

## Protocolos para Emprego de Óleos Essenciais no Controle de Monogenoides, Parasitas de Brânquias de Peixes





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Documentos 119**

## **Protocolos para Emprego de Óleos Essenciais no Controle de Monogenoides, Parasitas de Brânquias de Peixes**

*Edsandra Campos Chagas  
Patricia Oliveira Maciel  
Sanny Maria de Andrade Porto  
Cláudia Majolo  
Cheila de Lima Bojjink*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Ocidental**

Rodovia AM 010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

<http://www.cpa.embrapa.br>

[www.embrapa.br/fale-conosco/sac/](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa, Maria Perpétua Beleza Pereira e Ricardo Lopes*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Fotos da capa: *Siglia Regina dos Santos Souza*

**1ª edição**

1ª impressão (2015): 300

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação**

**Embrapa Amazônia Ocidental**

---

Protocolos para emprego de óleos essenciais no controle de monogenoides, parasitas de brânquias de peixes / Edsandra Campos Chagas, Patricia Oliveira Maciel, Sanny Maria de Andrade Porto, Cláudia Majolo, Cheila de Lima Boijink. – Manaus : Embrapa Amazônia Ocidental, 2015.  
27 p. : il. color. - (Documentos / Embrapa Amazônia Ocidental, ISSN 1517-3135; 119).

1. Aquicultura. 2. Protocolo. 3. Óleo essencial. 4. Parasitologia. 5. Peixes. I. Chagas, Edsandra Campos. II. Maciel, Patricia Oliveira. III. Porto, Sanny Maria de Andrade. IV. Majolo, Cláudia. V. Boijink, Cheila de Lima. VI. Série.

---

CDD 597.02

© Embrapa 2015

# **Autores**

## **Edsandra Campos Chagas**

Engenheira de pesca, doutora em Aquicultura, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

## **Patrícia Oliveira Maciel**

Médica-veterinária, mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, pesquisadora da Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO.

## **Sanny Maria de Andrade Porto**

Engenheira de pesca, doutora em Aquicultura, professora da Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Manaus, AM.

## **Cláudia Majolo**

Química, doutora em Ciências Veterinárias, analista da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

## **Cheila de Lima Boijink**

Bióloga, doutora em Ciências Fisiológicas, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.



# Apresentação

A produção de peixes no Brasil vem crescendo de forma acelerada, tomando um lugar importante na produção de alimentos. Com a intensificação da piscicultura, problemas e prejuízos relacionados à sanidade têm sido mais frequentes. Em alguns casos extremos, a perda de peixes por enfermidades chega a inviabilizar a continuidade de alguns empreendimentos. Conseqüentemente, os piscicultores vêm demandando, cada vez mais, pesquisas com a utilização de produtos alternativos para controlar o surgimento de parasitos e doenças, além de tratamento que possa substituir os produtos químicos de potencial tóxico, possíveis causadores de danos ambientais e à saúde humana.

Assim, este documento apresenta protocolos para utilização de óleos essenciais, discutindo aspectos da diluição e métodos para testá-los, no controle de parasitas monogenoides.

*Luiz Marcelo Brum Rossi*  
Chefe-Geral



# Sumário

<b>Protocolos para Emprego de Óleos Essenciais no Controle de Monogenoides, Parasitas de Brânquias de Peixes.....</b>	<b>9</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>Diluição dos óleos essenciais.....</b>	<b>11</b>
<b>Ensaio in vitro com monogenoides.....</b>	<b>13</b>
<b>Ensaio de toxicidade.....</b>	<b>16</b>
<b>Ensaio in vivo com monogenoides.....</b>	<b>18</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>22</b>
<b>Referências.....</b>	<b>23</b>



# Protocolos para Emprego de Óleos Essenciais no Controle de Monogenoides, Parasitas de Brânquias de Peixes

---

*Edsandra Campos Chagas*

*Patricia Oliveira Maciel*

*Sanny Maria de Andrade Porto*

*Cláudia Majolo*

*Cheila de Lima Boijink*

## Introdução

A aplicação de óleos essenciais e extratos de plantas na aquicultura vêm sendo estudada como método alternativo à utilização de quimioterápicos, os quais têm sido empregados, ao longo dos anos, na prevenção e no tratamento de doenças em peixes, embora apresentem impactos negativos conhecidos na produção, como resistência bacteriana e parasitária e acúmulo nos tecidos do pescado quando o uso é indiscriminado (CHAGAS et al., 2014; HARIKRISHNAN et al., 2011; REVERTER et al., 2014).

Já foi demonstrado que produtos originados de plantas têm aplicação na aquicultura como estimulante do apetite, promotor do crescimento, imunoestimulante e antiparasitário (CARSON; RILEY 2013; CHAKRABORTY et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2016; REVERTER et al., 2014). Essas funções estão ligadas principalmente a substâncias (moléculas) como alcaloides, terpenoides, saponinas e flavonoides, que podem atuar de forma isolada ou combinada por meio de sinergismo entre as moléculas (CHAKRABORTY et al., 2013). Os óleos essenciais,

extraídos de plantas aromáticas, formam concentrados líquidos hidrofóbicos caracterizados por alta volatilidade e forte odor (BAKKALI et al., 2008).

Testes com esses óleos têm demonstrado resultados promissores no controle de doenças parasitárias em peixes, principalmente contra protozoários, helmintos e crustáceos (EKANEM et al., 2004; KHALIL; EL-HOUSEINY, 2013; ORIAKPONO et al., 2012; WU et al., 2011; ZHANG et al., 2013). As doenças parasitárias provocam prejuízos econômicos na produção brasileira em consequência, principalmente, de surtos, embora dados estatísticos relativos a essas perdas sejam escassos para comprovação. Em países asiáticos, por exemplo, perdas por parasitoses, na ordem de US\$ 500 milhões, já foram registradas na década de 1990 (HARIKRISHNAN et al., 2011).

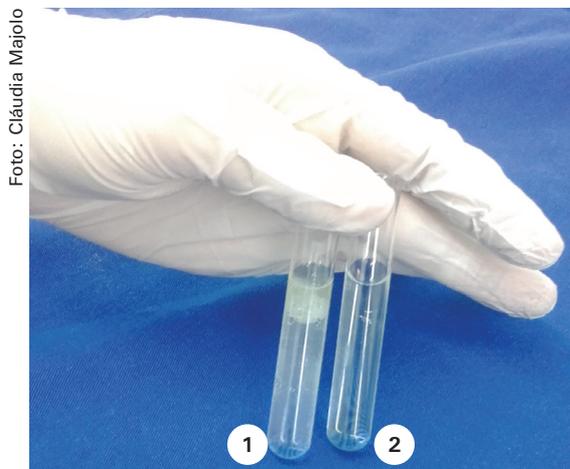
A aplicação dos óleos essenciais na prevenção e tratamento dessas doenças é feita de duas formas: ou por administração oral, adicionando os óleos na ração; ou na forma de banhos, também conhecidos por banhos terapêuticos (FOUZ et al., 2001; WISE; TERHUNE, 2001; WU et al., 2011). Contudo, antes da indicação desses óleos para uso na aquicultura, é preciso realizar diversos testes e padronização de procedimentos. Nesse sentido, este documento apresenta e discute aspectos da diluição de óleos essenciais; métodos para testá-los, tanto diretamente nos parasitos (organismos-alvo), os chamados testes *in vitro*, quanto seus efeitos e a toxicidade nos peixes (organismos-não alvo) para emprego via banhos terapêuticos, os testes *in vivo*. O grupo de parasitas-alvo deste documento são os monogenoides, helmintos que ocorrem em brânquias e corpo dos hospedeiros e que apresentam importância para a piscicultura, pois são capazes de provocar lesões que abrem portas para infecções bacterianas secundárias (IWASHITA; MACIEL, 2013; UZUN; OGUT, 2015).

Os protocolos descritos foram validados para os seguintes óleos essenciais: hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*), erva-cidreira (*Lippia alba*), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) e gengibre (*Zingiber officinale*). Contudo, para descrever alguns exemplos, utilizou-se o óleo essencial de hortelã-pimenta (*M. piperita*).

## Diluição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são obtidos principalmente pelos processos de hidrodestilação e vaporização, dependendo da sua densidade e composição (SANTOS et al., 2004). Como os óleos essenciais são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos, para facilitar a sua solubilidade é necessário utilizar solventes (etanol, metanol), detergentes ou agentes emulsificantes, como o Tween (polissorbato) e o DMSO (dimetil sulfóxido) (NASCIMENTO et al., 2007).

A solubilidade dos óleos essenciais pode ser avaliada por ensaios qualitativos (HANSEN, 1967), nos quais é possível verificar se a adição de diversos solventes ao soluto torna o óleo solúvel ou insolúvel (Figura 1).



**Figura 1.** Teste de solubilidade do óleo essencial de *Mentha piperita* em DMSO: (1) insolúvel; e (2) solúvel.

No caso dos óleos citados, após uma série de testes de solubilidade com utilização de 10% em massa de soluto, de acordo com Brusantin (2000), obteve-se a solubilização das amostras dos óleos essenciais em menor proporção de solvente (1:10 m/v). Os diluentes mais indicados foram o álcool (etanol) e o DMSO, já que nos ensaios in vitro nenhum desses afetou os parasitos monogenoides na maior concentração de diluição testada.

Para se alcançar as concentrações-teste, recomenda-se o preparo de uma solução de trabalho ou solução-estoque mais concentrada, que será utilizada para preparar as demais concentrações. Seguindo a proporção de 1:10 (m/v), no preparo de uma solução-estoque com concentração de 100 mg/mL, deve-se homogeneizar 1,0 g do óleo essencial, preferencialmente em balão volumétrico, e completar o volume até 10 mL de álcool ou DMSO. Exemplificando: no preparo de uma solução com concentração de 0,32 mg/mL, deve-se diluir 80 µL da solução-estoque em 25 mL de água. Assim, deve-se diluir proporcionalmente, a partir dessa solução-estoque, o volume adequado para o alcance da concentração final desejada, em placas de Petri, para ensaios in vitro, ou em aquários, caixas-d'água e mesmo na água de embalagens ou caixas de transporte de peixes, quando da utilização para banhos terapêuticos. Destaca-se ainda que a água utilizada para preparação das concentrações-teste deve ser a própria água do tanque dos organismos aquáticos.

Após definição dos agentes solubilizantes mais efetivos e o preparo das diluições do óleo essencial, é preciso avaliar sua ação isolada contra os organismos-alvo (parasitas) e não alvo (peixes), como será visto nos tópicos “Ensaio in vitro com monogenoides” e “Ensaio in vivo com monogenoides”.

## Ensaio in vitro com monogenoides

Os ensaios in vitro consistem em uma etapa preliminar de qualquer procedimento para teste de produtos terapêuticos e visam obter melhor resposta na eficácia do produto para controle de patógenos em peixes. Esse processo tem por objetivo testar a sensibilidade do organismo-alvo ao composto avaliado. Ressalta-se a importância de avaliar a sensibilidade desse organismo também ao diluente utilizado. É possível ainda verificar a eficácia do composto nas diferentes fases de desenvolvimento do organismo, no caso de parasitas monogenoides (ovo, oncomiracídio, larva/juvenil e adulto), as quais podem apresentar níveis de resposta diferenciados ao óleo essencial, o que irá influenciar na eficácia do produto (ANDRADE-PORTO, 2015).

### Protocolo

1. Separar peixes parasitados naturalmente ou experimentalmente por monogenoides com prevalência mínima de 20 parasitos por campo. Identificar a(s) espécie(s) de monogenoide(s) presente(s).
2. Preparar as concentrações do óleo essencial a ser avaliado. Preparar um tratamento contendo apenas a maior concentração do diluente utilizado para diluir o óleo essencial (controle positivo) e um tratamento controle contendo somente água.
3. Separar placas de Petri de mesmo diâmetro (indica-se 5,5 cm para utilizar um volume menor de óleo essencial) e acrescentar a solução contendo as concentrações do óleo essencial a serem avaliadas.
4. Proceder à eutanásia<sup>1</sup> dos peixes e remover os arcos branquiais acondicionando-os individualmente nas placas de Petri com a solução teste (Figura 2).

---

<sup>1</sup>A eutanásia dos animais deve seguir preceitos de ética e bem-estar animal (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013; CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO AMBIENTAL, 2013).

5. Considerar cada arco branquial como uma repetição, devendo-se utilizar pelo menos três repetições para cada concentração avaliada.
6. Colocar os arcos branquiais simultaneamente nas placas de Petri e iniciar a contagem do tempo.
7. Submergir totalmente os arcos branquiais na solução com óleo essencial.
8. Ajustar os cronômetros de cada observador e programá-los para dispararem a cada 15 minutos, intervalo estabelecido para observação dos parasitos.
9. É recomendável que cada observador fique com uma concentração do óleo essencial e suas respectivas réplicas.
10. Observar as placas de Petri em microscópio estereoscópico preferencialmente da mesma marca e com a mesma intensidade de luz.
11. Cada observador deve ter uma ficha de registro de mortalidade por réplica. Cada ficha deve conter: nome da espécie de peixe, nome da espécie de parasito, concentração do óleo essencial, tempo, comportamento do parasita (vivo ou morto) e nome do observador.
12. Registrar, a cada 15 minutos, iniciando do tempo zero, o número de monogenoides mortos e vivos.
13. Finalizar o teste quando todos os parasitos monogenoides do grupo controle forem a óbito.

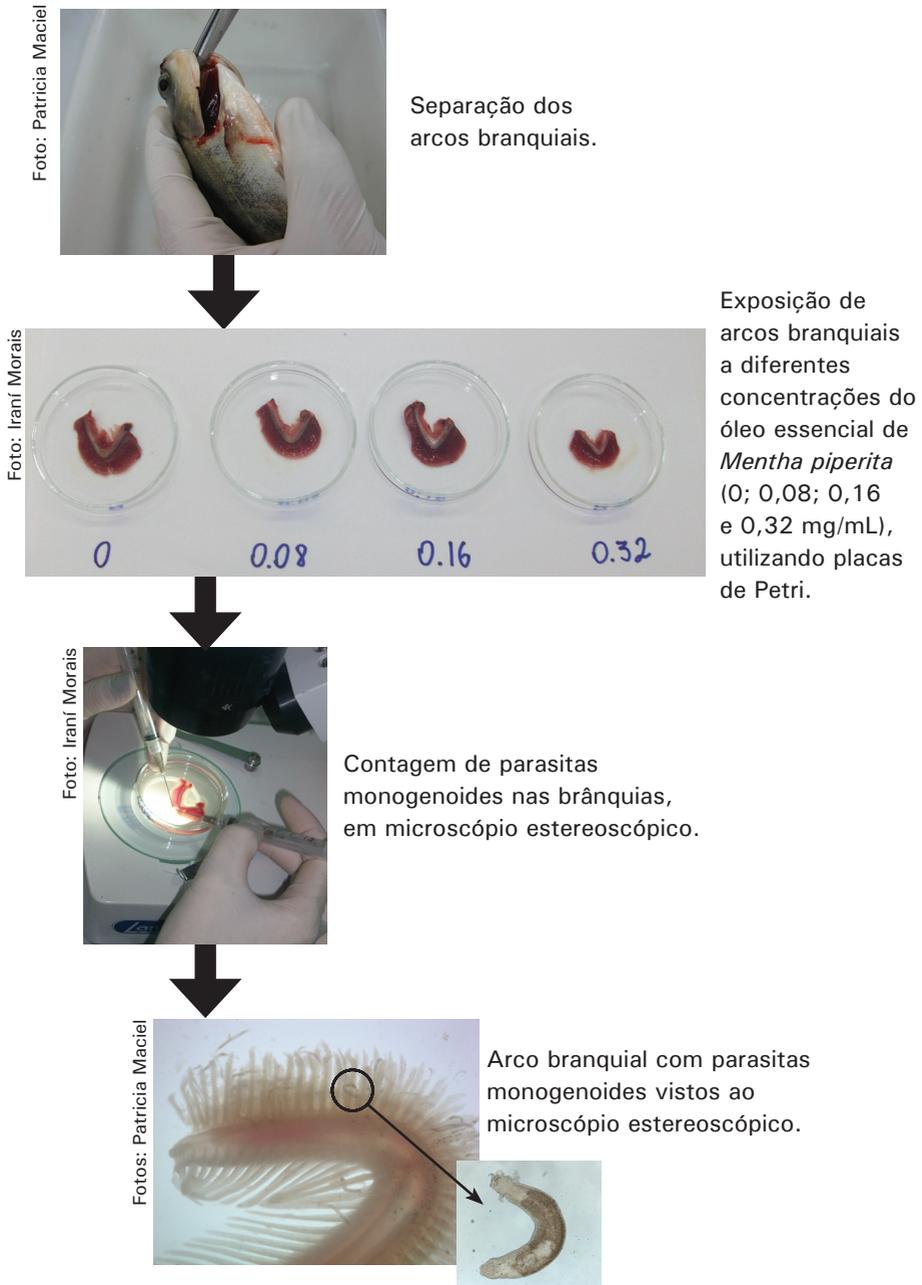


Figura 2. Etapas do ensaio in vitro com monogenoides.

## Ensaio de toxicidade

As avaliações in vivo devem ser precedidas de ensaios de toxicidade. Esses ensaios são conduzidos para avaliar os efeitos tóxicos e adversos provocados pelo emprego do óleo essencial ou qualquer produto sobre os organismos aquáticos. Caracteriza-se como efeito tóxico a mortalidade do organismo e como efeitos subletais as alterações no crescimento e desenvolvimento, na reprodução, nas respostas patológicas, fisiológicas e comportamentais (RAND; PETROCELLI, 1985).

Por meio desses ensaios são estabelecidos limites seguros para uso comercial, visto que, muitas vezes, a dosagem terapêutica para o organismo-alvo pode ser próxima à dosagem letal para o organismo-não alvo. Desta forma, a recomendação da concentração de determinado produto, por meio dos resultados obtidos em ensaios de eficácia in vitro e de toxicidade, torna-se mais segura.

### Protocolo

1. Conduzir os ensaios de toxicidade em sistema estático, com aeração constante, durante 96 horas.
2. Não alimentar os peixes durante o período de exposição ao óleo essencial.
3. Realizar ensaios preliminares para conhecer a tolerância dos peixes ao óleo essencial, visando estabelecer a menor concentração que causa letalidade a 100% dos organismos e a maior concentração na qual não se observa letalidade para uso nos testes definitivos.
4. Utilizar, nos ensaios definitivos, unidades experimentais (preferencialmente aquários) com volume fixo, podendo variar de 10 L a 50 L.
5. Aclimatar os peixes nas unidades experimentais por um período de 48 horas (Figura 3).

6. Estabelecer, com base nos ensaios preliminares, cerca de seis concentrações de cada produto/óleo essencial para constituírem os tratamentos experimentais, com pelo menos três repetições cada.
7. Estipular período de exposição de 96 horas e registros de mortalidade a cada 24 horas.
8. Avaliar também, durante o período de exposição ao óleo essencial, o padrão comportamental dos peixes, no que se refere a perda de equilíbrio, agitação, aumento na frequência de batimentos operculares, natação errática, bem como ocorrência de hemorragias externas.
9. Registrar, durante os ensaios, as variáveis de qualidade da água, como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, dureza e amônia tóxica.
10. Deve-se calcular, com os dados de mortalidade dos peixes, a concentração média letal ( $CL_{50}$ ) pelo método *Trimmed – Spearman Karber* (HAMILTON et al., 1977). A  $CL_{50}$  é a concentração média estimada que produz mortalidade de 50% da população teste, no período de 24 horas a 96 horas de exposição (RAND; PETROCELLI, 1985).



Foto: Erix Batista

**Figura 3.** Aclimação dos peixes em unidades experimentais para condução dos ensaios de toxicidade.

## Ensaio in vivo com monogenoides

Com os resultados dos ensaios de toxicidade, podem ser realizados os ensaios in vivo. Esses ensaios, ou banhos terapêuticos, são recomendados para o tratamento de monogenoides e podem ser aplicados inclusive durante o transporte dos peixes, visando à redução da infestação parasitária (Figura 4). Os banhos podem ter duração variada, que irá depender da concentração e toxicidade do óleo essencial testado. Os banhos de imersão rápidos são caracterizados por utilizar concentrações elevadas do produto e terem duração de aproximadamente 5 minutos; os banhos de curta duração utilizam baixas concentrações e exposição por um período de 30 a 60 minutos; e nos banhos prolongados ou indefinidos, o produto é utilizado em baixas concentrações por 12 horas ou mais (PAVANELLI et al., 2008).



Foto: Edsandra Chagas

**Figura 4.** Aplicação de óleo essencial de *Mentha piperita* na água de transporte de tambaquis para o controle de monogenoides.

## Protocolo

1. Conduzir os ensaios em sistema estático, em aquários ou caixas-d'água de volume conhecido (Figura 5).
2. Colocar os aquários para aerar pelo menos um dia antes do experimento. A aeração deverá ser constante.
3. Registrar, antes e depois dos ensaios, as variáveis de qualidade de água, como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, dureza e amônia tóxica.
4. Considerar como nível mínimo de infestação dos peixes a quantidade de 50 parasitos. Em caso de baixa infestação parasitária, recomenda-se reduzir a renovação de água nas caixas, manter o sistema estático, para promover as reinfestações dos monogenoides.
5. Realizar de forma aleatória a distribuição dos peixes e dos tratamentos nos aquários.
6. Colocar os peixes nos aquários para aclimação 24 horas antes do início do ensaio.
7. Deixar os peixes em jejum durante a realização dos banhos.
8. Preparar as concentrações do óleo essencial a serem avaliadas.
9. Adicionar a concentração indicada de óleo essencial com o auxílio de provetas ou seringas, distribuindo uniformemente o líquido pelas bordas do aquário ou caixa-d'água.
10. Registrar o comportamento dos peixes, como perda de equilíbrio, agitação, aumento na frequência de batimentos operculares, natação errática, bem como ocorrência de hemorragias externas durante o ensaio.

11. O tempo de exposição dos peixes ao óleo essencial vai depender dos resultados obtidos no teste in vitro, podendo variar de banhos de imersão rápidos, de curta duração ou de longa duração.
12. Coletar, após o término dos banhos, amostras dos peixes para as análises parasitológicas. Recomenda-se que parte das amostras de brânquias coletadas seja analisada imediatamente após a coleta, enquanto a outra metade das brânquias ou peixes inteiros podem ser fixados em formol 5% para posterior contagem dos parasitos (Figura 6). A contagem imediata de parasitos visa observar o número de parasitos vivos e mortos. Outra forma de fixação das brânquias é colocá-las em um frasco e banhá-las com água a 60°C e, depois de aproximadamente 30 minutos, completar a água do frasco com formol até alcançar a concentração de formol 5%.
13. Efetuar a contagem dos monogenoides nas brânquias dos peixes com o auxílio de microscópio estereoscópico. Quando a brânquia for analisada imediatamente após a coleta, registrar os monogenoides mortos e vivos. Quando analisar amostras fixadas em formol, contabilizar o número total de monogenoides.
14. Trocar, após o tempo dos banhos, toda a água dos aquários ou colocar os peixes restantes em outros aquários ou caixas-d'água contendo água sem o óleo essencial.
15. É importante avaliar a recuperação dos animais por um período de 96 horas.
16. A eficácia dos tratamentos com óleo essencial no controle dos monogenoides é calculada pela fórmula:

$$EF = \frac{MNPGC - MNPGT}{MNPGC} \times 100$$

**Em que:** EF = Eficácia; MNPGC = Média do número de parasitos no grupo controle; e MNPGT = Média do número de parasitos no grupo tratado (DOTTA, 2015).

Foto: Susanne Oliveira



**Figura 5.** Unidades experimentais onde são conduzidos os testes in vivo ou banhos terapêuticos.

Foto: Edsandra Chagas



Foto: Susanne Oliveira

**Figura 6.** Fixação de amostras em formol 5% para posterior contagem de monogenoides: (A) peixes inteiros; (B) brânquias de tambaqui.

## Considerações finais

No estabelecimento de tratamentos para doenças parasitárias em peixes, como as ocasionadas por monogenoides, deve-se primeiramente conduzir os ensaios *in vitro* e posteriormente os *in vivo*, visando estabelecer protocolos eficazes, seguros e viáveis para uso na criação de peixes quando do diagnóstico dessa parasitose. Há a necessidade ainda de realizar ensaios para avaliar os efeitos secundários dessa aplicação sobre a fisiologia dos animais, por meio de análises hematológicas, bioquímicas e histológicas, além de quantificar o nível residual nos tecidos dos peixes, determinando o período de carência para o consumo.

## Referências

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **AVMA guidelines for the euthanasia of animals**. Schaumburg, 2013. 102 p.

ANDRADE-PORTO, S. M. **Efeito da formalina no controle de monogenóides (Platyhelminthes: Monogenoidea) do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteichthyes: Arapaimidae): toxicidade, histopatologia e hematologia**. 143 f. 2015. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446–475, 2008.

BRUSANTIN, A. M. **Predição da solubilidade de polímeros em solventes**. 108 f. 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de Campinas, Campinas.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Non-antibiotictherapies for infectious diseases. **Communicable Diseases Intelligence**, Australia, v. 27, p. 143-146, 2013.

CHAGAS, E. C.; MAJOLO, C.; BOIJINK, C. L.; CHAVES, F. C. M.; HASHIMOTO, G. S. O.; FIGUEREDO, A. B.; MARTINS, M. L. Uso de óleos essenciais e extratos no tratamento de enfermidades de peixes. In: MADI, R. R.; CAMPOS, C. M.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. (Ed.). **Patologia e sanidade em ambientes aquáticos**. Maringá: Massoni, 2014. p. 269-294.

CHAKRABORTY, S. B.; HORN, P.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. **Reviews in Aquaculture**, Richmond, v. 5, p. 1-19, 2013.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO AMBIENTAL. **Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA**. Brasília, DF: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2013. 54 p.

DOTTA, G.; BRUM, A.; JERÔNIMO, G. T.; MARASCHIN, M.; MARTINS, M. L. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 24, p. 66-71, 2015.

EKANEM, A. P.; OBIEKEZIE, A.; KLOAS, W.; KNOPF, K. Effects of crude extracts of *Mucunapruriens* (Fabaceae) and *Caricapapaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multiliis*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 92, p. 361-366, 2004.

FOUZ, B.; ESTEVE-GASSENT, M. D.; BARRERA, R.; LARSEN, J. L.; NIELSEN, M. E.; AMARO, C. Field testing of a vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 45, p. 183-189, 2001.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, Washington, DC, v. 11, p. 714-719, 1977.

HANSEN, C. M. The three dimensional solubility parameters – Key to paint component affinities: III. Independent calculation of the parameter components. **Journal of Paint Technology**, Philadelphia, v. 39, p. 511, 1967.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Impact of plant products on innate and adaptative immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 317, p. 1-15, 2011.

HASHIMOTO, G. S. de O.; MARINHO NETO, F.; 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**, Amsterdam, v. 450, p. 182-186, 2016. (Na imprensa)

IWASHITA, M. K. P.; MACIEL, P. O. Princípios básicos de sanidade de peixes. In: RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; SANTOS, V. R. V. (Ed.). **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 215–272.

KHALIL, A. A.; EL-HOUSEINY, W. Ginger (*Zingiber officinale*) an antiparasitic and its effect on health status of *Clarias gariepinus* infested with gill monogenia. **Egyptian Journal for Aquaculture**, Abassa, v. 3, p. 55-62, 2013.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. L. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, p. 108-113, 2007.

ORIAKPONO, O.; ADUABOBO, H.; AWI-WAADU, G. D. B.; NZEAKO, S. Anti-Parasitic Effects of Methanolic Extracts of *Artemisia annua* L. against Parasites of *Sarotherodon melanotheron*. **International Journal of Modern Biology and Medicine**, Florida, v. 1, p. 108-116, 2012.

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

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington, DC: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.

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**, Amsterdam, v. 443, p. 50-61, 2014.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. de M.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. da. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 6 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 99).

UZUN, E.; OGUT, H. The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 437, p. 30-37, 2015.

WISE, D. J.; TERHUNE, J. S. The relationship between vaccine dose and efficacy in channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated as fry with a live attenuated strain of *Edwardsiella ictaluri* (re-33). **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 32, p. 177-183, 2001.

WU, Z. F.; ZHU, B.; WANG, Y.; LU, C.; WANG, G. X. In vivo evaluation of anthelmintic potential of medicinal plant extracts against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology Research**, Berlin, v. 108, p. 1557-1563, 2011.

ZHANG, Q.; XU, D. H.; KLESZIUS, P. H. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Parasitology**, Chichester, v. 198, p. 45-53, 2013.

*Divulgação e acabamento*  
**Embrapa Amazônia Ocidental**





---

*Amazônia Ocidental*

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



CGPE 12677