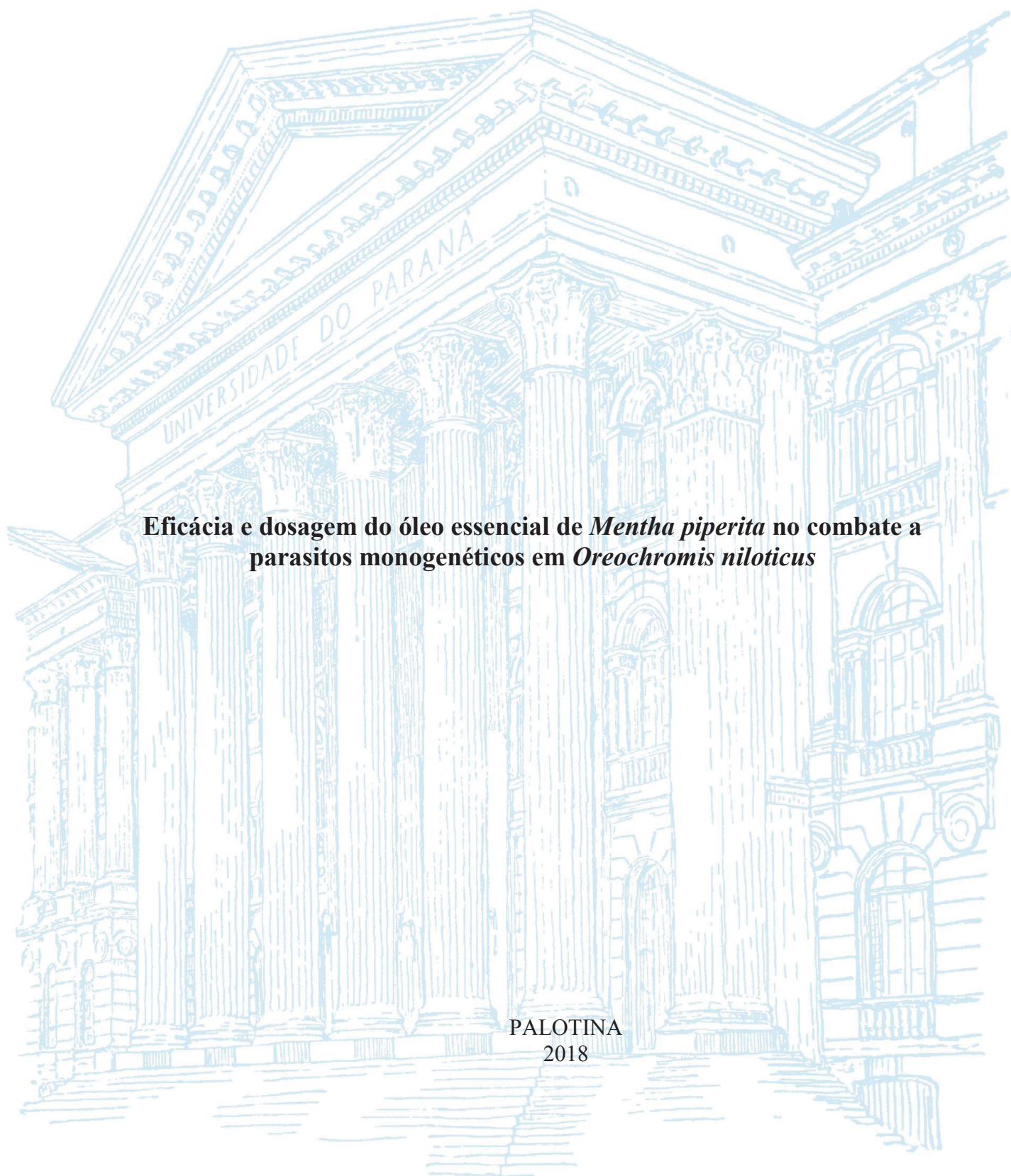


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE CRISTINA PAULINO DOS ANJOS

**Eficácia e dosagem do óleo essencial de *Mentha piperita* no combate a parasitos monogenéticos em *Oreochromis niloticus***

PALOTINA  
2018



ALINE CRISTINA PAULINO DOS ANJOS

**Eficácia e dosagem do óleo essencial de *Mentha piperita* no combate a parasitos monogenéticos em *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável do Setor Palotina, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Área de concentração: Produção de organismos Aquáticos e impactos ambientais da atividade de Aquicultura

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Isaac

Coorientador: Prof. Dr. Gilberto Cezar Pavanelli

PALOTINA  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A599 Anjos, Aline Cristina Paulino dos  
Eficácia e dosagem do óleo essencial de *Mentha piperita*  
no combate a parasitos monogenéticos em *Oreochromis niloticus*  
/ Aline Cristina Paulino dos Anjos. – Palotina, 2018.  
37f.

Orientadora: Andréia Isaac.  
Coorientador: Gilberto Cezar Pavanelli.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação Aquicultura e  
Desenvolvimento Sustentável.

1. Banho terapêutico. 2. Hortelã-pimenta. 3. Tilápia do Nilo.  
I. Isaac, Andréia. II. Pavanelli, Gilberto Cezar. III. Universidade  
Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 639.3

## TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AQUICULTURA E  
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALINE CRISTINA PAULINO DOS ANJOS** intitulada: **Eficácia e dosagem do óleo essencial de *Mentha piperita* no combate a parasitos monogenéticos em *Oreochromis niloticus***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 30 de Julho de 2018.

  
ANDRÉIA ISAAC

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
MILTON RÖNNA

Avaliador Externo (UFPR)

  
FABRICIO MARTINS DUTRA

Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho a Deus, minha família e orientadora que sempre me incentivam a obter conhecimento e acima de tudo aprender com as falhas e supera-lás.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais e toda minha família, incentivando buscar conhecimento e superar barreiras.

Ao meu namorado, sempre ao meu lado, estimulando a lutar pelos meus sonhos.

A minha orientadora Andréia Isaac e ao meu coorientador Gilberto Cezar Pavanelli, pelo o apoio nas horas mais difíceis e os sábios conselhos.

Aos senhores Dirceu A. Rossato e Rafael Silva, pela gentileza e a doação de peixes.

Pela bolsa concedida, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (Capes)- código de financiamento 001 e Fundação Araucária.

Aos professores Eduardo L. C. Ballester e Leandro Portz, por cederem o laboratório de carcinocultura e pelo auxílio no transporte dos peixes.

À professora Lucíola Thais Baldan e toda equipe do laboratório de qualidade de água, pela ajuda nas análises.

À ajuda da professora Lilian Carolina Rosa da Silva, cedendo equipamentos e materiais necessários à aclimatação dos peixes.

À professora Yara Moretto, permitindo a permanência no laboratório, sem restrição de horário.

Ao professor Álvaro J. Almeida Bicudo e a sua orientada Luciana de Oliveira pela doação de ração para os peixes.

Aos professores Plínio S. Furtado, Fabrício M. Dutra, André M. Vaz- dos -Santos e Isac G. Rosset, pela ajuda com cálculos.

Aos professores Milton Ronnau e Aline M. Viott, pela ajuda com a histologia.

Ao professor Almir M. Cunico, por disponibilizar o laboratório de fisiologia em organismos aquáticos.

Aos técnicos do laboratório: Ademir Heldt, Marlise T. Mauerwerk, Thamis Meurer, Suzana Galli, Guilherme F. Lenz e Mônica R. Matos , Dircelei Sponchiado; pela ajuda e conselhos durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao pessoal dos serviços gerais, guardas e os demais servidores.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram durante minha especialização. Levo a alegria e a honra pelo conhecimento que obtive, mas também a eterna gratidão às pessoas que conheci em mais essa caminhada.

O Saber a gente aprende com mestres e livros.  
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os  
humildes.

(CORA CORALINA)

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar a eficácia do óleo essencial contra monogênea e determinar a dosagem segura em *Oreochromis niloticus*. No teste de toxicidade aguda em alevinos, foram avaliadas sete concentrações (20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg/L) com dois controles, sendo um positivo (alevinos mantidos em água) e um controle negativo (alevinos mantidos em água com a adição de 35ml/L de álcool etílico absoluto - P.A. 99,8%). A concentração letal foi testada durante 48 horas (CL50-48h), período no qual registrou-se o comportamento e a mortalidade dos indivíduos. Após o teste de toxicidade aguda foram feitas análises histológicas das brânquias, utilizando o segundo arco branquial do lado direito de 3 peixes das 3 repetições, das concentrações de toxicidade aguda e dos respectivos controles (n=9). Para testar a eficácia do óleo essencial contra o parasito no hospedeiro vivo, foi realizado um ensaio *in vivo* com 27 juvenis de tilápia do Nilo naturalmente infectados. Para tanto, foi realizado um tratamentos com três repetições, onde os peixes foram submetidos a banhos de 60 minutos com óleo essencial de *M. piperita* na concentração de 35mg/L (valor determinado pelo teste de toxicidade aguda), e dois controles, um positivo e um negativo. A CL50 foi determinada através do programa Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95%. Adotou-se o programa Sigma Plot V.11 para gerar o gráfico de despigmentação do teste de toxicidade. Utilizou-se gráficos de ocorrência para visualização de dados dos comportamentos dos peixes do teste de toxicidade e do ensaio *in vivo*. No teste de toxicidade em alevinos a CL50-48h indicou 35,43 mg/L. Não foram observadas mudanças comportamentais dos indivíduos nos controles ou na concentração de 20 mg/L. Porém, nas demais concentrações (25, 30, 35, 40, 45 e 50mg/L) ocorreram alterações comportamentais. Dos 270 indivíduos, 20 apresentaram despigmentações. Encontrou-se alterações histológicas nos alevinos: levantamento do epitélio lamelar, fusão lamelar parcial, proliferação generalizada do tecido epitelial, fusão lamelar total, parasitos protozoários, aneurismas. No ensaio *in vivo* mesmo na concentração suportada de 35mg/L, após uma hora de observação não foi verificado eficácia imediata do óleo essencial de *Mentha piperita* contra os monogenéticos, uma vez que não foram encontrados parasitos mortos. O presente trabalho fornece evidência de que nas concentrações de 40, 45 e 50mg/L, o óleo essencial de *M. piperita* demonstrou-se tóxico para os alevinos de *O. niloticus* nas condições avaliadas, causando alterações histológicas, mudanças na coloração do animal, morte e ineficácia contra os parasitos monogenéticos após banho de 60 minutos.

Palavras-chave: Hortelã-pimenta. Tilápia do Nilo. Banho terapêutico.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effectiveness of the essential oil against monogenea and to determine the safe dosage in *Oreochromis niloticus*. In the acute toxicity test in fingerlings, seven concentrations (20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 mg/L) were evaluated with two controls, one positive (fingerlings kept in water) and one negative control (Fingerlings kept in water with the addition of 35ml/L of absolute ethyl alcohol – P.A. 99.8%). The lethal concentration was tested for 48 hours (LC50-48h), during which period the behavior and mortality of individuals were registered. After the acute toxicity test, histological analysis of the second right branchial arch of 3 fish from the 3 replicates, acute toxicity concentrations and respective controls (n = 9) was performed. To test the efficacy of the essential oil against the parasite in the live host, an *in vivo* assay was performed with 27 naturally infected juvenile Nile tilapia juveniles. For that, a three-replicate treatment, where the fish were submitted to 60-minute baths with essential oil of *M. piperita* at a concentration of 35 mg/L (value determined by the acute toxicity test), and two controls, one positive and a negative. The LC50 was determined through the Trimmed Spearman-Kärber program with a 95% confidence interval. The Sigma Plot V.11 program was adopted to generate the depigmentation graph of the toxicity test. Occurrence plots were used to visualize fish behavior data from the toxicity test and the *in vivo* test. In the fingerlings toxicity test in the LC50-48h indicated 35.43 mg/L. No behavioral changes were observed in controls or at a concentration of 20 mg/L. However, in the other concentrations (25, 30, 35, 40, 45 and 50 mg/L), behavioral changes occurred. Of the 270 individuals, 20 presented depigmentations. Histological changes were found in the fingerlings: lamellar epithelium removal, partial lamellar fusion, generalized epithelial tissue proliferation, total lamellar fusion, protozoan parasites, and aneurysms. In the *in vivo* assay even at the supported concentration of 35mg/L, after one hour of observation no immediate efficacy of the *Mentha piperita* essential oil against the monogenetics was observed, since no dead parasites were found. The present work provides evidence that at concentrations of 40, 45 and 50 mg/L, the essential oil of *M. piperita* was toxic for *O. niloticus* fingerlings under the conditions evaluated, causing histological changes, changes in the color of the animal, death and ineffectiveness against monogenetic parasites after a 60 minute bath.

Key-words: Pepper mint. Nile Tilapia. Therapeutic baths.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Esquema do teste de toxicidade do óleo essencial de <i>M. piperita</i> em alevinos de <i>O. niloticus</i> . .....	17
<b>FIGURA 2-</b> <b>A-B</b> (Controle Positivo); <b>C-D</b> (Controle Negativo); <b>E-F</b> (Tratamento de 20 mg/L ); <b>G-H</b> (Tratamento de 25 mg/L ). Setas pretas = Fusão lamelar parcial. Cabeça seta preta =parasito. Círculo preto = proliferação generalizada do tecido epitelial. Seta branca =levantamento do epitélio. Hexágono preto =brânquia normal. ....	24
<b>FIGURA 3-</b> <b>I-J</b> (Tratamento de 30 mg/L); <b>K-N</b> (Tratamento de 35 mg/L ); <b>O-P</b> (Tratamento de 40 mg/L ). Setas pretas = Fusão lamelar parcial. Cabeça seta preta = parasito. Círculo preto = proliferação generalizada do tecido epitelial. Seta branca = levantamento do epitélio. Colchete duplo = Aneurisma. ....	25
<b>FIGURA 4-</b> <b>Q</b> (Tratamento de 40 mg/L) ; <b>R-S</b> (Tratamento de 45 mg/L ); <b>T-U</b> (Tratamento de 50 mg/L). Cabeça seta preta = parasito. Círculo preto = proliferação generalizada do tecido epitelial. Arco = Fusão lamelar total. ....	26

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b> – COMPORTAMENTO DOS ALEVINOS DE <i>O. niloticus</i> NO TESTE DE TOXICIDADE. ....	22
<b>GRÁFICO 2</b> - DESPIGMENTAÇÃO NOS ALEVINOS DE <i>O. niloticus</i> APÓS A UTILIZAÇÃO DE <i>Mentha piperita</i> .....	23
<b>GRÁFICO 3</b> – COMPORTAMENTO DOS JUVENIS DURANTE 60 MINUTOS NOS CONTROLES E NO TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL. a = Deitado no fundo; b = Esfregar o corpo no aquário; c = Natação errática; d = Natação na superfície; e = Parado no fundo; f = Tombado.....	28

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DO TESTE DE TOXICIDADE....	21
<b>TABELA 2</b> – ALTERAÇÕES NAS BRÂNQUIAS DE ALEVINOS DE <i>O. niloticus</i> . CP = Controle positivo; CN = Controle negativo; T20= Tratamento de 20 mg/L; T25= Tratamento de 25 mg/L; T30= Tratamento de 30 mg/L; T35= Tratamento de 35 mg/L; T40= Tratamento de 40 mg/L; T50= Tratamento de 50 mg/L. P= Presente; A= Ausente. ....	23
<b>TABELA 3</b> – PARÂMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS DA ÁGUA ANTES DO BANHO....	27
<b>TABELA 4</b> – PARÂMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS DA ÁGUA DEPOIS DO BANHO..	27

## LISTA DE SÍMBOLOS

® – marca registrada

µm – micrômetro

CL 50 – concentração letal em 50 % dos indivíduos

g/L – gramas por litro

mg/L – miligramas por litro

ml – mililitro

ml/L – mililitro por litro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
2.1	TESTE DE TOXICIDADE EM ALEVINOS .....	16
2.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS .....	18
2.3	ENSAIO <i>IN VIVO</i> .....	18
2.4	ANÁLISE DOS DADOS .....	19
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	20
3.1	TESTE DE TOXICIDADE EM ALEVINOS.....	20
3.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS .....	23
3.3	ENSAIO <i>IN VIVO</i> .....	26
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	28
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO CONSELHO DE ÉTICA</b> .....	36
	<b>ANEXO B – INFORMAÇÕES SOBRE O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. PIPERITA</i></b> ....	37

## 1 INTRODUÇÃO

As tilápias, peixes de água doce da família Cichlidae, são originárias da África e Ásia (Jordânia e Israel), sendo que mais de 70 espécies foram identificadas. Dessas, registros indicam que a espécie *Oreochromis niloticus* foi importada para o Brasil em 1971 (LIM e WEBSTER, 2007) e pode ser considerada uma das espécies de grande importância para a aquicultura (EL SAYED, 2006). Segundo FAO (2018), em 2015 a produção global da tilápia foi de 5,6 milhões de toneladas, sendo que no Brasil foram produzidos 219,4 toneladas.

*Oreochromis niloticus* apresenta algumas espécies de parasitos específicos, principalmente parasitos monogenéticos como: *Cichlidogyrus halli*, *C. longicornis*, *C. sclerosus*, *C. thurstonae*, *Scutogyrus longicornis* e *Enterogyrus cichlidarum* (EIRAS, TAKEMOTO e PAVANELLI, 2010).

Vargas et al. (2000) comentam que esses ectoparasitos monogenéticos podem causar problemas sanitários para as tilápias. Boijink et al. (2016) descreve que os parasitos monogenéticos possuem uma estrutura denominada haptor localizada na parte posterior do corpo e que, juntamente com barras, âncoras e ganchos, têm a função de fixação no hospedeiro. Os autores comentam que as lesões causadas por esses parasitos facilitam a entrada de patógenos secundários, como fungos e bactérias e, como mecanismo de defesa, o hospedeiro secreta grandes quantidades de muco prejudicando assim as trocas gasosas e levando o hospedeiro a morte por asfixia.

Os autores Kaur, Siddhnath e Bharti (2018) comentam que os parasitos monogenéticos (Platyhelminthes, Monogenea) apresenta ciclo de vida direto, sendo ovo, larva (oncomirácidio) e adulto, que conseguem detectar as diferentes espécies de peixes nos ambientes através de estruturas sensoriais através de estímulos químicos e físicos oriundos da superfície do hospedeiro.

Como modo de profilaxia contra esses ectoparasitos, são aplicados os tratamentos convencionais como: cloreto de sódio, formalina, permanganato de potássio, verde malaquita, formalina + verde malaquita (PAVANELLI, EIRAS e TAKEMOTO, 2008). Segundo Mabilia e Souza (2006) e Maximiano et al. (2005) o uso de tratamentos convencionais utilizados no combate a ectoparasitos tem causado preocupação uma vez que, muitos produtos químicos utilizados na aquicultura não são autorizados, sendo que os efeitos desses produtos não estão elucidados na ciência, principalmente devido ao impacto no ambiente, saúde dos animais e fisiologia dos peixes e na saúde humana.

Onaka, Martins e Moraes (2003) em seu estudo do uso de praziquantel e albendazol contra monogênea de Pacu, comentam que o uso de tratamentos químicos podem causar impactos ambientais como: prejuízos na comunidade biótica, cadeia alimentar e ainda por cima os organismos podem desenvolver resistência contra o produto. Ademais, Burridge et al. (2010), em seu trabalho com uso de químicos na aquicultura do salmão, observou que o uso de antibióticos e parasiticidas (avermectinas, piretróides, peróxido de hidrogênio, organofosforados, síntese inibitória da quitina) ocasionou efeitos biológicos nos peixes (a nível celular, molecular e bioquímico) e alteraram ciclos de vida em organismos da comunidade bentônica, ficando resíduos dos produtos químicos que não foram decompostos pela atividade microbiológica, causando impacto ambiental. Além disso, alguns tratamentos convencionais podem não resultar em eficácia como foi observado por Porto et al. (2017) ao avaliarem o permanganato de potássio e observaram em seus resultados que não houve eficácia contra monogênea de *Colossoma macropomum*. Nesse contexto, medidas profiláticas alternativas contra parasitos de interesse na aquicultura são de suma importância, pois podem minimizar prejuízos financeiros e ecológicos.

Como método alternativo, os fitoterápicos são usados há séculos na medicina tradicional e apresentam uma ampla gama de propriedades, entre as quais: estimulação do apetite, promoção de crescimento, anti-inflamatório, anti-estimulante, imunoestimulante, anti-stress e anti-câncer (BULFON, VOLPATTI e GALEOTTI, 2015). Segundo Marques et al. (2015) e Kaur e Shah (2017), fitoterápicos causam efeito na resposta imunológica devido às diversas propriedades químicas de seus metabólitos: flavonóides, terpenos, taninos, polissacarídeos, alcalóides e saponinas, presentes em diversas partes das plantas; favorecendo a utilização de extratos e óleos essenciais de sementes, raiz, folhas e frutos (BULFON, VOLPATTI e GALEOTTI, 2015). Bizzo, Hovell e Rezende (2009) comentam que os óleos essenciais têm ganhado destaque no Brasil, principalmente por ser um processo altamente sustentável e renovável. Para Tavares-Dias (2018), a utilização desses óleos tem aumentado consideravelmente devido à procura por novos compostos bioativos com potencial antiparasitário para diversos animais, despertando o interesse para aquicultura, especificamente em peixes.

Atualmente, mais de 60 espécies de plantas são utilizadas na aquicultura para garantir a melhoria da saúde dos peixes e sanidade de doenças (BULFON, VOLPATTI e GALEOTTI, 2015). Entretanto, sabendo-se da diversidade de metabólitos e propriedades químicas que as plantas podem apresentar, bem como das implicações ecológicas, são necessários estudos para determinar a aplicabilidade desses produtos (NEELAVATHI, VENKATALAKSHMI e

BRINDHA, 2013). Pereira et al. (2016), em seu trabalho com uso de extratos de plantas e suas propriedades profiláticas ou terapêuticas na produção de peixes, comenta que são necessários estudos envolvendo plantas e peixes, principalmente aqueles de importância para piscicultura, que irão definir o melhor produto a ser utilizado no combate a determinados parasitos.

Entre as diversas plantas testadas para uso na aquicultura inclui-se a espécie *Mentha piperita* (Família Lamiaceae) (MALHEIROS et al., 2016). Extratos dessa espécie possuem compostos como: terpenóides, flavonóides, fenólicos, que têm atividade contra bactérias e protozoários (TREVISAN et al., 2017). Assim como, estudos com extratos dessa espécie possuem efeito anestésico (MAZANDARANI e HOSEINI, 2017).

Pesquisas com banhos terapêuticos avaliando os efeitos de *M. piperita* contra parasitos de peixes incluem: taxas de eclosão de *Oncorhynchus mykiss* (Família Salmonidae) contra a atividade de fungos (MOUSAVI et al., 2009); em alevinos de *Arapaima gigas* (Família Arapaimidae) contra monogênea (MALHEIROS et al., 2016) e; em juvenis de *Oreochromis niloticus* contra monogênea (HASHIMOTO et al., 2016). Entretanto, a avaliação da propriedade anti-helmíntica de *M. piperita* usando banhos terapêuticos, ainda requer estudos de eficiência e dosagem (REVERTER et al., 2014).

Os parasitos monogênicos podem infectar os peixes em sua fase inicial de vida e serem transportados juntamente com seu hospedeiro para os tanques de crescimento, causando inúmeros prejuízos ao produtor, já que uma vez instalados nesses tanques, sua erradicação é praticamente impossível. Neste contexto, ressalta-se a importância do estudo de novas substâncias eficazes contra os parasitos monogênicos, e que possam ser utilizados ainda na fase de alevinos, evitando a contaminação dos tanques de crescimento e consequente mortalidade em massa dos hospedeiros.

Neste estudo foi testada a hipótese de que o óleo essencial de *Mentha piperita* é eficaz no combate a parasitos monogênicos em *Oreochromis niloticus*.

Este trabalho teve como objetivos avaliar a eficácia do óleo essencial contra monogênea e determinar a dosagem segura em *Oreochromis niloticus*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido na Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) em 21/11/2017 sob protocolo nº38/2017 disponível no anexo A.

Os alevinos e juvenis de *Oreochromis niloticus* pertencentes à linhagem *GIFT* foram adquiridos diretamente de fornecedores da região.

O óleo essencial de *Mentha piperita* pertence ao lote 05960220/17 comercializado pela empresa Mundo dos óleos, sendo declarado como máximo grau de pureza. Extraído pelo laboratório PHITOEXTRATOS LTDA. O anexo B mostra as informações técnicas fornecidas pela empresa.

## 2.1 TESTE DE TOXICIDADE EM ALEVINOS

Foram utilizados 270 alevinos com peso médio de  $2,67g \pm 0,66$  e comprimento médio de  $4,36cm \pm 0,32$ . Os indivíduos foram aclimatados em tanques de fibra de polietileno com capacidade para 500 litros de água, permanecendo em fluxo contínuo e aeração constante (MALHEIROS et al., 2016). Os indivíduos foram alimentados com a mesma ração comercial duas vezes ao dia (10h:00min e 16h:30min) até a saciedade aparente (LIM e WEBSTER, 2006). Após a última alimentação, aguardava-se 30 minutos e as fezes eram removidas e 30 % da água renovada.

Antes de iniciar o experimento, os alevinos permaneceram em jejum por 24 horas e logo após foram transferidos para o laboratório. Para diminuir o estresse durante o transporte, utilizou-se banho em cloreto de sódio na proporção de 1g/L (EPA, 2002). Em laboratório, os indivíduos foram submetidos a um banho em solução de Eugenol e, posteriormente, foi realizada a biometria. Após a biometria, os indivíduos foram transferidos para os aquários, onde permaneceram até sua completa recuperação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os peixes foram alocados de forma aleatória em aquários com capacidade de 50 litros, porém com 20 litros de água. Cada aquário (tratamento e controle) recebeu 10 espécimes de *O. niloticus*. A água utilizada nos aquários foi proveniente de abastecimento público, e para não haver presença de cloro, esta foi mantida sob aeração constante durante 24 horas e em seguida foi aplicado o teste-cloro. Por tratar-se de um sistema estático, a concentração letal foi observada durante 48 horas (CL50-48h), e durante os testes os alevinos não foram alimentados. A luminosidade foi controlada, garantindo-se um fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

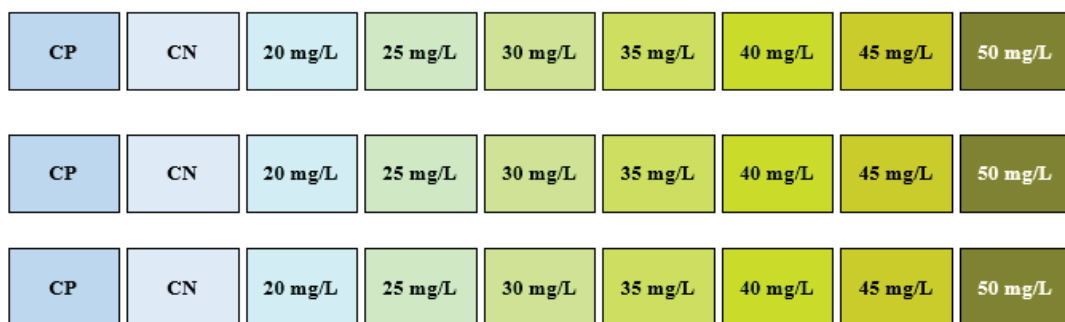
No teste de toxicidade aguda, avaliou-se sete concentrações (20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg/L) do óleo essencial de *M. piperita*. As concentrações foram obtidas realizando-se diluições simples a partir de uma solução *stock* preparada com 1g do óleo essencial de *M.*

*piperita* diluído em 10mL de álcool etílico absoluto (P.A. 99,8%). Para tanto, utilizou-se a seguinte fórmula Química:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Sendo:  $C_i$  = Concentração inicial;  $V_i$  = Volume inicial;  $C_f$  = Concentração final;  $V_f$  = Volume final.

Para cada tratamento de toxicidade aguda e para os dois controles, foram realizadas três repetições. No controle positivo, os alevinos foram mantidos em água, e no controle negativo, os alevinos permaneceram em água com a adição de álcool etílico (P.A. 99,8 %) absoluto a uma concentração de 50 mg/L, conforme a FIGURA 1.



**FIGURA 1** - Esquema do teste de toxicidade do óleo essencial de *M. piperita* em alevinos de *O. niloticus*.

Seguindo a metodologia proposta por Hashimoto et al. (2016) e Chagas et al. (2015) e Hashimoto et al. (2016), os níveis de amônia, nitrito, oxigênio dissolvido, temperatura e pH da água foram mensurados antes e após o tratamento. Os dados foram obtidos utilizando o aparelho multiparâmetro AKSO88, e para análise dos níveis de amônia e nitrito foi utilizado método de APHA (2005).

Registrou-se a mortalidade e o comportamento dos indivíduos a cada 30 minutos nas primeiras 24 horas e a cada 60 minutos nas 24 horas restantes (CHAGAS et al., 2015). Seguindo a metodologia de Malheiros et al. (2016), os indivíduos eram considerados mortos quando o movimento do opérculo e batimentos caudais estavam parados completamente e caso não houvesse resposta através de um estímulo mecânico (bastão de vidro). Estes eram, então, retirados do aquário para não comprometer a qualidade de água. Foram considerados comportamentos anormais: anoxia, natação errática ou agitação, tombado, deitado no fundo e parado no fundo do aquário, seguindo a metodologia de Chagas et al. (2015) adaptada para esta pesquisa. Mudanças na coloração do animal foram observadas em todos os tratamentos e controles durante a exposição ao óleo. Após o período de 48 horas os indivíduos sobreviventes foram transferidos para outro aquário e seu comportamento foi observado.

## 2.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS

A análise histológica das brânquias teve como finalidade, a observação de possíveis alterações causadas pelo uso do óleo essencial em alevinos.

Realizou-se a análise histológica do segundo arco branquial do lado direito de 3 peixes das 3 repetições, das concentrações de toxicidade aguda e dos respectivos controles (n=9). Os arcos branquiais extraídos foram fixados em solução de Davidson por 24 horas. Após esse período foram desidratados em uma série de soluções etanólicas (70 %, 80 %, 90 % e 100 %), diafanizadas em xilol e em seguida, processados em parafina (CAPUTO et al., 2010).

Os cortes histológicos foram obtidos com o auxílio de um micrótomo semiautomático, obtendo-se amostras de 4 $\mu$ m, que passaram por um banho com água e gelatina aquecida e depois um banho com álcool. Após esse processo, seguiu-se o protocolo de rotina coradas com hematoxilina-eosina (HE) e finalizadas com uma gota de Bálsamo do Canadá sobre o tecido para preservação do corte (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Para as análises morfológicas, foi utilizado um microscópio óptico comum com resolução de 400 vezes, seguindo metodologia adaptada de Malheiros et al. (2016). As imagens foram capturadas usando um microscópio modelo LEICA DM 1000 com uma câmera modelo LEICA DFC 295 acoplada e o *software* LAS v3.8.

## 2.3 ENSAIO *IN VIVO*

Utilizou-se 27 juvenis de *O. niloticus* naturalmente parasitados, com peso médio de 29,46 g  $\pm$  3,93 e comprimento médio de 9,43cm  $\pm$ 0,45, os quais passaram pelo período de aclimatação de 7 dias em tanques de fibra de polietileno com capacidade para 1000 litros. Os juvenis foram alimentados diariamente às 16h30min até a saciedade aparente (LIM e WEBSTER, 2006). Optou-se por alimentar os juvenis somente uma vez ao dia, para que a quantidade de infestação de parasitos se mantivesse. Após a refeição, aguardava-se um tempo de 30 minutos, em seguida as fezes eram removidas e 30 % da água renovada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os juvenis foram distribuídos aleatoriamente em aquários transparentes com 20 litros de água, aeração constante, sendo que cada aquário (tratamento e controle) recebeu 3 espécimes. A água utilizada nos aquários era proveniente de abastecimento público, e a presença de cloro foi testada. Tal como proposto por Hashimoto et al. (2016), alguns parâmetros físicos e químicos da água foram obtidos antes e após os banhos, são eles: oxigênio dissolvido, pH, temperatura, concentrações

de amônia e nitrito. Os dados de oxigênio dissolvido e temperatura foram obtidos do aparelho (Lutrom DO-5519) e para o pH (Hanna HI 9126). Para análise dos níveis de amônia e nitrito foi utilizado método de APHA (2005).

Nesta etapa, o experimento foi realizado com 1 tratamento e 3 repetições, além do controle positivo (peixes expostos somente à água) e controle negativo (peixes mantidos em água com a adição de 35 mg/L de álcool etílico absoluto - P.A. 99,8 %). No tratamento, os peixes foram submetidos a banhos curtos de 60 minutos, conforme sugerido por Malheiros et al. (2016) adaptado para esta pesquisa, com óleo essencial de *Mentha piperita* na concentração de 35mg/L. A concentração foi determinada pelo resultado do teste de toxicidade.

Durante os banhos, os peixes permaneceram em jejum, sendo observados a cada 15 minutos e registrando-se a ocorrência dos seguintes comportamentos: natação errática, tombado e deitados no fundo do aquário (CHAGAS et al.,2015, HASHIMOTO et al., 2016 e MALHEIROS et al., 2016).

Após o banho terapêutico, os peixes foram sacrificados pelo método de comoção cerebral. Esse método foi utilizado para que não houvesse influência do anestésico sobre os parasitas (EIRAS, TAKEMOTO e PAVANELLI, 2006). Estes foram então medidos e pesados, e os arcos branquiais do lado direito e esquerdo foram individualizados e examinados com o objetivo de registrar o número de parasitas mortos, conforme metodologia adaptada de Fajer-Ávila et al. (2003), Paixão et al. (2013) e Chagas et al. (2015).

Após a análise, as brânquias foram fixadas em formol 5% para preservação dos ectoparasitas (EIRAS, TAKEMOTO e PAVANELLI, 2006).

## 2.4 ANÁLISE DOS DADOS

Adotou-se como ferramentas para análises dos dados de parâmetros físicos e químicos da água, o Software IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics (versão 22.0) e o software SAS System Versão 9.0<sup>®</sup>.

Os dados obtidos dos parâmetros físicos e químicos da água foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para testar os pressupostos de normalidade e ao teste de Bartellett para testar os pressupostos de homocedasticidade. Também, utilizou-se a ANOVA e o Teste de Tukey com significância de 5 % tendo como referência Zar (2010).

A CL50 foi determinada através do programa Trimmed Spearman-Karber v.1.00 (HAMILTON et al., 1997) com intervalo de confiança de 95% (BERTOLETTI e ZAGATTO, 2006)

Adotou-se o programa Sigma Plot V.11 para gerar o gráfico de despigmentação. Utilizou-se gráficos de barras para visualização de dados dos comportamentos dos peixes do teste de toxicidade e do ensaio *in vivo* utilizando o Microsoft Excel®.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 TESTE DE TOXICIDADE EM ALEVINOS**

Pelo método de Trimmed Spearman–Karber, com intervalo de confiança de 95%, a cl50-48h indicou a concentração de 35,43 mg/l, com limites de 34,32 mg/l e 36,58 mg/l.

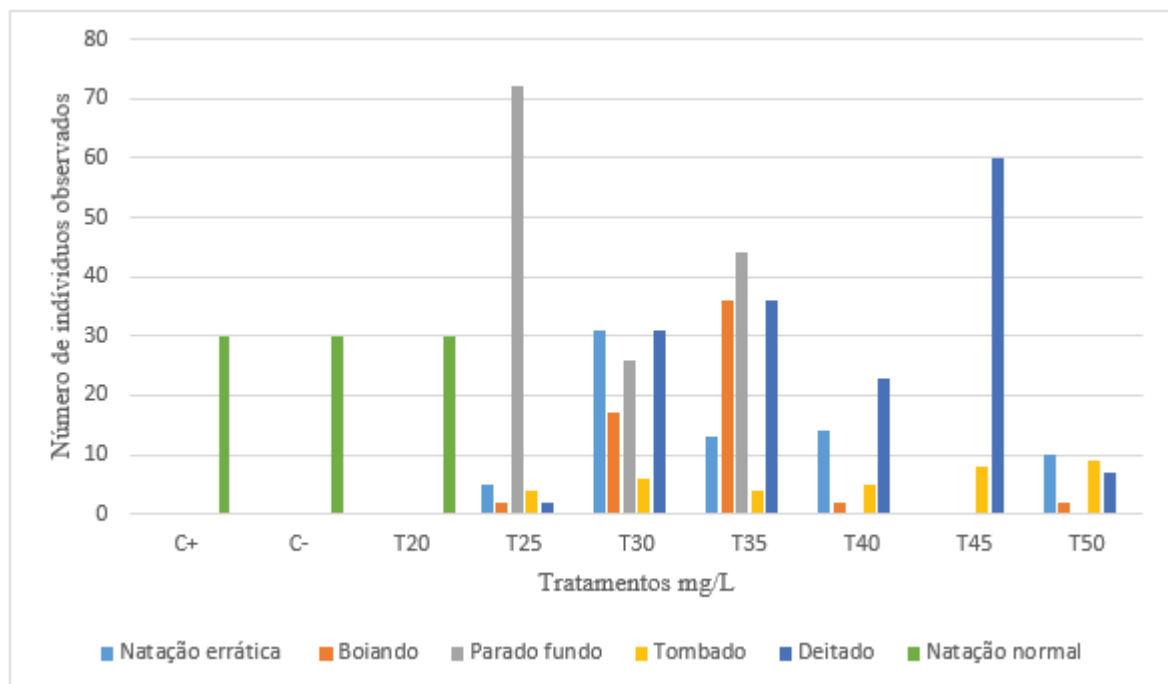
Nos parâmetros físicos e químicos da água (TABELA 1) os tratamentos e controles apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de temperatura, pH e amônia. No entanto, para o nitrito e oxigênio dissolvido os tratamentos e controles não demonstram diferença significativa.

TABELA 1 – PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DO TESTE DE TOXICIDADE

Parâmetros físico-químicos da água	Tratamentos									
	CP	CN	T20	T25	T30	T35	T40	T45	T50	
Temperatura (°C)	25,91±0,37 <sup>a</sup>	25,75±0,18 <sup>ab</sup>	26,03±0,16 <sup>a</sup>	24,78±0,28 <sup>c</sup>	24,83±0,28 <sup>c</sup>	24,86±0,35 <sup>c</sup>	25,63±0,60 <sup>ab</sup>	25,43±0,26 <sup>abc</sup>	25,15±0,60 <sup>bc</sup>	
pH	7,39±0,17 <sup>b</sup>	7,18±0,24 <sup>b</sup>	7,25±0,27 <sup>b</sup>	7,26±0,32 <sup>b</sup>	7,21±0,19 <sup>b</sup>	7,10±0,23 <sup>b</sup>	8,14±0,36 <sup>a</sup>	7,99±0,77 <sup>a</sup>	8,00±0,16 <sup>a</sup>	
Oxigênio dissolvido (mg/L)	8,2±0,35	7,8±0,28	8,2±0,79	8,0±1,45	8,1±1,24	8,2±1,28	8,8±0,41	8,8±0,36	8,8±0,16	
Amônia (mg/L)	0,107±0,087 <sup>a</sup>	0,0215±0,015 <sup>b</sup>	0,0198±0,011 <sup>b</sup>	0,009±0,003 <sup>b</sup>	0,008±0,003 <sup>b</sup>	0,011±0,002 <sup>b</sup>	0,008±0,008 <sup>b</sup>	0,005±0,001 <sup>b</sup>	0,004±0,001 <sup>b</sup>	
Nitrito (mg/L)	0,003±0,002	0,015±0,016	0,040±0,078	0,005±0,004	0,010±0,002	0,008±0,007	0,010±0,003	0,007±0,003	0,007±0,001	

CP = Controle Positivo; CN = Controle Negativo; T20= Tratamento de 20 mg/L; T25= Tratamento de 25 mg/L; T30= Tratamento de 30 mg/L; T35= Tratamento de 35 mg/L; T40= Tratamento de 40 mg/L; T50= Tratamento de 50 mg/L. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste Tukey <0,05.

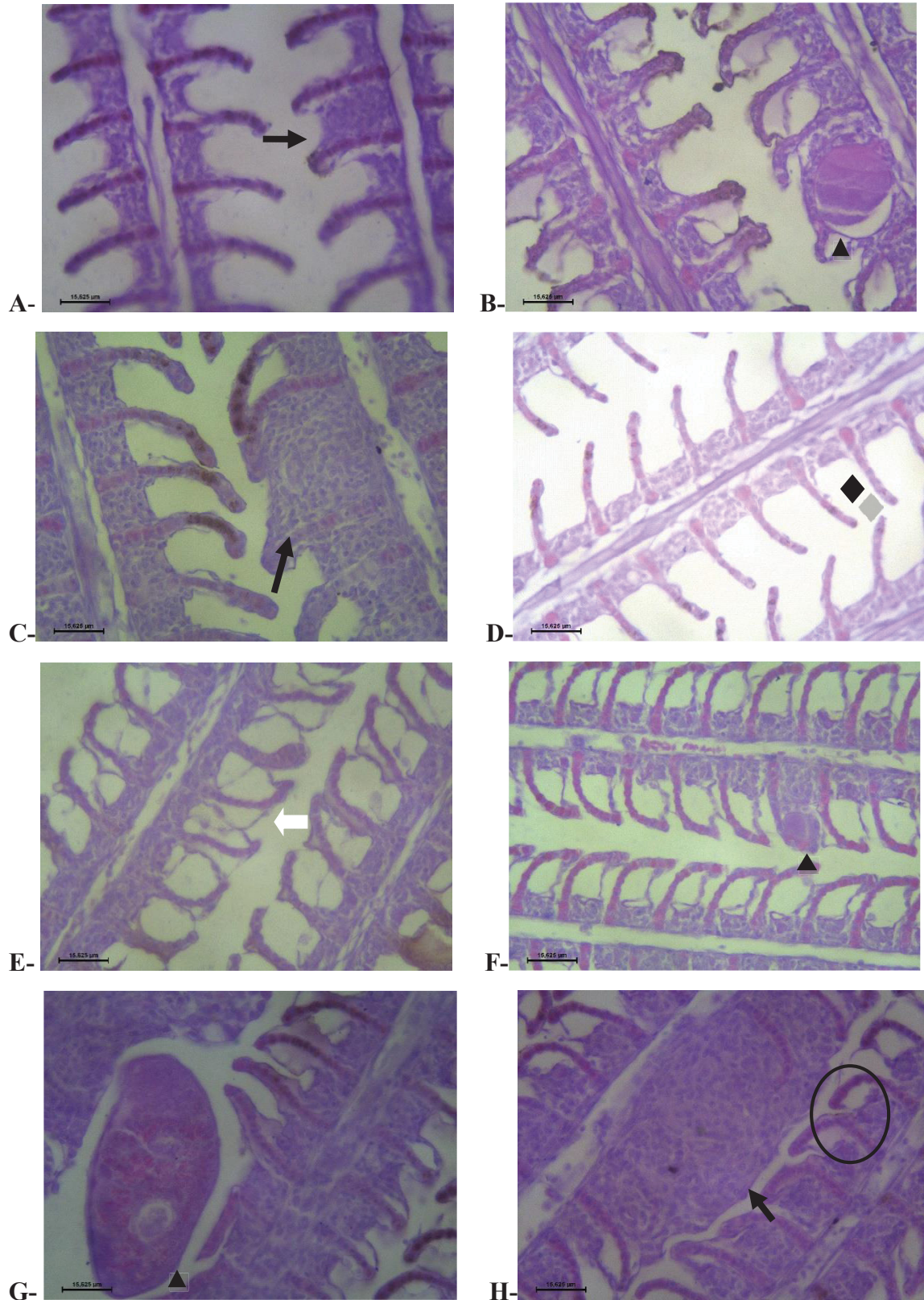
Não foram observadas mudanças comportamentais dos indivíduos nos controles e na concentração de 20 mg/L. Porém, o GRÁFICO 1 mostra que nas demais concentrações (25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg/L) ocorreram alterações comportamentais, tais como: parado no fundo do aquário em 25 mg/L; maior frequência de natação errática em 30 mg/L; boiando em 35 mg/L; deitado no fundo do aquário em 40 e 45 mg/L e; tombado em 50 mg/L. Os peixes que sobreviveram às 48 horas dos tratamentos não apresentaram mudanças tardias no comportamento.



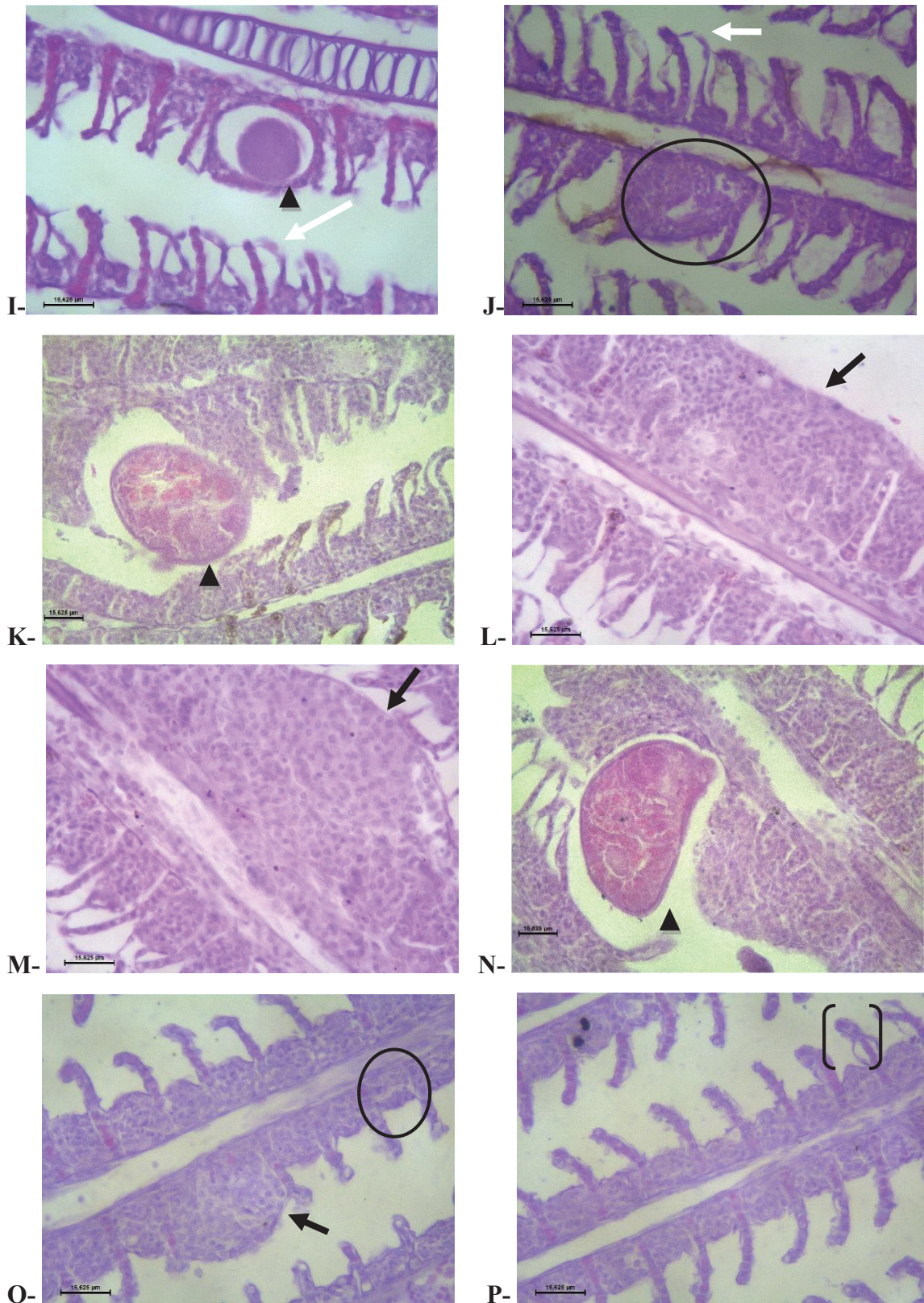
**GRÁFICO 1**– COMPORTAMENTO DOS ALEVINOS DE *O. niloticus* NO TESTE DE TOXICIDADE.

Mudanças na coloração com diferentes tamanhos foram observadas em indivíduos de todos os tratamentos, incluindo controles. Dos 270 indivíduos, 20 apresentaram despigmentações. As despigmentações apresentaram-se como manchas em ambos os lados (direito e esquerdo), perto do opérculo e na boca. Na concentração de 40mg/L, 40% dos indivíduos apresentaram algum grau de despigmentação, seguido de 20% em 45mg/L e 6,65% em 50mg/L (GRÁFICO 2).

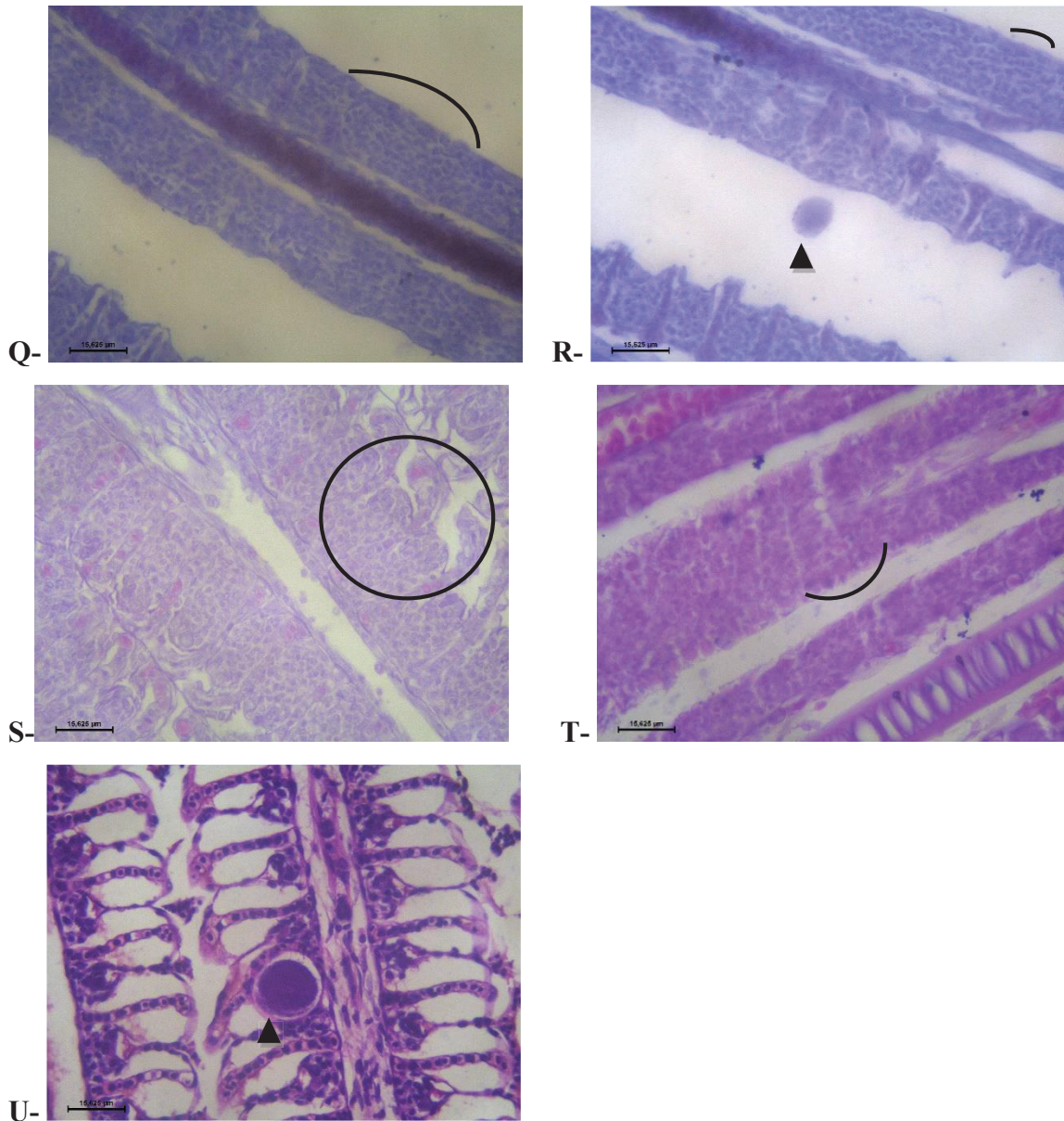




**FIGURA 2- A-B** (Controle Positivo); **C-D**(Controle Negativo); **E-F**(Tratamento de 20 mg/L ); **G-H** (Tratamento de 25 mg/L ). Setas pretas = Fusão lamelar parcial. Cabeça seta preta =parasito. Círculo preto = proliferação generalizada do tecido epitelial. Seta branca =levantamento do epitélio. Hexágono preto =brânquia normal.



**FIGURA 3-** I-J (Tratamento de 30 mg/L); K-N (Tratamento de 35 mg/L ); O-P (Tratamento de 40 mg/L ). Setas pretas = Fusão lamelar parcial. Cabeça seta preta = parasito. Círculo preto = proliferação generalizada do tecido epitelial. Seta branca = levantamento do epitélio. Colchete duplo = Aneurisma.



**FIGURA 4-** Q (Tratamento de 40 mg/L) ; R-S (Tratamento de 45 mg/L) ; T-U (Tratamento de 50 mg/L). Cabeça seta preta = parasito. Círculo preto = proliferação generalizada do tecido epitelial. Arco = Fusão lamelar total.

### 3.3 ENSAIO *IN VIVO*

Após o banho terapêutico de uma hora, não foi verificada eficácia do óleo essencial de *Mentha piperita* contra os monogenéticos na concentração de 35mg/L, uma vez que não foram encontrados parasitos mortos.

Verificou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os parâmetros físico-químicos da água do tratamento e os controles antes dos banhos (TABELA 3) em relação à temperatura e oxigênio dissolvido, porém para o pH, a amônia e o nitrito não houve diferença.

TABELA 3 – PARÂMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS DA ÁGUA ANTES DO BANHO.

Parâmetros Físicos-Químicos da água	Tratamentos		
	C+	C-	T35
Temperatura (°C)	27,63±0,20 <sup>a</sup>	27,66±0,30 <sup>a</sup>	27,03±0,11 <sup>b</sup>
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,1±0,1 <sup>b</sup>	6,6±0,17 <sup>a</sup>	6,8±0,2 <sup>a</sup>
Ph	7,8±0,09	8,0±0,14	8,1±0,03
Amônia (mg/L)	0,0022±0,0020	0,009±0,002	0,03±0,004
Nitrito(mg/L)	0,005±0,004	0,0007±0,0004	0,03±0,049

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa <0,05.

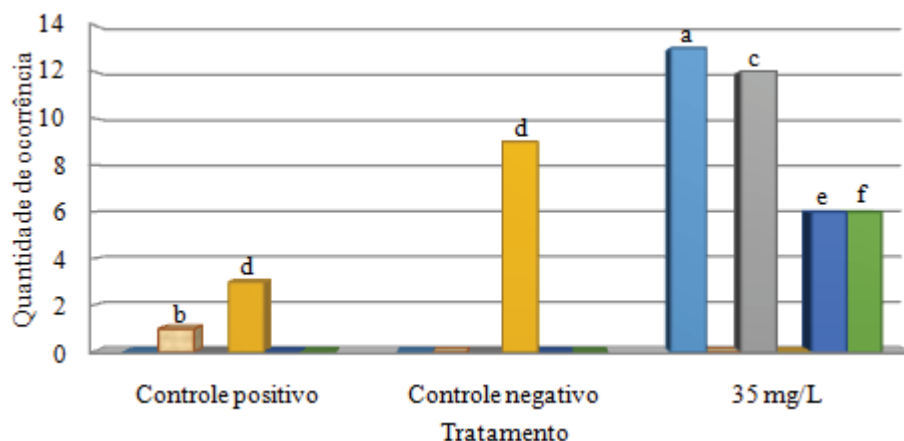
A TABELA 4 exibe os parâmetros físicos e químicos da água após os banhos. Nota-se que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de temperatura e amônia, todavia, para oxigênio dissolvido, pH e nitrito não há diferença entre os controles e o tratamento.

TABELA 4 – PARÂMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS DA ÁGUA DEPOIS DO BANHO.

Parâmetros Físicos-Químicos da água	Tratamentos		
	C+	C-	T35
Temperatura (°C)	27,53±0,20 <sup>ab</sup>	27,76±0,30 <sup>a</sup>	27,16±0,15 <sup>b</sup>
Oxigênio dissolvido(mg/L)	6±0,26	6,5±0,1	6,3±0,20
Ph	7,8±0,10	8,01±0,11	8,16±0,21
Amônia (mg/L)	0,1±0,002 <sup>b</sup>	0,025±0,004 <sup>a</sup>	0,019±0,0015 <sup>a</sup>
Nitrito(mg/L)	0,005±0,008	0,001±0,0001	0,0011±0,0008

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa <0,05.

As alterações de comportamentos mais frequentes dos juvenis durante o banho de 60 minutos sob concentração de 35mg/L foram: deitado no fundo, natação errática, parado no fundo e tombado (GRÁFICO 3). Após o banho os peixes foram transferidos para recipientes sem o óleo essencial e normalizaram seu comportamento em até 20 minutos.



**GRÁFICO 3**– COMPORTAMENTO DOS JUVENIS DURANTE 60 MINUTOS NOS CONTROLES E NO TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL. a = Deitado no fundo; b = Esfregar o corpo no aquário; c = Natação errática; d = Natação na superfície; e = Parado no fundo; f = Tombado.

#### 4 DISCUSSÃO

Os níveis de temperatura, oxigênio dissolvido, amônia, nitrito e pH, no teste de toxicidade e ensaio *in vivo* estão de acordo com os resultados de El Sayed (2006) e Lim e Webster (2006) no que tange ao desenvolvimento da tilápia.

O resultado do teste de toxicidade com óleo essencial de *Mentha piperita* em alevinos de *Oreochromis niloticus* CL50-48h pelo método de Trimmed Spearman–Karber foi de 35,43 mg/L (34,32 mg/L-36,58 mg/L), similar ao encontrado por Malheiros et al. (2016). Ao realizarem o teste em alevinos de pirarucu com a CL50-4h, os autores acima citados registraram a concentração de 38mg/L com intervalo entre 30mg/L e 40mg/L.

As observações do comportamento dos peixes durante o teste de toxicidade CL50-48h, principalmente em altas concentrações (30, 35, 40, 45 e 50mg/L) foram similares ao observado por Malheiros et al. (2016) nas concentrações de 40, 80, 100 e 160mg/L: natação errática, movimento do opérculo acelerado, agitação e letargia, abdomen voltado para cima. Entretanto, na concentração de 20mg/L os autores observaram um efeito anestésico (paralisia) e, no presente estudo, em concentrações de 20 e 25mg/L os alevinos de *O. niloticus* apresentaram comportamento de natação normal. Ademais, acrescenta-se que o uso do etanol para diluir o óleo essencial no controle negativo, não ocasionou comportamento anormal no teste de toxicidade, sendo similar ao encontrado por Meneses et al. (2018), que não observou mudanças no controle negativo em juvenis de *O. niloticus*.

A literatura carece de resultados acerca de despigmentação nos alevinos expostos a óleos essenciais de *M. piperita*. Contudo, Ayotunde et al. (2010) avaliaram a toxicidade do extrato aquoso de sementes de *Carica papaya* (Família Caricaceae) em alevinos de *Clarias gariepinus* (Família Clariidae) e relataram descoloração nas maiores concentrações, destacando que em estudos com experimentos toxicológicos o tempo de exposição ao fitoterápico tem influência direta na resposta biológica.

As alterações histológicas encontradas nos controles e nos tratamentos em alevinos de *O. niloticus* após o teste de toxicidade são similares àquelas encontradas por Malheiros et al.

(2016) em alevinos de pirarucu quando utilizando o óleo essencial de *M. piperita* nas concentrações de 80, 100, 130 e 160mg/L: fusão lamelar secundária, elevação epitelial e aneurisma. Neste trabalho, observou-se mudanças histológicas nas brânquias no teste de toxicidade com a concentração de 50mg/L. Contudo, é relevante considerar o exposto por Costa et al. (2016) ao concluir que, apesar de haver alterações histológicas como: hiperplasia e hipertrofia que resultaram em fusão secundária lamelar moderada, foram os parasitos e não a Oleoresina a 50 mg/L que causou danificações nas brânquias de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Nesse sentido, Cantanhêde et al. (2014), em seu trabalho com uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis*, observaram elevação do epitélio lamelar, proliferação excessiva de células dos epitélios filamental e lamelar causando fusão total ou parcial das lamelas, alteração da estrutura das lamelas, hiperplasia das células mucosas, ruptura do epitélio lamelar, espessamento descontrolado do tecido proliferativo filamental e lamelar, aneurismas de vários tamanhos e em alguns exemplares a presença de parasito. Os autores comentam que essas alterações podem estar relacionados com mecanismos de defesa contra agentes estressores presentes na água. Sendo assim, as alterações encontradas nos tratamento e controles neste estudo, podem ser decorrentes da presença de parasitos protozoários, o que corrobora com Soares et al. (2016) observaram alterações histológicas sendo no controle positivo (hiperplasia lamelar, monogenoides), controle negativo (aneurisma lamelar e monogenoides) em 40 mg/L (monogenoides e ruptura epitelial com hemorragia disseminada em brânquias) e 20 mg/L (ruptura epitelial com sangramento generalizado, aneurisma e hiperplasia lamelar) do ensaio *in vivo* com óleo essencial de *Lippia origanoides* (Família Verbenaceae) em tambaquis (*Colossoma macropomum*). Os autores comentam que essas alterações histológicas encontradas em todos os tratamentos e controles após a exposição ao óleo essencial é devido a presença de parasitos. Com relação ao tempo de vida dos parasitos monogêneas no teste *in vitro* utilizando o óleo essencial de *M. piperita*, consta no trabalho de Hashimoto et al. (2016), que testou a sua eficácia sobre as espécies *C. thurstonae*, *C. halli*, *C. tilapiae* e *S. longicornis*, que na concentração de 320mg/L houve morte dos parasitas em 1 minuto e 58 segundos, e na concentração de 160mg/L em 8 minutos e 11 segundos. Malheiros et al. (2016) utilizaram o óleo essencial de *M. piperita* em alevinos de pirarucu, contra as espécies *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides* e observaram a morte de 100% dos parasitos na concentração de 80mg/L após 5 horas de exposição e em 160mg/L e 320mg/L após 30 minutos. Segundo Costa et al. (2016), o óleo essencial de *M. piperita* em juvenis de pacu infectados pelas espécies de monogenea *Anacanthorus penilabiatus* e

*Mymarothecium viatorum*, em concentração de 400mg/L, resultou em 100% de mortalidade dos parasitos após 1 hora e 20 minutos de exposição e na concentração de 1600mg/L em 15 minutos.

Apesar, dos resultados bastante satisfatórios contra parasitos monogenéticos nos experimentos *in vitro* com óleo essencial de *M. piperita*, os autores acima citados comentam que as espécies de peixes usadas nos respectivos trabalhos, não conseguem sobreviver nessas altas concentrações.

Contudo, como exposto por Soares et al. (2016), a eficácia *in vitro* pode não ser verificada nos ensaios *in vivo*. Os autores avaliaram que o óleo essencial de *Lippia origanoides* em alevinos de *Colossoma macropomum* no ensaio *in vivo*, e em concentrações de 20mg/L e 40mg/L, não foram efetivas contra os parasitos. Dessa forma, apesar de reconhecerem a eficácia do óleo essencial de *L. origanoides* nos testes *in vitro*, sugeriram que deve-se estudar qual o composto que obteve a eficácia contra os parasitos e extraí-lo para ser usado em ensaio *in vivo*.

Neste estudo, após 60 minutos de banho em juvenis de *O. niloticus* no teste *in vivo*, não foi verificada eficácia do óleo essencial de *M. piperita* na concentração de 35 mg/L. A literatura relata que no teste *in vitro* a eficácia de *M. piperita* é de 100 % em concentrações como 160mg/L, porém o resultado obtido com o teste de toxicidade indica que os juvenis de *O. niloticus* não suportam tal concentração.

Hashimoto et al. (2016), também utilizando o óleo essencial de *M. piperita* em banhos com mesmo tempo de exposição e em juvenis da mesma espécie, obtiveram mortalidade de 41,63% dos parasitos em uma concentração de 40mg/L. No entanto, após os banhos terapêuticos com *M. piperita*, os autores submeteram os peixes a anestesia com eugenol (óleo de cravo) em uma concentração de 75mg/L. Nesse contexto, Boijink et al. (2015) avaliaram a atividade anti-helmíntica do eugenol em juvenis de tambaquis contra monogênea e observaram que banhos terapêuticos de 60 minutos com concentração de 10mg/L resultaram em uma eficácia imediata de 90 %. Portanto, é possível que o eugenol tenha causado a mortalidade dos parasitos observada por Hashimoto et al. (2016), e não o óleo essencial de *M. piperita*.

O estudo realizado por Malheiros et al. (2016) avaliando o óleo essencial de *M. piperita* em alevinos de pirarucu contra monogênea obteve eficácia de 15,6% em uma concentração de 40mg/L com banho de 30 minutos. O trabalho desses autores difere do presente estudo, que não obteve eficácia na concentração de 35mg/L com banho de 60 minutos. Contudo, os autores não analisaram a eficácia logo após o banho com óleo essencial, mas retiraram as brânquias fixando em formalina 5% realizando posteriormente a contagem.

Embora, Sutili et al. (2016) também tenham utilizado um número reduzido de peixes parasitados para realizar a profilaxia, diferem do presente estudo ao obterem resultados positivos utilizando o óleo essencial de *Ocimum americanum* em *Rhamdia quelen* contra *Aeromonas hydrophyla* e *Gyrodactylus* sp., em uma hora de banho, com concentrações de 10 e 50 mg/L em testes *in vitro* e *in vivo*.

Corroborando com os resultados do presente estudo, Soares et al. (2016) ao testar o óleo de *Lippia alba*, observaram mudanças de comportamento nos grupos controles do teste *in vivo*, não havendo mortalidade antes e após os banhos. Entretanto, neste estudo não houve eficácia no controle negativo, diferindo do encontrado por Soares et al. (2016) onde o tratamento utilizando água + álcool teve uma eficácia de 29,1 %. Contudo, cabe ressaltar que ação e eficácia do fitoterápico podem estar relacionadas com a espécie de planta testada, o parasito, o peixe, o tempo de exposição e a técnica aplicada. De acordo com este estudo, o óleo essencial de *M. piperita* mostrou-se tóxico para os alevinos de *O. niloticus* nas concentrações acima de 35mg/L, dentro das condições avaliadas, causando alterações histológicas, mudanças na coloração do animal e morte. No ensaio *in vivo*, em virtude de todos os parasitos estarem vivos, descarta-se a eficácia do óleo essencial de *Mentha piperita* contra monogênea após banhos de 60 minutos.

## REFERÊNCIAS

- AYOTUNDE, E. O., OFFEM, B. O., OKEY, I. B., IKPI, G. U., OCHANG, S. N., AGBAM, N. E., & OMINI, D. E. Toxicity of pawpaw (*Carica papaya*) seed powder to sharptooth catfish *Clarias gariepinus* fingerlings and effects on haematological parameters. **International Journal of Fisheries and Aquaculture**, v.2, n.3, p.71-78, 2010.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) (2005). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington.
- BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. RiMa Editora, 2006.
- BOIJINK, C.L., MIRANDA, W. S. C., CHAGAS, E. C., DAIRIKI, J. K., & INOUE, L. A. K. A. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. **Aquaculture**, v. 438, p.138-140, 2015.
- BOIJINK, C.L., QUEIROZ, C. A., CHAGAS, E. C., CHAVES, F. C. M., & INOUE, L. A. K. A. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, n.457, p.24-28,2016.
- BULFON, C., VOLPATTI, D., & GALEOTTI, M. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. **Aquaculture Research**, v.46, n.3, P.513-551, 2015.
- BURRIDGE, L., WEIS, J. S., CABELLO, F., PIZARRO, J., & BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v.306, p.1-4, 7-23, 2010.
- CHAGAS, E.C., MACIEL, P.O., PORTO, S.M.A., MAJOLO, C., BOIJINK, C.L. **Protocolo para emprego de óleos essenciais no controle de monogenóides, parasitas de brânquias de peixes**. Manaus: Embrapa amazônica ocidental, p. 1-32, 2015.
- CAPUTO, L. F. G., GITIRANA, L. B., MANSO, P. P. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E. M., CAPUTO, L. F. G., AMENDOEIRA, M. R. R. (Ed.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. cap. 3, p. 89-188.
- CANTANHÊDE, S.M., MEDEIROS, A.M., FERREIRA, F.S., FERREIRA, J.R.C., ALVES, L.M.C., CUTRIM, M.V.J., SANTOS, D.M.S. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, v.66, n.2, p.593-601,2014.
- COSTA, J. C., VALLADÃO, G. M. R., PALA, G., GALLANI, S. U., KOTZENT, S., CROTTI, A. E. M., FRACAROLLI, F., SILVA, J.J.M & PILARSKI, F. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v.471, p.72-79, 2016.
- EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. 294 p., CABI, 2006.

EIRAS, J. C., TAKEMOTO, R. M., PAVANELLI, G. C. **Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**. Eduem, 2006.

EIRAS, J. C., TAKEMOTO, R. M., PAVANELLI, G. C. **Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil**. 333 p. :il. Maringá: Clichetec, 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. 50 ed. October 2002 , U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

FAJER-ÁVILA, E. J., ABDO-DE LA PARRA, I., AGUILAR-ZARATE, G., CONTRERAS-ARCE, R., ZALDÍVAR-RAMÍREZ, J., & BETANCOURT-LOZANO, M. Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. **Aquaculture**, v. 223, n. (1-4), p.41-50, 2003.

HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., & THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v.11, n.7, p.714-719, 1997.

HASHIMOTO, G. S. O., NETO, F. M., RUIZ, M. L., ACCHILE, M., CHAGAS, E. C., CHAVES, F. C. M., MARTINS, M. L. 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.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica–Texto. Atlas 11ª edição Guanabara Koogan**, 2008.

KAUR, R., & SHAH, T. K. A review on role of plant waste products on fish growth, health and production. **Journal of Entomology and Zoology studies**, v.5, n.3, p.583-589, 2017.

LIM, C.E., WEBSTER, C. D. **Tilapia: biology, culture, and nutrition**. CRC Press, 2006.

MABILIA, R. G., & DE SOUZA, S. M. G. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.28, n.2, p.159-163,2006.

MALHEIROS, D. F., MACIEL, P. O., VIDEIRA, M. N., TAVARES-DIAS, M. 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.

MARQUES, G. S., SILVA, C. C. D. A. R., VILELA, W. T., FIGUEIRÊDO, C. B. M., SILVA, A. C. A. F., SILVA, R. M. F., NETO, P. J. R. Plantas medicinais como alternativa terapêutica para aumento da resistência imunológica. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.36, n.1, p.27-33, 2015.

MAXIMIANO, A. D. A., FERNANDES, R. O. D., NUNES, F. P., ASSIS, M. P. D., MATOS, R. V. D., BARBOSA, C. G. S., & OLIVEIRA-FILHO, E. C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.10, p.483-491,2005.

MENESES, J. O., DO COUTO, M. V. S., SOUSA, N. C., CUNHA, F. D. S., ABE, H. A., RAMOS, F. M., ... & CARNEIRO, P. C. 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.

MOUSAVI, S. M., MIRZARGAR, S. S., MOUSAVI, H. E. Z., BAIGI, R. O., KHOSRAVI, A., BAHONAR, A., & AHMADI, M. Evaluation of antifungal activity of new combined essential oils in comparison with malachite green on hatching rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.4, n.2, p.103-110, 2009.

NEELAVATHI, P., VENKATALAKSHMI, P., & BRINDHA, P. Antibacterial activities of aqueous and ethanolic extracts of *Terminalia catappa* leaves and bark against some pathogenic bacteria. **International journal of Pharmacy and pharmaceutical sciences**, v.5, n. 1, p.114-120, 2013.

ONAKA, E. M., MARTINS, M. L., & MORAES, F. R. Eficácia do Albendazol e Praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogiridae), parasito de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) i. banhos terapêuticos [Albendazole and praziquantel efficacy against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogiridae), gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) I. Therapeutic baths]. **Boletim do Instituto de Pesca [Internet]**, v.29, n.2, p.101-107,2003.

PAIXÃO, L.F., SANTOS, R. F.B., RAMOS, F.M., FUJIMOTO, R.Y. Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus sp.* (Osteichthyes: Characidae). **Acta Amazonica**, v.43, n.2 p.211-213, 2013.

PAVANELLI, G.C., EIRAS, J.C., TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3 ed., 311.p. Maringá: Eduem, 2008.

PEREIRA, L. A., WEISS, L. A., BESEN, M. A., & MARENGONI, N. G. Uso de extratos de plantas e suas propriedades profiláticas ou terapêuticas na produção de peixes. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.15, n.4, p.373-380, 2016.

REVERTER, M., BONTEMPS, N., LECCHINI, D., BANAIGS, B., SASAL, P. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p.50-61, 2014.

PORTO, D. B., DE SOUZA, A. K. S., DA VITÓRIA, M. R., & MALTA, J. C. O. Ação do permanganato de potássio (kmno4) sobre populações de *Anacanthorus spathulatus* e *Notozothecium janauachensis* (platyhelminthes: dactylogiridae) parasita das brânquias de

tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.5.n.3, p. 68-72,2017.

SOARES, B. V., CARDOSO, A. C. F., CAMPOS, R. R., GONÇALVES, B. B., SANTOS, G. G., CHAVES, F. C. M., CHAGAS, E.C., TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v.469, p.72-78, 2016.

SOARES, B. V., NEVES, L. R., OLIVEIRA, M. S. B., CHAVES, F. C. M., DIAS, M. K. R., CHAGAS, E. C., & TAVARES-DIAS, M. 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.

SUTILI, F. J., MURARI, A. L., SILVA, L. L., GRESSLER, L. T., HEINZMANN, B. M., VARGAS, A. C., ... & BALDISSEROTTO, B. The use of *Ocimum americanum* essential oil against the pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus sp.* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Letters in applied microbiology**, v.63, n.2, p. 82-88, 2016.

TAVARES-DIAS, M. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. **Aquatic living resources**, v.31, n.13, p.1-11, 2018.

TREVISAN, S. C. C., MENEZES, A. P. P., BARBALHO, S. M., & GUIGUER, É. L. Properties of *Mentha piperita*: a brief review. **wjpmr**, v. 3, n.1, p.309-313, 2017.

VARGAS, L., POVH, J. A., RIBEIRO, R. P., & MOREIRA, H. L. OCORRÊNCIA de ectoparasitos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), de origem tailandesa, em Maringá-Paraná. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.3, n.1, p.31-37,2000.

WINKALER, E. U., SANTOS, T. R., MACHADO-NETO, J. G., & MARTINEZ, C. B. 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.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. **Pearson prentice hall**, 5 th ed., 944. p., 2010.

## ANEXO A – Aprovação do conselho de ética

Ministério da Educação  
 Universidade Federal do Paraná  
 Setor Palotina  
 Comissão de Ética no Uso de Animais



### Certificado

Certificamos que o **Protocolo nº 38/2017** referente ao **Uso de óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Terminalia catappa* no combate a parasitas monogenéticos em alevinos de *Oreochromis niloticus***, sob responsabilidade da **Andreia Issac**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) em **21/11/2017**.

O responsável pelo envio do formulário deve estar ciente de que deve:

- informar qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo;
- informar sobre a necessidade de modificações ou emendas ao protocolo que foi descrito e aprovado, identificando a parte do protocolo a ser modificada e apresentando justificativas claras

Palotina, 21 de novembro de 2017.

Prof. Geraldo Camilo Alberton  
 Coordenador/Coordinator  
 CEUA/Palotina - UFPR

### Certificate

Certify that the **Protocol n. 38/2017** regarding the research project **Use of essential oils of *Mentha piperita* and *Terminalia catappa* in the control of monogenetic parasites in fingerlings of *Oreochromis niloticus* of *Andreia Isaac***, is according to the **Ethical Principles of Animal Experimentation** adopted by the **National Council for Animal Experiments Control (CONCEA)** and was **APPROVED** by the **Ethics Committee on Animal Use of the UFPR – Setor Palotina (CEUA / Palotina) in nov 21, 2017**.

Palotina, November 21, 2017.

Prof. Geraldo Camilo Alberton  
 Coordenador/Coordinator  
 CEUA/Palotina - UFPR

ANEXO B – Informações sobre o óleo essencial de *M. piperita*

**MENTA / HORTELÃ**  
**MENTHA PEPPERMINT ÓLEO VEGETAL**

Nome Vulgar: Hortelã Pimenta, Hortelã Brasil, Menta Piperita	Parte Utilizada: Folha
Nome Científico: Mentha Peppermint	Procedência: Brasil

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

Item	ANÁLISE	Resultado
Aparência	Líquido de média viscosidade	Conforme
Cor	Amarelado a esverdeado	Conforme
Odor	Característico	Conforme
Densidade @ 20°C	0,900 ± 0,050	0,920
Índice Refração @ 20°C	N/A	***
Índice Acidez (ac. Oléico)	Max. 0,30	0,056
Índice Iodo (cgl/g)	110 - 143	128
Índice Peróxido (mEq/kg)	Max. 10,00	1,8
Índice Saponificação mgKOH/g	188 - 194	190
Solubilidade:	Solúvel em bases oleosas	

Fabricação:	20.02.2017
Validade:	24 meses
Lote:	05960220/17
Quantidade:	5.000 L
Invoice:	00

**Armazenagem:**

Conservar longe de umidade, ao abrigo de luz e calor, em lugar seco e arejado. De preferência na embalagem original.

OBS: O produto acima especificado apresenta suas características e propriedades conforme especificações técnicas e padrão de qualidade previamente estipulado. Certificado relativo ao produto após sua fabricação, devidamente identificado e lacrado, e não exime de responsabilidade do usuário em realizar sua própria análise a fim de verificar se as características do produto atendem a aplicação pretendida. Os dados contidos nesta especificação são provenientes do fabricante, não nos responsabilizamos por perdas e danos decorrentes destes. Proibido o manuseio por pessoas não habilitadas. Armazenar em local seco e fresco. Manter embalagem fechada.

*(\*) Nunca consuma insumos vegetais sem orientação e acompanhamento de profissional qualificado. (\*) Produto para uso exclusivamente industrial e cosmético.*

(cópia do original - dispensa assinatura)