareli *et al.* Antibacterial activity of essential oils on *Anthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vo. 47 n.3, 2012.

LUQMAN, Suaib. The saga of opium poppy: Journey from traditional medicine to modern drugs and nutraceuticals. *In: International Symposium on Papaver 1036*. p. 91-100, 2011.

MACHADO, Marcelo Ruben. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 1, 2015.

MACIEL, Patricia Oliveira *et al.* Anatomia e histologia funcional do rim e baço de alevinos de pirarucu (*Arapaima gigas*). In: **Embrapa Pesca e Aquicultura-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: Congresso da sociedade brasileira de aquicultura e biologia aquática, 5. 2012, Palmas. Unir, consolidar e avançar: anais. Palmas: AQUABIO, 2012.

MACIEL, Patricia Oliveira *et al.* Trichodinidae in commercial fish in South America. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 28, n. 1, p. 33-56, 2018.

MADUREIRA, Tânia Vieira *et al.* The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal)- Experimental assessment using a zebrafish embryo test. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p.212-217, 2011.

MAGALHÃES, André Lincoln Barroso de; JACOBI, Claudia Maria. E-commerce of freshwater aquarium fishes: potential disseminator of exotic species in Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 32, n. 3, 2010.

MALHEIROS, Dayna Filocreão *et al.* Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema spp.* (Monogenea). **Aquaculture**, v. 455, p. 81-86, 2016.

MANIAT, Milad; GHOTBEDDIN, Negar; RAJABZADEH-GHATRAMI, Ebrahim. Effect of garlic on growth performance and body composition of benni fish (*Mesopotamichthys sharpeyi*). **International Journal of Bioscience**, v. 5, p. 269-277, 2014.

MARIGOUDAR, Shambanagouda R. *et al.* Biomarker and histopathological responses of *Lates calcarifer* on exposure to sub lethal concentrations of chlorpyrifos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 327-335, 2018.

MARTINS, Maurílio Lopes *et al.* Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus sp.* **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 3, p. 657-661, 2008.

MARTINS, Maurílio Lopes *et al.* Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 2015.

MARTINS, Maurílio Lopes *et al.* *Trichodina nobilis* Chen, 1963 and *Trichodina reticulata* Hirschmann et Partsch, 1955 from ornamental freshwater fishes in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 281-286, 2012.

MATULOVIC, Felipe Matelli; OSHIRO, Lídia Miyako Yoshii. Uso de óleos essenciais como anestésico para manejo de camarões marinhos *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 14, p. 57-68, 2016.

MEDEIROS, Francisco das Chagas. <http://www.aquaculturebrasil.com/2018/01/19/tanques-rede-de-grande-volume-nova-fronteira-da-piscicultura-brasileira/>. Visualizado em maio de 2019, as 20:26 horas. 2019.

MENDES, Adriano Ivo; CARVALHO, Marcos Cesar de. Caracterização da piscicultura em tanques-rede no município de Rubinéia-SP: Um Estudo de Caso. **Revista do Agronegócio – Reagro**, Jales, v. 5, n.1, p. 16-33, 2016.

MENESES, Juliana Oliveira *et al.* Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus tilapiae* gill parasite of Nile tilapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 497-504, 2018.

MESA-ARANGO, Ana Cecilia. *et al.* Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.

MONTEIRO, Maria Vivina Barros *et al.* Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.

MONTEIRO, Patrícia Castro. **O uso do extrato aquoso de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) no controle de monogenóideos (Platyhelminthes) em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Nilton Lins, Manaus Amazonas/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2012.

MORALES-SERNA, Francisco Neptalí *et al.* Efficacy of praziquantel and a combination anthelmintic (Adecto®) in bath treatments against *Tagia ecuadori* and *Neobenedenia melleni* (Monogenea), parasites of bullseye puffer fish. **Aquaculture**, v. 492, n.1, p. 361-368, 2018.

MORRISON, John. Normal histology. In: MUMFORD, S., HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J.; MACCONNELL, B.; BLAZER, V. (Org.) **Fish Histology and Histopathology**. United States Fish and Wildlife Service - National Conservation Training Center, p.357, 2007.

NALDONI, Juliana *et al.* *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 52-59, 2009.

NASSER, Nivin *et al.* Toxicity of Four chemotherapeutic agents to rabbitfish *Siganus rivulatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 6, p. 877-886, 2017.

NGUGI, Charles C.; OYOO-OKOTH, Elijah; MUCHIRI, Mucai. Effects of dietary levels of essential oil (EO) extract from bitter lemon (*Citrus limon*) fruit peels on growth, biochemical, haemato-immunological parameters and disease resistance in juvenile *Labeo victorianus* fingerlings challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture research**, v. 48, n. 5, p. 2253-2265, 2017.

NIKAIDO, Hiroshi. Multidrug resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-146. 2009.

NOGUEIRA, Marisa A. *et al.* Antibacterial activity of *Lippia alba* (Lemon Herb). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 404, 2007.

OBA, Eliane Tie; MARIANO, W. S.; SANTOS, Laila. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá**, p. 226-247, 2009.

OCAZIONEZ, Raquel Elvira *et al.* Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication *in vitro*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 304-309, 2010.

OLIVEIRA, Danilo R. *et al.* Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* HBK. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007.

ONAKA, Eduardo; MARTINS, Maurício Lopes; MORAES, Flávio. Eficácia do albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae). i. banhos terapêuticos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n. 2, p. 101-107, 2003.

OOTANI, Marcio Akio *et al.* Effect of essential oils and citronellal compound on bean seeds stored microflora. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 1, p. 49-56, 2016.

PACHANAWAN, Adithepchaikarn; PHUMKHACHORN, Parichat; RATTANACHAIKUNSOPON, Pongsak. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 5, p. 419-424, 2008.

PAIXÃO, Luciana Farias *et al.* Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (Osteichthyes: Characidae). **Act Amazônica**, v. 43, n. 2, p. 211-216, 2013.

PALANISAMY, Ponnusamy *et al.* Haematological changes of fresh water food fish, *Channa striata* on exposure to *Cleistanthus collinus* suicidal plant extract. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 812-816, 2011.

PARIS-PALÁCIOS, Séverine; BIAGIANTI-RISBOURG, Sylvie; VERNET, Guy. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of cooper sulfate. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p.109-124, 2000.

PASCUAL, María Elena *et al.* *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PAVANELLI, Gilberto Cezar; EIRAS, Jorge da Costa; TAKEMOTO, Ricardo Massato. **Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. São Paulo: Universidade Estadual de Maringá, 2008.

PEREIRA, Fernando do Amaral; CARNEIRO, Mayara Rosa; ANDRADE, Lucilene Maria de. Piscicultura em tanques-redes/ Embrapa Amazônia Oriental. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 120, 2009.

PERESSIN, Alexandre.; SILVA, Thiago Teixeira. Capítulo 11. Sistemática, anatomia, fisiologia e ecologia de peixes. *In*: GANDINI, Cintia Veloso; LOURES Raquel Coelho. (org.). **Tópicos de manejo e conservação da ictiofauna para o setor elétrico**. Belo Horizonte: Cemig, 2015. p. 243.

PIAZZA, Rômi Sharon *et al.* Parasitic diseases of freshwater ornamental fishes commercialized in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32. p. 51-57, 2006.

PIEPERHOFF, Sebastian. Heart on a Plate: Histological and functional Assessment of isolated adult zebrafish hearts maintained in culture. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 96771, 2014.

PLACHA, Iveta *et al.* Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. **British Poultry Science**, v. 55, n. 1, p. 105-114, 2014.

PORTZ, Lenadro *et al.* Parasitos de peixes de cultivo e ornamentais. **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Eduem, Maringá, p. 85-114, 2013.

POUGH, F. Harvey; HEISER, John B.; MCFARLAND, William N. **A vida dos Vertebrados**. 4. Ed. 2003.

QUEIROZ, Marieta Nascimento de. **Efeito do extrato aquoso da *Piper aduncum* L (Maia *et al.*, 1998) no controle de parasitas monogenéticos (Platyhelminthes: Monogenoidea) e parâmetros fisiológicos do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz 1822)**, 82 f. Dissertação (Mestrado em aquicultura)-Programa de Pós-Graduação em aquicultura. Universidade Nilton Lins, Manaus Amazonas/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 2012.

RAMOS, Fábio. **Crise econômica não afeta comércio de peixes ornamentais em Minas**. L

RAŠKOVIĆ, Bozidar. S. *et al.* Histological methods in the assessment of diferente feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 56, n. 1, p. 87-100 2011.

RATTANACHAIKUNSOPON, Pongsak; PHUMKHACHORN, Parichat. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. **Fitoterapia**, v. 78, n. 6, p. 434-436, 2007.

- RAUHA, Jussi-Pekka *et al.* Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.
- REED, Peggy *et al.* Monogenean parasites of fish. **Fisheries and aquatic sciences. University of Florida UF, IFAS Extension. FA28, USA**, v. 4, p. 1-4, 2009.
- REZENDE, Fernanda Mendes *et al.* Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, p. 93, 2016.
- RIBEIRO, Allyson Soares *et al.* Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2016.
- RIBEIRO, Felipe de Azevedo Silva.; FERNANDES, João Batista Kochenborger. Sistemas de criação de peixes ornamentais. **Panorama da Aquicultura**, 2008.
- RINGØ, Einar *et al.* Prebiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 117-136, 2010.
- ROBERTS, Margaret F. (Ed.). **Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications**. Springer Science & Business Media, 2013.
- ROMERO, Jaime; FEIJOÓ, Carmen Gloria; NAVARRETE, Paola. Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. In *Health and environment in aquaculture*. **Intech Open**. 2012.
- ROSSI, Carlos Augusto *et al.* Uso de óleos essenciais no controle dos sinais clínicos das diarreias neonatais em leitões nascidos de fêmeas com diferentes ordens de parto. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.1, p. 93-102, 2015.
- ROTTA, Marco Aurélio. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Embrapa Pantanal-Documents (INFOTECA-E)**, 2003.
- SACCOL, Etiane M. H. *et al.* Addition of *Lippia alba* (Mill) NE Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416, p. 244-254, 2013.
- SALEM, Mohamed; ABDEL-GHANY, Heba M. Effects of dietary orange peel on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Aquaculture Studies**, v. 18, n. 2, p. 127-134, 2018.
- SANTOS, Adailson da Silva. **Óleos Essenciais- Uma Abordagem Econômica e Industrial**. Rio de Janeiro: Editora Inter ciências, 2011.
- SANTOS, Fernanda Carlini Cunha dos; VOGEL, Fernanda Silveira Flores. Avaliação *in vitro* da ação do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o carrapato bovino

Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 712-716, 2012.

SANTOS, Monyele Acchile. *et al.* Parasitic fauna and histopathology of farmed freshwater ornamental fish in Brazil. **Aquaculture**, v. 470, p. 103-109, 2017.

SANTURIO, Janio Morais. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SARAIVA, Aurélia. Aspectos gerais de histologia e de histopatologia de peixes. *In*: SILVA-SOUZA, A.T. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá, ABRAPOA, 2006. p. 239-240.

SARAVANAN, Manoharan. *et al.* Toxicity of neem leaf extracts (*Azadirachta indica* A. Juss) on some haematological, ionoregulatory, biochemical and enzymological parameters of Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. **Journal of Tropical Forestry and Environment**, v. 1, n. 1, 2011.

SARRAZIN, Sandra Layse F. *et al.* Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1860-1871, 2015.

SEFU, Gerefá.; SATHEESH, Neela.; BERECHA, Gezahegn. Effect of Essential oils treatment on anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease development, quality and shelf life of mango fruits (*Mangifera indica* L). **American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 15, n. 11, p. 2160-2169, 2015.

SENAPINA, Saengchan. *et al.* Inapparent infection cases of tilapia lake virus (TiLV) in farmed tilapia. **Aquaculture**, v. 487, p. 51-55, 2018.

SERAFINI, L. A. *et al.* Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. **Caxias do Sul: EDUCS**, 2002.

SILVA, Alexandre Livramento da. *et al.* Utilização de cloreto de sódio, formalina e a associação destes produtos no controle de ectoparasitas em larvas de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 35(4): p. 597- 608, 2009.

SILVA, Andressa das Graças. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 2004.

SILVA, Leyciane Tayana de Souza. *et al.* Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, 506, p. 205-211, 2019.

SILVA, Maria Aparecida. *et al.* Óleo essencial de aroeira-vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 676-681, 2011.

SILVA, N. A. *et al.* Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) NE Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.

SILVA, Taísa Rocha Gomes. *et al.* Inclusão de óleos essenciais como elementos fitoterápicos na dieta de suínos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 1, p. 181-191, 2012.

SILVEIRA, Ulisses Simon da.; LOGATO, Priscila. Vieira Rosa.; PONTES, Conceição. Edvância. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 817-836, 2009.

SIMAS, Islayla. *et al.* Atividade *in vitro* do óleo essencial de gengibre (*zingiber officinale*) sobre formas jovens de *Contraceacum* sp. (anisakidae) obtidas de peixes *Astyanax altiparanae* e *Geophagus brasiliensis* do lago do parque do ingá de Maringá, Paraná. XIV Encontro brasileiro de patologistas de organismos aquáticos (XIV ENBRAPOA) 2016. Florianópolis-SC. Anais [...]. Florianópolis/SC. 2016.

790

SIQUEIRA, Virginia Medeiros. *et al.* Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, n. 2, p. 89-95, 2011.

SNA, Sociedade Nacional de Agricultura. 2017. Óleos essenciais: uma fonte de divisas a ser mais explorada no Brasil 09/11/2017|Tags: A lavoura, óleos essenciais. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/oleos-essenciais-uma-fonte-de-divisas-a-ser-mais-explorada-no-brasil-2/>. Acesso em: 4 de março de 2019.

SOARES, Bruna Viana. *et al.* Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, v. 452, p. 107-114, 2016.

SOARES, B. V. *et al.* Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 234, p. 49-56, 2017a.

SOARES, Bruna Viana.; TAVARES-DIAS, Marcos. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Embrapa Amapá-Artigo em Periódico Indexado (ALICE)**, 2013.

SÖNMEZ, Adem Yavuz. *et al.* Effects of dietary supplementation of herbal oils containing 1, 8-cineole, carvacrol or pulegone on growth performance, survival, fatty acid composition, and liver and kidney histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 15, p. 813-819, 2015.

SOUSA, Gabriel Soares.; VARNHAGEN, Francisco Adolfo.; PORTO SEGURO, V. **Tratado Descritivo do Brasil em 1587**, Companhia editora nacional, p. 289, 1971.

SOUZA, Maria Luiza R. *et al.* Análise da pele de três espécies de peixes: Histologia, morfometria e testes de resistência. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1551-1559, 2003.

SOUZA, Renilde Cordeiro. *et al.* Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 29-33, 2017.

STASHENKO, Elena E. *et al.* Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 563-566, 2008.

SVÅSAND, Terje. *et al.* **Genetic impact of aquaculture activities on native populations.** European Commission, 2007.

TAIZ, Lincoln.; ZEIGER, Eduardo. Secondary metabolites and plant defense. **Plant Physiology**, v. 4, p. 315-344, 2006.

TALPUR, Allah Dad. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**, v. 420, p. 71-78, 2014.

TANIGUCHI, Fernando.; KATO, Hellen. Christina de Almeida.; TARDIVO, Thiago Fontolan. Definições e estrutura de tanques-rede. Empresa brasileira de agropecuária/ EMBRAPA. Projeto peixes, 2014.

TANIGUCHI, Nobuhiko. *et al.* Color, growth and maturation in ploidy-manipulated fancy carp. **Aquaculture**, v. 57, n. 1-4, p. 321-328, 1986.

TAVARES-DIAS, Marcos.; LEMOS, Jefferson Raphael. Gonzaga.; MARTINS, Maurício Laterça. Parasitic fauna of eight species of ornamental freshwater fish species from the middle Negro River in the Brazilian Amazon Region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 103-107, 2010.

TAVECHIO, Washinton Luiz Gomes.; GUIDELLI, Gislaine.; PORTZ, Leandro. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-41, 2009.

TAYLOR, Edwin W; LEITE, Cleo. A. C; SKOVGAARD, N. Autonomic control of cardiorespiratory interactions in fish, amphibians and reptiles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 7, p. 600-610, 2010.

TEIXEIRA, Rafael Rivas. *et al.* Essential oil of *Aloysia triphylla* is effective in Nile tilapia transport. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 1, p. 17-24, 2018.

TEMPERO, Grant. W. *et al.* Age composition, growth, and reproduction of koi carp (*Cyprinus carpio*) in the lower Waikato region, New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 40, n. 4, p. 571-583, 2006.

TRAESEL, Carolina Kist. *et al.* Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 278-284, 2011.

TRANCOSO, Marcelo Delena. Projeto óleos essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, n. 9, 2013.

URBINATI, Elisabeth. Criscuolo.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *In: Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*, 2004. p. 171-194.

VALENTIM, Daniel Sales Souza. **Atividade antiparasitária de nanoemulsões com óleo essencial e óleo resina contra Monogenoidea das brânquias de *Collossoma macropomum* (Serassalmidae)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical. Universidade Federal do Amapá-AP. 2017.

VALLADÃO, Gustavo. M.R. *et al.* Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. **Aquaculture research**, v. 48, n. 11, p. 5640-5649, 2017.

VALLADÃO, Gustavo Moraes Ramos. *et al.* Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. **Aquaculture International**, p. 1-13, 2019.

VALLADÃO, Gustavo Moraes Ramos. *et al.* Essential oils to control *Ichthyophthiriasis* in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, p.1143-1152, 2016.

VELLOSO, Ana Luiza. *et al.* Histopatologia de brânquias de *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) parasitado por *Therodamas fluviatilis* (Copepoda: Ergasilidae). **Atlântica**, v. 34, n. 1, p. 47-52, 2012.

VIANA, Glauce. S. *et al.* Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 5, p. 347-351, 1998.

VIANA, Gabriela de Moraes. *et al.* Uso do cipó-alho (*Adenocalymna alliacea*) em ração para o controle de parasitas Monogenóides (PLATHYHELMINTHES: MONOGENOIDEA) de tambaquis, *Collossoma macropomum*. *In: I Encontro Nacional de Aquicultura na Amazônia de 29 a 31 de outubro de 2012*.

VICUÑA, Gloria Carolina.; STASHENKO, Elena E.; FUENTES, Jorge Luis. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 343-349, 2010.

VIDAL JR, Manuel Vazquez. V. Sistemas de produção de peixes ornamentais. Cad.Téc. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 51, p. 62-74, 2006.

VROMANT, Nico. *et al.* Survival rate and growth performance of *Cyprinus carpio* L. in intensively cultivated rice fields. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 2, p. 171-177, 2004.

WINKALER, Elissandra. U. *et al.* Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 236-244, 2007.

YADAV, Akhilesh Kumar. *et al.* Histological changes in threatened Asian catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) gills following dietary fat interventions. **European Journal of Experimental Biology**, v. 5, n. 2, p. 65-70, 2015.

YANG, Yong; Ye, Xiao-li, LI, Xue-gang. Antimicrobial effect of four alkaloids from coptidis rhizome. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, v. 18, n. 12, p. 3013-3014, 2007.

YANONG, R. P. Necropsy techniques for fish. *In*: **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. WB Saunders. p. 89-105, 2003.

YIGIT, Nalan Ozgur. *et al.* Effect on histology and nutrient digestibility of supplemented *Origanum onites* essential oil to rainbow trout diets (*Oncorhynchus mykiss*). **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, 2017.

YUAN, Ye *et al.* Effects of dietary dosage forms of copper supplementation on growth, antioxidant capacity, innate immunity enzyme activities and gene expressions for juvenile *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, 84, p. 1059-1067. 2019.

ZHANG, Xiao P. *et al.* The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). **Aquaculture**, p. 420, p. 302-307, 2014.

ZHOU, Shun *et al.* Anthelmintic efficacies of three common disinfectants and extracts of four traditional Chinese medicinal plants against *Gyrodactylus kobayashii* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). **Aquaculture**, v. 466, p.72-77, 2017b.

ZHOU, Yangen *et al.* Effects of various levels of dietary copper supplementation with copper sulfate and copper hydroxychloride on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* performance and microbial communities. **Aquaculture**, v. 476, p. 94-105. 2017a.

ZIEGLER, Jörg; FACCHINI, Peter J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 735-769, 2008.

ZORAL, Mehmet Arif *et al.* Anthelmintic activity of *Rosmarinus officinalis* against *Dactylogyrus minutus* (Monogenea) infections in *Cyprinus carpio*. **Veterinary Parasitology**, v. 247, p. 1-6, 2017.