



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical
Mestrado e Doutorado
UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil



BRUNA VIANA SOARES

**EFEITOS ANTIPARASITÁRIOS E FISIOLÓGICOS de *Lippia* spp.
(*VERBENACEAE*) EM *Colossoma macropomum* E USO DESSAS PLANTAS NA
MEDICINA VETERINÁRIA E AQUICULTURA**

MACAPÁ, AP

2016

BRUNA VIANA SOARES

**EFEITOS ANTIPARASITÁRIOS E FISIOLÓGICOS de *Lippia* spp.
(VERBENACEAE) EM *Colossoma macropomum* E USO DESSAS PLANTAS NA
MEDICINA VETERINÁRIA E AQUICULTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Dr. Marcos Tavares-Dias

Co-Orientador: Dr. Francisco Célio M. Chaves

MACAPÁ, AP

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

577

S676e Soares, Bruna Viana.

Efeitos antiparasitários e fisiológicos de *Lippia* spp. (VERBENACEAE) em *Colossoma macropomum* e uso dessas plantas na medicina veterinária e aquicultura / Bruna Viana Soares; orientador, Marcos Tavares Dias; co-orientador, Francisco Célio M. Chaves – Macapá, 2016.

135 f.

Tese (doutorado)– Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO).

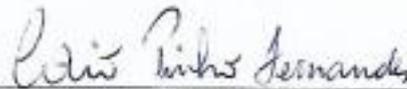
1. Ecologia – Peixes de água doce. 2. Biodiversidade – Amazônia - Amapá. 3. Plantas Medicinais. I. Dias, Marcos Tavares, orientador. II. Chaves, Francisco Célio M., co-orientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

BRUNA VIANA SOARES

EFEITOS ANTIPARASITÁRIOS E FISIOLÓGICOS de *Lippia* spp. (VERBENACEAE) EM
Colossoma macropomum E USO DESSAS PLANTAS NA MEDICINA VETERINÁRIA E
AQUICULTURA



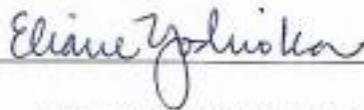
Dr. Marcos Tavares Dias (Orientador)
Embrapa Amapá/ PPGBIO



Dr. Caio Pinho Fernandes
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)/ PPGBIO



Dra. Raquel Rodrigues do Amaral
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka
Embrapa Amapá/ PPGBIO



Dra. Marcela Nunes Videira
Universidade Estadual do Amapá (UEAP)

PREFÁCIO

Esta tese está dividida em quatro artigos, seguindo o formato alternativo proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), que segue normas da Ecology até a Introdução Geral. O artigo 1 é uma revisão bibliográfica intitulado “**Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura**”, foi publicado no periódico **Biota Amazônia** em 2013, e segue as normas desse periódico (Anexo 1). O artigo 2 intitulado “**Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects**” foi publicado no periódico **Aquaculture** (Qualis A2) em 2015, e segue as normas desse periódico (Anexo 2). O artigo 3 intitulado “**Atividade antiparasitária, histopatologia e fisiologia em *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae) expostos a óleo essencial de *Lippia sidoides* (Verbenaceae)**”, segue as normas do período **Veterinary Parasitology**, para o qual será submetido. O artigo 4 “**Atividade antiparasitária do óleo essencial de *Lippia organoides* Kunth em ectoparasitos de *Colossoma macropomum* e seus efeitos fisiológicos e histopatológicos**”, segue as normas do período periódico **Aquaculture**, para o qual será submetido.

RESUMO

Soares, Bruna Viana. Efeitos antiparasitários e fisiológicos de *Lippia* spp. (Verbenaceae) em *Colossoma macropomum* e uso dessas plantas na medicina veterinária e aquicultura. Macapá, 2016. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

O uso de produtos naturais em aquicultura e medicina veterinária vem ganhando destaque na busca de substâncias bioativas que causam menos danos aos animais, à natureza e ao homem, e nesse contexto o gênero *Lippia* se destaca pela potencial atividade terapêutica. Esse estudo investigou a atividade antiparasitária, *in vitro* e *in vivo*, os efeitos sanguíneos e histopatológicos dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, *Lippia sidoides* Cham. 1832 e *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, naturalmente infectados. Os constituintes majoritários do óleo essencial de *L. alba* (LA) foram: carvona (61,7%) e limoneno (17,5%); do óleo essencial de *L. sidoides* (LS) foram: timol (64,5%) e p-cimeno (11,7); e do óleo essencial de *L. origanoides* (LO) foram: carvacrol (49,7%), p-cimeno (13,3%) e timol (9,9%). Nos ensaios antiparasitários *in vitro*, monogenoideas *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* das brânquias de *C. macropomum* foram expostas a diferentes concentrações desses três óleos essenciais. Os resultados *in vitro* indicaram efeito dose-dependente dos óleos essenciais, os quais mostraram 100% de eficácia em até uma hora de exposição 2560 e 1280 mg/L de LA, 360 e 160 mg/L de LS e 320 e 160 mg/L de LO. Nos testes *in vivo*, através de banhos terapêuticos, com 100 e 150 mg/L de LA, 10 e 20 mg/L de LS e 20 e 40 mg/L de LO não houve eficácia contra monogenoideas nas brânquias *C. macropomum*. Essas baixas concentrações desses três óleos essenciais foram usadas devido ao efeito anestésico das substâncias, cujos tempos de exposição foram de 30 minutos para as maiores e 60 minutos para as menores concentrações. Em *C. macropomum*, o óleo essencial LA causou alterações nos níveis de glicose plasmática, proteínas plasmáticas totais, hemoglobina, hematócrito, número de eritrócitos, trombócitos, leucócitos totais, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos. O óleo essencial de LS não influenciou os níveis de glicose e proteínas totais plasmáticas, mas reduziu o número de eritrócitos totais; enquanto óleo essencial de LO causou aumento nos níveis de proteínas totais, número de monócitos e neutrófilos, e aumentou o hematócrito dos

peixes. Logo após banhos terapêuticos e depois de 24 horas de recuperação dos peixes, a tais concentrações dos diferentes óleos essenciais, a avaliação histopatológica das brânquias mostrou que LA e LS causaram alterações severas e danos irreversíveis, enquanto que o óleo essencial LO causou danos leves a moderados. As lesões observadas foram hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio e aneurisma lamelar, ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose, proliferação de células mucosas e células de cloreto e hipertrofia lamelar. Nenhum dos três óleos essenciais pode ser recomendado para banhos terapêuticos nas condições testadas devido aos efeitos anestésicos e alterações sanguíneas e histopatológicas causadas aos peixes, apesar da eficácia antiparasitária *in vitro*. Assim, devido esse potencial bioativo, *in vitro*, dos óleos essenciais de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides*, estudos utilizando os seus constituintes químicos majoritários deveriam ser conduzidos, para testar *in vivo* os efeitos contra parasitos de *C. macropomum*.

Palavras-chave: Tambaqui; Monogenoidea; Parasitos; Planta medicinal; Sangue; Histologia

ABSTRACT

Soares, Bruna Viana. Efeitos antiparasitários e fisiológicos de *Lippia* spp. (Verbenaceae) em *Colossoma macropomum* e uso dessas plantas na medicina veterinária e aquicultura. Macapá, 2016. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá

The use of natural products in aquaculture and veterinary medicine has been gaining attention in the search for bioactive substances that cause less harm to animals, nature and humans, and plants of the *Lippia* genus stands out as a potential therapeutic source. This study investigated the *in vitro* and *in vivo* antiparasitic activity, blood and histopathologic effects of essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, *Lippia sidoides* Cham. 1832 and *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, naturally infected. The major constituents of the essential oil of *L. alba* (LA) were carvone (61.7%) and limonene (17.5%); *L. sidoides* (LS) essential oil were thymol (64.5%) and p-cymene (11.7); and *L. origanoides* (LO) essential oil were carvacrol (49.7%), p-cymene (13.3%) and thymol (9.9%). Gills of *C. macropomum* were exposed to different concentrations of these three essential oils to evaluate the *in vitro* antiparasitic effects against monogenoideans *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* and *Mymarothecium boegeri*. The *in vitro* results showed dose-dependent effect of the essential oils, which showed 100% effectiveness within one hour of exposure to 2560 and 1280 mg/L of LA, 360 and 160 mg/L of LS, 320 and 160 mg/L of LO. *In vivo* tests, using therapeutic baths with 100 and 150 mg/L of LA, 10 and 20 mg/L of LS, 20 and 40 mg/L of LO showed no efficacy against monogenoideas of *C. macropomum*. These low concentrations of the three essential oils were used due to the anesthetic effect of the essential oils, which used in baths of 30 minutes or 60 minutes. In *C. macropomum*, the LA essential oil causes changes in plasma glucose levels, total plasma proteins, hemoglobin, hematocrit, number of erythrocytes, thrombocytes, total leukocytes, lymphocytes, eosinophils and neutrophils. The LS essential oil did not influence glucose levels and total plasma proteins, but reduced the total number of erythrocytes; while the LO essential oil caused an increase in total plasma protein levels, number of monocytes and neutrophils, and increased the hematocrit of fish exposed to these oils. Immediately after therapeutic baths and after 24 hours of fish recovery to the different essential oils, histopathological evaluation of the gills showed that LA and LS caused severe and irreversible change, while the LO essential oil caused minor injury to moderate. The lesions observed were hyperplasia and fusion of the

lamellar epithelium, capillary dilation, epithelial detachment and lamellar aneurism, epithelial disruption with hemorrhage, congestion, edema and necrosis, mucosal cell proliferation and cell chloride and lamellar hypertrophy. None of the three essential oils can be recommended for therapeutic baths in the conditions here used due to anesthetic effects and blood and histopathological changes caused to fish, despite the antiparasitic *in vitro* efficacy. Therefore, due to potential bioactive *in vitro* of essential oils of *L. alba*, *L. organoides* and *L. sidoides*, further studies using their majority chemical constituents should be conducted to test the *in vivo* efficacy against parasites of *C. macropomum*.

Keywords: Tambaqui; Monogenoidea; Parasites; Medicinal plant; Blood; Histology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1.1. TAMBAQUI <i>Colossoma macropomum</i>.....	10
1.2. PARASITOS DE BRÂNQUIAS DE TAMBAQUI EM CULTIVO.....	11
1.3. ÓLEOS ESSENCIAIS E OUTROS PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA EM PEIXES.....	14
1.4. <i>Lippia alba</i>.....	15
1.5. <i>Lippia origanoides</i>.....	17
1.6. <i>Lippia sidoides</i>.....	18
2. PROBLEMAS.....	20
3. HIPÓTESES	20
4. OBJETIVOS	21
4. 1. GERAL	21
4. 2. ESPECÍFICOS.....	21
5. REFERÊNCIAS	22
ARTIGO 1	31
Espécies de <i>Lippia</i> (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura.....	32
ARTIGO 2	61
“Antiparasitic activity of the essential oil of <i>Lippia alba</i> on ectoparasites of <i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui) and its physiological and histopathological effects”.....	62
ARTIGO 3.....	85
Atividade antiparasitária, histopatologia e fisiologia em <i>Colossoma macropomum</i> (Serrasalminidae) expostos a óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> (Verbenaceae).....	86
ARTIGO 4	108
Atividade antiparasitária do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> Kunth em ectoparasitos de <i>Colossoma macropomum</i> e seus efeitos fisiológicos e histopatológicos.....	109
6. CONCLUSÕES	133
ANEXO 1	
ANEXO 2	

1. INTRODUÇÃO GERAL

A piscicultura é considerada de grande importância para o desenvolvimento socioeconômico de toda a região amazônica, devido à existência de recursos naturais (peixes e recursos hídricos) com capacidade para produção que atenda aos mercados local, regional, nacional e internacional. Além disso, essa é uma atividade de expressão econômica mundial, em decorrência da demanda crescente de pescado provocada pela redução dos estoques naturais (Lima 2005), bem como pela demanda por proteína animal.

Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, o pescado tem grande importância na alimentação da população, especialmente para comunidades tradicionais. De forma que 60% do consumo nacional de peixes ocorre nessas regiões, contra 40% na região Centro-Sul. O consumo de peixe é inversamente proporcional à renda *per-capita* da população brasileira (Sonoda et al. 2012). Em 2010, a produção nacional da pesca extrativista foi de aproximadamente 249.000 toneladas e a produção da aquicultura foi de aproximadamente 395.000 toneladas. Porém, a região Norte contribui com apenas 10,5% dessa produção da aquicultura, a região Nordeste com 20%, a região Sudeste com 18%, a região Sul com 33,8% e a região Centro-Oeste 17,7% (Ministério da Pesca e Aquicultura 2012). Todavia, a aquicultura da região Norte tem como característica a produção de peixes de água doce, enquanto a região Sul além da piscicultura destaca-se pela aquicultura marinha.

Em 2010, a produção nacional de tambaqui *Colossoma macropomum* foi 479.399 de toneladas, e juntamente com o pacu *Piaractus mesopotamicus* e o híbrido tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*) foram responsáveis por 24,6% da produção (Ministério da Pesca e Aquicultura 2012). O tambaqui é um peixe economicamente importante para as regiões Norte e Nordeste do Brasil, pois apresenta várias características zootécnicas favoráveis para o cultivo, tais como a fácil obtenção de alevinos, rápido crescimento e boa produtividade (Lopera-Barrero et al. 2011). Porém, com a intensificação do cultivo de tambaqui, o surgimento de doenças é inevitável.

No Brasil, embora tais estimativas sejam ainda desconhecidas, pode-se supor que as perdas econômicas provocadas por enfermidades e mortalidade sejam elevadas. Em diversos países, estimativas mostram que as perdas econômicas anuais na aquicultura causadas pela ocorrência dessas doenças foram em torno de US\$ 400 milhões na China, US\$ 17,6 milhões na Índia e acima de US\$ 500 milhões na Tailândia (Harikrishnan et al. 2011). Portanto, há necessidade de descobrir substâncias para controlar a mortalidade de peixes e minimizar

perdas econômicas na piscicultura. O uso de fitoterápicos merece destaque devido ao crescente interesse em produzir alimentos orgânicos.

A produção de alimentos orgânicos no Brasil tem avançado nos últimos anos, e paralelamente a esses avanços vem a legislação a ela aplicada. Atualmente, a legislação brasileira contempla vários setores e aspectos relacionados à produção orgânica de produtos de origem vegetal e animal, e define que estas devem conservar o ambiente, proteger os consumidores e proibir o uso de terapêuticos sintéticos, produtos químicos e organismos geneticamente modificados (Boscolo et al. 2012). Além disso, os produtos químicos usados na piscicultura são tóxicos e não possuem autorização dos órgãos competentes (Tavares-Dias et al. 2011).

Os óleos essenciais extraídos de espécies de *Lippia* possuem grande potencial bioativo, constituindo recursos promissores para uso na medicina veterinária e aquicultura. Nesse contexto, merecem destaque as atividades antimicrobiana, antiparasitária, anestésica, analgésica, antiinflamatória e antitumoral (Soares e Tavares-Dias 2013). Porém, não há na literatura informações sobre atividade antiparasitária de óleos essenciais de *Lippia* spp. em *C. macropomum*. Assim, são necessários estudos sobre a atividade dessas plantas contra parasitos de brânquias de *C. macropomum*, visando estabelecer protocolos terapêuticos eficazes no tratamento de parasitoses desse peixe de grande importância para a piscicultura.

1.1. TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

Colossoma macropomum pertence à família Serrasalminidae e é de grande importância para Amazônia. Está amplamente distribuído nas bacias dos rios Orinoco e Amazonas, vivendo em lagos e áreas marginais alagadas associadas às calhas dos rios principais. Pode alcançar cerca de um metro de comprimento e atingir 30 kg, sendo considerado o segundo maior peixe de escamas da bacia Amazônica (Goulding e Carvalho 1982, Lopera-Barrero et al. 2011, Santos et al. 2013).

Na natureza, o tambaqui possui desova anual e total, ocorrendo geralmente na época da enchente dos rios amazônicos, com alta fecundidade média por desova (Vieira et al. 1999). Devido à sua alta mobilidade, longevidade, tamanho e hábito alimentar onívoro, o tambaqui pode contribuir para a dispersão de sementes, exercendo influência sobre a dinâmica do recrutamento de plantas e a biodiversidade regional em matas ciliares e de várzea (Horn et al. 2011).

Nos últimos anos, os estoques naturais de tambaqui vêm sofrendo drástica redução, devido ao fato de ser muito apreciado pelas comunidades ribeirinhas e urbanas da Amazônia (Santos e Santos 2005). O cultivo é uma das soluções para esta sobre-exploração, sendo a espécie nativa mais cultivada na Amazônia e demais regiões brasileiras, cuja produção nacional aumentou em 66% no período de 2007 a 2009 (Lopera-Barrero et al. 2011).

O tambaqui pode ser cultivado tanto em viveiros escavados como também em tanques-rede em lagos de várzea, uma vez que pode suportar elevadas densidades sem prejuízos ao crescimento e ganho de peso, representando uma alternativa de produção economicamente viável (Gomes et al. 2006). Peixes de maior capacidade zootécnica podem ser obtidos pelo cruzamento do tambaqui com o pacu *P. mesopotamicus* ou com a pirapitinga *Piaractus brachypomus*, resultando nos híbridos tambacu ou tambatinga, respectivamente (Hashimoto et al. 2012).

1.2. PARASITOS DE BRÂNQUIAS DE TAMBAQUI EM CULTIVO

A ocorrência de infecções parasitárias é fator determinante para o sucesso da piscicultura de qualquer espécie, principalmente em sistemas de criação intensiva, onde a sanidade dos animais é um aspecto que jamais pode ser negligenciado (Santos et al. 2013). Tambaqui de pisciculturas brasileiras tem sido infectado por diversas espécies de parasitos, principalmente por espécies de protozoários e helmintos (Tabela 1). Os protozoários, monogenoídeos, mixosporídeos e crustáceos parasitam, em geral, as brânquias e o tegumento desse hospedeiro. Porém, *Perulernaea gamitanae* ocorre nas brânquias e boca do tambaqui, e assim, pode causar a morte de alevinos quando em elevada infestação na boca, que impede a alimentação dos peixes. Os trematóides, cestóides e acantocéfalos infectam principalmente o intestino (Tavares-Dias et al. 2013), mas *Neoechinorhynchus buttnerae* tem sido um grande problema para o cultivo de tambaqui na Amazônia central.

TABELA 1 - Principais parasitos de brânquias e trato gastrointestinal de tambaqui em pisciculturas de diferentes localidades do Brasil.

Espécies de Parasitos	Localidade	Referências
PROTOZOA		
<i>Chilodonella</i> sp.	Jaboticabal (SP)	Martins e Romero (1996), Martins et al. (2000)
<i>Cryptobia</i> sp.	Pentecoste (CE)	Békési (1992)
<i>Trichodina</i> sp.	Jaboticabal (SP)	Martins e Romero (1996)
<i>Trichodina</i> sp.	Pirassununga (SP)	Ceccarelli et al. (1990)
<i>Trichodina</i> sp.	Jaboticabal (SP)	Martins et al. (2000)
<i>Trichodina</i> sp.	Pentecoste (CE)	Békési (1992)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Pentecoste (CE)	Békési (1992)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Pirassununga (SP)	Ceccarelli et al. (1990)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Jaboticabal (SP)	Martins e Romero (1996), Martins et al. (2000)
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Manaus (AM)	Tavares-dias et al. (2006)
<i>Piscinoodinium pillulare</i>	Guariba (SP)	Schalch e Moraes (2005)
<i>Piscinoodinium pillulare</i>	Jaboticabal (SP)	Martins et al. (2000)
<i>Ichthyobodo necator</i>	Jaboticabal (SP)	Martins et al. (2000)
CRUSTACEA		
<i>Argulus chicomendesi</i>	Itacoatiara (AM)	Malta e Varella (2000)
<i>Argulus</i> sp.	Jaboticabal (SP)	Martins et al. (2000)
<i>Argulus</i> sp.	Pirassununga (SP)	Ceccarelli et al. (1990)
<i>Dolops</i> sp.	Jaboticabal (SP)	Martins e Romero (1996)
<i>Lernaea cyprinacea</i>	Jaboticabal (SP)	Martins e Romero (1996), Martins et al. (2000)
<i>Lernaea cyprinacea</i>	Pentecoste (CE)	Békési (1992)
<i>Perulernaea gamitanae</i>	Manaus (AM)	Benetton e Malta (1999)
<i>Perulernaea gamitanae</i>	Macapá (AP)	Tavares-dias et al. (2011)
<i>Gamictylus jaraquensis</i>	Irاندuba (AM)	Varella et al. (2003)
<i>Ergasilus</i> sp.	Irاندuba (AM)	Varella et al. (2003)
TREMATODA		
Digenea gen. sp.	Pentecoste (CE)	Békési (1992)
CESTODA		
Cestoda gen. sp	Jaboticabal (SP)	Martins e Romero (1996)
Cestoda gen. sp	Pentecoste (CE)	Békési (1992)
Cestoda gen. sp	Pirassununga (SP)	Kohn et al.(1985)

TABELA 1 – Continuação...

MONOGENOIDEA		
Monogenoidea gen. sp	Jaboticabal (SP)	Martins;Romero (1996), Martins et al. (2000)
Monogenoidea gen. sp	Pentecoste (CE)	Békési (1992)
<i>Dactylogyrus</i> sp.	Pirassununga (SP)	Ceccarelli et al. (1990)
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Irاندuba (AM)	Varella et al.(2003)
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Manaus (AM)	Tavares-Dias et al.(2006)
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	Irاندuba (AM)	Varella et al.(2003)
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	Pirassununga (SP)	Ceccarelli et al. (1990)
<i>Mymarothecium boegeri</i>	Pentecoste (CE)	Cohen e Kohn (2005)
<i>Notozothecium janauachnsis</i>	Jaboticabal (SP)	Belmont-Jégu et al. (2004)
MYXOZOA		
<i>Myxobolus colossomatis</i>	Pentecostes (CE)	Molnar e Békési (1993)
<i>Myxobolus colossomatis</i>	Manaus (AM)	Tavares-dias et al. (2006) , Maciel et al. (2011)
<i>Myxobolus</i> sp.	Irاندuba (AM)	Varella et al. (2003)
<i>Myxobolus</i> sp.	Belém (PA)	Videira et al. (2016)
<i>Henneguya</i> sp.	Irاندuba (AM)	Varella et al. (2003)
<i>Henneguya</i> sp.	Pirassununga (SP)	Ceccarelli et al. (1990)
<i>Henneguya</i> sp.	Pentecoste (CE)	Békési (1992)
<i>Henneguya</i> sp.	Belém (PA)	Videira et al. (2016)
<i>Coccidia</i> sp.	Pentecoste (CE)	Békési (1992)

A presença de *M. colossomatis* foi relatada nas brânquias e extensões sanguíneas de juvenis de tambaqui e a maior prevalência ocorreu em peixes cultivados em viveiros (5,5%), quando comparados aos peixes de tanque-rede (2,7%). Esses resultados indicam que os parasitos Myxozoa também devem ser investigados em extensões sanguíneas, visto que podem causar doenças em peixes, sendo necessária a identificação da espécie para um adequado manejo sanitário (Maciel et al. 2011). Filamentos branquiais de tambaquis têm sido também parasitados por *Branchiomyces* sp., fungo que causa graves alterações circulatórias e lesões histopatológicas localizadas nos hospedeiros (Pereira et al. 2012). Assim, há necessidade de estudos sobre produtos naturais tais como *Lippia* spp. para profilaxia e tratamento de tambaqui em cultivo intensivo.

1.3. ÓLEOS ESSENCIAIS E OUTROS PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA EM PEIXES

O uso de produtos químicos convencionais no controle de parasitos tem encontrado dois problemas: o desenvolvimento da seleção ao princípio ativo e a preocupação da sociedade e órgãos governamentais com os resíduos nos produtos de origem animal e no ambiente. Esses dois pontos têm determinado efetivamente o rumo atual das pesquisas científicas na área da parasitologia. Acredita-se que a aplicação de extratos vegetais possa causar desenvolvimento bem mais lento da resistência, atingindo, geralmente, somente a espécie alvo, além de serem biodegradáveis e menos danosos ao meio ambiente (Chagas 2004), diminuindo assim o problema dos resíduos.

De acordo com o Anexo I da Instrução Normativa Interministerial N° 28, de 8 de junho de 2011, os fitoterápicos e os extratos vegetais são permitidos na prevenção e tratamento de enfermidades dos organismos aquáticos (Brasil 2011). Para tanto, são necessários estudos que comprovem a eficácia desses produtos naturais na aquicultura, bem como o estabelecimento de protocolos terapêuticos para o tratamento das diversas enfermidades.

Diversos produtos naturais vêm sendo investigados para uso na piscicultura. Foi relatada eficácia, *in vitro* e *in vivo*, de extratos das folhas de *Mucuna pruriens* (Fabaceae) e sementes de *Carica papaya* (Caricaceae) contra *I. multifiliis* de *Carassius auratus auratus* por Ekanem et al. (2004). Adição de alho em pó na ração de pacu *P. mesopotanicus* reduziu a infecção por monogenoideas *Anacanthorus penilabiatu*s e aumentou o número de eritrócitos, trombócitos e leucócitos totais, o hematócrito e hemoglobina (Martins et al. 2002). Estudo conduzido em lambari *Astyanax cf. zonatus* demonstrou efeito antiparasitário de sementes de abóbora *Cucurbita maxima*, desidratadas e moídas, fornecidas na alimentação dos peixes (Fujimoto et al. 2012). Hashimoto et al. (2016) encontraram eficácia *in vitro* e *in vivo* de *Mentha piperita* contra monogenoideas de *Oreochromis niloticus*.

Pinus elliottii teve efeito no tratamento *in vitro* (Tóro et al. 2003) e *in vivo* (Vilem et al. 1998) para crustáceos *Lernaea* spp. Extratos de *Momordica charantia* e *Melia azedarach* foram efetivos contra *Cryptocaryon irritans* e *Neobenedenia melleni* em peixes ornamentais marinhos, além de apresentarem boa margem de segurança para a aplicação *in vivo* (Osoria

2003). O uso de extrato aquoso de *Terminalia catappa* em tambaqui foi efetivo contra *P. pillulare*, mas não contra *I. multifiliis* (Claudiano et al. 2009).

Os óleos essenciais são misturas complexas de numerosos compostos obtidos das plantas e caracterizam-se por possuir uma composição muito diversificada, especialmente por compostos químicos terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (Calsamiglia et al. 2007). São metabólitos secundários que geralmente exercem função de defesa nas plantas, frente às agressões externas (Briskin 2000). Sua utilização tem sido amplamente difundida nos últimos anos, pois possuem atividades antibacteriana, antioxidante, antifúngica, analgésica, anticancerígena, inseticida, anticoccídica e promotora do crescimento (Tipu et al. 2006).

Os componentes monoterpênicos geraniol e citronellal mostraram-se ativos durante tratamento *in vitro* contra larvas de *Contracaecum* sp. de traíra *Hoplias malabaricus*, indicando atividade anti-helmíntica promissora contra o parasito supra-citado (Barros et al. 2009). O geraniol é um dos constituintes majoritários mais abundantes nos óleos essenciais de *Lippia alba* e *Lippia citriodora*, conferindo a essas plantas potencial antiparasitário promissor (Soares e Tavares-Dias 2013) para uso na piscicultura de tambaqui.

1.4. *Lippia alba*

Lippia alba (Figura 1) da família Verbenaceae, é conhecida popularmente como erva-cidreira, falsa-melissa, chá-de-tabuleiro, erva cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava, alvia sija, alecrim do campo e chá-de-febre (Tavares et al. 2011). Possui como características qualitativas predominantes o caule marrom e as folhas de coloração verde-escuro, a nervura da folha e a coloração das sépalas verde, e as pétalas de coloração lilás claro. Apresenta também, em menor quantidade, plantas de caule verde e folhas verdes, sépalas e nervuras verdes e flores com pétalas na coloração lilás, podendo ocorrer, em menor proporção, flores de coloração branca. Devido à sua variedade fenotípica, as características morfológicas e agronômicas dessa espécie diferenciam dos diferentes acessos da planta (Camêlo et al. 2011). Trata-se de um subarbusto aromático que ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil. Tem grande importância na medicina popular do país, pois é usada principalmente como analgésico, antiinflamatório, sedativo e anti-espasmódico.

Diversos autores (Zoghbi et al. 1998, Jannuzzi et al. 2011, Nogueira et al. 2007, Oliveira et al. 2007, Silva et al. 2006, Escobar et al. 2010, Heldwein et al. 2012, Pandeló et al. 2012, Hatano et al. 2012) investigaram a composição química de óleos essenciais extraídos de *L. alba* cultivadas em diferentes localidades. Os principais constituintes majoritários encontrados nesses estudos foram: geranial, neral, β -cariofileno, carvona, limoneno, geraniol, mirceno, 1,8-cineole e germacreno D, dentre outros. As variações na constituição química dos óleos essenciais da *L. alba* podem ser atribuídas aos fatores ambientais, tais como influência do clima e solo sobre as plantas analisadas, bem como a época de sua colheita.



FIGURA 1 - *Lippia alba*. Fonte: TAVARES et al. (2011)

Estudos agrônômicos são importantes, pois têm como objetivo aperfeiçoar a produção de *L. alba* e possibilitar o seu cultivo em larga escala. A adubação com composto orgânico de capim elefante influenciou positivamente a produção de biomassa seca de *L. alba*, mas a inoculação dos compostos com actinomicetos não exerceu influência (Gama et al. 2012). Em relação ao estágio de desenvolvimento dessa planta, Pandeló et al. (2012) verificaram que o maior rendimento na produção de óleo essencial ocorre nas folhas, cujos tricomas ainda não foram abertos.

Em estudos conduzidos em Pentecoste (CE), Nagao et al. (2005) relataram obtenção de maior quantidade de óleo essencial na época seca (outubro) quando comparada a época úmida (abril). Corroborando esses resultados, Almeida et al. (2012), em experimento

realizado em Campinas (SP), demonstraram que as plantas com maior rendimento de óleo essencial foram aquelas colhidas na época seca, e que as plantas colhidas na época úmida apresentaram maior produção de linalol. O horário de corte também pode ser um fator relevante, pois maior rendimento de óleo essencial ocorre ao meio dia em plantas cultivadas em Crato-CE (Bezerra et al. 2011). Contudo, em estudos realizados em Botucatu-SP, não houve diferenças no teor do óleo de *L. alba* submetida aos diferentes horários de corte, havendo, porém, variação em relação à proporção dos constituintes majoritários (Ehlert et al. 2013).

Devido as propriedades medicinais de *L. alba* atribuídas ao seu uso tradicional, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram seu potencial bioativo. Os óleos essenciais e extratos de *L. alba* foram capazes de inibir bactérias, fungos e protozoários (Nogueira et al. 2007, Escobar et al. 2010, Fabri et al. 2011), além de causar efeito sedativo em organismos aquáticos durante transporte (Azambuja et al. 2011, Cunha et al. 2010, Cunha et al. 2011, Parodi et al. 2012, Becker et al. 2012, Veeck et al. 2013). Porém, *L. alba* não tem sido ainda usada para tratamento contra parasitos de peixes, incluindo o tambaqui.

1.5. *Lippia origanoides*

Lippia origanoides H. B. K. conhecida popularmente como salva-de-marajó e alecrim-d'angola no Brasil, e como orégano no México, é uma verbenácea nativa da América Central e América do Sul, encontrada principalmente no México, Cuba, Guatemala e região amazônica (Guiana, Venezuela, Colômbia e Brasil) (Figura 2). É amplamente utilizada na culinária e na medicina tradicional para o tratamento de enfermidades gastrointestinais tais como náuseas, vômitos, diarreias, dores estomacais, cólicas, indigestão e azia, além de febre, corrimentos vaginais e cólicas menstruais, além de anti-séptico bucal e feridas (Oliveira et al. 2007).

Óleo essencial de *L. origanoides* possui como principais constituintes majoritários o timol, carvacrol, ρ -cimeno, γ -terpineno, trans- β -cariofileno e α -felandreno, mas a composição e percentual desses constituintes pode variar de acordo com o local e condições de cultivo (Oliveira et al. 2007, Escobar et al. 2010, Betancourt et al. 2012).



FIGURA 2 - *Lippia origanoides* H.B.K. Fonte: Barreto et al. (2014).

Estudos *in vitro* comprovaram ação antimicrobiana de óleo essencial de *L. origanoides* contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos resistentes aos fármacos sintéticos (Oliveira et al. 2007, Ospina et al. 2011, Betancourt et al. 2012, Barreto et al. 2014), bem como ação contra protozoários *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* (Escobar et al. 2010). Esses resultados indicam o potencial bioativo dessa planta para uso no tratamento contra protozoários de tambaqui.

1.6. *Lippia sidoides*

Lippia sidoides (Figura 2) (Verbenaceae) é conhecida popularmente como alecrim-pimenta, alecrim-bravo, estrepa-cavalo e alecrim-grande. Seu uso popular é relatado para tratar infecções e outras enfermidades, das quais muitas tiveram atividades já comprovadas cientificamente. Trata-se de um arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço, próprio da vegetação do semi-árido nordestino, comum na caatinga entre Mossoró-RN e Tabuleiro do Norte-CE. Apresenta folhas aromáticas e picantes, opostas, simples e pecioladas; flores pequenas, esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto nas axilas das folhas; além de frutos extremamente pequenos, que produzem sementes pequenas que raramente germinam (Camurça-Vasconcelos 2006, Fontenelle 2009).



FIGURA 3 - Arbustos (esquerda) e detalhes botânicos (direita) de *Lippia sidoides*. Fonte: Fontenelle (2009).

O óleo essencial de *L. sidoides* possui como constituintes majoritários o timol, carvacrol, p -cimeno, γ -terpineno, β -cariofileno, outros em menor abundância. Assim, ocorre variações na sua composição química (Jesus et al. 2006, Camurça-Vasconcelos et al. 2007, Fontenelle et al. 2007, Oliveira et al. 2009, Cavalcanti et al. 2010, Farias-Junior et al. 2012, Gomes et al. 2012, Morais et al. 2012, Mota et al. 2012, Rondon et al. 2012, Carvalho et al. 2013, Lima et al. 2013, Veras et al. 2013), influenciado por diferentes fatores.

Devido ao desenvolvimento de resistência microbiana e parasitária aos fármacos sintéticos, óleo essencial de *L. sidoides* vem sendo amplamente pesquisado quanto ao seu potencial antibiótico, devido à necessidade de novas bases para essa finalidade que garantam eficiência no tratamento de infecções. Costa et al. (2011) verificaram que óleo de *L. sidoides* teve eficácia, em ensaio *in vitro*, no tratamento contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas de leite cru. Outros estudos (Fontenelle et al. 2007, Fabri et al. 2011, Fernandes et al. 2012) têm também descrito atividade antimicrobiana contra diversas bactérias e fungos, alguns resistentes às drogas sintéticas.

Gomes et al. (2012) relataram ação contra carrapatos *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus microplus*, de animais silvestres e domésticos, respectivamente. Também foi

comprovada bioatividade contra formas amastigotas e promastigotas do protozoário *Leishmania chagasi*, causador da leishmaniose visceral, conhecida popularmente como calazar, uma zoonose importante para a saúde pública (Oliveira et al. 2009, Farias-Junior et al. 2012, Rondon et al. 2012). Camurça-Vasconcelos et al. (2007) verificaram atividade antihelmíntica contra *Haemonchus contortus*, *Syphaciaob velata* e *Aspiculuris tetraptera*, parasitos que acometem pequenos ruminantes. Hashimoto et al. (2016) encontraram eficácia *in vitro* e *in vivo* de *L. sidoides* contra monogenoideas de *Oreochromis niloticus*. Portanto, tais resultados sugerem que *L. sidoides* pode ter efeitos no tratamento contra protozoários e helmintos monogenoideas das brânquias de tambaqui, mas isso não foi ainda investigado.

2. PROBLEMAS

- Qual o potencial bioativo e importância das espécies de *Lippia* sp. na medicina veterinária e aquicultura?
- Óleos essenciais de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. organoides* possuem atividade contra parasitos das brânquias de *C. macropomum*? As concentrações terapêuticas usadas podem causar alterações fisiológicas adversas?
- Há diferença na atividade antiparasitária entre óleo essencial de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. organoides*?

3. HIPÓTESES

- Espécies de *Lippia* sp. têm potencial bioativo para uso na medicina veterinária e aquicultura, uma vez que possuem efeitos terapêuticos em diversos animais.
- Óleos essenciais de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. organoides* possuem atividade contra parasitos das brânquias de tambaqui, devido à ação anti-protozoário e anti-helmíntica de seus constituintes majoritários.
- Concentrações clínicas de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. organoides* não apresentam efeitos hematológicos e histopatológico indesejáveis, pois são produtos naturais de baixa toxicidade.
- Há diferença na atividade antiparasitária de óleo essencial de *L. alba*, *L. sidoides* ou *L. organoides*, devido às variações nas concentrações de seus constituintes majoritários.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade do óleo essencial de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* contra parasitos das brânquias de *C. macropomum*, bem como conhecer o potencial bioativo de *Lippia* spp. na medicina veterinária e aquicultura.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar revisão bibliográfica sobre a ação de espécies de *Lippia* sp. usadas na medicina veterinária e aquicultura.
- Avaliar concentrações *in vitro* de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* quanto à eficácia contra *I. multifiliis* (Protozoa), *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri* (Monogenoidea) das brânquias de tambaqui.
- Determinar o tempo de exposição e as concentrações de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* com eficácia para banhos terapêuticos contra *I. multifiliis* (Protozoa), *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri* (Monogenoidea) de tambaqui.
- Investigar no tecido branquial de tambaqui possíveis alterações histopatológicas causadas pelos banhos terapêuticos com diferentes concentrações de óleos essenciais de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides*.
- Estudar os efeitos sanguíneos das concentrações de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* usadas nos banhos terapêuticos de tambaqui.
- Em caso de comprovação de eficácia, indicar a melhor concentração e espécie de *Lippia* para tratamento contra monogenoideas e protozoários de tambaqui.

5. REFERÊNCIAS

- Almeida, F. M., C. A. Colombo, e W. J. Siqueira. 2012. Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* químiótipo linalol em função de duas épocas de colheita. Páginas 1-6. In: 6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, Jaguariúna, SP, Brasil.
- Azambuja, C. R., J. Mattiazzi, A. P. K. Riffel, I. A. Finamor, L. O. Garcia, C. G. Heldwein, B. M. Heinzmann, B. Baldisserotto, M. A. Pavanato e S. F. Llesuy. 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture* **319**: 156-161.
- Barreto, H. M., F. C. Fontinele, A. P. Oliveira, D. D. R. Arcanjo, B. H. C. Santos, A. P. L. Abreu, H. D. M. Coutinho, R. A. C. Silva, T. O. Sousa, M. G. F. Medeiros, A. M. G. L. Citó e J. A. D. Lopes. 2014. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity *in vitro* by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, ID 305610, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/305610>.
- Barros, L. A., A. R. Yamanaka, L. E. Silva, M. L. A. Vanzeler, D. T. Braum e J. Bonaldo. 2009. *In vitro* larvicidal activity of geraniol and citronellal against *Contraecaecum* sp (Nematoda: Anisakidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **42**(10): 918-920.
- Becker, A. G., T. V. Parodi, C. G. Heldwein, C. C. Zeppenfeld, B. M. Heinzmann e B. Baldisserotto. 2012. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**: 789-796.
- Békési, L. 1992. Evaluation of data on ichthyopathological analyses in the Brazilian northeast. *Ciência e Cultura* **44**: 400-403.
- Belmont-Jégu, E., M. V. Domingues e M. L. Martins. 2004. *Notozothecium janauachnsis* n. sp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) from wild and cultured tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae) in Brazil. *Zootaxa* **736**: 1-8.
- Beneton, M. L. F. N. e J. C. O. Malta. 1999. Morfologia dos estágios de náuplios e copepodito de *Perulernaea gamitanae* Thatcher & Paredes, 1985 (Crustacea: Cyclopoida: Lernaídade), parasita do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), (Osteichthyes: Characidae), cultivados em laboratório. *Acta Amazonica* **29**(1): 97-121.
- Betancourt, L., V. Phandanouvong, R. Patiño, C. Ariza-Neto e G. Afanador-Téllez. 2012. Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. *Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia* **59**(1): 21-31.
- Bezerra, F. N. R., R. R. Rolim, H. R. Santos, C. A. Marco, J. V. Feitosa e A. N. L. Costa. 2011. Rendimento do óleo essencial de cidreira brava (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. em diferentes horários de corte. *Cadernos de Agroecologia* **6**(2): 1-5.

Boscolo, W. R., A. Feiden, D. H. Neu e F. Dieterich. 2012. Sistema orgânico de produção de pescado de água doce. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* **13**(2): 578-590.

BRASIL. Instrução normativa interministerial n° 28, de 8 de junho de 2011. Estabelece normas técnicas para os sistemas orgânicos de produção aquícola a serem seguidos por toda pessoa física ou jurídica responsável por unidades de produção em conversão ou por sistemas orgânicos de produção. Disponível em: http://www.ibd.com.br/Media/arquivo_digital/e78177c8-62d5-4630-987d-d971d384a7e3.pdf Acesso em: 25 jun. 2013.

Briskin, D. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology* **124**: 507-514.

Calsamiglia, S., M. Busquet, P. Cardozo, L. Castillejos e A. Ferret. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* **90**: 2580–2595.

Camêlo, L. C. A., A. F. Blank, P. A. D. Ehlert, C. R. D. Carvalho, M. F. Arrigoni-Blank e J. Mattos. 2011. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. *Scientia Plena* **7**(5): 1-8.

Camurça-Vasconcelos, A. L. F., C. M. L. Bevilaqua, S. M. Morais, M. V. Maciel, C. T. C. Costa, I. T. F. Macedo e L. M. B. Oliveira. 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology* **148**: 288-294.

Camurça-Vasconcelos, A. L. F. 2006. Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. 83 p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual do Ceará/UECE, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Carvalho, R. R. C., D. Laranjeira, J. L. S. Carvalho-Filho, P. E. Souza, A. F. Blank, P. B. Alves, H. C. R. Jesus e D. R. N. Warwick. 2013. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. *Química Nova* **36**(2): 241-244.

Cavalcanti, S. C. H., E. S. Niculau, A. F. Blank, C. A. G. Câmara, I. N. Araújo e P. B. Alves. 2010. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spidermite (*Tetranychus urticae* Koch). *Bioresource Technology* **101**: 829–832.

Ceccarelli, P. S., L. B. Figueira, C. L. B. Ferraz Lima e C. A. Oliveira. 1990. Observações sobre a ocorrência de parasitos no CEPTA entre 1983 e 1990. *Boletim Técnico do CEPTA* **3**: 43–55.

Chagas, A. C. S. 2004. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **13**(1): 156-160.

Cohen, S. C. e A. Kohn. 2005. A new species of *Mymarothecium* and new host and geographical records for *M. viatorum* (Monogenea: *Dactylogyridae*), parasites of freshwater fishes in Brazil. *Folia Parasitologica* **52**: 307-310.

- Claudiano, G. S., J. Dias Neto, R. Sakabe, C. Cruz, R. Salvador e F. Pilarski. 2009. Eficácia do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* **10**(3): 625-636.
- Costa, J. P. R., A. C. Almeida, E. R. Martins, M. N. Rodrigues, C. A. Santos e I. R. Menezes. 2011. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. *Biotemas* **24**(4): 1-6.
- Cunha, M. A., F. M. C. Barros, L. O. Garcia, A. P. L. Veeck, B. M. Heinzmann, V. L. Loro, T. Emanuelli e B. Baldisserotto. 2010. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* **306**: 403-406.
- Cunha, M. A., B. F. Silva, F. A. C. Delunardo, S. C. Benovit, L. C. Gomes, B. M. Heinzmann e B. Baldisserotto. 2011. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology* **9**(3): 683-688.
- Ehlert, P. A. D., L. C. Ming, M. O. M. Marques, D. M. Fernandes, W. A. Rocha, J. M. Q. Luz e R. F. 2013. Silva Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **15**(1): 72-77.
- Ekanem, A. P., A. Obiekezie, W. Kloas e K. Knopf. 2004. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research* **92**: 361-366.
- Escobar, P., S. M. Leal, L. V. Herrera, J. R. Martinez e E. Stashenko. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **105**(6): 184-190.
- Fabri, R. L., M. S. Nogueira, J. R. Moreira, M. L. M. Bouzada e E. Scio. 2011. Identification of antioxidante and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *Journal of Medicinal Food* **14**: 840-846.
- Farias-Junior, P. A., M. C. Rios, T. A. Moura, R. P. Almeida, P. B. Alves, A. F. Blank, R. P. M. Fernandes e R. Scher. 2012. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biology Research* **45**: 399-402.
- Fernandes, L. P., R. C. Candido e W. Oliveira. 2012. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. *Food and Bioproducts Processing* **90**: 425-432.
- Fontenelle, R. O. S. 2009. Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida* spp. isolados de cães. 150 p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual do Ceará/UECE, Fortaleza, Ceará, Brasil.

- Fontenelle, R. O. S., S. M. Morais, E. H. S. Brito, M. R. Kerntopf, R. S. N. Brilhante, R. A. Cordeiro, A. R. Tomé, M. G. R. Queiroz, N. R. F. Nascimento, J. J. C. Sidrim e M. F. G. Rocha. 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 934-940.
- Fujimoto, R. Y., H. C. Costa, F. M. Ramos. 2012. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax* cf. *zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Curcubita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* **32**(1): 5-10.
- Gama, E. V. G., M. S. Garrido, F. Silva, A. C. F. Soares e C. T. S. Marques. 2012. Produção de biomassa de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.] sob adubação com composto de capim elefante inoculado e sem inoculação de actinomicetos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **14**: 163-168.
- Gomes, G. A., C. M. O. Monteiro, T. O. S. Senra, V. Zeringota, F. Calmon, R. S. Matos, E. Daemon, R. W. S. Gois, G. M. P. Santiago e M. G. Carvalho. 2012. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, **111**: 2423-2430.
- Gomes, L. C., E. C. Chagas, H. Martins-Junior, R. Roubach, E. A. Ono e J. N. P. Lourenço. 2006. Cage culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a central Amazon floodplain lake. *Aquaculture* **253**: 374-384.
- Goulding, M. e M. L. Carvalho. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): na important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia* **1**(2):107-133.
- Harikrishnan, R., C. Balasundaram e M. Heo. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* **317**: 1-15.
- Hashimoto, D. T., J. A. Senhorini, F. Foresti e F. Porto-Foresti. 2012. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. *Reviews in Aquaculture* **4**: 108-118.
- Hashimoto, G. S. O., F. M. Neto, M. L. Ruiz, M. Achille, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves e M. L. Martins. 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of *Nile tilápia*. *Aquaculture* **450**: 182-186.
- Hatano, V. Y., A. S. Torricelli, A. C. C. Giassi, L. A. Coslope e M. B. Viana. 2012. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **45** (3): 179-290.
- Heldwein, C. G., L. L. Silva, P. Reckziegel, F. M. C. Barros, M. E. Bürger, B. Baldisserotto, C. A. Mallmann, D. Schmidt, B. O. Caron, B. M. Heinzmann. 2012. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **45**(5): 376-472.

- Horn, H. H., S. B. Correa, P. Parolin, B. J. A. Pollux, J. T. Anderson, C. Lucas, P. Widmann, A. Tiju, M. Galetti, M. Goulding. 2011. Seed dispersal by fishes in tropical and temperate fresh waters: The growing evidence. *Acta Oecologica* **37**: 561-577.
- Jannuzzi, H., J. K. A. Mattos, D. B. Silva, L. A. M. Gracindo e R. F. Vieira. 2011. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **13**(3): 258-264.
- Jesus, H. C. R., D. A. Santos, P. B. Alves, E. M. O. Cruz, A. F. Blank. 2006. Composição química do óleo essencial de três espécies do gênero *Lippia* cultivadas em Sergipe. IN: 33º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- Kohn, A., B. M. M. Fernandes, B. Macedo, B. Abramson. 1985. Helminths parasites of freshwater fishes from Pirassununga, SP, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **80**(3): 327-336.
- Lima, G. P. G., T. M. Souza, G. P. Freire, D. F. Farias, A. P. Cunha, N. M. P. S. Ricardo, S. M. Morais e A. F. U. Carvalho. 2013. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *Parasitology Research* **122**(5): 1953-1958.
- Lima, M. S. 2005. Os fluxos de conhecimentos na piscicultura do estado do Amazonas: uma análise da trajetória e das condições institucionais. *ConTexto* **5**(8): 1-20.
- Lopera-Barrero, N. M., R. P. Ribeiro, J. A. Povh, L. D. M. Vargas, A. R. Poveda Parra e M. Digmayer. 2011. As Principais Espécies Produzidas No Brasil, In: Lopera-Barrero, N. M., R. P. Ribeiro, J. A. Povh, L. D. M. Vargas, A. R. Poveda-Parra e M. Digmayer. Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo. *Agrolivros* 143-215.
- Maciel, P. O., E. G. Affonso, C. L. Boijink, M. Tavares-Dias e L. A. K. A. Inoue. 2011. *Myxobolus* sp. (Myxozoa) in the circulating blood of *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Characidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **20**(1): 82-84.
- Malta, J. C. O e A. M. B. Varella. 2000. *Argulus chicomendesi* sp. n. (Crustacea: *Argulidae*) parasita de peixes da Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica* **30**: 481-498.
- Martins, M. L., F. R. Moraes, D. M. Y. Miyazaki, C. D. Brum, E. M. Anaka, J. Fenerick Jr. e F. R. Bozzo. 2002. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylodyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haematological effects. *Parasite* **9**: 175-180.
- Martins, M. L. e N. G. Romero. 1996. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial em peces cultivados: Estudio parasitológico e histopatológico. *Revista Brasileira de Zoologia* **13**: 489-500.

- Martins, M. L., F. R. Moraes, R. Y. Fujimoto, E. M. Onaka, D. T. Nomura, C. A. H. Silva e S. H. C. Schalch. 2000. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes a survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **9**: 23-28.
- Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura, Brasília (DF) 2010, p.129.
- Molnar, K. e L. Bekesi. 1993. Description of a new *Myxobolus* species, *M. colossomatis* n. sp. From the teleost *Colossoma macropomum* of the Amazon River basin. *Journal of Applied Ichthyology* **9**(1): 57-63.
- Morais, S. R., T. L. S. Oliveira, M. T. F. Bara, E. C. Conceição, M. H. Rezende, P. H. Ferri e J. R. Paula. 2012. Chemical Constituents of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) Leaves Cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. *International Journal of Analytical Chemistry* doi: 10.1155/2012/363919.
- Mota, M. L., L. T. C. Lobo, J. G. M. Costa, L. S. Costa, H. A. O. Rocha, L. F. R. Silva, A. M. Pohlit e V. F. A. Andrade-Neto. 2012. *In Vitro* and *In Vivo* Antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in Northeastern Brazil. *Planta Medica* **78**: 658-664.
- Nagao, E. O., R. Innecco, S. H. Mattos e C. A. Marco. 2005. Influência do período de secagem nas estações seca e chuvosa no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br., nas condições do Ceará. *Revista Ciência Agronômica* **36**(1): 53-59.
- Nogueira, M. A., G. Diaz e L. Sakumo. 2007. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **28**(3): 273-278.
- Oliveira, V. C. S., D. M. S. Moura, J. A. D. Lopes, P. P. Andrade, N. H. Silva e C. B. Q. Figueiredo. 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitology Research* **104**: 1053-1059.
- Oliveira, D. R., G. G. Leitão, H. R. Bizzo, D. Lopes, D. S. Alviano, C. S. Alviano, S. G. Leitão. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H. B. K. *Food Chemistry* **101**: 236-240.
- Osoria, R. A. F. 2003. Evaluación de extractos de plantas medicinales con actividad antiparasitaria. IN: II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, p. 358-370.
- Ospina, D. I., V. Álvarez, H. G. Torres, M. S. Sánchez e C. R. Bonilla. 2011. Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Acta Agronómica* **60**(4): 306-311.

- Pandeló, D., T. D. Melo, J. L. Singulani, F. A. F. Guedes, M. A. Machado, C. M. Coelho, L. F. Viccini e M. O. Santos. 2012. Oil production at different stages of leaf development in *Lippia alba*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **22**(3): 497-501.
- Parodi, T. V., M. A. Cunha, C. G. Heldwein, D. M. Souza, A. C. Martins, L. O. Garcia, W. Wasielesky Junior, J. M. Monserrat, D. Schimidt, B. O. Caron, B. Heinzmann e B. Baldisserotto. 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)* **155**: 462-468.
- Pereira, W. L. A., A. J. S. Souza, A. M., Gabriel, A. M. C. Cardoso, S. G. B. Monger, I. C. A. Seligmann, A. C. A. Pereira e D. K. S. Queiroz. 2012. Branchiomycosis in tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier), from the eastern Brazilian Amazon. *Journal of Fish Diseases* **35**: 615-617.
- Rondon, F. C. M., C. M. L. Bevilaqua, M. P. Accioly, S. M. Morais, H. F. Andrade-Júnior, C. A. Carvalho, J. C. Lima e H. C. R. Magalhães. 2012. *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **21**(3): 185-191.
- Santos, E. F., M. Tavares-Dias, D. A. Pinheiro, L. R. Neves, R. G. B. Marinho e M. K. R. Dias. 2013. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanques-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. *Acta Amazonica* **43**(1): 107-114.
- Santos, G. M. e A. C. M. Santos. 2005. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. *Estudos Avançados* **19**: 165-182.
- Schalch, S. H. C. e F. R. Moraes. 2005. Distribuição sazonal de parasitos branquiais em diferentes espécies de peixes em pesque-pague do município de Guariba-SP, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **14**: 141-146.
- Silva, N. A., F. F. Oliveira, L. C. B. Costa, H. R. Bizzo e R. A. Oliveira. 2006. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **8**(3): 52-55.
- Soares, B. V. e M. Tavares-Dias. 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia* **3**(1): 109-123.
- Sonoda, D. Y., S. K. Campos, J. E. Cyrino e R. Shirota. 2012. Demand for fisheries products in Brazil. *Scientia Agricola* **69**(5), 313-319.
- Tavares, I. B., V. G. Momenté e I. R. Nascimento. 2011. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias* **4**(1): 204-220.
- Tavares-Dias, M., C. S. O. Araujo, S. M. A. Porto, G. M. Viana e P. C. Monteiro. 2013. Sanidade do Tambaqui *Colossoma macropomum* nas fases de larvicultura e alevinagem.

Macapá: Embrapa Amapá, Manaus: Universidade Nilton Lins, Instituto de Pesquisa da Amazônia, 42p. Brasil.

Tavares-Dias, M., L. R. Neves, E. F. Santos, M. K. R. Dias, R. G. B. Marinho e E. A. Ono. 2011. *Perulernaea gamitanae* (Copepoda: Lernaeidae) parasitizing tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characidae) and the hybrids tambacu and tambatinga, cultured in northern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia* **63**(4): 988-995.

Tavares-Dias, M, J. R. G. Lemos, S. M. S. Andrade e S. L. Aquino-Pereira. 2006. Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) cultivados em estação de piscicultura na Amazônia Central. In: IV Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura.

Tipu, M. A., M. S. Akhtar, M. I. Anjum e M. L. Raja. 2006. New dimension of medicinal plants as animal feed. *Pakistan Veterinary Journal* **26**(3): 144-148.

Tóro, R. M., A. A. F. Gessner, N. A. J. C. Furtado, P. S. Ceccarelli, S. Albuquerque e J. K. Bastos. 2003. Activity of the *Pinus elliottii* resin compounds against *Lernaea cyprinacea* *in vitro*. *Veterinary Parasitology* **118**: 143-149.

Varella, A. M. B., S. N. Peiro e J. C. O. Malta. 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae) cultivado em tanques-rede em um lago de várzea na Amazônia, Brasil. Simpósio brasileiro de Aquicultura: Goiânia/GO Brasil. Associação Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática (AQUABIO), p. 95-106.

Veeck, A. P. L., B. Klein, L. F. Ferreira, A. G. Becker, C. G. Heldwein, B. M. Heinzmann, B. Baldisseroto e T. Emanuelli. 2013. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**: 955-960.

Veras, H. N. H., M. K. A. Araruna, J. G. M. Costa, H. D. M. Coutinho, M. R. Kerntopf, M. A. Botelho e I. R. A. Menezes. 2013. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. *Phytotherapy Research* **27**: 179-185.

Vieira, M., M. Velasco, C. S. Malcher, P. Santos, P. Matos, P. Matos. 2016. An outbreak of myxozoan parasites in farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon region, Brazil. *Aquaculture Reports* **3**: 31-34.

Vieira, E. F., V. J. Isaac e N. N. Fabr e. 1999. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae) no baixo Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* **29**(4): 625-638.

Vilem, R., C. R. Del Carratore e J. H. Machado. 1998. Eficácia do tratamento terapêutico com Dimetil-parathion e asc culas de *Pinus* (*Pinnus elliot*) em peixes acometidos por lerneoses (*Lerneae* sp.). 2: 689-695. In: Anais do Aquicultura Brasil 98, Recife, Pernambuco, Brasil.

Zoghbi, M. G. B., E. H. A. Andrade, A. S. Santos, M. H. L. Silva e J. G. S. Maia. 1998. Essential Oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br Growing Wild in the Brazilian Amazon. Flavour And Fragrance Journal **13**: 47-48.

ARTIGO 1 (Anexo 1)

Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura

Artigo publicado no periódico “Biota Amazônia” (ISSN 2179-5746)
Volume 3, Número 1, Pág 109-123, Ano: 2013.

Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura

Bruna Viana Soares¹, Marcos Tavares-Dias^{2*}

¹Bacharel em Medicina Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). E-mail: drbrunasoares@yahoo.com.br

²Biólogo, Doutor em Aquicultura de Águas Continentais, Pesquisador da Embrapa Amapá, Macapá, Estado do Amapá. E-mail: marcos.tavares@embrapa.br

* Autor para correspondência: Marcos Tavares-Dias

Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, N° 2600, 68903-419, Macapá, AP, Brasil. E-mails: marcos.tavares@embrapa.br; mtavaresdias@pq.cnpq

Resumo

As espécies de plantas do gênero *Lippia* Linn., pertencentes à família Verbenaceae, possuem grande distribuição geográfica e são facilmente encontradas em países tropicais. No Brasil, ocorrem principalmente a *Lippia alba* Mill.) N. E. Brown, *Lippia gracilis* Schauer, *Lippia grandis* Schau, *Lippia origanoides* Kunth, *Lippia sidoides* Cham. e *Lippia triplinervis* Gardner. Há muito tempo, diversas espécies de *Lippia* são usadas na medicina popular por suas atividades biológicas e terapêuticas. Por isso, diferentes espécies dessas plantas vêm sendo testadas, devido ao potencial bioativo, para o tratamento de diferentes doenças do homem e animais. O objetivo deste estudo foi concatenar e discutir dados da literatura sobre o uso de *Lippia* spp. na medicina veterinária e aquicultura. Os constituintes majoritários dessas plantas são o timol, carvacrol, geranial, linalol, p-cimeno, carvona, neral, limoneno, β -cariofileno, óxido cariofileno, mirceno e γ -terpineno. Porém, as concentrações de tais constituintes podem variar em função de diversos fatores aqui discutidos. Estudos *in vivo* e *in vitro* usando principalmente *L. alba*, *L. sidoides*, *L. gracilis*, *L. origanoides* e *L. gracilis* comprovaram atividade antimicrobiana, antiparasitária, antiinflamatória, analgésica, anestésica e antitumoral em animais, indicando grande potencial dessas espécies para uso na medicina veterinária. Algumas espécies de *Lippia* estão sendo utilizadas também na aquicultura. Assim, produtos obtidos dessas plantas são recursos promissores, necessitando de estudos para desenvolvimento de tecnologias que possibilitem seu uso na sanidade e produção animal.

Palavras-chave: Produto natural, óleo essencial, parasitos, tratamento.

Introdução

O gênero *Lippia* Linn. (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e árvores de pequeno e porte distribuídas principalmente na América Central, regiões tropicais da África, América do Norte, América do Sul e Austrália (MUNIR, 1993; SILVA et al., 2006; PASCUAL et al., 2001; GOMES et al., 2011). Os principais centros de diversidade específica das espécies de *Lippia* estão localizados no México e Brasil. No Brasil, essas encontram-se na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. De forma que, aproximadamente, 120 espécies estão distribuídas no Cerrado e Caatinga (OLIVEIRA et al., 2007; GOMES et al., 2011), dois importantes biomas brasileiros.

Extratos e óleos essenciais obtidos de *Lippia* spp. têm sido amplamente testados cientificamente, devido ao potencial dos princípios bioativos. Na medicina popular, espécies dessas plantas têm sido usadas no tratamento de resfriados, bronquite e tosse (GOMES et al., 2011), bem como relaxante muscular. Estudos em diversas áreas do conhecimento vêm confirmando tais atividades terapêuticas propaladas na medicina popular. Por exemplo, foi demonstrada atividade bacteriana em gengivite e placa dentária com uso de óleo essencial de *Lippia sidoides* (LOBO et al., 2011; PEREIRA et al., 2013), bem como atividade antifúngica obtida também do seu extrato etanólico contra cepas resistentes de *Candida* spp., quando isoladas de secreções vaginais de mulheres (FARIAS et al., 2012).

Os óleos essenciais pertencem ao metabolismo secundário das plantas e constituem um dos mais importantes grupos de matéria prima para a indústria alimentícia, farmacêutica, perfumaria e afins. São misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídas, em sua maioria, por moléculas de natureza terpênic (MORAIS, 2009) e de outras propriedades químicas (GOMES et al., 2011). Consequentemente, podem ser obtidos diferentes constituintes químicos de óleos essenciais extraídos de diferentes *Lippia* spp. (SILVA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2007; ESCOBAR et al., 2010; HATANO et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2012; PANDELÓ et al., 2012). As análises químicas dos extratos dessas plantas são fundamentais, pois as concentrações desses constituintes podem variar consideravelmente para uma mesma espécie (FARIAS-JUNIOR et al., 2012; MORAIS et al., 2012), devido a diversos fatores.

Óleo essencial de *L. sidoides* tem demonstrado propriedades de interesse epidemiológico, tais como a atividade inseticida contra *Aedes aegypti* (CARVALHO et al., 2003; LIMA et al., 2013) e contra *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*, agentes causadores da malária (MOTA et al., 2012). Similarmente, extrato de *L. multiflora* apresenta atividade anti-malária (AJAIYEGBA et al., 2006) e antimicrobiana (KUNLE et al., 2003). Produtos bioativos de *Lippia* spp. são também usados para eliminar fitopatógenos (CAVALCANTI et al., 2010; CARVALHO et al., 2013), fungos e insetos que afetam alimentos estocados (KHANI et al., 2012; PORTILLO-RUIZ et al., 2012).

Óleos essenciais de *Lippia alba*, *L. alba* f. *intermedia* (OLIVEIRA et al., 2006), *L. origanoides* (OLIVEIRA et al., 2007) e *L. citriodora* (ANSARI et al., 2012) também mostraram atividade contra *Staphylococcus aureus*, bactérias resistentes e causadora de graves infecções hospitalares. A atividade antifúngica de óleo essencial de *L. berlandieri*

contra *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* spp., fungos de produtos de panificação foi relatada por Portillo-Ruiz et al. (2012). Estudos *in vitro* avaliando os efeitos de extratos de folhas de *L. nodiflora*, em células cancerosas do pulmão do homem, demonstraram capacidade antiproliferativa contra linhagem de células testada, além da indução de apoptose (VANAJOTHI et al., 2012). Portanto, tais estudos indicam o potencial terapêutico de espécies de *Lippia*.

O uso de produtos naturais vem ganhando destaque na sanidade animal, pois podem ser fontes promissoras de substâncias biotivas contra parasitos e microrganismos. Além disso, tais produtos não são prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do homem, no que refere-se aos resíduos farmacológicos presentes nos alimentos de origem animal. Por isso, espécies de *Lippia* vêm sendo exploradas também na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu uso potencial e facilidade de produção agrônômica em escala. Como tais informações relevantes encontram-se dispersas na literatura, o objetivo deste estudo foi concatenar e discutir o uso de *Lippia* spp. na medicina veterinária e aquicultura. Assim, foram utilizadas referências bibliográficas baseadas em teses, artigos e anais completos em eventos científicos, todos disponíveis nos Periódicos Capes, Scielo, Google Acadêmico, Web of Knowledge e bibliotecas digitais das universidades, publicados no período de 1993 a 2013.

Constituição química dos óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia*

Em geral, geranial (= citral, ou 3,7-dimetil-2,6-octadienal ou lemonal), carvona, carvacrol (= cimofenol) e timol são os constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Lippia* spp. Há uma variação no teor e composição química dos óleos essenciais de diferentes espécies, no que refere-se aos constituintes majoritários (Tabela 1). Tais variações nos constituintes majoritários do óleo essencial, para uma mesma espécie, são decorrentes da parte da planta utilizada para extração, processo de extração e colheita de *Lippia* spp., ambiente e solo diferenciados (ZOGHBI et al., 1998; SILVA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2007; ESCOBAR et al., 2010; JANNUZZI et al., 2011; BITU et al., 2012), além de outros fatores.

Carvona e geranial são terpenóides, enquanto carvacrol é um monoterpeno e timol um terpeno, mas todos têm propriedades odoríferas diferentes. Além de tais compostos voláteis, outras substâncias tais como alcalóides, taninos, flavonóides, iridóides e

naftoquinonas podem ser encontradas também nos extratos. Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre as espécies de *Lippia*, mas com relativa frequência em espécies desse gênero. Os iridóides glicosilados são outros componentes em espécies de plantas desse gênero, enquanto as naftoquinonas são menos frequentes em *Lippia* spp. (GOMES et al., 2011). Porém, tais constituintes desempenham funções diferenciadas.

TABELA 1. Constituintes majoritários de óleos essenciais de diferentes espécies de *Lippia*, localidades de cultivo e partes das plantas usadas para extração do produto. NI: Não informado.

Espécies de Planta	Estrutura usada	Constituintes majoritários (% relativo)			Localidade	Referências
		Primeiro	Segundo	Terceiro		
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Geranial (20,7)	Neral (16,4)	Mirceno (15,0)	Oriximiná, PA (Brasil)	OLIVEIRA et al. (2006)
<i>L. alba</i>	Folhas secas	Geranial (41,16)	Neral (26,64)	Limoneno (14,04)	São Cristóvão, SE (Brasil)	JESUS et al. (2006)
<i>L. alba</i>	Folhas frescas	<i>trans</i> -dihidrocarvona (61,3)	β -cariofileno (7,4)	Neral (6,0)	Cascavel, PR (Brasil)	NOGUEIRA et al. (2007)
<i>L. alba</i>	Folhas frescas	<i>trans</i> -dihidrocarvona (52,2)	Geranial (7,8)	Neral (7,2)	Cascavel, PR (Brasil)	NOGUEIRA et al. (2007)
<i>L. alba</i>	Folhas frescas	Geranial (38,0)	Neral (24,0)	β -cariofileno (22,0)	Cascavel, PR (Brasil)	NOGUEIRA et al. (2007)
<i>L. alba</i>	Folhas frescas	Geranial (34,0)	Neral (20,0)	Mirtenol (11,2)	Cascavel, PR (Brasil)	NOGUEIRA et al. (2007)
<i>L. alba</i>	Folhas frescas	Geranial (46,9)	Neral (32,1)	Geraniol (2,0)	Ilhéus, BA (Brasil)	SILVA et al. (2006)
<i>L. alba</i>	Folhas frescas	Geranial (39,9)	Neral (30,7)	6-metil-5-hepten-2-ona (3,1)	Ilhéus, BA (Brasil)	SILVA et al. (2006)
<i>L. alba</i>	Folhas frescas	Geranial (43,7)	Neral (32,9)	Geraniol (3,3)	Ilhéus, BA (Brasil)	SILVA et al. (2006)
<i>L. alba</i>	Folhas frescas	Geranial (46,3)	Neral (32,1)	Geraniol (2,9)	Ilhéus, BA (Brasil)	SILVA et al. (2006)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Carvona (31,8)	Limoneno (29,0)	Biciclosesquifelandreno (11,3)	Santander e Bucaramanga (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Carvona (49,4)	Limoneno (31,9)	Piperitenona (5,1)	Boyacá e Cubará (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Carvona (49,6)	Limoneno (25,8)	Piperitenona (6,1)	Santander e Bucaramanga (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Carvona (47,6)	Limoneno (10,8)	Piperitenona (5,1)	Cundinamarca e Cachipai (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Carvona (52,6)	Limoneno (18,2)	Piperitenona (4,6)	Cundinamarca, Cachipai (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Carvona (48,3)	Limoneno (19,1)	Biciclosesquifelandreno (9,3)	Tolima e Flandes (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Geranial (28,9)	Neral (21,5)	Trans- β -cariofileno (7,3)	Bolívar e Colorado (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Geranial (23,3)	Neral (19,5)	Geraniol (11,9)	Santander e Bucaramanga (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Geranial (26,7)	Neral (26,7)	Geraniol (5,5)	Bolívar e Turbaco (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i>	Folhas	Linalol (59,66)	1,8-cineole (9,11)	Germacrene D (3,78)	RS (Brasil)	HELWEIN et al. (2012)

TABELA 1. Continuação...

<i>L. alba</i>	Folhas frescas	Linalol (37,47)	1,8-cineole (8,59)	Camphor (6,87)	RS (Brasil)	CUNHA et al. (2010), apud HELWEIN et al. (2012)
<i>L. alba</i>	Folhas	Neral (44,72)	Geranial (23,10)	Limoneno (11,89)	NI	PANDELÓ et al. (2012)
<i>L. alba</i>	Folhas	(S)-(+)-carvona (60,07)	Limoneno (14,22)	Linalol (6,12)	NI	PANDELÓ et al. (2012)
<i>L. alba</i>	Folhas	Linalol (57,71)	Eucaliptol (10,14)	Geranial (4,89)	NI	PANDELÓ et al. (2012)
<i>L. alba</i>	Folhas	Carvona (54,57)	Limoneno (23,13)	Alpha-muroleno (4,84)	CE (Brasil)	HATANO et al. (2012)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Linalol (62,6)	Eucaliptol (5,9)	Germacreno D (3,9)	São Luiz Gonzaga, RS (Brasil)	VEECK et al. (2012)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	1,8-Cineole (34,9)	Limoneno (18,4)	Carvona (8,6)	Santa Maria, PA (Brasil)	ZOGHBI et al. (1998)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Limoneno (32,1)	Carvona (31,8)	Germacreno D (21,0)	Belterra, PA (Brasil)	ZOGHBI et al. (1998)
<i>L. alba</i>	Partes aéreas	Germacreno D (25,4)	Geranial (22,5)	Neral (13,7)	Chaves, PA (Brasil)	ZOGHBI et al. (1998)
<i>L. alba</i>	Folhas secas	Geranial (28,71 a 42,96)	Neral (32,17 a 22,52)	Limoneno (19,94 a 0,0)	DF (Brasil)	JANNUZZI et al. (2011)
<i>L. alba</i>	Folhas secas	Geranial (36,92)	Neral (28,44)	Mirceno (7,69)	Formosa, GO (Brasil)	JANNUZZI et al. (2011)
<i>L. alba</i>	Folhas secas	Geranial (34,92)	Neral (26,87)	Linalol (4,92)	Recife, PE (Brasil)	JANNUZZI et al. (2011)
<i>L. alba</i>	Folhas secas	Geranial (29,05)	Neral (22,68)	Limoneno (9,2)	Rio de Janeiro, RJ (Brasil)	JANNUZZI et al. (2011)
<i>L. alba</i>	Folhas secas	Geranial (39,63)	Neral (29,6)	Óxido cariofileno (7,38)	Santa Maria da Vitória, BA (Brasil)	JANNUZZI et al. (2011)
<i>L. alba</i>	Folhas secas	Geranial (40,1)	Neral (30,97)	Mirceno (3,9)	Curitiba, PR (Brasil)	JANNUZZI et al. (2011)
<i>L. alba</i>	Folhas secas	Geranial (29,18)	Neral (22,7)	Mirceno (14,42)	Viçosa, MG (Brasil)	JANNUZZI et al. (2011)
<i>L. alba f. intermedia</i>	Partes aéreas	Geranial (12,9)	Neral (9,2)	Nerol (9,7)	Oriximiná, PA (Brasil)	OLIVEIRA et al. (2006)
<i>L. citriodora</i>	Partes aéreas	Geranial (17,5)	Neral (15,0)	Limoneno (8,4)	Antioquia, Rio negro (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. citriodora</i>	Folhas secas	Citral (11,32)	Limoneno (10,6)	Neral (7,86)	Iranshahr (Irã)	KHANI et al. (2012)
<i>L. citriodora</i>	Partes aéreas	Geranial (18,9)	Neral (15,6)	Limoneno (10,7)	Quindío e Armenia (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. dulcis</i>	Partes aéreas	Trans- β -cariofileno (10,4)	δ -cadineno (8,8)	α -copaeno (8,4)	Santander e Bucaramanga (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. gracilis</i>	Folhas secas	Carvacrol (36,73)	ρ -cimeno (20,05)	γ -terpineno (13,09)	São Cristóvão, SE (Brasil)	JESUS et al. (2006)
<i>L. gracilis</i>	Folhas secas	Timol (24,08 a 32- 68)	ρ -cimeno (15,91 a 17,82)	Metil timol (10,83 a 11,18)	São Cristóvão, SE (Brasil)	MENDES et al. (2010)
<i>L. gracilis</i>	Folhas secas	Timol (59,26)	β -cariofileno (8,57)	Metil timol (8,32)	Tomar do Geru, SE (Brasil)	CRUZ et al. (2013)
<i>L. gracilis</i>	Folhas secas	Carvacrol (47,10)	ρ -cimeno (11,75)	γ -terpineno (8,81)	Tomar do Geru, SE (Brasil)	CRUZ et al. (2013)
<i>L. gracilis</i>	Folhas secas	Carvacrol (48,99)	ρ -cimeno (13,02)	γ -terpineno (8,55)	Tomar do Geru, SE (Brasil)	CRUZ et al. (2013)
<i>L. gracilis</i>	Folhas secas	Carvacrol (35,28)	γ -terpineno (21,11)	ρ -cimeno (13,74)	Rio Real, BA (Brasil)	CRUZ et al. (2013)

TABELA 1. Continuação...

<i>L. gracilis</i>	Folhas secas	Timol (21,3)	Carvacrol (20,85)	α -pineno (19,42)	Crato, CE (Brasil)	BITU et al. (2012)
<i>L. gracilis</i>	Folhas frescas	Timol (44,42)	Carvacrol (22,21)	ρ -cimeno (6,23)	Crato, CE (Brasil)	BITU et al. (2012)
<i>L. grandis</i>	Partes aéreas	Carvacrol (37,12)	ρ -cimeno (11,64)	Timol (7,83)	Santarém, PA (Brasil)	SARRAZIN et al. (2012)
<i>L. gracilis</i>	Folhas secas	Carvacrol (27,59)	Timol (18,0)	ρ -cimeno (16,24)	SE (Brasil)	CARVALHO et al. (2013)
<i>L. gracilis</i>	Folhas frescas	Timol (55,5)	ρ -cimeno (10,8)	Timol metil eter (10,53)	Poço Redondo, SE (Brasil)	FERRAZ et al. (2013)
<i>L. micromera</i>	Partes aéreas	Timol (29,1)	Timol metil eter (14,9)	ρ -cimeno (13,1)	Cesar e Manaure (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. multiflora</i>	NI	1,8-cineole (38,7 – 60,5)	Sabineno (16,9)	β -pineno (13,0)	Nigéria	FOLASHADE e OMOREGIE (2012)
<i>L. multiflora</i>	NI	1,8-cineole (43-47)	Timol (30,0-40,0)	Linalol (29,0)	Ghana	FOLASHADE e OMOREGIE (2012)
<i>L. multiflora</i>	NI	Ipsdienona (54,6)	Timol (41,9)	(E)- tagetona (30,2)	Países Africanos	FOLASHADE e OMOREGIE (2012)
<i>L. origanoides</i>	Partes aéreas	Timol (78,8)	ρ -cimeno (6,6)	γ -terpineno (2,7)	Alto Patía (Colômbia)	BETANCOURT et al. (2012)
<i>L. origanoides</i>	Partes aéreas	Carvacrol (46,2)	ρ -cimeno (12,0)	γ -terpineno (9,5)	Santander e Piedecuesta (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. origanoides</i>	Partes aéreas	Carvacrol (36,5)	ρ -cimeno (13,9)	γ -terpineno (13,2)	Santander e Jórdan Sube (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. origanoides</i>	Partes aéreas	ρ -cimeno (15,7)	Trans- β -cariofileno (9,4)	a -felandreno (8,7)	Santander e Jórdan Sube (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. origanoides</i>	Partes aéreas	Timol (53,6)	ρ -cimeno (11,5)	γ -terpineno (6,3)	Cauca e Mercaderes (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. origanoides</i>	Partes aéreas	Carvacrol (38,8)	Timol (15,1)	γ -terpineno (12,6)	Santander e Bucaramanga (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. origanoides</i>	Partes aéreas	Trans- β -cariofileno (11,3)	ρ -cimeno (11,2)	a -felandreno (9,9)	Santander e Los Santos (Colômbia)	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. origanoides</i>	Partes aéreas	Carvacrol (38,6)	ρ -cimeno (10,3)	Timol (18,5)	Oriximiná, PA (Brasil)	OLIVEIRA et al. (2007)
<i>L. rugosa</i>	Folhas frescas	Germacreno D (43,5)	trans- β -cariofileno (17,4)	Limoneno (3,8)	N'Dali (Benim)	YEHOUENOU et al. (2012)
<i>L. rugosa</i>	Folhas frescas	Germacreno D (43,7)	Z- β -cariofileno (16,4)	α -cadinol (6,5)	Gbegourou (Benim)	YEHOUENOU et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Timol (83,62)	ρ -cimeno (6,34)	Mirceno (1,75)	São Cristóvão, SE (Brasil)	JESUS et al. (2006)
<i>L. sidoides</i>	Folhas	Timol (59,65)	E-cariofileno (10,60)	ρ -cimeno (9,08)	Horizonte, CE (Brasil)	FONTENELLE et al. (2007)
<i>L. sidoides</i>	Folhas frescas	Timol (68,3)	ρ -cimeno (14,4)	NI	Teresina, PI (Brasil)	OLIVEIRA et al. (2009)

TABELA 1. Continuação...

<i>L. sidoides</i>	Folhas frescas	Timol (67,6)	1-monoestearina (8)	2-monopalmitina (7,15)	Fortaleza, CE (Brasil)	GOMES et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	NI	Timol (59,65)	Cariofileno (E) (10,60)	Cimeno para (9,08)	CE (Brasil)	CAMURÇA-VASCONCELOS et al. (2007)
<i>L. sidoides</i>	NI	Timol (59,65)	β -cariofileno (10,60)	Cimeno (9,08)	NI	RONDON et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	Partes aéreas	Timol (83,24)	trans-cariofileno (5,77)	ρ -cimeno (4,46)	Horizonte, CE (Brasil)	LIMA et al. (2013)
<i>L. sidoides</i>	Folhas	1,8 cineole (26,67)	Isoborneol (14,60)	Bornil acetato (10,77)	Hidrolândia, GO (Brasil)	MORAIS et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Timol (38,7)	ρ -cimeno (34,1)	Metil timol (9,4)	Poço Redondo, SE (Brasil)	FARIAS-JUNIOR et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Carvacrol (43,7)	ρ -cimeno (17,8)	γ -terpineno (16,6)	Poço Redondo, SE (Brasil)	FARIAS-JUNIOR et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Timol (42,33)	ρ -cimeno (11,97)	β -cariofileno (11,03)	SE (Brasil)	CARVALHO et al. (2013)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Timol (68,81)	ρ -cimeno (10,02)	β -cariofileno (8,13)	Mossoró, RN (Brasil)	CAVALCANTI et al. (2010)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Timol (68,4)	ρ -cimeno (10,56)	β -cariofileno (8,81)	Mossoró, RN (Brasil)	CAVALCANTI et al. (2010)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Timol (70,36)	ρ -cimeno (8,36)	β -cariofileno (8,01)	Limoeiro do Norte, CE (Brasil)	CAVALCANTI et al. (2010)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Carvacrol (46,09)	γ -terpineno (15,5)	ρ -cimeno (15,06)	Poço Redondo, SE (Brasil)	CAVALCANTI et al. (2010)
<i>L. sidoides</i>	Folhas secas	Timol (84,87)	ρ -cimeno (5,33)	Timol metil eter (3,01)	Crato, CE (Brasil)	MOTA et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	Folhas frescas	Timol (84,9)	ρ -cimeno (5,33)	etil-metil carvacrol (3,01)	Crato, CE (Brasil)	VERAS et al. (2013)
<i>L. triplinervis</i>	Partes aéreas	Carvacrol (31,9)	Timol (30,6)	ρ -cimeno (12,3)	Araponga, MG (Brasil)	LAGE et al. (2013)

A composição química de óleos essenciais de *Lippia* spp. é também determinada por fatores genéticos e outros fatores podem ainda acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários de tais plantas. A ação de fatores abióticos no rendimento e composição de óleos essenciais pode ser influenciada pela sazonalidade (SILVA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2007; MORAIS, 2009), disponibilidade de água, luminosidade, temperatura, estágio de desenvolvimento da planta e seu estado nutricional. Além disso, a colheita e os procedimentos de pós-colheita influenciam, sobremaneira, na quantidade e constituição química desses óleos essenciais. Bezerra et al. (2011) relataram que o horário de corte das folhas de *L. alba* influenciou no rendimento de óleo essencial, obtendo-se uma maior produção em amostra coletas ao meio-dia. Ehlert et al. (2013) não observaram diferenças significativas na produção de massa foliar e produtividade de óleo essencial em massa fresca e seca de *L. alba* submetidas à diferentes horários de colheita. Porém, houve variação nos teores dos constituintes majoritários carvora, limoneno, sabineno, g-terpuneno e linalol. Em relação ao estágio de desenvolvimento, Pandeló et al. (2012) verificaram que a maior produção de óleo essencial de *L. alba* ocorreu nas folhas onde os tricomas ainda não foram abertos. Conseqüentemente, isso pode influenciar nos resultados de tratamentos e testes biológicos usando patógenos e óleos essenciais de espécies de *Lippia* (MORAIS, 2009).

O comportamento agrônômico também possui relevância no rendimento de óleo essencial. Jannuzzi et al. (2010) estudando 16 quimiotipos de *L. alba* observaram que os genótipos com maior área foliar e maior comprimento de hastes tendem a apresentar maior teor de óleo essencial e concentração de linalol. Além disso, que a quantidade de óleo extraído foi inversamente proporcional à produção de massa foliar seca. A variabilidade genética e fenotípica das plantas aromáticas pode ser útil em programas de melhoramento genético e fitoterapia, melhorando a qualidade da matéria prima vegetal (JANNUZZI et al., 2011).

O rendimento e teor do óleo essencial de 42 clones-elite de *L. alba* mostraram maior rendimento em plantas colhidas no período seco, mas o maior teor de linalol foi obtido de plantas colhidas no período chuvoso (ALMEIDA et al., 2012). Variações sazonais no rendimento, teor e constituição química de óleo de *L. alba*, extraídos nas quatro estações do ano, foram descritas por Nogueira et al. (2007), com os melhores rendimentos e maiores concentrações de *trans*-dihidrocarvona, citral, β -cariofileno e germacreno-D ocorrendo durante a primavera e verão. Para o cultivo de *L. sidoides*, o crescimento foi positivamente

influenciado pela irrigação, com maiores valores em diâmetro do coleto e altura para as maiores lâminas aplicadas (ALVARENGA et al., 2012).

No tocante aos procedimentos pós-colheita alguns estudos foram também conduzidos. Nagao et al. (2005) avaliando a influência do período de secagem durante estação seca e chuvosa, para óleo essencial de *L. alba* nas condições do Ceará/Brasil, observaram que a secagem do material vegetal pode ser feita até o oitavo dia, garantindo o maior teor de óleo essencial rico em citral e limoneno. Além disso, concluíram que o período de secagem e a época de colheita influenciam no teor de óleo essencial, e também que a massa do material vegetal sofre influência da umidade quando seco em ambiente natural.

Portanto, como os constituintes dos óleos essenciais de *Lippia* são muito instáveis à presença de luz, calor e umidade (GOMES et al., 2011), o armazenamento deve ser criterioso para evitar variações quantitativas e qualitativas dos constituintes no óleo essencial de qualquer espécie.

Efeitos antimicrobianos e antiparasitários de *Lippia* spp.

Vários tipos de extratos de *Lippia* spp. vêm sendo amplamente testados por seu potencial antimicrobiano e antiparasitário em diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tabela 2). A ação antimicrobiana de determinados óleos essenciais dessas plantas pode ser superior à de fármacos-controles utilizados em protocolos *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2007; SARRAZIN et al., 2012; ZARE et al., 2012; FONTENELLE et al., 2007). Em geral, são os compostos majoritários timol e carvacrol que possuem forte atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (GOMES et al., 2011).

Outros estudos também destacam o uso de *Lippia* spp. contra microrganismos e parasitos. Extratos micro-encapsulados de *L. sidoides* apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (FERNANDES et al., 2012).

A resistência de ectoparasitos e endoparasitos às drogas antiparasitárias convencionais, a poluição ambiental causada por tais drogas e presença de resíduos farmacológicos em alimentos de origem animal são desafios enfrentados na produção animal, incentivando então pesquisas com fitoquímicos. Óleo essencial de *L. gracilis* mostrou eficácia, *in vitro*, no controle de larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (CRUZ et al., 2013), bem como *L. sidoides* no controle de larvas de *Dermacentor nitens* e larvas e fêmeas

ingurgitadas de *R. microplus* (GOMES et al., 2012). Similarmente, Lage et al. (2013) comprovaram a bioatividade do óleo essencial de *L. triplinervis* no controle de larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Esses estudos indicam que óleos essenciais de *Lippia* spp. possuem princípios bioativos com potencial antiparasitário satisfatório contra espécies de carrapatos que acometem animais silvestres e domésticos, podendo ser uma alternativa viável para tratamento da ectoparasitose.

Outro desafio da medicina veterinária tem sido a Leishmaniose Visceral (LV), uma zoonose característica das regiões tropicais e subtropicais do planeta, causada pelo protozoário *Leishmania infantum chagasi*. Essa doença infectocontagiosa, transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomia longipalpis* acomete canídeos, felinos, roedores e marsupiais. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde (MS) e Organização Mundial da Saúde (OMS) têm apoiado e incentivado investigações visando novas tecnologias que contribuam para a vigilância epidemiológica e novos tratamentos para controle da LV no País (VILA-NOVA, 2012). Estudos *in vitro* usando 19 óleos essenciais de *Lippia* spp. relataram que sete dos seus constituintes majoritários foram efetivos contra formas intracelulares de *L. chagasi* e *T. cruzi*, principalmente *L. alba*, a mais efetiva contra formas epimastigotas e promastigotas de *T. cruzi*. Porém, *L. origanoides* foi mais efetiva contra formas promastigotas de *L. chagasi*. Tais resultados são atribuídos aos constituintes timol e S-carvone, os quais tem efetividade contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (ESCOBAR et al., 2010). Óleo essencial de *L. sidoides* foi também efetivo contra formas promastigotas de *L. chagasi* (OLIVEIRA et al., 2009; FARIAS-JUNIOR, et al, 2012; RONDON et al., 2012). Portanto, tais atividades anti-protozoários indicam esses óleos essenciais como promissores no tratamento e controle da LV em animais.

TABELA 2. Potencial antimicrobiano e antiparasitário de diferentes extratos de *Lippia* spp. OE: Óleo essencial; EM: extrato metanólico; EC: extrato clorofórmico; EE: extrato etanólico. MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

Espécies de <i>Lippia</i>	Tipo de extrato	Microrganismos e parasitos sensíveis	Microrganismos e parasitos resistentes	Tipo de Ensaio	Referências
<i>L. alba</i>	OE	<i>Candida albicans</i> sorotipo B, <i>Candida albicans</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophytum rubrum</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	-	<i>In vitro</i>	OLIVEIRA et al. (2006)
<i>L. alba</i>	EM	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bartonella cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Shigella sonnei</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>In vitro</i>	FABRI et al. (2011)
<i>L. alba</i>	OE	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus intermedius</i>	-	<i>In vitro</i>	NOGUEIRA et al. (2007)
<i>L. alba</i>	OE	<i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .	-	<i>In vitro</i>	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. alba</i> f. <i>intermedia</i>	OE	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophytum rubrum</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Streptococcus mutans</i> .	-	<i>In vitro</i>	OLIVEIRA et al. (2006)
<i>L. berlandieri</i>	OE	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp. e <i>Rhizopus</i> spp.	-	<i>In vitro</i>	PORTILLO-RUIZ et al. (2012)
<i>L. berlandieri</i>	EC	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus cereus</i> .	-	<i>In vitro</i>	AVILA-SOSA et al. (2010)
<i>L. citriodora</i>	OE	<i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	-	<i>In vitro</i>	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. citriodora</i>	OE	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.	-	<i>In vitro</i>	ANSARI et al. (2012)
<i>L. citrodora</i>	OE	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>In vitro</i>	ASGHARI et al. (2012)
<i>L. dulcis</i>	OE	<i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	-	<i>In vitro</i>	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. gracilis</i>	OE	<i>Rhipicephalus microplus</i>	-	<i>In vitro</i>	CRUZ et al. (2013)
<i>L. gracilis</i>	OE	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Shigella flexineri</i> e <i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>In vitro</i>	BITU et al. (2012)

TABELA 2. Continuação...

<i>L. grandis</i>	OE	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i>	<i>In vitro</i>	SARRAZIN et al. (2012)
<i>L. hermannioides</i>	EM	<i>Bartonella cereus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella sonnei</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>In vitro</i>	FABRI et al. (2011)
<i>L. micromera</i>	OE	<i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	-	<i>In vitro</i>	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. nodiflora</i>	EM	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Klebsiella oxytocal</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aspergillus Níger</i> e <i>Candida albicans</i>	-	<i>In vitro</i>	ZARE et al. (2012)
<i>L. origanoides</i>	OE	<i>Candida albicans</i> sorotipo B, <i>Candida albicans</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophyllum rubrum</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	-	<i>In vitro</i>	OLIVEIRA et al. (2007)
<i>L. origanoides</i>	OE	<i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	-	<i>In vitro</i>	ESCOBAR et al. (2010)
<i>L. origanoides</i>	OE	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	-	<i>In vivo</i>	BETANCOURT et al. (2012)

TABELA 2. Continuação...

<i>L. pseudo-thea</i>	EM	<i>Candida albicans</i> , <i>Bartonella cereus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella sonnei</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>In vitro</i>	FABRI et al. (2011)
<i>L. rubella</i>	EM	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bartonella cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Shigella sonnei</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>In vitro</i>	FABRI et al. (2011)
<i>L. rugosa</i>	OE	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .	-	<i>In vitro</i>	YEHOUENOU et al. (2012)
<i>L. salviaefolia</i>	EE	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	-	<i>In vitro</i>	FUNARI et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	EE	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida glabrata</i>	-	<i>In vitro</i>	FERNANDES et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	EM	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bartonella cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Shigella sonnei</i>	<i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella typhimurium</i>	<i>In vitro</i>	FABRI et al. (2011)
<i>L. sidoides</i>	OE	<i>Microsporium canis</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i>	-	<i>In vitro</i>	FONTENELLE et al. (2007)
<i>L. sidoides</i>	OE	<i>Leishmania chagasi</i> promastigotas	-	<i>In vitro</i>	OLIVEIRA et al. (2009)
<i>L. sidoides</i>	OE	<i>Dermacentor nitens</i> e <i>Rhipicephalus microplus</i>	-	<i>In vitro</i>	GOMES et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	OE	<i>Haemonchus contortus</i> , <i>Syphaciaob velata</i> e <i>Aspicularis tetraptera</i>	-	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	CAMURÇA-VASCONCELOS et al. (2007)

TABELA 2. Continuação...

<i>L. sidoides</i>	OE	<i>Leishmania chagasi</i> promastigota	-	<i>In vitro</i>	FARIAS-JUNIOR et al. (2012)
<i>L. sidoides</i>	OE	<i>L. chagasi</i> promastigota e amastigota	-	<i>In vitro</i>	RONDON et al. (2012)
<i>L. triplineris</i>	OE	<i>Rhipicephalus microplus</i>	-	<i>In vitro</i>	LAGE et al. (2013)

O uso indiscriminado de antihelmínticos sintéticos no controle de espécies de nematóides gastrointestinais em ruminantes tem causado resistência parasitária, alto custo para a pecuária, além da contaminação ambiental. Tais fatores vêm estimulando a busca por fármacos naturais como alternativa para tal finalidade na medicina veterinária. Efeito inibitório dose-dependente do timol em óleo essencial de *L. sidoides*, na eclosão de ovos e larvas de *H. contortus*, *S. velata* e *A. tetraptera*, nematoides comuns em pequenos ruminantes, foi relatado por Camurça-Vasconcelos et al. (2007).

Outras utilidades dos óleos essenciais de *Lippia* spp. na medicina veterinária

Vários estudos têm comprovado ação antiinflamatória, analgésica e cicatrizante de produtos extraídos de *Lippia* spp. Em ratos, foi demonstrado efeito antiinflamatório e analgésico do óleo essencial de *L. gracilis*, que causou redução de edema e migração leucocitária, bem como redução na nocicepção de modo similar aos efeitos do ácido acetil salicílico (Mendes, 2010). Ação cicatrizante e antiinflamatória do timol, obtido de *L. gracilis* ocorreu em ratos, levou também a redução de edema e influxo leucocitário na região lesada, além da melhoria na granulação e retração da lesão (RIELLA et al., 2012).

Efeitos antinociceptivo e antiinflamatório do óleo essencial de *L. gracilis* usado via oral, avaliado por medição do ácido acético, formalina e teste da placa quente, em inflamação induzida por carragenina foram também relatados em ratos. Houve redução da peritonite e decréscimo na síntese de mediadores da inflamação, provavelmente devido à ação da naringenina, constituinte químico isolado de *L. gracilis* com atividade antiinflamatória (GUIMARÃES et al., 2012). Haldar et al. (2012) avaliando diferentes extratos de *L. alba* observaram que o extrato aquoso teve maior ação antinociceptiva, enquanto os extratos clorofórmico e etanólico mostraram maior ação antiinflamatória. Ação antiinflamatória do óleo essencial de *L. sidoides* e seu constituinte majoritário, o timol, foi investigada em edema agudo da orelha de ratos. Houve ação antiinflamatória desse óleo provavelmente devido à abundância de timol, pois não houve diferença significativa entre os resultados de ambas as substâncias e o uso crônico dessa substância causou efeito pró-inflamatório (VERAS et al., 2013).

Como *L. alba* é amplamente utilizada na América Central e do Sul como tranquilizante, concentrações de citral, limoneno e mirceno obtidas a partir de óleo essencial dessa planta mostraram efeitos sedativo e relaxante em camundongos (VALE et al., 2002). Em ratos, (R)-(-)-carvona obtido de *L. alba* e administradoa intraperitoneal mostrou efeito

similar ao Diazepam[®], fármaco de referência para tranquilizantes, indicando então o uso potencial desse óleo essencial no tratamento da ansiedade (HATANO et al., 2012).

Espécies do gênero *Lippia* tem sido testadas também por sua ação anti-cancerígena. Ensaio *in vitro* da proliferação e apoptose de células HepG2 (human hepato cellular carcinoma) e camundongos com células tumorais Sarcoma 180 usando óleo essencial de *L. gracilis* mostraram atividade antitumoral significativa em ambos os ensaios (FERRAZ et al., 2013). Estudos de Ribeiro et al. (2012) também confirmaram atividade citotóxica do extrato de *L. gracilis*.

***Lippia* spp. na aquicultura**

Várias substâncias químicas vêm sendo também testadas como anestésicos, antimicrobianos e antiparasitários, para uso na aquicultura. Porém, a busca por novos produtos alternativos de baixo custo, para esse setor produtivo, com menor risco à saúde dos animais e dos manipuladores tem incentivado pesquisas com fitoquímicos (CUNHA, 2011). Em cavalos-marinhos *Hippocampus reidi*, avaliação do tempo de indução e recuperação da anestesia com óleo essencial de *L. alba* mostrou que concentração crescente desse óleo diminuiu proporcionalmente o tempo de indução da anestesia, inibindo o aumento da glicose sanguínea provocada pelo estresse de transporte, e evitando alterações no número de leucócitos sanguíneos (CUNHA et al. 2011). Em jundiá *Rhamdia quelen*, concentrações de óleo essencial de *L. alba*, variando de 100 a 500 mg/L, mostraram eficácia anestésica, inibindo os níveis de cortisol plasmático sem alterar o odor e sabor do filé (CUNHA et al., 2010).

Óleo essencial de *L. alba* mostrou também eficácia sedativa no transporte de *R. quelen* (BECKER et al., 2012; VEECK et al., 2013) e na redução dos efeitos oxidativos *post-mortem*, devido a estabilização lipídica durante a estocagem sob congelamento (VEECK et al., 2013). Estudos avaliaram os biomarcadores lipoperoxidação, catalase, superóxido dismutase e glutathione-s-transferase durante o transporte de *R. quelen* com uso de óleo essencial de *L. alba*, que melhorou o estado de oxirredução nos tecidos avaliados, tanto em condição de hiperóxia quanto em hipóxia (AZAMBUJA et al., 2011). Portanto, o uso desse óleo essencial no transporte de *R. quelen* reduziu o estresse oxidativo. Similarmente, em camarão *Litopenaeus vannamei*, 500 e 750 µL/L de óleo essencial de *L. alba* para animais em estágios

de pós-larvas e sub-adultos, respectivamente, teve efeito anestésico e diminuiu o estresse oxidativo (PARODI et al., 2012). Em peixes, o efeito anestésico do óleo essencial de *L. alba* está relacionado com o envolvimento do sistema GABAérgico (HELDWEIN et al., 2012).

Em surubim *Pseudoplatystoma* sp., foi demonstrado eficácia do extrato hidroalcoólico de *L. sidoides* contra *Listeria monocytogenes*, bactéria que acomete pescados refrigerados (REIS et al., 2011). Óleo essencial de *L. citriodora* mostrou ação contra *Tribolium confusum*, inseto geralmente encontrado em rações para animais, quando estocadas (KHANI et al., 2012). Óleo essencial de *L. rugosa* possui também uso potencial contra microrganismos que acometem alimentos estocados (YEHOUEYOU et al., 2012). Assim, ambas as plantas parecem promissoras para conservação de rações de peixes e outros organismos aquáticos, pois no cultivo o uso de rações com elevados níveis de proteína de origem animal tem problemas constantes de conservação, devido à ação de insetos, microrganismos e outros.

Em tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* foi demonstrado que óleo essencial de *L. origanoides* e seu constituinte majoritário (carvacrol) apresentaram atividade, principalmente, contra bactérias intestinais, tais como *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Edwardsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. e *Klebsiella* sp. (LA ROSA, 2011). Porém, não há informações sobre a eficácia de *Lippia* spp. no tratamento de bactérias patogênicas e ectoparasitos (protozoários e monogenoideas) e endoparasitos (helminto) causadores de doenças em peixes de piscicultura.

Estudos conduzidos durante duas décadas têm demonstrado o potencial de *Lippia* spp. na medicina veterinária, devido aos diferentes constituintes bioativos com múltiplas propriedades nessas plantas. Porém, são necessários estudos para implementação de protocolos farmacológicos e terapêuticos visando a profilaxia, tratamento de enfermidades, bem como o aprimoramento do manejo de animais de interesse zootécnico. Na aquicultura, os problemas com doenças bacterianas e parasitárias são frequentes devido ao estresse de manejo e intensificação do cultivo, assim o uso de produtos quimioterápicos é constante, causando riscos aos manipuladores e contaminação dos os efluentes despejados, geralmente, em corpos d'água naturais, além do acúmulo residual na carne dos pescados cultivados. O uso de *Lippia* spp. poderia ser uma alternativa economicamente viável em substituição aos quimioterápicos, além de ser mais seguro para o consumidor e para o meio ambiente. Além disso, estudos agrônomicos indicam facilidade na produção em larga escala, na obtenção de óleos essenciais e outros extratos de *Lippia* spp.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela Bolsa PQ concedida a Marcos Tavares-Dias e a Embrapa, pelo suporte financeiro ao Projeto FISHFITO.

Referências

- AJAIYEGBA, E.O.; ABIODUN, O.O.; FALADE, M.O.; OGBOLE, N.O.; ASHIDI, J.S.; HAPPI, C.T.; AKINBOYE, D.O. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytomedicine**, v.13, n.4, p. 295-298, 2006.
- ALMEIDA, F. M.; COLOMBO, C. A.; SIQUEIRA, W. J. Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* químiótipo linalol em função de duas épocas de colheita. In: 6º CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Jaguariúna, SP. p. 1-8, 2012.
- ALVARENGA, I. C. A.; LOPES, O. D.; PACHECO, F. V.; OLIVEIRA, F. G.; MARTINS, E. R. Fator de resposta do alecrim-pimenta a diferentes lâminas de irrigação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 4, p. 462-468, 2012.
- ANSARI, M.; LARIJANI, K.; SABER-THERANI, M. Antibacterial activity of *Lippia citriodora* herb essence against MRSA *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n.1, p. 16-19, 2012.
- ASGHARI, G.; BAHRI NAJAFI, R.; KHADOOR, K.; GHAEMI, Y.; ALIOMRANI, M. Evaluation of antimicrobial activity of *Lippia citriodora* Kunth. arial part. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 789, 2012.
- AVILA-SOSA, R.; GASTÉLUM-FRANCO; M. G.; CAMACHO-DÁVILA, A.; TORRES-MUÑOZ, J. V.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 434-440, 2010.
- AZAMBUJA, C. R.; MATTIAZZI, J.; RIFFEL, A. P. K.; FINAMOR, I. A.; GARCIA, L. O.; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in

silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, p. 156-161, 2011.

BECKER, A. G.; PARODI, T. V.; HELDWEIN, C. G.; ZEPPENFELD, C. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 789-796, 2012.

BEZERRA, F. N. R.; ROLIM, R. R.; SANTOS, H. R.; MARCO, C. A.; FEITOSA, J. V.; COSTA, A. N. L. Rendimento do óleo essencial de cidreira brava (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. em diferentes horários de corte. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

BITU, V.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; VERAS, H. N. H.; MARTINS, K. T.; LYRA, A.; COLUCHI, G. G.; RUELA, R. S.; QUEIROZ, D. B.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTAS-JUNIOR, L. J. Phytochemical screening and antimicrobial activity of essential oil from *Lippia gracillis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 69-75, 2012.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288-294, 2007.

CARVALHO, R. R. C.; LARANJEIRA, D.; CARVALHO-FILHO, J. L. S.; SOUZA, P. E.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; JESUS, H. C. R.; WARWICK, D. R. N. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 241-244, 2013.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. 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.

CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spidermite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 829–832, 2010.

CRUZ, E. M. O.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. A.; ARAUJO, S. A. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.046>, 2013.

CUNHA, M. A. **Óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown como anestésico para peixes**. 2011, 78 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Maria/UFSM, Santa Maria, 2011.

CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L. O.; VEECK, A. P. L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V. L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403-406, 2010.

CUNHA, M. A.; SILVA, B. F.; DELUNARDO, F. A. C.; BENOVI, S. C.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 3, p. 683-688, 2011

EHLERT, P. A. D.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; FERNANDES, D. M.; ROCHA, W. A.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, R. F. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 72-77, 2013.

ESCOBAR, P.; LEAL, S. M.; HERRERA, L. V.; MARTINEZ, J. R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 184-190, 2010.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; MOREIRA, J. R.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Identification of antioxidante and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 7-8, p. 840-846, 2011.

FARIAS, E. M. F. G.; XIMENES, R. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; CHIAPETA, A. A.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, p. 63-67, 2012.

FARIAS-JUNIOR, P. A.; RIOS, M. C.; MOURA, T. A.; ALMEIDA, R. P.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; FERNANDES, R. P. M.; SCHER, R. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biology Research**, v. 45, p. 399-402, 2012.

FERNANDES, L. P.; CANDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 425-432, 2012.

FERRAZ, R. P. C.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, N. C.; SOARES, M. B. P.; SILVA, T. B.; MACHADO, W. J.; PRATA, A. P. N.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; BEZERRA, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-621, 2013.

FOLASHADE, K. O.; OMOREGIE, E. H. Essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke: A review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 1, p. 15-23, 2012.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FUNARI, C. S. F.; GULLO, P.; NAPOLITANO, A.; CARNEIRO, R. L.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; SILVA, D. H. S. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2086–2094, 2012.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E.; GOIS, R. W. S.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, p. 2423-2430, 2012.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GUIMARÃES, A. G.; GOMES, S. V. F.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F.; SANTOS, A. D. C.; VIANA, M. D.; SILVA, G. H.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 428-434, 2012.

HALDAR, S.; KAR, B.; DOLAI, N.; KUMAR, R. B. S.; BEHERA, B.; HALDAR, P. K. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. S667-S670, 2012.

HATANO, V. Y.; TORRICELLI, A. S.; GIASSI, A. C. C.; COSLOPE, L.A.; VIANA, M. B. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 179-290, 2012.

HELDWEIN, C. G.; SILVA, L. L.; RECKZIEGEL, P.; BARROS, F.M.C.; BÜRGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C. A.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 376-472, 2012.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. M. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 412-417, 2010.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação agrônômica e química de dezesseis acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p.258-264, 2011.

JESUS, H. C. R.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F. Composição química do óleo essencial de três espécies do gênero *Lippia* cultivadas em Sergipe. IN: 33° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

KHANI, A.; BASAVAND, F.; RAKHSHANI, E. Chemical composition and insecticide activity of lemon verbena essential oil. **Journal of Crop Protection**, v. 1, n. 4, p. 313-320, 2012.

KUNLE, O.; EGAMANA, O.; EMOJEVWE, M.; SHOK, M. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, v. 10, n. 1, p. 59-61, 2003.

LA ROSA, M. G. N. **Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta**. 2011. 98 f. Tese (Doutorado) Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá, 2011.

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 863-869, 2013.

LIMA, G. P. G.; SOUZA, T. M.; FREIRE, G. P.; FARIAS, D. F.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. P. S.; MORAIS, S. M.; CARVALHO, A. F. U. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**, doi10.1007/s00436-013-3351-1, 2013.

LOBO, P.L.D.; CARVALHO, C.B.M.; NASCIMENTO, D.F.; FONSECA, S.G.C.; JAMACARU, F.V.F.; MORAES, M.E.A. Dose–response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 551-556, 2011.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracillis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MORAIS, S. R.; OLIVEIRA, T. L. S.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; REZENDE, M. H.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; Chemical Constituents of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) Leaves Cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, doi: 10.1155/2012/363919, 2012.

MOTA, M. L.; LOBO, L. T. C.; COSTA, J. G. M.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A. O.; SILVA, L. F. R.; POHLIT, A. M.; ANDRADE-NETO, V. F. A. *In Vitro* and *In Vivo* Antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in Northeastern Brazil. **Planta Medica**, v. 78, p. 658-664, 2012.

MUNIR, A. A. A taxonomic revision of the genus *Lippia* [HOUST. EX] Linn. (Verbenaceae) in Australia. **Journal of the Adelaide Botanic Gardens**, v. 15, n. 2, p. 129-145, 1993.

NAGAO, E. O.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; MARCO, C. A. Influência do período de secagem nas estações seca e chuvosa no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., nas condições do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 1, p. 53-59, 2005.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 273 - 278, 2007.

OLIVEIRA, V. C. S.; MOURA, D. M. S.; LOPES, J. A. D.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, C. B. Q. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1053-1059, 2009.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; SUZANA, G. L. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103–108, 2006.

PANDELÓ, D.; MELO, T. D.; SINGULANI, J. L.; GUEDES, F. A. F.; MACHADO, M. A.; COELHO, C. M.; VICCINI, L. F.; SANTOS, M. O. Oil production at different stages of leaf development in *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 497-501, 2012.

PARODI, T.V.; CUNHA, M. A.; HELDWEIN, C. G.; SOUZA, D. M.; MARTINS, A. C.; GARCIA, L. O.; WASIELESKY JUNIOR, W.; MONSERRAT, J. M.; SCHIMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B.; BALDISSEROTTO, B. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)**, v. 155, p. 462-468, 2012.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.

PEREIRA, S. L. S.; PRAXEDES, Y. C. M.; BASTOS, T. C.; ALENCAR, P. N. B.; COSTA, F. N. Clinical effect of a gel containing *Lippia sidoides* on plaque and gingivitis control. **European Journal of Dentistry**, v. 7, p. 28-34, 2013.

PORTILLO-RUIZ, M. C.; SÁNCHEZ A. S.; RAMOS, S. V.; MUÑOZ, J. V. T.; NEVÁREZ-MOORILLÓN. Antifungal effect of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on a wheat flour-based medium. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p.441-445, 2012.

REIS, F. B.; SOUZA, V. M.; THOMAZ, M. R. S.; FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W. P.; MARTINS, E. C. P. Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic

extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 228-234, 2011.

RIBEIRO, S. S.; JESUS, A. M.; ANJOS, C. S.; SILVA, T. B.; SANTOS, A. D. C.; JESUS, J. R.; ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; GOMES, W. F.; ALVES, P. B.; CARVALHO, A. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; PINHEIRO, M. L. B.; PRATA, A. P. N.; BLANK, A. F.; SILVA-MANN, R.; MORAES, V. R. S.; COSTA, E. V.; NOGUEIRA, P. C. L.; BEZERRA, D. P. Evaluation of the cytotoxic activity of some brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, v. 78, p. 1601-1606, 2012.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 656-663, 2012.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; ANDRADE-JÚNIOR, H. F.; CARVALHO, C. A.; LIMA, J. C.; MAGALHÃES, H. C. R. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2012.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA R. B.; BARATA, L. E. S.; MOURÃO, R. H. V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, p. 147-1478, 2012.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.

VALE, T.G; FURTADO, E.C.; SANTOS JR, J.G. VIANA, GS B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, v. 8, p. 709-714, 2002.

VANAJOTHI, R.; SUDHA, A.; MANIKANDAN, R.; RAMESHTHANGAM, P.; SRINIVASAN, P. *Luffa acutangula* and *Lippia nodiflora* leaf extract induces growth inhibitory effect through induction of apoptosis on human lung cancer cell line. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, p. 287-293, 2012.

VEECK, A. P. L.; KLEIN, B.; FERREIRA, L. F.; BECKER, A. G.; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTO, B.; EMANUELLI, T. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 955-960, 2013.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 179-185, 2013.

VILA-NOVA, N. S. **Alternativas fitoterápicas para o tratamento da Leishmaniose**. 2012.148 f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual do Ceará/UECE, Fortaleza, 2012.

YEHOUENOU, B.; AHOUSSE, E.; SESSOU, P.; ALITONOU, G. A.; TOUKOUROU, F.; SOHOUNHLOUE, D. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils (EO) extracted from leaves of *Lippia rugosa* A. Chev against foods pathogenic and adulterated microorganisms. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 26, p. 5496-5505, 2012.

ZARE, Z.; MAJD, A.; SATTARI, T. N.; IRANBAKHSH, A.; MEHRABIAN, S. Antimicrobial activity of leaf and flower extracts of *Lippia nodiflora* L. (Verbenacea). **Journal of Plant Protection Research**, v. 52, n. 4, p. 401-403, 2012.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Essential Oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br Growing Wild in the Brazilian Amazon. **Flavour And Fragrance Journal**, v. 13, p. 47-48, 1998.

ARTIGO 2 (Anexo 2)

“Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects”

Atividade antiparasitária do óleo essencial de *Lippia alba* em ectoparasitos de *Colossoma macropomum* e seus efeitos fisiológicos e histopatológicos

Artigo publicado no periódico “**Aquaculture**”

Volume 452, Pág 107-114, Ano: 2016.

Atividade antiparasitária do óleo essencial de *Lippia alba* em ectoparasitos de *Colossoma macropomum* e seus efeitos fisiológicos e histopatológicos

Bruna Viana Soares¹, Lígia Rigôr Neves², Marcos Sidney Brito Oliveira³, Francisco Célio Maia Chaves⁴, Márcia Kelly Reis Dias¹, Edsandra Campos Chagas⁴ & Marcos Tavares-Dias^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brasil.

²Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Embrapa Amapá Macapá, AP, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos (PPG-RACAM), Universidade do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, PA, Brasil.

⁴ Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil

Autor para correspondência: Marcos Tavares-Dias

Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, 2600, 68903-419, Macapá, AP, Brasil. E-mails: marcos.tavares@embrapa.br

RESUMO

Este estudo investigou os efeitos antiparasitários, *in vivo* e *in vitro*, do óleo essencial (OE) de *Lippia alba* e alterações sanguíneas e histopatológicas para *Colossoma macropomum*. No ensaio *in vitro* foram testados os efeitos antihelmínticos de 160, 320, 640, 1280 e 2560 mg/L do OE contra monogenoideas (*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri*) das brânquias desse peixe parasitados naturalmente. As concentrações de 1280 mg/L e 2560 mg/L mostraram 100% de eficácia após 20 minutos de exposição aos OE, enquanto nas menores concentrações essa eficácia contra os monogenoideas de brânquias ocorreu somente após 2-3 h da exposição *in vitro*. Porém, nos controles a mortalidade de todos esses monogenoideas ocorreu somente em 9 horas. Um total de 240 alevinos foram distribuídos em 4 tratamentos (20 peixes por repetição) e 3 repetições foram usados no ensaio *in vivo*, para banhos com 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*, durante 30 minutos. Neste ensaio ocorreu eficácia de 40,7% e 50,3% contra *Ichthyophthirius multifiliis* nos peixes expostos a 100 e 150 mg/L do OE, respectivamente. Porém, para monogenoideas houve uma eficácia de 14,0% somente nos peixes expostos 100 mg/L do OE usado. Além disso, nos peixes expostos tais concentrações do OE houve aumento dos níveis de glicose plasmática, indicando sinais de estresse. Lesões severas como hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio e aneurisma lamelar, ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose, proliferação de células mucosas e células de cloreto e hipertrofia lamelar foram observadas nas brânquias dos peixes expostos a 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*. Alterações nos níveis de proteínas totais, hemoglobina, hematócrito, número de eritrócitos, trombócitos e leucócitos totais, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos sanguíneos também foram observadas nesses peixes. OE de *L. alba* mostrou grande potencial no tratamento antiparasitário, uma vez que foi encontrada elevada eficácia *in vitro* contra espécies de monogenoideas e eficácia *in vivo* contra protozoários *I. multifiliis*. Devido as baixas concentrações do OE (100 e 150 mg/L), que foram toleradas pelos peixes e possível então usar nos banhos terapêuticos, a eficácia contra monogenoideas foi baixa, indicando a necessidade de estratégias adicionais para o uso desse OE nos tratamentos antiparasitários, pois as concentrações que eliminam esses ectoparasitos são tóxicas para os hospedeiros. Finalmente, este é o primeiro estudo sobre atividade antiparasitária de *L. alba*.

PALAVRAS-CHAVE: Monogenoidea, Parasitos, Planta medicinal, Sangue, Tambaqui.

1. Introdução

A fitoterapia tem se tornado uma alternativa importante no tratamento de doenças parasitárias, devido aos efeitos secundários atribuídos a drogas sintéticas. Uma planta medicinal pode conter um ou mais compostos químicos com potencial para ser utilizado terapeuticamente. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) é um subarbusto aromático amplamente encontrado em várias regiões do mundo tais como Brasil, Bangladesh, Índia, México, Paraguai, Uruguai, norte da Argentina, sul dos Estados Unidos e Austrália.

Devido ao grande potencial bioativo de *L. alba*, com efeitos analgésico, anti-inflamatório, sedativo e antiespasmódico, é muito usada na medicina tradicional (Mamun-Or-Rashid et al., 2013; Tavares et al., 2011). Estudos comprovam atividades antibacteriana, antifúngica, antiprotozoário (Fabri et al., 2011; Nogueira et al., 2007; Oliveira et al., 2006), antiparasitária (Escobar et al., 2010), antiinflamatória (Haldar et al., 2012) de óleo essencial (OE) de *L. alba* e seus constituintes. Em peixes, tem sido demonstrado ação anestésica e redutora do estresse oxidativo do OE de *L. alba* em animais submetidos a transporte (Azambuja et al., 2011, Cunha et al., 2010). Tais propriedades bioativas do OE de *L. alba* são atribuídas à riqueza de constituintes químicos majoritários tais como geranial, carvona, neral, linalol, neral e limoneno. Recentemente, a utilização de produtos naturais derivados de plantas, para controle de parasitos, tem recebido grande atenção (Boijink et al., 2015; Hashimoto et al., 2016; Huang et al., 2013; Ji et al., 2012; Steverding et al., 2005; Xiao-Feng et al., 2014; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2014; Zheng et al., 2015). Porém, não tem sido investigado os efeitos de OE de *L. alba* em ectoparasitos de peixes.

Colossoma macropomum Cuvier, 1818 (tambaqui) é um Serassalmidae da Amazônia amplamente cultivado em diferentes sistemas intensivos, devido a sua boa adaptação às rações balanceadas e relativa rusticidade. Porém, com o incremento da produção desse peixe o surgimento de doenças parasitárias causadas por ectoparasitos, protozoários (*Ichthyophthirius multifiliis*) e monogenoideas (*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni*), tem afetado o seu cultivo, causando prejuízos econômicos devido às epizootias (Boijink et al., 2015; Martins et al., 2002; Pinheiro et al., 2015). Tais problemas requerem um constante monitoramento para diagnóstico e tratamento adequados das parasitoses, um desafio na piscicultura intensiva do tambaqui. Porém, as substâncias usadas para controle dos parasitos são produtos quimioterápicos, geralmente tóxicos para os peixes e podem causar danos à saúde do homem

e ao meio ambiente (Pinheiro et al., 2015). O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas, tais como OE de *L. alba*, pode ser uma solução para o controle desses parasitos em peixes, necessitando de estudos para testar a sua efetividade ainda não investigada. Assim, esse estudo teve como objetivo investigar os efeitos antiparasitários, *in vivo* e *in vitro*, do OE de *L. alba*, bem como as possíveis alterações sanguíneas e histopatológicas nas brânquias de tambaqui *C. macropomum*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção e composição química do óleo essencial de *Lippia alba*

O cultivo das plantas e a extração do óleo essencial foram realizados no Setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, estado do Amazonas, Brasil. O óleo essencial foi extraído das folhas e inflorescências da *L. alba* através de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. A análise química do OE foi feita por cromatografia gasosa com espectrometria de massas. Os componentes químicos do OE de *L. alba*, usado neste estudo, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Constituição química do óleo essencial de *Lippia alba*.

Pico	Teor %	IR	Identificação
1	0,7	977	beta-pineno
2	3,5	989	mirreno
3	17,5	1029	limoneno
4	0,3	1037	(Z)-ocimeno
5	1,1	1048	(E)-ocimeno
6	1,6	1096	linalol
7	0,2	1200	<i>trans</i> -di-hidro-carvona
8	0,4	1216	<i>trans</i> -carveol
9	61,7	1245	carvona
10	0,6	1252	piperitona
11	0,7	1337	piperitenona
12	0,5	1372	alfa-copaeno
13	0,4	1380	beta-bourboneno
14	0,3	1387	beta-elemeno
15	1,8	1414	(E)-beta-cariofileno
16	0,2	1456	alfa-humuleno
17	2,7	1475	germacreno D
18	0,2	1497	alfa-muuroleno
19	0,5	1508	germacreno A
20	0,4	1517	gama-cadineno
21	0,4	1557	nerolidol
22	0,3	1576	óxido de cariofileno
23	0,8	1641	beta-cedren-9-ona
24	3,0	1655	n.i.
25	0,4	1677	n.i.
Total identificado (%): 96,7			

2.2. Peixes e aclimação

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Aquicultura e Pesca da Embrapa Amapá, Macapá, estado do Amapá, Brasil. Alevinos de *C. macropomum* (± 30 g) foram obtidos de piscicultura comercial. Os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanques de 500 L de água e alimentados com ração contendo 32% proteína bruta (PB). Nos tanques foi mantido o sistema constante de renovação da água, e os parâmetros da água foram monitorados: temperatura média $30,4 \pm 0,1$ °C, oxigênio dissolvido $5,5 \pm 0,2$ mg/L, pH $5,3 \pm 0,2$, amônia $0,5 \pm 0,2$ mg/L, alcalinidade $10,0 \pm 0$ mg/L e dureza $10,0 \pm 0$ mg/L. Diariamente foi feita uma remoção de matéria orgânica acumulada no fundo dos tanques.

2.3. Ensaio *in vitro* com OE de *Lippia alba* e monogenoideas de *C. macropomum*

Para avaliar o tempo de exposição e as concentrações de OE de *L. alba* que causam mortalidade em espécies de monogenoideas das brânquias de 20 *C. macropomum* ($12,0 \pm 3,0$ cm e $35,0 \pm 25,0$ g) foram conduzidos testes *in vitro*. Para tal, utilizou-se dois grupos controles, um com água do tanque e outro com água do tanque + álcool etílico absoluto, e cinco diferentes concentrações de OE de *L. alba* (160, 320, 640, 1280 e 2560 mg/L), usando três repetições para cada tratamento. Este solvente foi usado na proporção de 1:10.

Arcos branquiais *C. macropomum* naturalmente parasitados por monogenoideas foram retirados e individualizados em placas de Petri, onde foram submersos nas soluções de OE de *L. alba*. Usando estereomicroscópio, campos de visão contendo no mínimo 20 monogenoideas foram selecionados para cada repetição, e após a submersão dos arcos branquiais nas diferentes concentrações de OE de *L. alba*, a cada 10 minutos realizou-se visualizações para quantificar o número de monogenoideas vivos e mortos. Foram considerados parasitos mortos aqueles que se desprenderam do tecido branquial e os aderidos ao tecido branquial que perderam totalmente a mobilidade (Hashimoto et al., 2016). Em seguida, a eficácia de cada tratamento foi calculada (Zhang et al., 2014).

A partir dos resultados *in vitro* foram determinadas as concentrações usadas nos banhos terapêuticos com OE de *L. alba*, após um teste prévio da tolerância dos peixes.

2.4. Ensaio *in vivo* com *Colossoma macropomum*

Alevinos ($11,0 \pm 1,0$ cm e $44,0 \pm 10,0$ g), naturalmente parasitados, foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques de 100 L, mantidos em sistema aberto de água durante 48

horas. Para este ensaio, foram usados quatro tratamentos e três repetições, com 20 peixes por repetição, e os peixes foram mantidos em sistema estático de água (temperatura média $29,3 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido $6,3 \pm 0,06$ mg/L, pH $5,2 \pm 0,09$, amônia $0,3 \pm 0,12$ mg/L, alcalinidade $10,0 \pm 0$ mg/L e dureza $10,0 \pm 0$ mg/L). Os tratamentos são os seguintes: grupos controles com água do tanque ou com água + álcool etílico absoluto (1:10), o solvente usado para diluição do OE, 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*. Os peixes de todos os tratamentos foram expostos durante 30 minutos ao OE de *L. alba*, exceto os dos grupos controle. Após o banho de 30 minutos, a água dos tanques foi mantida em fluxo contínuo e 10 peixes de cada repetição, dos diferentes tratamentos, foram usados para coleta das brânquias, fixadas em formalina 5%, para quantificação e identificação dos parasitos. Os parasitos foram preparados para identificação usando recomendações prévias (Eiras et al., 2006). Após quantificação dos parasitos, foram calculados prevalência e intensidade média de infecção (Bush et al., 1997). A eficácia de cada tratamento foi calculada (Zhang et al., 2014).

A outra parte dos peixes foi usada para análises sanguíneas e histopatológicas.

As concentrações *in vitro*, previamente testadas, mostram baixa tolerância dos peixes ao OE de *L. alba*; assim, somente concentrações 100 e 150 mg/L puderam ser usadas nos banhos terapêuticos.

2.5. Procedimentos de análises dos parâmetros sanguíneos de *Colossoma macropomum*

Após os banhos terapêuticos de 30 minutos com 0, 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*, cinco peixes de cada repetição (15 peixes por tratamento) foram usados para colheita sanguínea. De cada peixe foi colhida uma amostra de sangue por punção do vaso caudal, utilizando seringas com EDTA (10%), que foi dividida em duas alíquotas. Uma alíquota foi usada para contagem de eritrócitos totais em homocitômetro, determinação do hematócrito usando o método de microhematócrito e concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina. Com esses dados foram calculados índices hematimétricos de Wintrobe: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas pancromicamente com uma combinação de May Grünwald-Giemsa-Wright (Ranzani-Paiva et al., 2013) para contagem diferencial de leucócitos em até 200 células de interesse em cada extensão. A identificação e nomenclatura das populações de leucócitos seguiram as recomendações de

Tavares-Dias et al. (1999). As extensões foram também usadas para contagem do número de leucócitos e trombócitos totais (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A segunda alíquota de sangue foi centrifugada a 75 G, para obtenção do plasma e para análise dos níveis de glicose e proteínas plasmáticas totais. A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico de glicose oxidase usando kit comercial (Biotécnica, MG, Brasil). A concentração de proteínas plasmáticas totais foi determinada pelo método de biureto usando kit comercial (Biotécnica, MG, Brasil). Para ambas as análises bioquímicas, a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

2.6. Procedimentos de análises histopatológicas das brânquias de *Collossoma macropomum*

Após os banhos terapêuticos de 30 minutos com 0, 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*, 6 peixes por tratamento (2 peixes de cada repetição) foram usados para coleta dos arcos branquiais para análises histopatológicas. Após 24 h desses banhos terapêuticos, outros 6 peixes por tratamento (2 peixes de cada repetição) foram usados para coleta dos arcos branquiais para análises histopatológicas (recuperação). Esses peixes usados na recuperação estavam mantidos nos tanques com água de fluxo contínuo e foram alimentados.

O primeiro arco branquial direito de cada peixe foi coletado e fixado em formalina tamponada (10%), para análises histopatológicas. Os arcos branquiais foram desidratados através de uma série gradual de etanol e xilol e, em seguida, inclusos em parafina, para obtenção de cortes consecutivos seriados em micrótomo. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio de luz comum.

A análise histopatológica foi realizada de forma semiquantitativa usando o valor médio de alteração (VMA) (Schwaiger et al., 1997) e índice de alteração histopatológica (IAH) (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

2.7. Análises estatísticas

Todos os dados foram previamente avaliados nos pressupostos de normalidade e homocedasticidade usando Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para os dados com distribuição normal foi usada análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Holm-Sidak, para comparação entre médias. Para os dados que não seguiram esse padrão de distribuição, foi usado Kruskal-Wallis seguido pelo teste Tukey, para comparação entre as medianas ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Ação antiparasitária *in vitro* do óleo essencial de *Lippia alba*

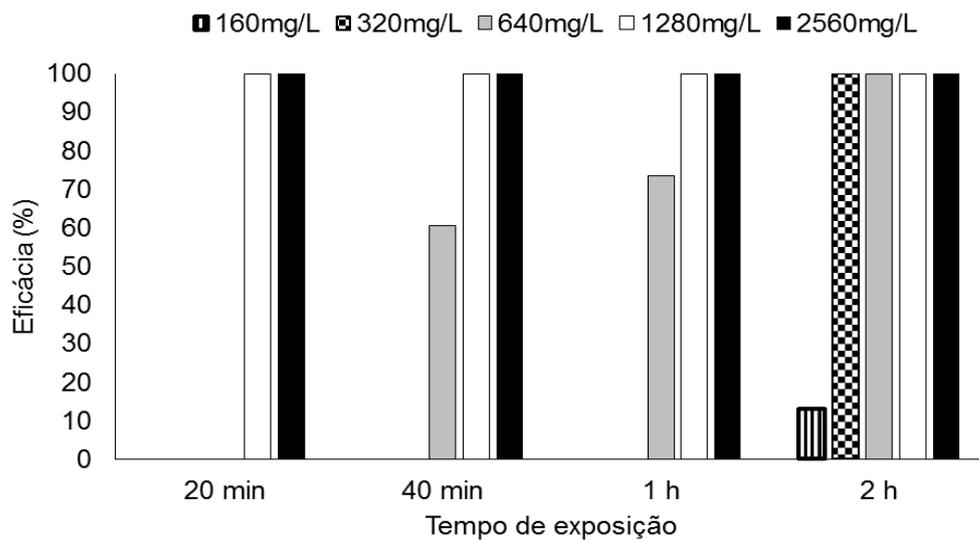
No teste *in vitro*, OE de *L. alba* mostrou 100% de atividade anti-helmíntica contra monogenoideas *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* Cohen & Kohn, das brânquias de *C. macropomum* após 20 minutos de exposição nas concentrações de 1280 mg/L e 2560 mg/L, quando foi observada a imobilização dos parasitos. Nas concentrações de 320 e 640 mg/L, causando a imobilização total dos parasitos ocorreu somente após 2 horas da exposição *in vitro*, enquanto na menor concentração, 160 mg/L, ocorreu após 3 horas da exposição. Contudo, o início da mortalidade de monogenoideas no Controle 2 ocorreu em 2 horas, enquanto que, no Controle 1, ocorreu em 6 horas de exposição. A imobilização total dos parasitos nesses dois grupos controle ocorreu em nove horas de experimento (Tabela 2 e Figura 1).

Tabela 2. Ação antiparasitária *in vitro* do óleo essencial de *Lippia alba* contra parasitos de brânquias de *Colossoma macropomum*, em relação ao tempo de exposição.

Tempo	Tratamentos	Nº Parasitos vivos	Nº Parasitos mortos
0h	Água	76	0
	Água + Álcool	66	0
	160 mg/L	70	0
	320 mg/L	65	0
	640 mg/L	60	0
	1280 mg/L	75	0
	2560 mg/L	74	0
	1 hora	Água	76
Água + Álcool		66	0
160 mg/L		70	0
320 mg/L		65	0
640 mg/L		20	40
1280 mg/L		0	75
2560 mg/L		0	74
2 horas		Água	76
	Água + Álcool	63	3
	160 mg/L	66	4
	320 mg/L	0	65
	640 mg/L	0	60
	1280 mg/L	0	75
	2560 mg/L	0	74

Tabela 2. Continuação...

	Água	76	0
	Água + Álcool	60	6
	160 mg/L	0	70
	320 mg/L	0	65
	640 mg/L	0	60
	1280 mg/L	0	75
3 horas	2560 mg/L	0	74
	Água	8	68
	Água + Álcool	30	36
	160 mg/L	0	70
	320 mg/L	0	65
	640 mg/L	0	60
	1280 mg/L	0	75
6 horas	2560 mg/L	0	74
	Água	0	76
	Água + Álcool	0	66
	160 mg/L	0	70
	320 mg/L	0	65
	640 mg/L	0	60
	1280 mg/L	0	75
9 horas	2560 mg/L	0	74

**Figura 1.** Eficácia *in vitro* das diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba* contra monogenoideas de *Colossoma macropomum*.

3.2. Ação antiparasitária in vivo (banhos terapêuticos)

As brânquias de todos os peixes expostos a OE de *L. alba*, estavam naturalmente parasitadas por *I. multifiliis*, *A. spatulathus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis*, com variação na abundância entre os diferentes tratamentos. As concentrações 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*, após banhos terapêuticos de 30 minutos, reduziram a abundância de *I. multifiliis*, mas essa menor concentração teve efeito na abundância dessas três espécies de monogenoideas. Porém, o grupo água + álcool também teve eficácia de 29,1% na abundância desses ectoparasitos (Tabela 3).

Nos banhos terapêuticos os peixes apresentaram comportamento estático, permanecendo submersos no fundo dos tanques, impossibilitando assim banhos acima de 30 minutos. Porém, os peixes dos grupos controles, expostos a água ou água + álcool não apresentaram tal comportamento. Com o retorno do fluxo contínuo de água nos tanques, para eliminação do óleo essencial, os peixes expostos ao OE retornaram rapidamente a natação e não houve qualquer mortalidade durante e após o experimento.

Tabela 3. Prevalência (P%) e abundância média (AM) dos parasitos das brânquias de *Colossoma macropomum* expostos ao óleo essencial de *Lippia alba*.

Espécies de parasitos	Água (n=30)		Água+Álcool (n=30)		100 mg/L (n=30)		150 mg/L (n=30)	
	P (%)	AM	P (%)	AM	P (%)	AM	P (%)	AM
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	100	9.607,8±4.425,5 ^a	100	6.813,3±2.760,5 ^{ac}	100	5.693,8±2.256,7 ^{bc}	100	4.777,3±1.976,6 ^b
<i>Anacanthorus spatulathus</i>	100	279,5±102,5 ^b	100	256,8±94,3 ^a	100	177,1 ± 44,5 ^c	100	320,3±136,8 ^a
<i>Mymarothecium boegeri</i>	100	11,3±6,9 ^b	70,4	3,9±4,7 ^a	73,3	2,9±2,9 ^a	83,3	4,0±4,6 ^a
<i>Notozothecium janauachensis</i>	100	194,2±95,7 ^b	100	159±99,9 ^c	100	143, ±53,2 ^a	100	223,0±139,3 ^a

P: Prevalência, AM: Abundância média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Dunn ($p < 0,001$).

3.3. Efeitos dos banhos terapêuticos com *Lippia alba* nos parâmetros sanguíneos

Em *C. macropomum*, banhos de 30 minutos com 100 ou 150 mg/L de OE de *L. alba* aumentaram os níveis de glicose plasmática, incluindo o grupo controle 2. Os níveis de proteínas totais aumentaram somente nos peixes expostos a 150 mg/L. A hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos totais foram similares nos dois grupos controles, mas a hemoglobina no grupo controle 2 foi maior que nos dois grupos expostos ao OE de *L. alba*. Porém, o hematócrito e número de eritrócitos total nos peixes expostos a 100 e 150 mg/L foram menores quando comparados aos peixes exposto somente a água, enquanto o CHCM e número de trombócitos aumentaram. O número de leucócitos totais, linfócitos e eosinófilos diminuíram em relação a ambos os grupos controles, enquanto no grupo exposto a 150 mg/L de OE de *L. alba* houve aumento do número de neutrófilos (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros sanguíneos de *Colossoma macropomum* expostos ao óleo essencial de *Lippia alba* em banhos de 30 minutos.

Parâmetros	Água (n=15)	Água+Álcool (n=15)	100 mg/L (n=15)	150 mg/L (n=15)
Glicose (g/dL)	78,2 ± 17,2b	103,0 ± 25,0a	112,2 ± 13,6a	106,6 ± 8,9a
Proteínas (mg/dL)	2,5 ± 0,7a	2,7 ± 0,9a	2,5 ± 0,2a	3,0 ± 0,3b
Hemoglobina (g/dL)	6,8 ± 0,7ab	7,3 ± 0,9b	6,1 ± 0,9a	6,3 ± 1,1a
Hematócrito (%)	21,9 ± 2,3a	21,9 ± 2,4a	17,7 ± 1,5b	17,9 ± 1,9b
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	1,40 ± 0,40a	1,20 ± 0,03ab	1,00 ± 0,30b	1,0 0± 0,30b
VCM (fL)	170,2 ± 49,1a	190,7 ± 59,6a	186,5 ± 51,4a	187,5 ± 39,6a
CHCM (g/dL)	31,2 ± 4,1a	33,5 ± 5,9ab	34,7 ± 5,2b	35,3 ± 5,2b
Trombócitos (μL)	15.739 ± 4.626a	24.373 ± 5.460b	20.035 ± 5.927b	19.556,3 ± 5.922,2ab
Leucócitos (μL)	15.024 ± 4.414a	10.968 ± 2.457b	6.944 ± 2.540c	7.709 ± 2.323c
Linfócitos (μL)	10.435 ± 3.823a	5.980 ± 2.907b	2.167 ± 859b	1.722 ± 894b
Monócitos (μL)	1.901 ± 790a	1.547 ± 704a	1.257 ± 915a	1.679 ± 758a
Neutrófilos (μL)	2.510 ± 824b	2.535 ± 1.208b	3.425 ± 1.260ab	4.227 ± 1.309a
Eosinófilos (μL)	224 ± 124a	212 ± 185a	53 ± 53b	35 ± 34b
LG-PAS (μL)	98 ± 114a	69 ± 98a	42 ± 74,6a	45 ± 46a

Dados expressam valores médio ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ou teste de Holm-Sidak (p<0,05).

3.4. Efeitos histopatológicos nas brânquias após banhos terapêuticos com *Lippia alba*

Nas brânquias de *C. macropomum*, após os banhos terapêuticos de 30 minutos não houve diferenças no VMA entre todos os tratamentos e controles, mas após 24 h de recuperação ocorreu aumento nos valores do grupo de peixes exposto a água + álcool e nos grupos expostos a 100 ou 150 mg/L de *L. alba*. Após 30 minutos de banhos ocorreu aumento nos valores de IAH nos dos peixes expostos 100 ou 150 mg/L de *L. alba* quando comparados aos peixes expostos somente a água. Similarmente, após 24 da recuperação ocorreu aumento nos valores do IAH dos peixes expostos 100 ou 150 mg/L de *L. alba* e naqueles expostos a água + álcool, quando comparados aos peixes expostos somente a água (Tabela 5). Tais variações no VMA e IAH são devido a danos severos e frequentes nas brânquias dos peixes expostos ao OE, tais como hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio lamelar e aneurisma lamelar, ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose (Figura 2), além de proliferação de células mucosas e células de cloreto e hipertrofia lamelar foram alterações com menor frequência.

Tabela 5. Valor médio de alterações (VMA) e índice de alterações histopatológicas (IAH) nas brânquias de *Colossoma macropomum* expostos ao óleo essencial de *Lippia alba*.

Após 30 minutos dos banhos terapêuticos				
Tratamentos	N	VMA	IAH	Severidade das lesões de acordo com o IAH
Água	6	1,2 ± 0,4aA	7,2 ± 6,5aA	Funcionamento normal das brânquias
Água + Álcool	6	1,7 ± 0,5aA	12,5 ± 8,0aA	Danos leves a moderados nas brânquias
100 mg/L	6	2,2 ± 0,8aA	66,0 ± 62,0bB	Alterações severas nas brânquias
150 mg/L	6	2,3 ± 0,5aA	121,0 ± 5,0cB	Danos irreparáveis nas brânquias
Após recuperação de 24 horas dos banhos terapêuticos				
Água	6	1,5 ± 0,5aB	29,0 ± 44,0aA	Alterações moderadas a severas nas brânquias
Água + Álcool	6	2,8 ± 0,4aA	118,0 ± 4,0bB	Danos irreparáveis nas brânquias
100 mg/L	6	2,5 ± 0,5aA	123,0 ± 5,0bB	Danos irreparáveis nas brânquias
150 mg/L	6	2,8 ± 0,4aA	126,0 ± 2,0bB	Danos irreparáveis nas brânquias

Letras minúsculas similares, na mesma coluna, não indicam diferenças entre tratamentos, e letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças entre tempos, de acordo com o teste de Tukey (P<0,05).

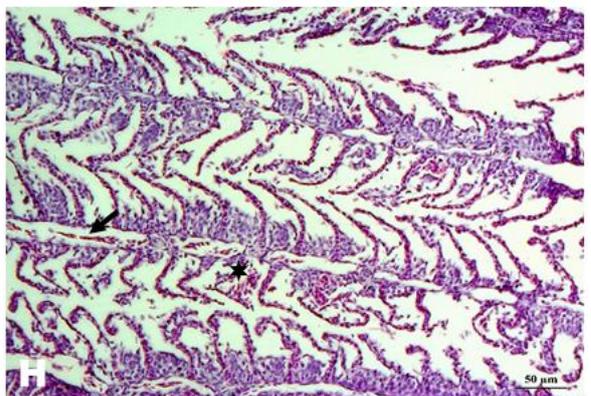
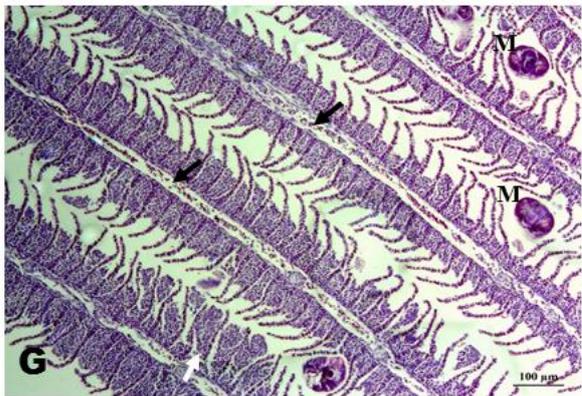
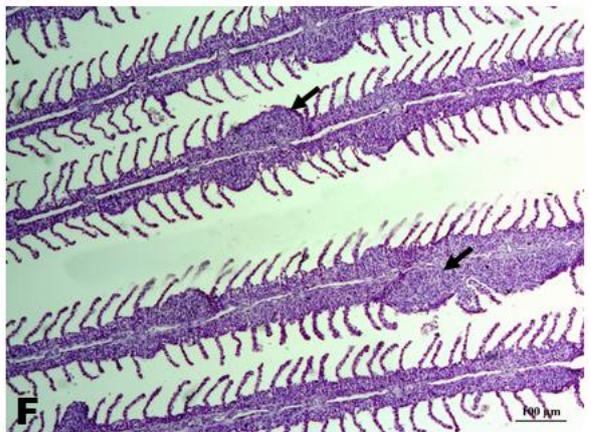
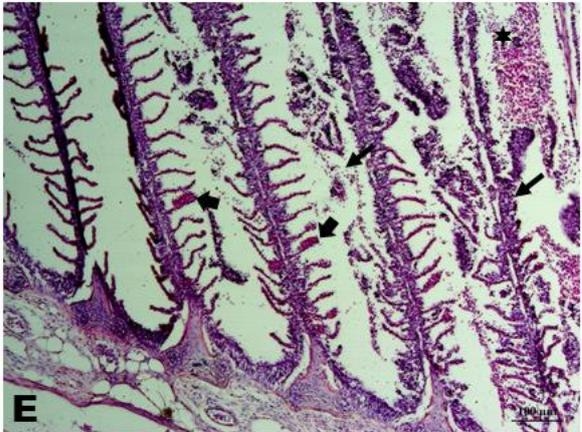
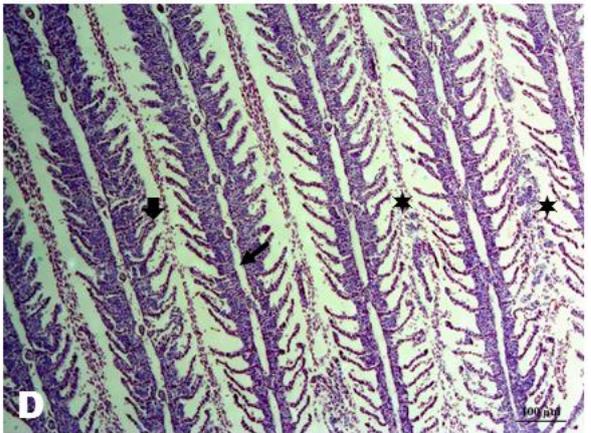
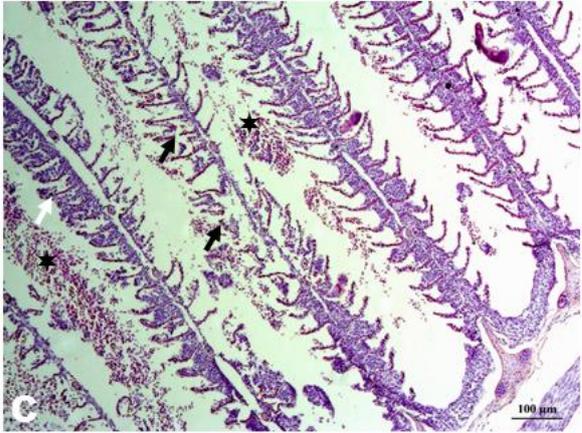
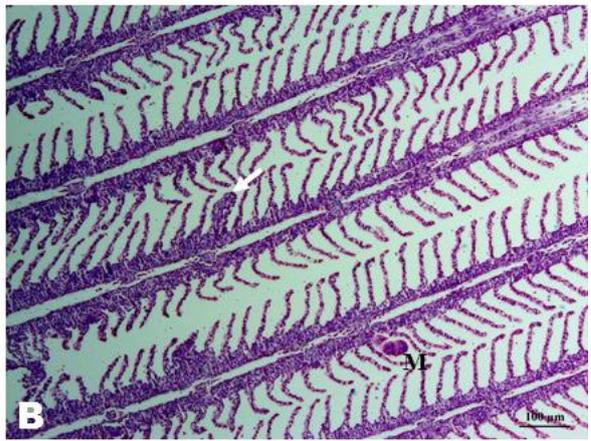
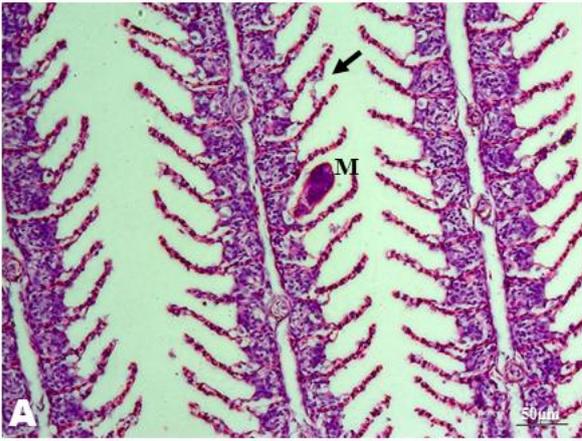


Figura 2A-H. Alterações histológicas nas brânquias de *Colossoma macropomum* expostos a óleo essencial de *Lippia alba*. **(A)** Monogenoidea (M) e descolamento epitelial (seta) em peixes expostos a água durante 30 minutos. **(B)** Monogenoidea (M) e hiperplasia lamelar (seta) em peixes expostos à água durante 30 minutos. **(C)** Presença de regiões com ampla necrose lamelar (setas pretas), hiperplasia epitelial com fusão lamelar (seta branca) e sangue oriundo de hemorragia lamelar (asterisco) em peixes expostos a água + álcool, após 24 horas do banho. **(D)** Vasodilatação do vaso sanguíneo central (seta longa), vasodilatação e congestão do vaso sanguíneo das lamelas secundárias, com extravazamento sanguíneo (seta curta) e hemorragia lamelar (estrelas) em peixes expostos a água + álcool, após 24 horas do banho. **(E)** Presença de extensas áreas de necrose lamelar (setas compridas), aneurismas (setas curtas) e hemorragia lamelar (asterisco) em peixes expostos a 100 mg/L de óleo essencial de *Lippia alba*, após 24 horas do banho. **(F)** Hiperplasia epitelial com fusão lamelar (setas) em peixes expostos a 150 mg/L de óleo essencial de *Lippia alba* durante 30 minutos. **(G)** Hiperplasia lamelar disseminada e fusão lamelar (seta branca) e vasodilatação central (seta branca) em peixes expostos a 150 mg/L óleo essencial de *Lippia alba*, após 24 horas do banho. **(H)** Necrose disseminada, vasodilatação central (seta) e ruptura do epitélio lamelar com hemorragia (asterisco) em peixes expostos a 150 mg/L óleo essencial de *Lippia alba*, após 24 horas do banho.

4. Discussão

Aquicultura é uma importante atividade econômica no Brasil, e tem crescido consideravelmente na última década. No entanto, a baixa qualidade ambiental tem ocasionado elevadas perdas ainda não estimadas para a indústria aquícola, devido às doenças nos peixes causadas por ectoparasitos monogenoideas e protozoários (Boijink et al., 2015; Hashimoto et al., 2016; Martins et al., 2002; Pinheiro et al., 2015). Porém, as principais estratégias de controle e tratamento dessas ectoparasitoses envolvem, em geral, diferentes quimioterápicos, que devido ao seu uso constante e de forma errônea tem levado a uma redução na atividade antiparasitária, além de causar morte aos peixes devido à toxicidade desses produtos químicos (Boijink et al., 2015; Steverding et al., 2005; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2014). Assim, a busca por produtos naturais antiparasitários tem despertado a atenção de diversos pesquisadores (Boijink et al., 2015; Hashimoto et al., 2016; Huang et al., 2013; Ji et al., 2012;

Steverding et al., 2005; Xiao-Feng et al., 2014; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2014; Zheng et al., 2015), pois pode ser uma alternativa aos produtos quimioterápicos.

Em ensaio *in vitro*, deste estudo, 100% da mortalidade de *A. spatulathus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis* exposto a 160 mg/L do OE de *L. alba*, a menor concentração usada, ocorreu após 3 h da exposição, enquanto nos parasitos exposto a água ou água + álcool absoluto (controles) após 9 h. Além disso, nos parasitos expostos a 1289 e 2560 mg/L, as maiores concentrações de OE de *L. alba* usadas, ocorreu 100% de mortalidade após 1 h. Porém, Hashimoto et al. (2016) relataram que 160 mg/L de OE de *Lippia sidoides* causou a completa mortalidade *in vitro* de *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis*, em *Oreochromis niloticus*, em aproximadamente 8 minutos, enquanto a maior concentração que casou 100% de mortalidade foi 320 mg/L do OE, que ocorreu em quase 2 minutos. Além disso, esses autores verificaram que a completa imobilização desses parasitos nos grupos expostos a água ou água + DMSO ocorreu em mais de 4 horas. Portanto, esses resultados mostram diferenças na resposta de parasitos distintos para óleos oriundos de espécies congêneras de *Lippia*.

Para *C. macropomum*, todas as concentrações de OE de *L. alba* mostraram 100% de eficácia *in vitro* contra espécies de monogenoideas. Porém, essa atividade anti-helmíntica foi dose-dependente; assim, duas concentrações de OE de *L. alba* foram testadas para banhos terapêuticos. Similarmente, extrato de *Euphorbia fischeriana* mostrou 87,3% de eficácia *in vitro* contra *Dactylogyrus vastator* de para *Carassius auratus* (Zhang et al., 2014). Apesar das plantas medicinais ou seus constituintes químicos majoritários isolados terem a vantagem da baixa toxicidade quando comparados aos produtos quimioterápicos (Huang et al., 2013; Zhang et al., 2013; Zheng et al., 2015), nem sempre as concentrações elevadas obtidas nos ensaios *in vitro* podem ser utilizadas no controle e tratamento antiparasitário em peixes, devido a sua toxicidade (Hashimoto et al., 2016; Ji et al., 2012).

Durante os banhos terapêuticos de *C. macropomum* com OE de *L. alba*, os peixes permaneceram estáticos devido ao efeito anestésico desse óleo (Azambuja et al., 2011; Cunha et al., 2010). Similar efeito anestésico do eugenol (Boijink et al., 2015) e OE de *L. sidoides* (Hashimoto et al., 2016) foi relatado para *C. macropomum* e *O. niloticus*, respectivamente. Conseqüentemente, somente duas baixas concentrações do OE de *L. alba* dos ensaios *in vitro* (100 e 150 mg/L), puderam ser usadas nos banhos terapêuticos, devido a toxicidade desse óleo essencial e seu efeito anestésico. Porém, como não existem estudos sobre a avaliação da

atividade antiparasitária de *L. alba*, este é o primeiro relato dessa atividade para essa planta medicinal.

Em *C. macropomum*, nos ensaios *in vivo*, todos os peixes dos diferentes tratamentos estavam com as brânquias infectadas por *M. boegeri*, *A. spatulathus*, *N. janauachensis* e *I. multifiliis*. Nos peixes expostos a 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*, durante 30 minutos, a eficácia contra *I. multifiliis* foi de 40,7% e 50,3%, respectivamente. Compostos bioativos derivados de *Toddalia asiática* também mostraram uma baixa eficácia *in vivo* similar contra *I. multifiliis*, embora *in vitro* a eficácia tenha sido de 100% (Xiao-Feng et al., 2014). Porém, Zheng et al. (2015) demonstraram uma redução na prevalência de *I. multifiliis* variando de 27,7% a 100% após exposição dos parasitos a compostos bioativos derivados de *Costus speciosus*, enquanto a eficácia *in vivo* foi somente 16,7 e 26,7% para *Ctenopharyngodon idella* e *C. auratus*, respectivamente. Além disso, nos peixes deste estudo expostos a 100 mg/L de OE de *L. alba* a eficácia contra monogenoideas foi baixa, 14,0%. Hashimoto et al. (2016) também encontraram baixa eficácia (1,9%) de 20 mg/L de OE de *L. sidoides* contra monogenoideas de tilapia do Nilo. Porém, exposição de *C. auratus* a extratos de *Cinnamomum cassia*, *Lindera aggregata*, *Pseudolarix kaempferi*, *Caesalpinia sappan*, *Lysima chiachristinae*, *Cuscuta chinensis*, *Artemisia argyic* e *Eupatorium fortunei* mostraram 100% de eficácia contra *Dactylogyrus intermedius* (Huang et al., 2013; Ji et al., 2012).

Nos peixes deste estudo, expostos a 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*, por 30 minutos, além da baixa eficácia contra monogenoideas houve severas alterações estruturais nas brânquias, órgão que participa da respiração, osmoregulação e excreção nos peixes (Fiuza et al., 2011; Kumar et al., 2010). Além disso, foi observado intenso parasitismo por monogenoideas e *I. multifiliis* em todos os tratamentos, que também influenciou a integridade tecidual das brânquias. Em *C. macropomum* expostos somente a água ocorreu somente hiperplasia do epitélio, fusão e ruptura do epitélio lamelar com hemorragias e descolamento epitelial, lesões que tiveram uma distribuição de forma dispersa nas brânquias, havendo regiões mais lesionadas do que outras e sem predomínio desses em área específica desse órgão. Alterações similares também foram descritas para *Rachycentron canadum* (Guerra-Santos et al., 2012) e *Piaractus brachypomus* (Verján et al., 2001) parasitados. Porém, nos peixes expostos a água + álcool houve lesões tardias no epitélio branquial de *C. macropomum*, após 24 de exposição. Porém, nos peixes expostos ao OE de *L. alba* severidade das lesões de brânquias foi diretamente proporcional ao tempo de exposição e concentração

desse OE. Após 24 dos banhos, as alterações nas brânquias foram mais severas e irreparáveis no tratamento com 150 mg/L de OE de *L. alba*. Portanto, tais alterações estruturais nas brânquias de *C. macropomum* foram causadas pela toxicidade do OE de *L. alba* e potencializada pelo diluente desse OE. Ação similar de diferentes diluentes foi descrita para *Heteropneustes fossilis* expostos ao extrato de *Azadirachta indica* (Kumar et al., 2010) e *O. niloticus* expostos ao extrato de *Eugenia uniflora* (Fiuza et al., 2011).

Em *C. macropomum*, após banhos com OE de *L. alba*, ocorreu aumento nos níveis de glicose plasmática, bem como nos peixes expostos a água + álcool, devido ao estresse (Barton e Iwama, 1991; Hashimoto et al., 2016), causado pelas alterações branquiais. Porém, o número de eritrócitos totais e hematócrito decresceram devido às lesões nas brânquias, principalmente hemorragias, enquanto o CHCM e número de trombócitos aumentaram, na tentativa de retornar a homeostase e hemostasia. Estudos similares com *O. niloticus* também relataram aumento nos níveis de glicose após banho de 10 minutos com 20 mg/L de OE de *L. sidoides*, causado pelo estresse. Por outro lado, descreveram aumento do número de eritrócitos e hematócrito, com redução do número de trombócitos totais (Hashimoto et al., 2016). Além disso, nos peixes expostos ao OE de *L. alba* o número de leucócitos totais diminuiu, devido a uma redução no número de linfócitos e eosinófilos, enquanto nos peixes exposto a 150 mg/L do OE de *L. alba* o número de neutrófilos aumentou, em resposta a severidade das alterações nas brânquias (Ranzani-Paiva et al., 2013). Similar resposta de neutrófilos, a primeira linha de defesa do organismo contra infecções e lesões teciduais (Ranzani-Paiva et al., 2013; Tavares-Dias et al., 1999) também foi relatada para *O. niloticus* expostos ao OE de *L. sidoides*, mas sem qualquer alteração no número de leucócitos (Hashimoto et al., 2016).

Em conclusão, OE de *L. alba* demonstrou atividade antiparasitária contra parasitos de brânquias do tambaqui *in vitro*, mas *in vivo* sua eficácia antiparasitária foi relativamente potencializada pelo diluente desse óleo, a exemplo do que ocorreu em outros estudos que usaram outros diferentes diluentes (Hashimoto et al., 2016; Steverding et al., 2005). Além disso, OE de *L. alba* causou alterações sanguíneas e severos danos estruturais nas brânquias dos peixes, que não são reversíveis em 24 h após exposição. Conseqüentemente, OE de *L. alba* não pode ser recomendado para controle e tratamento antiparasitário, exceto se usado de uma forma que reduza sua toxicidade e efeitos deletérios as brânquias do tambaqui. Portanto, como produtos fitoterápicos são fontes promissoras de princípios bioativos que podem ser

úteis na aquicultura, estudos devem ser conduzidos para investigar a melhor forma de uso terapêutico desse OE para em peixes, como uma maior efetividade antiparasitária e menor toxicidade.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (#472054/2013-9) e pela bolsa PQ concedida a M. Tavares-Dias.

6. Referências

Azambuja, C.R., Mattiazzi, J., Riffel, A.P.K., Finamor, I.A., Garcia, L.O., Heldwein, C.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., Llesuy, S.F., 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture*, 319, 156-161.

Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and affects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 1, 3-26.

Boijink, C.L., Miranda, W.S.C., Chagas, E.C., Dairiki, J.K., Inoue, L.A.K.A., 2015. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture*. 438, 138-140.

Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostack A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83(4), 575-583.

Cunha, M.A., Barros, F.M.C., Garcia, L.O., Veeck, A.P.L., Heinzmann, B.M., Loro, V.L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B., 2010. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 306, 403-406.

Eiras, J.C.; Takemoto R.M., Pavanelli G.C., 2006. Métodos de estudos e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Editora UEM. Maringá, 173 pp.

- Escobar, P., Leal, S.M., Herrera, L.V., Martinez, J.R., Stashenko, E., 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Men. Inst. Oswaldo Cruz.* 105(2), 184-190.
- Fabri, R.L., Nogueira, M. S., Moreira, J.R., Bouzada, M.L.M, Scio, E., 2011. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *J. Med. Food.* 14 (7/8), 840-846.
- Fiuza, T.S.; Silva, P.C.; Paula, J.R.; Tresvenzol, L.M.F.; Souto, M.E.D.; Sabóia-Morais, S.M.T., 2011. Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L. tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) – Myrtaceae. *Rev. Brasil. Pl. Med.* 13(4): 389-395
- Guerra-Santos, B., Albinati R.C.B., Moreira, E.L.T., Lima, F.W.M., Azevedo, T.M.P., Costa, D.S.P, Medeiros, S.D.C, Lira, A.D., 2012. Parâmetros hematológicos e alterações histopatológicas em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com amyloodiniose. *Pesq. Vet. Bras.* 32 (11), 1184-1190.
- Haldar, S., Kar, B., Dolai, N., Kumar, R.B.S., Behera, B., Haldar, P.k., 2012. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* S667-S670.
- Hashimoto, G.S.O., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Achille, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture.* 450, 182-186.
- Huang, A.G., Yi, Y.L., Ling, F., Lu, L., Zhang, Q.Z., Wang, G.X., 2013. Screening of plant extracts for anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res.* 112, 4065-4072.

Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G.X., Chen, P., 2012. Screening of 42 medicinal plants for *in vivo* anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol. Res. 111, 97-104.

Kumar, A.; Prasad, M. R.; Srivastava, K.; Tripathi, S.; Srivastav, A.K., 2010. Branchial histopathological study of catfish *Heteropneustes fossilis* following exposure to purified neem extract, azadirachtin. World J. Zool. 5(4): 239-243.

Mamun-Or-Rashid, A.N.M., Sem, M.K., Jamal, M.A.H.M., Nasrin, S., 2013. A comprehensive ethno-pharmacological review on *Lippia alba* M. Intern. J. Biom. Mat. Res. 1(1), 14-20.

Martins, M.L., Moraes, F.R., Fujimoto, R.Y., Nomura, D.T., Fenerick Jr., J., 2002. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho X *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. B. Inst. Pesca. 28(2), 195-204.

Nogueira, M.A., Diaz, G., Sakumo, L., 2007. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. JAPS. V. 28, n. 3, 273-278.

Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Santos, S.S., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, C.S., Alviano, D.S., Leitão, S.G., 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. J. Ethnopharm. 108, 103-108.

Pinheiro, D.A., Cavero, B.A.S., Vargas, L., Braccini, G.L., Yoshioka, E.T.O., Oliveira, M.S.B., Tavares-Dias, M., 2015. Performance, parasitic infections, hematology and hepatic histology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) fed on homeopathic product. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 9(4), 82-90.

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution, p.339-352. In: Muller R. & Lloyd R. (Eds), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Fishing News Books, Oxford.

- Ranzani-Paiva, M.J.T., Padua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análises hematológicas em peixes. EDUEM: Maringá, São Paulo. 135p.
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. J. Aqua. Ecosys. Stress and Recovery. 6, 75-86.
- Steverding, D., Morgan, E., Tkacynski, Walder, F., Tinsley, R., 2005. Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp., infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. Dis. Aquat. Org. 66, 29-32.
- Tavares, I.B., Momenté, V.G., Nascimento do, I.R., 2011. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agronômicos. Rev. Brasil. Tecn. Apl. Ciên. Agr. 4, 204-220.
- Tavares-Dias, M., Sandrin E.F.S., Campos Filho E., 1999. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. Revta Brasil. Zool. 16, 175-84.
- Verján, N., Iregui, C.A., Rey, A.L., Donado, P., 2001. Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente. Revista AquaTIC, n.15.
- Xiao-feng, S., Qin-feng, M., Yuan-huan, K., Yu, B., Yun-hang, G., Wei-li, W., Ai-dong, Q., 2014. Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). Vet. Parasitol. 199, 250-254.
- Zhang, Q., Xu, D.H., Klesius, P.H., 2013. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Vet. Parasitol. 198, 45-53.

Zhang, X.P., Li, W.X., Ai, T.S., Zou, H., Wu, S.G., Wang, G.T., 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture*. 420-421, 302-307.

Zheng, W., Yan, C., Zhang, Y., Li, Ze-hong, Li, Zhongqiang, Li, X., Wang, X., Chen, W., Yu, X., 2015. Antiparasitic efficacy of Gracillin and Zingiberis newsaponin from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology*. 142, 473-479.

ARTIGO 3

Atividade antiparasitária, histopatologia e fisiologia em *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae) expostos a óleo essencial de *Lippia sidoides* (Verbenaceae)

Artigo a ser submetido ao periódico “Veterinary Parasitology”

Atividade antiparasitária, histopatologia e fisiologia em *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae) expostos a óleo essencial de *Lippia sidoides* (Verbenaceae)

Bruna Viana Soares¹, Lígia Rigôr Neves², Drielly de Oliveira Ferreira², Marcos Sidney Brito Oliveira³, Francisco Célio Maia Chaves⁴, Edsandra Campos Chagas⁴, Raissa Alves Gonçalves⁵ & Marcos Tavares-Dias^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brasil.

²Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Embrapa Amapá Macapá, AP, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos (PPG-RACAM), Universidade do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, PA, Brasil.

⁴Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil

⁵Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil

Autor para correspondência: Marcos Tavares-Dias

Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, 2600, 68903-419, Macapá, AP, Brasil. E-mails: marcos.tavares@embrapa.br

RESUMO

A atividade antiparasitária do óleo essencial de *Lippia sidoides* *in vivo* e *in vitro* e alterações sanguíneas e histológicas foram avaliadas em *Colossoma macropomum*. Concentrações 10, 20, 40, 80, 160 e 320 mg/L do óleo essencial foram testadas *in vitro* contra monogenoideas das brânquias dos peixes. Concentrações 320 e 160 mg/L de óleo essencial de *L. sidoides* foram 100% efetivos contra monogenoideas *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* em 10 minutos e 1 h de exposição, respectivamente. Porém, a efetividade de 100% das concentrações de 80 mg/L e 40 mg/L ocorreu em 3 e 6 h, respectivamente. Nos controles usando água dos tanques e água + álcool, o início da mortalidade desses monogenoideas ocorreu em 6 e 3 h, respectivamente. Nos testes *in vivo*, alevinos foram submetidos a banhos de 60 minutos com 10 mg/L e 15 minutos com 20 mg/L de óleo essencial de *L. sidoides*. Tais banhos terapêuticos não foram eficientes contra *Ichthyophthirius multifiliis*, *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri* das brânquias de *C. macropomum*. Além disso, 10 e 20 mg/L de óleo essencial de *L. sidoides* teve efeito anestésico nos peixes e não influenciou os níveis de glicose e proteínas totais plasmática, mas reduziu o número de eritrócitos totais nos peixes expostos a essa maior concentração desse óleo essencial. Foram observados alterações severas e danos irreversíveis nas brânquias dos peixes logo após os banhos com óleo essencial de *L. sidoides* e após 24 h de recuperação. As lesões mais comuns foram hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio e aneurisma lamelar, ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose, proliferação de células mucosas e células de cloreto e hipertrofia lamelar. Portanto, como óleo essencial de *L. sidoides* tem atividade antiparasitária *in vitro* e baixas concentrações mostraram efeitos tóxicos, deve ser investigado o potencial bioativo de seus principais componentes químicos, bem como formas mais eficientes de sua administração em banhos terapêuticos para eliminação de parasitos em peixes.

PALAVRAS-CHAVE: Monogenoidea, Parasitos, Planta medicinal, Sangue, Tambaqui.

1. Introdução

O uso de plantas medicinais vem ganhando cada vez mais espaço em aquicultura devido à grande diversidade de componentes químicos que conferem diferentes ações, incluindo atividade terapêutica. Na piscicultura, a busca por substâncias naturais com ação antiparasitária vem ganhando destaque devido aos seus efeitos potenciais e aos danos causados pelos quimioterápicos, que podem prejudicar o meio ambiente e a saúde dos peixes e do homem. Óleos essenciais extraídos de espécies de *Lippia* (Verbenaceae) possuem grande potencial bioativo, assim, podem vir a ser fitoterápicos promissores para uso na piscicultura. *Lippia* spp. tem atividades antimicrobiana, antiparasitária, anestésica, analgésica, antiinflamatória e antitumoral (Cunha et al. 2010; Becker et al., 2012; Soares e Tavares-Dias, 2013; Hashimoto et al., 2016; Soares et al., 2016).

Lippia sidoides Cham. 1832, conhecida como alecrim-pimenta, alecrim-bravo, estrepa-cavalo e alecrim-grande, tem uso popular para tratar infecções e outras enfermidades, das quais muitas tiveram atividades comprovadas cientificamente (Silva et al., 2006; Lobo et al., 2014; Veras et al., 2014). Trata-se de um arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço, próprio da vegetação do semi-árido, comum na Caatinga da região Nordeste do Brasil. Apresenta folhas aromáticas e picantes, opostas, simples e pecioladas; flores pequenas, esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto nas axilas das folhas; além de frutos extremamente pequenos que produzem sementes pequenas que raramente germinam (Camurça-Vasconcelos et al., 2007; Fontenelle et al., 2007).

Estudos demonstram que óleo essencial e extratos de *L. sidoides* possuem ação antiparasitária contra carrapatos (Gomes et al., 2012, 2014), formas de *Leishmania* (Oliveira et al., 2009; Farias-Júnior et al., 2012), helmintos de caprinos e ovinos (Camurça-Vasconcelos et al., 2007) e monogenoideas de *Oreochromis niloticus* (Hashimoto et al., 2016); além de atividade contra fungos e bactérias (Fabri et al., 2011; Fernandes et al., 2012; Funari et al., 2012; Fontenele et al., 2007). Porém, *L. sidoides* não tem sido usada contra monogenoideas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (tambaqui), um importante peixe para a piscicultura região da Amazônia.

Colossoma macropomum é uma espécie de Serassalmidae nativo da Amazônia que, devido à sua rusticidade e alimentação onívora, tem sido largamente cultivado em diferentes sistemas intensivos, favorecendo a disseminação de doenças parasitárias devido às altas densidades usadas nesses sistemas (Dias et al., 2015). Assim, tem sido frequentemente

parasitado por *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa), *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni* (Monogenoidea), que podem causar perdas econômicas (Boijink et al., 2015; Martins et al., 2002; Soares et al. 2016), ainda não estimadas. Devido à necessidade de tratar eficientemente tais parasitoses de *C. macropomum*, a terapia herbal pode ser uma alternativa aos quimioterápicos (Soares et al., 2016). Portanto, devido ao potencial bioativo do óleo essencial (OE) de *L. sidoides* contra diferentes patógenos, faz-se necessário estudar a sua ação contra ectoparasitos de tabaqui. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antiparasitária, *in vivo* e *in vitro*, do OE de *L. sidoides*, bem como as possíveis alterações sanguíneas e histopatológicas nas brânquias de *C. macropomum*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção e composição química do OE de *L. sidoides*

O cultivo da *L. sidoides* e a extração do OE foram realizados no Setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, estado do Amazonas, Brasil. O óleo essencial foi extraído das folhas e inflorescências da *L. sidoides* através de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. A análise química do OE foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os componentes químicos do OE de *L. sidoides*, usado neste estudo, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Constituição química do óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Pico	Teor %	IR	Identificação
1	1,1	854	(<i>E</i>)-2-hexenal
2	0,9	928	alfa-tujeno
3	2,0	989	mirceno
4	1,1	1016	alfa-terpineno
5	11,7	1024	p-cimeno
6	3,6	1059	gama-terpineno
7	1,4	1144	ipsdienol
8	1,2	1175	4-terpineol
9	1,1	1232	timil-metil-éter
10	4,6	1241	carvona
11	64,5	1289	timol
12	4,9	1414	(<i>E</i>)-beta-cariofileno
13	1,9	1576	óxido de cariofileno
Total identificado (%): 100			

2.2. Peixes e aclimação

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Aquicultura e Pesca da Embrapa Amapá, Macapá, estado do Amapá, Brasil. Alevinos de *C. macropomum* (± 30 g) foram obtidos de piscicultura comercial. Os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanques de 500 L de água e alimentados com ração contendo 32% proteína bruta (PB). Nos tanques foi mantido o sistema constante de renovação da água, e os parâmetros da água foram monitorados: temperatura média $30,7 \pm 0,2$ °C, oxigênio dissolvido $5,6 \pm 0,4$ mg/L, pH $5,3 \pm 0,2$, amônia $0,4 \pm 0,2$ mg/L, alcalinidade $10,0 \pm 0$ mg/L e dureza $10,0 \pm 0$ mg/L. Diariamente foi feita uma remoção de matéria orgânica acumulada no fundo dos tanques.

2.3. Ensaio *in vitro* com OE de *L. sidoides* e monogenoideas de *C. macropomum*

Para avaliar o tempo de exposição e as concentrações de OE de *L. sidoides* que causam mortalidade em espécies de monogenoideas das brânquias de 24 *C. macropomum* ($15,7 \pm 1,2$ cm e $78,2 \pm 10,7$ g) foram conduzidos testes *in vitro*. Para tal, utilizou-se dois grupos controles, um com água do tanque e outro com água do tanque + álcool etílico absoluto, e seis diferentes concentrações de OE de *L. sidoides* (10, 20, 40, 80, 160 e 320 mg/L), usando três repetições para cada tratamento, de acordo com a metodologia utilizada por Soares et al. (2016). Este solvente foi usado na proporção de 1:10.

A partir dos resultados *in vitro* foram determinadas as concentrações usadas nos banhos terapêuticos com OE de *L. sidoides*, após um teste prévio da tolerância dos peixes.

2.4. Ensaio *in vivo* com *C. macropomum*

Alevinos ($13,2 \pm 1,1$ cm e $42,4 \pm 10,1$ g), naturalmente parasitados, foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques de 100 L, mantidos em sistema aberto de água durante 48 horas. Para este ensaio, foram usados quatro tratamentos e três repetições, com 20 peixes por repetição, e os peixes foram mantidos em sistema estático de água (temperatura média $29,3 \pm 0,1$ °C, oxigênio dissolvido $6,3 \pm 0,06$ mg/L, pH $5,2 \pm 0,09$, amônia $0,3 \pm 0,12$ mg/L, alcalinidade $10,0 \pm 0$ mg/L e dureza $10,0 \pm 0$ mg/L). Os tratamentos são os seguintes: grupos controles com água do tanque ou com água + álcool etílico absoluto (1:10), o solvente usado para diluição do OE, 10 e 20 mg/L de OE de *L. sidoides*. Os peixes submetidos à concentração de 10 mg/L e 20 mg/l foram expostos ao banho de OE de *L. sidoides* durante 60 e 15 minutos, respectivamente, enquanto que os peixes dos tratamentos controle

permaneceram no banho por 60 minutos. Após os tempos dos banhos, a água dos tanques foi mantida em fluxo contínuo e 10 peixes de cada repetição, dos diferentes tratamentos, foram usados para coleta das brânquias, fixadas em formalina 5%, para quantificação e identificação dos parasitos. Os parasitos foram preparados para identificação usando recomendações prévias (Eiras et al., 2006). Após quantificação dos parasitos, foram calculados prevalência e intensidade média de infecção (Bush et al., 1997). A eficácia de cada tratamento foi calculada (Zhang et al., 2014).

A outra parte dos peixes foi usada para análises sanguíneas e histopatológicas.

As concentrações *in vitro*, previamente testadas, mostram baixa tolerância dos peixes ao OE de *L. sidoides*; assim, somente concentrações 10 e 20 mg/L puderam ser usadas nos banhos terapêuticos para tambaqui.

2.5. Procedimentos de análises dos parâmetros sanguíneos de *C. macropomum* após exposição ao OE de *L. sidoides*

Após os banhos terapêuticos de 15 e 60 minutos com 20 e 10 mg/L de OE de *L. sidoides*, respectivamente, e de 60 minutos para os grupos controle, cinco peixes de cada repetição (15 peixes por tratamento) foram usados para análises sanguínea. De cada peixe foi colhida uma amostra de sangue por punção do vaso caudal, utilizando seringas contendo EDTA (10%), que foi dividida em duas alíquotas. Uma alíquota foi usada para contagem de eritrócitos totais em homocitômetro, determinação do hematócrito usando o método de microhematócrito e concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina. Com esses dados foram calculados índices hematimétricos de Wintrobe: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas pancromicamente com uma combinação de May Grünwald-Giemsa-Wright (Ranzani-Paiva et al., 2013) para contagem diferencial de leucócitos em até 200 células de interesse em cada extensão. A identificação e nomenclatura das populações de leucócitos seguiram as recomendações de Tavares-Dias et al. (1999). As extensões foram também usadas para contagem do número de leucócitos e trombócitos totais (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A segunda alíquota de sangue foi centrifugada a 75 G, para obtenção do plasma e para análise dos níveis de glicose e proteínas plasmáticas totais. A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico de glicose oxidase usando kit comercial

(Biotécnica, MG, Brasil). A concentração de proteínas plasmáticas totais foi determinada pelo método de biureto usando kit comercial (Biotécnica, MG, Brasil). Para ambas as análises bioquímicas, a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

2.6. Procedimentos de análises histopatológicas das brânquias de C. macropomum após exposição ao OE de L. sidoides

Após os banhos terapêuticos de 15 e 60 minutos com 20 e 10 mg/L de OE de *L. sidoides*, respectivamente, e de 60 minutos para os grupos controle, 6 peixes de cada tratamento (2 peixes de cada repetição) foram usados para coleta dos arcos branquiais para análises histopatológicas. Após 24 h desses banhos terapêuticos, outros 6 peixes por tratamento (2 peixes de cada repetição) foram usados para coleta dos arcos branquiais para análises histopatológicas (recuperação). Esses peixes usados na recuperação estavam mantidos nos tanques com água de fluxo contínuo e foram alimentados.

O primeiro arco branquial direito de cada peixe foi coletado e fixado em formalina tamponada (10%), para análises histopatológicas. Os arcos branquiais foram desidratados através de uma série gradual de etanol e xilol e, em seguida, inclusos em parafina, para obtenção de cortes consecutivos seriados em micrótomo. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio de luz comum (Soares et al., 2016).

A análise histopatológica foi realizada de forma semiquantitativa usando o valor médio de alteração (VMA) (Schwaiger et al., 1997) e índice de alteração histopatológica (IAH) (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

2.7. Análises estatísticas

Todos os dados foram previamente avaliados nos pressupostos de normalidade e homocedasticidade usando Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para os dados que não seguiram padrão de distribuição normal foi usada análise de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Ação antiparasitária *in vitro* do OE de *L. sidoides*

No teste *in vitro*, OE de *L. sidoides* mostrou 100% de atividade anti-helmíntica contra monogenoideas *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri* das brânquias de *C. macropomum*, após 10 minutos de exposição na concentração de 320 mg/L, e após 1 e 3 horas de exposição nas concentrações de 160 e 80 mg/L, respectivamente, quando foi observada a imobilização total dos parasitos. Na concentração de 40 mg/L, a imobilização total dos parasitos ocorreu somente em 6 horas da exposição *in vitro*, enquanto nas menores concentrações, ocorreu após 6 horas da exposição. Contudo, nos peixes expostos somente a água + álcool (controle), o início da mortalidade dos monogenoideas ocorreu em 3 horas, enquanto que no nos peixes expostos somente a água dos tanques de cultivo (controle), ocorreu em 6 horas de exposição. A imobilização total dos parasitos nesses dois grupos controle ocorreu em mais de 8 horas de experimento (Figura 1 e Tabela 2).

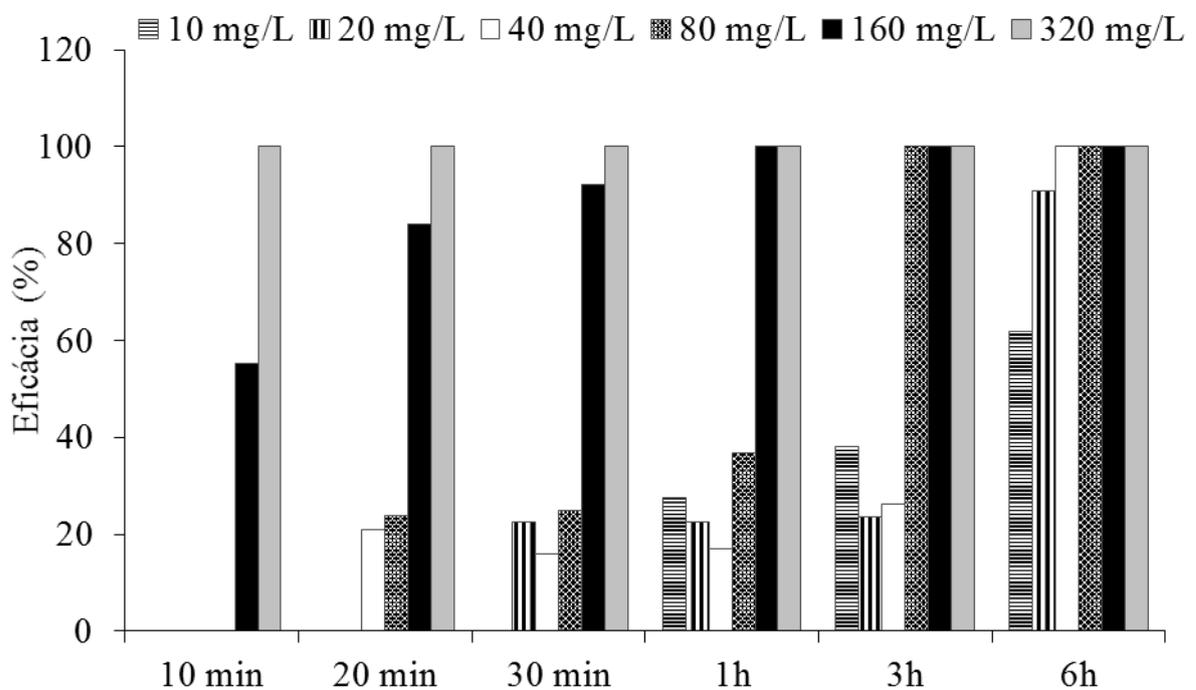


Figura 1. Eficácia *in vitro* das diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia sidoides* contra monogenoideas das brânquias de *Colossoma macropomum*.

Tabela 2. Ação antiparasitária *in vitro* do óleo essencial de *Lippia sidoides* contra parasitos de brânquias de *Colossoma macropomum*, em relação ao tempo de exposição.

Tempo	Tratamentos	Parasitos vivos	Mortalidade (%)
0h	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22 ± 2,6	0
	10 mg/L	20 ± 0,0	0
	20 mg/L	20 ± 0,0	0
	40 mg/L	21,7 ± 2,9	0
	80 mg/L	21 ± 1,7	0
	160 mg/L	20,7 ± 12	0
	320 mg/L	20,3 ± 06	0
10 min	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	20 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	40 mg/L	21,7 ± 2,9	0
	80 mg/L	19,3 ± 1,2	8,1
	160 mg/L	8,0 ± 7,5	61,3
	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
20 min	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	20 mg/L	19,7 ± 0,6	1,5
	40 mg/L	21,3 ± 3,2	1,8
	80 mg/L	19,3 ± 1,2	8,1
	160 mg/L	3,3 ± 3,5	84
	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
30 min	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	20 mg/L	19,7 ± 0,6	1,5
	40 mg/L	21,3 ± 3,2	1,8
	80 mg/L	19,0 ± 1,7	9,5
	160 mg/L	2,0 ± 3,5	90,3
	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
1 hora	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	18,3 ± 1,5	8,5
	20 mg/L	19,7 ± 0,6	1,5
	40 mg/L	21,0 ± 2,6	3,2
	80 mg/L	16,0 ± 5,3	23,8
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100

Tabela 2. Continuação...

	Água	25,0 ± 5,0	1,2
	Água + álcool	20,0 ± 5,0	9,1
	10 mg/L	14,7 ± 6,8	26,5
	20 mg/L	17,3 ± 2,1	13,5
	40 mg/L	18,7 ± 3,1	13,8
	80 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
3 horas	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	Água	4,7 ± 4,6	81,4
	Água + álcool	12,0 ± 9,5	45,5
	10 mg/L	7,7 ± 4,9	61,5
	20 mg/L	3,0 ± 3,6	85
	40 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	80 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
6 horas	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	Água	1,3 ± 2,3	94,9
	Água + álcool	1,3 ± 1,5	94,1
	10 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	20 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	40 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	80 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
8 horas	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100

3.2. Ação antiparasitária após exposição de *C. macropomum* ao OE de *L. sidoides*

As brânquias dos peixes expostos ao OE de *L. sidoides* estavam naturalmente parasitadas por *I. multifiliis*, *A. spatulatus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis*, mas não houve diferenças na abundância e prevalência entre os diferentes tratamentos (Tabela 3).

Nos banhos terapêuticos, os peixes apresentaram o seguinte comportamento: normal no controle com água, excitação moderada no controle com água + álcool, letargia na concentração de 10 mg/L, e submersão no fundo dos tanques na concentração de 20 mg/L. Com o retorno do fluxo contínuo de água nos tanques, para eliminação do óleo essencial, os peixes expostos ao OE de *L. sidoides* retornaram rapidamente a natação normal, e não houve qualquer mortalidade durante e após o experimento.

Tabela 3. Prevalência (P%) e abundância média (AM) dos parasitos das brânquias de *Colossoma macropomum* expostos ao óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Espécies de parasitos	Água (n = 30) 60 minutos		Água+álcool (n = 30) 60 minutos		10 mg/mL (n = 30) 60 minutos		20 mg/mL (n = 30) 15 minutos	
	P (%)	AM	P (%)	AM	P (%)	AM	P (%)	AM
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	100	639,1 ± 561,3a	100	451,3 ± 410,7a	93,3	410,5 ± 329,3a	96,7	469,4 ± 320,7a
<i>Anacanthorus spatulathus</i>	100	112,0 ± 83,0a	100	83,4 ± 68,8a	100	131,5 ± 112,9a	100	105,3 ± 78,2a
<i>Mymarothecium boegeri</i>	83,3	16,5 ± 17,2a	96,7	18,2 ± 21,8a	86,7	6,6 ± 6,9a	86,7	11,9 ± 13,0a
<i>Notozothecium janauachensis</i>	96,7	118,2 ± 91,3a	100	107,0 ± 73,8a	100	151,5 ± 126,3a	100	119,6 ± 68,0a

P: Prevalência, AM: Abundância média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.3. Efeitos dos banhos com OE de *L. sidoides* nos parâmetros sanguíneos

Em *C. macropomum*, banhos de 60 minutos com 10 mg/L e de 15 minutos com 20 mg/L de OE de *L. sidoides* não influenciaram os níveis de glicose e proteínas totais plasmática. O número de eritrócitos nos peixes do tratamento com 20 mg/L foi inferior aos outros tratamentos, mas o hematócrito e hemoglobina desse tratamento foram semelhantes aos dos tratamentos com água e 10 mg/L de OE de *L. sidoides*. Em relação ao VCM, o tratamento com 20 mg/L de OE de *L. sidoides* apresentou valores superiores aos demais tratamentos, mas não houve diferença entre os valores de CHCM (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros sanguíneos de *Colossoma macropomum* submetidos a banho com óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Parâmetros	Água	Água + álcool	10 mg/L	20 mg/L
Glicose (g/dL)	67,4 ± 12,1a	80,2 ± 21,0a	63,7 ± 15,8a	64,6 ± 6,0a
Proteínas (mg/dL)	2,5 ± 0,4a	2,4 ± 0,4a	2,4 ± 0,2a	2,3 ± 0,4a
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	1,3 ± 0,3a	1,2 ± 0,3a	1,0 ± 0,15a	0,6 ± 0,3b
Hemoglobina (g/dL)	6,9 ± 0,9ab	7,0 ± 0,8a	5,8 ± 0,6c	6,2 ± 0,7bc
Hematócrito (%)	30,1 ± 4,9ab	30,2 ± 1,7a	26,5 ± 2,0c	26,9 ± 2,8bc
VCM (fL)	278,6 ± 136,4a	266,4 ± 56,3a	267,0 ± 41,8a	546,4 ± 355,8b
CHCM (g/dL)	23,2 ± 3,5a	23,3 ± 2,3a	21,8 ± 2,2a	23,2 ± 2,2a

Dados expressam valores médio ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.4. Efeitos histopatológicos nas brânquias de *C. macropomum* expostos ao OE de *L. sidoides*

Logo após os banhos terapêuticos verificou-se aumento no VMA das brânquias dos peixes expostos ao OE de *L. sidoides* nas duas concentrações utilizadas, que foram semelhantes ao controle com água + álcool e diferentes do controle somente com água dos tanques de cultivo. Após 24 horas de recuperação, o VMA das brânquias da concentração de 20 mg/L se mostrou semelhante ao dos demais tratamentos, todavia, apenas o VMA da concentração de 10 mg/L se mostrou diferente do grupo controle com água. Comparando os dois momentos de análises histopatológicas das brânquias, houve diferença apenas entre o VMA dos peixes expostos a 20 mg/L e o controle exposto somente a água, após 24 horas

de recuperação. Mas, houve semelhança entre os demais tratamentos nos dois períodos analisados (tempo zero e 24 h).

Em relação ao IAH das brânquias coletadas logo após os banhos terapêuticos com 10 mg/L de OE de *L. sidoides* foi semelhante aos demais tratamentos do mesmo período, enquanto que a concentração de 20 mg/L foi superior aos dois tratamentos controles. Após as 24 horas de recuperação, o IAH dos tratamentos com OE foi superior ao grupo controle com água e semelhante ao grupo controle com água + álcool. Comparando os dois momentos de coleta, os dois tratamentos com óleo logo após o banho foram semelhantes aos dois tratamentos com OE de *L. sidoides* e controle com água + álcool, após 24 horas de recuperação (Tabela 5).

As principais alterações histológicas observadas nas brânquias dos peixes expostos ao OE de *L. sidoides* foram: hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio lamelar e aneurisma lamelar, ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose (Figura 2A-H), além de proliferação de células mucosas e células de cloreto e hipertrofia lamelar, que foram alterações com menor frequência.

Tabela 5. Valor médio de alterações (VMA) e índice de alterações histopatológicas (IAH) nas brânquias de *Colossoma macropomum* expostos ao óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Imediatamente após os banhos				
Tratamentos	N	VMA	IAH	Severidade das lesões de acordo com o IAH
Água	6	1,0 ± 0,0aAB	10,0 ± 6,3aB	Funcionamento normal das brânquias
Água + álcool	6	1,8 ± 0,4abAB	86,0 ± 54,8cC	Alterações severas nas brânquias
10 mg/L 60 min	6	2,0 ± 0,0bAB	82,8 ± 53,1abcA	Alterações severas nas brânquias
20 mg/L 15 min	6	2,3 ± 0,5bB	119,5 ± 5,4bA	Danos irreparáveis nas brânquias
Recuperação de 24 horas				
Água	6	1,0 ± 0,0bA	8,5 ± 6,1aB	Funcionamento normal das brânquias
Água + álcool	6	1,7 ± 0,5abAB	90,8 ± 54,2abA	Alterações severas nas brânquias
10 mg/L 60 min	6	1,8 ± 0,4aAB	94,0 ± 40,0bAC	Alterações severas nas brânquias
20 mg/L 15 min	6	1,3 ± 0,5abAB	96,8 ± 44,5bAC	Alterações severas nas brânquias

Letras minúsculas similares, na mesma coluna, não indicam diferenças entre tratamentos, e letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças entre tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

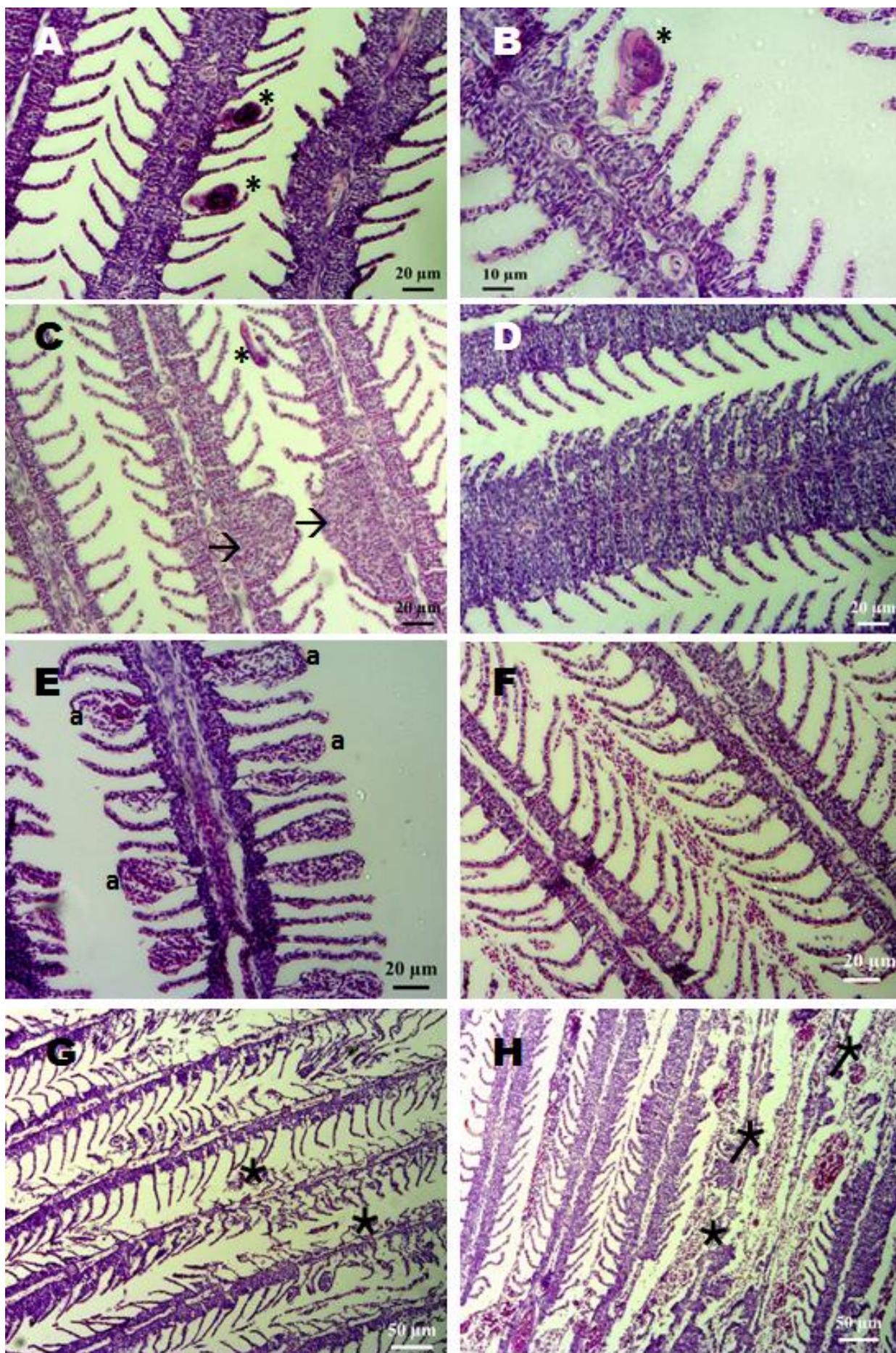


Figura 2A-H. Alterações histológicas nas brânquias de *Collossoma macropomum* expostos a duas concentrações de óleo essencial de *Lippia sidoides*, 10 e 20 mg/L, por 60 e 15 minutos, respectivamente (A) Monogenoideas (*), em brânquia do tratamento controle com água. (B) Monogenoidea (*), em brânquia do tratamento controle com água. (C) Monogenoidea (*) e regiões com hiperplasia de epitélio com fusão lamelar (setas), em brânquia do tratamento controle com água. (D) Hiperplasia de epitélio generalizada com regiões de fusão lamelar e descolamento de epitélio lamelar, em brânquias dos peixes expostos a 20 mg/L. (E) Aneurismas (a), em brânquias dos peixes controles expostos a água + álcool. (F) Ruptura epitelial com hemorragia lamelar nas brânquias dos peixes exposto a 10 mg/L. (G) Necrose lamelar (estrelas) com ruptura epitelial e hemorragia, em brânquias dos peixes expostos a 20 mg/L. (H) Necrose lamelar (estrelas), com regiões de hiperplasia lamelar e ruptura epitelial com hemorragia em brânquias dos peixes expostos a 20 mg/L.

4. Discussão

O óleo essencial de *L. sidoides* usado neste estudo apresentou timol e p-cimeno (76,2%) como os principais componentes, que foi similar ao descrito por Hashimoto et al. (2016), que encontraram 83,0% desses dois componentes. Porém, Veras et al. (2013) relataram uma maior concentração de timol e-cimeno (90,2%) em OE de *L. sidoides* analisado. Durante os banhos terapêuticos de *C. macropomum* com OE de *L. sidoides* observou-se efeito anestésico, similar efeito relatado para *O. niloticus* quando expostos a esses mesmo óleo essencial (Hashimoto et al., 2016). Assim, somente duas baixas concentrações desse OE puderam ser usadas nos banhos terapêuticos em *C. macropomum*. A análise química dos produtos naturais é indispensável, já que os extratos e óleos essenciais de uma mesma espécie de planta podem ser diferentes devido a fatores como local, condições de plantio, corte, sazonalidade, etc. (Soares et al., 2013). Porém, como não existem estudos sobre a atividade antiparasitária de *L. sidoides* para *C. macropomum*, este foi o primeiro relato.

O teste antiparasitário *in vitro* mostrou que as concentrações de 40, 80, 160 e 320 mg/L do OE de *L. sidoides* tiveram 100% eficácia contra *A. spatulathus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis* de *C. macropomum*, em tempos distintos, mas concentrações inferiores a essas tiveram uma baixa eficácia. Esses resultados corroboram os achados de Hashimoto et

al. (2016), que encontraram 100% efetividade do *L. sidoides* contra monogenoideas *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis* de *O. niloticus* nas concentrações de 160 e 320 mg/L, cujo tempo de sensibilização dos parasitos foi dependente da concentração de OE de *L. sidoides*. Óleos essenciais de *L. sidoides* usados nesses dois estudos tinham uma composição similar de timol e p-cimeno, substâncias responsáveis pela ação antiparasitária (Oliveira et al., 2009). Estudos *in vitro* do OE de *Lippia alba*, cujos componentes majoritários foram carvona e limoneno, mostram 100% de atividade contra monogenoideas de *C. macropomum* após exposição em concentrações de 160, 320, 640, 1280 e 2560 mg/L (Soares et al., 2016).

Após os testes antiparasitários *in vitro*, *C. macropomum* foram submetidos a testes de sensibilidade com as diversas concentrações de OE de *L. sidoides*, para determinar a tolerância dos peixes. Os resultados indicaram uma baixa tolerância OE de *L. sidoides*; assim, somente 10-20 mg/L desse óleo poderia ser usado para exposição de *C. macropomum*. Conseqüentemente, não houve diferença na prevalência e abundância de *I. multifiliis*, *A. spatulatus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis*. Hashimoto et al. (2016), após teste de sensibilidade de *O. niloticus* adotaram a concentração de 20 mg/L de OE de *L. sidoides* para banhos terapêuticos e encontram uma eficácia de apenas 33,3% contra *C. tilapiae*, *C. thurstonae*, *C. halli* e *S. longicornis*. Porém, em *C. macropomum*, 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*, por 30 minutos, mostrou eficácia de 40,7% e 50,3%, respectivamente, no tratamento contra *I. multifiliis* (Soares et al., 2016).

As brânquias dos peixes são órgãos responsáveis pela respiração, osmoregulação e excreção nos peixes (Fiuza et al., 2011; Kumar et al., 2010), assim respondem a exposição de diferentes compostos naturais. Em *C. macropomum*, os resultados da análise histológica mostraram que os banhos terapêuticos dos tratamentos com água + álcool, 10 e 20 mg/L de OE de *L. sidoides* causaram alterações severas nas brânquias tais como hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio lamelar e aneurisma lamelar, ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose. Estudos similares com terapêuticos expostos a 100 e 150 mg/L de *L. alba* também observaram severas alterações nas brânquias dos peixes, causadas pelo álcool e OE (Soares et al. (2016). Veras et al. (2013) relataram que o timol e p-cimeno possuem atividade antiinflamatória tópica, mas que o uso prolongado desse OE produz efeito inflamatório. Oliveira et al. (2014) avaliando a ação inflamatória cutânea do OE de *L. sidoides* em camundongos verificaram

que este óleo causou aumento de espessura da pele, edema e eritema cutâneo em graus variados em ratos, sendo seu efeito dose-dependente, mas não houve atraso na cicatrização das feridas. Além disso, houve efeito citotóxico nas células monocíticas expostas a 100 µg/mL de OE de *L. sidoides* e apenas 57,8% de células foram viáveis após exposição (Rondon et al., 2012).

Os banhos terapêuticos com 10 e 20 mg/L de OE de *L. sidoides* não influenciaram os níveis de glicose e proteínas totais plasmática; mas, aumentou o VCM devido a uma redução no número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina nos peixes expostos a 20 mg/L. Essa diminuição do número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito pode estar relacionada às lesões branquiais hemorrágicas, uma vez que nos tratamentos com OE de *L. sidoides* o IAH variou, de alterações severas e danos irreparáveis nas brânquias. Resultados similares nos parâmetros sanguíneos e lesões brânquias também ocorreram em *C. macropomum* expostos a 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba*, durante banhos terapêuticos de 30 minutos (Soares et al., 2016). Portanto, como OEs de *Lippia* spp. podem causar lesões branquiais e alterações parâmetros sanguíneos em peixes, não devem ser usados com parcimônia em banhos terapêuticos.

O grupo controle usando água + álcool diferiu do grupo controle usando somente água do tanque, quanto às lesões de brânquias, pois o álcool usado como diluente de OE pode influenciar nos resultados. *Colossoma macropomum* expostos à água + álcool mostrou alterações severas nas brânquias, enquanto peixes expostos somente a água não apresentaram alterações funcionais nas brânquias. Outros estudos também revelam influência de diferentes diluentes, tais como o álcool (Soares et al., 2016), DMSO (Hashimoto et al., 2016) e Tween 80 (Steverding et al., 2005), em estudos experimentais sobre atividade antiparasitária usando extratos vegetais. Portanto, tais diluentes podem potencializar a ação dos óleos essenciais usando em banhos terapêuticos.

5. Conclusões

A eficácia *in vitro* do OE de *L. sidoides* foi dose dependente e mesmo as baixas concentrações usadas nos banhos terapêuticos apresentaram toxicidade, causando alterações histopatológicas. Além disso, o diluente usado no OE também causa danos às brânquias dos peixes, resultando em alterações sanguíneas e histológicas, sem recuperação tecidual satisfatória em 24 h. Portanto, as concentrações de OE de *L. sidoides* e os tempos

de exposição utilizados nesse estudo não podem ser ainda indicados no tratamento antiparasitário contra *I. multifiliis* e monogenoideas de *C. macropomum*. Todavia, a terapia herbal é um recurso terapêutico alternativo na piscicultura, mas estudos para avaliar a bioatividade dos compostos majoritários do OE de *L. sidoides* devem ser conduzidos, além de testar formas mais eficazes de administração em peixes.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (#472054/2013-9) e pela bolsa PQ concedida a M. Tavares-Dias.

6. Referências

- Becker, A.G., Parodi, T.V., Heldwein, C.G., Zeppenfeld, C. C., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., 2012. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology Biochemistry*. 38, 789-796.
- Boijink, C.L., Miranda, W.S.C., Chagas, E.C., Dairiki, J.K., Inoue, L.A.K.A., 2015. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture*. 438, 138-140.
- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostack A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83(4), 575-583.
- Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, 148, 288-294.
- Cunha, M.A., Barros, F.M.C., Garcia, L.O., Veeck, A.P.L., Heinzmann, B.M., Loro, V.L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B., 2010. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 306, 403-406.

Dias, M.K.R., Neves, L.R., Marinho, R.G.B., Tavares-Dias, M., 2015. Parasitic infections in tambaqui from eight fish farms in Northern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67 (4), 1070-1076.

Eiras, J.C.; Takemoto R.M., Pavanelli G.C., 2006. Métodos de estudos e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Editora UEM. Maringá, 173 pp.

Fabri, R.L., Nogueira, M. S., Moreira, J.R., Bouzada, M.L.M, Scio, E., 2011. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds os *Lippia* species by bioautography. *Journal of Medicinal Food*, 14 (7/8), 840-846.

Farias-Júnior, P.A., Rios, M.C., Moura, T.A., Almeida, R.P., Alves, P.B., Blank, A.F., Fernandes, R.P.M.; Scher, R., 2012. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biology Research*, 45, 399-402.

Fernandes, L.P., Candido, R.C., Oliveira, W., 2012. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 425-432.

Fiuza, T.S., Silva, P.C., Paula, J.R., Tresvenzol, L.M.F., Souto, M.E.D., Sabóia-Morais, S.M.T., 2011. Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L. tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) – Myrtaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(4), 389-395.

Fontenelle, R.O.S., Morais, S.M., Brito, E.H.S., Kerntopf, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Tomé, A.R., Queiroz, M.G.R., Nascimento, N.R.F., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 934-940.

Funari, C.S.F., Gullo, P., Napolitano, A., Carneiro, R.L., Mendes-Giannini, M.J.S., Fusco-Almeida, A.M., Piacente, S., Pizza, C., Silva, D.H.S., 2012. Chemical and antifungal

investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. Food Chemistry, 135, 2086–2094.

Gomes, G.A., Monteiro, C.M.O., Senra, T.O.S., Zeringota, V., Calmon, F., Matos, R.S., Daemon, E., Gois, R.W.S., Santiago, G.M.P., Carvalho, M.G., 2012. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitology Research, 111, 2423-2430.

Gomes, G.A., Monteiro, C.M.O., Julião, L.S., Maturano, R., Senra, T.O.S., Zeringóta, V., Calmon, F., Matos, R.S., Daemon, E., Carvalho, M.G., 2014. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Experimental Parasitology, 137, 41-45.

Hashimoto, G.S.O., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Achille, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of *Nile tilapia*. Aquaculture. 450, 182-186.

Kumar, A.; Prasad, M. R.; Srivastava, K.; Tripathi, S.; Srivastav, A.K., 2010. Branchial histopathological study of catfish *Heteropneustes fossilis* following exposure to purified neem extract, azadirachtin. World Journal of Zoology, 5(4): 239-243.

Lobo, P.L.D., Fonteles, C.S.R., Marques, L.A.R.V., Jamacaru, F.V.F, Fonseca, S.G.C., Carvalho, C.B.M, Moraes, M.E.A., 2014. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. Phytomedicine, 21, 1043-1047.

Martins, M.L., Moraes, F.R., Fujimoto, R.Y., Nomura, D.T., Fenerick Jr., J., 2002. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho X

Colossoma macropomum Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. B. Inst. Pesca. 28(2), 195-204.

Oliveira, V.C.S., Moura, D.M.S., Lopes, J.A.D., Andrade, P.P.; Silva, N.H.; Figueiredo, C.B.Q., 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. Parasitology Research, 104, 1053-1059.

Oliveira, M.L.M., Bezerra, B.M.O., Leite, L.O., Girão, V.C.C., Nunes-Pinheiro, D.C.S., 2014. Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham. essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process. Journal of Ethnopharmacology, 153, 283-289.

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution, p.339-352. In: Muller R. & Lloyd R. (Eds), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Fishing News Books, Oxford.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Padua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análises hematológicas em peixes. EDUEM: Maringá, São Paulo. 135p.

Rondon, F.C.M., Bevilaqua, C.M.L., Accioly, M.P., Morais, S.M., Andrade-Júnior, H.F., Carvalho, C.A., Lima, J.C., Magalhães, H.C.R., 2012. *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 21(3), 185-191.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Tribskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery. 6, 75-86.

Silva, M. I., Gondim, A.P.S., Nunes, I.F.S., Sousa, F.C.F., 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). Brazilian Journal of Pharmacognosy, 16(4), 455-462.

Soares, B.V., Tavares-Dias, M., 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*, 3 (1), 109-123.

Soares, B.V., Neves, L.R., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Dias, M.K.R., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M., 2016. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, 452, 107-114.

Steverding, D., Morgan, E., Tkacynski, Walder, F., Tinsley, R., 2005. Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp., infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Dis. Aquat. Org.* 66, 29-32.

Tavares-Dias, M., Sandrin E.F.S., Campos Filho E., 1999. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. *Revista Brasileira de Zoologia*. 16, 175-84.

Veras, H.N.H., Rodrigues, F.F.G., Botelho, M.A., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Costa da, L.G.M., 2014. *Enterococcus faecalis* Biofilm of the Bacterium Isolated from Root Canals. *The ScientificWorld Journal*, 1-5.

Zhang, X.P., Li, W.X., Ai, T.S., Zou, H., Wu, S.G., Wang, G.T., 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture*. 420-421, 302-307.

ARTIGO 4

Atividade antiparasitária do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth em ectoparasitos de *Colossoma macropomum* e seus efeitos fisiológicos e histopatológicos

Artigo a ser submetido ao periódico “**Aquaculture**”

Atividade antiparasitária do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth em ectoparasitos de *Colossoma macropomum* e seus efeitos fisiológicos e histopatológicos

Bruna Viana Soares¹, Adriele Carolina Franco Cardoso¹, Lígia Rigôr Neves², Rosilene Ribeiro Campos³, Bianca Barata Gonçalves⁴, Gracienhe Gomes dos Santos⁴, Francisco Célio Maia Chaves⁵, Edsandra Campos Chagas⁵, & Marcos Tavares-Dias^{1,2,4}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – BIONORTE, Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brasil.

³ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

⁴ Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Embrapa Amapá Macapá, AP, Brasil

⁵ Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil

Autor para correspondência: Marcos Tavares-Dias

Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, 2600, 68903-419, Macapá, AP, Brasil. E-mails: marcos.tavares@embrapa.br

RESUMO

Este estudo analisou os efeitos sanguíneos, histopatológicos e antiparasitários *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial de *Lippia origanoides* em *Collossoma macropomum*. Concentrações 10, 20, 40, 80, 160 e 320 mg/L do óleo essencial foram testadas *in vitro* contra monogenoideas (*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri*) das brânquias de *C. macropomum*. Concentrações 320 e 160 mg/L do óleo essencial de *L. origanoides* foram 100% efetivas contra esses parasitos em 20 e 60 minutos de exposição, respectivamente. A concentração 80 mg/L foi cerca de 80% eficaz em 3 horas de exposição, atingindo 100% de eficácia em 6 horas de exposição, juntamente com a concentração 40 mg/L. As demais concentrações demonstraram baixa eficácia *in vitro*. O início da mortalidade dos parasitos expostos água ou água + álcool (controles) ocorreu em 3 horas de experimento, com 100% mortalidade após 8 horas de ensaio. Nos testes *in vivo*, quando alevinos de *C. macropomum* foram submetidos a banhos de 60 minutos com 20 mg/L e 30 minutos com 40 mg/L do óleo essencial de *L. origanoides*, não houve redução na abundância de *Ichthyophthirius multifiliis* e monogenoideas *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri*. O óleo essencial causou efeito anestésico nos peixes, elevou os níveis de proteínas totais, números de monócitos e neutrófilos, e reduziu o hematócrito dos peixes. Danos leves a moderados e alterações severas nas brânquias foram observados logo após a exposição ao óleo essencial e após 24 horas de recuperação e não houve diferença entre os tratamentos. As alterações histológicas observadas nas brânquias dos peixes expostos a 20 e 40 mg/L do óleo essencial de *L. origanoides* foram: hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio lamelar e aneurisma lamelar e ruptura epitelial com hemorragia, mas edema, proliferação de células mucosas e células de cloreto, hipertrofia lamelar, congestão e necrose foram alterações com menor frequência. Conclui-se que o óleo essencial de *L. origanoides* possui atividade *in vitro* dose-dependente contra parasitos monogenoideas de *C. macropomum*, mas as baixas concentrações (20 e 40 mg/L) que são toleradas pelos peixes não tem eficácia quando usada em banhos terapêuticos, embora não causem graves alterações sanguíneas e histopatológicas no tecido branquial nas condições deste estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Monogenoidea, Parasitos, Planta medicinal, Sangue, Tambaqui.

1. Introdução

Lippia organoides Kunth, Verbenaceae conhecida como salva-do-marajó, é um arbusto aromático encontrado no sul da América do Norte, América Central e norte da América do Sul, principalmente na região Amazônica, onde é utilizado para fins terapêuticos e na culinária local. Tem grande importância na medicina tradicional na região da Amazônia brasileira, por ser uma das plantas mais versáteis apontadas por estudos etnobotânicos, para uso no tratamento de distúrbios gastrointestinais, gênito-urinários e respiratórios, e contra malária (Ribeiro et al., 2014; Soares e Tavares-Dias, 2013; Oliveira et al., 2007; Vásquez, et al., 2014).

Os produtos naturais obtidos de *L. organoides* possuem atividades bioativas comprovadas, tais como ação antioxidante (Sarrazin et al., 2015b; Teles et al., 2014), inseticida contra *Aedes aegypti* (Vera et al., 2014), antimicrobiana (Barreto et al., 2014a, 2014b; Betancourt et al., 2012; Oliveira et al., 2007; Sarrazin et al., 2015a, 2015b), anti-protozoário (Escobar et al., 2010), repelente de insetos (Caballero-Gallardo et al., 2012) e antigenotóxica (Vicuña et al., 2010). Porém, estudos que exploram o potencial do óleo essencial (OE) de *L. organoides* contra parasitos de peixes são desconhecidos.

Colossoma macropomum Cuvier, 1818 (tambaqui) é um Serassalmidae onívoro e nativo da Amazônia, tem grande importância na aquicultura, e, devido a sua relativa rusticidade, é cultivado em diferentes sistemas intensivos, cujas altas densidades populacionais favorecem a disseminação de doenças parasitárias (Dias et al., 2015). As parasitoses podem causar perdas econômicas ainda não estimadas, por isso requerem constante monitoramento para diagnóstico e tratamento adequados, um desafio para a piscicultura intensiva desse peixe. Entre os parasitos mais frequentes em *C. macropomum* cultivados estão o protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 e monogenoideas *Anacanthorus spathulatus* Kritsky, Thatcher & Kayton 1979, *Notozothecium janauachensis* Belmont-Jégu, Domingues & Martins 2004, *Mymarothecium boegeri* Cohen & Kohn, 2005 e *Linguadactyloides brinkmanni* Thatcher & Kritsky, 1983 (Dias et al., 2015; Martins et al., 2002; Soares et al., 2016). A terapia herbal pode ser uma alternativa à prática terapêutica com produtos quimioterápicos, comumente usada na aquicultura (Hashimoto et al., 2016; Huang et al., 2013; Soares et al., 2016). Para plantas medicinais do gênero *Lippia*, foram estudadas em peixes para averiguar a ação antiparasitária dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (Hashimoto et al., 2016) e *Lippia alba* (Soares et al.,

2016). Porém, não foram investigados ainda os efeitos antiparasitários do óleo essencial de *L. origanoides* em peixes.

O objetivo desse estudo foi investigar a atividade antiparasitária, *in vivo* e *in vitro*, do óleo essencial de *L. origanoides* contra parasitos das brânquias de *C. macropomum*, bem como avaliar possíveis alterações sanguíneas e lesões histopatológicas nas brânquias desse peixe.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção e composição química do óleo essencial de L. origanoides

O cultivo de *L. origanoides* e a extração do óleo essencial (OE) foram realizados no Setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, estado do Amazonas, Brasil. O óleo essencial foi extraído das folhas da *L. origanoides* através de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. A análise química do OE de *L. origanoides* foi feito usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os componentes químicos do OE de *L. origanoides*, usado neste estudo, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Constituição química do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Pico	Teor %	IR	Identificação
1	0,5	853	(<i>E</i>)-2-hexenal
2	1,2	928	α -tujeno
3	0,5	936	α -pineno
4	0,6	977	1-octen-3-ol
5	2,4	989	mirceno
6	1,1	1016	α -terpineno
7	13,3	1025	p-cimeno
8	0,9	1032	1,8-cineol
9	4,5	1059	γ -terpineno
10	2,8	1096	linalol
11	0,4	1144	ipsdienol
12	1,1	1175	umbelulona
13	0,9	1232	timil-metil-éter
14	9,9	1288	timol
15	49,7	1298	carvacrol
16	0,4	1369	acetato de carvacrila
17	1,5	1414	(<i>E</i>)-beta-cariofileno
18	6,4	1487	n.i.
19	0,7	1566	n.i.
20	1,0	1576	óxido de cariofileno
Total identificado (%): 92,9			

n.i = não identificado

2.2. Peixes e aclimação

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos da Embrapa Amapá (Macapá, estado do Amapá, Brasil). Alevinos de *C. macropomum* (\pm 30 g) foram obtidos de piscicultura comercial. Os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanques de 500 L de água e alimentados com ração contendo 32% proteína bruta (PB). Nos tanques foi mantido o sistema constante de

renovação da água, e os parâmetros da água foram monitorados: temperatura média ($30,7 \pm 0,2$ °C), oxigênio dissolvido ($5,6 \pm 0,4$ mg/L), pH ($5,3 \pm 0,2$), amônia ($0,4 \pm 0,2$ mg/L), alcalinidade ($10,0 \pm 0$ mg/L) e dureza ($10,0 \pm 0$ mg/L). Diariamente foi feita a remoção de matéria orgânica acumulada no fundo dos tanques.

2.3. Ensaio *in vitro* com óleo essencial de *L. origanoides* e monogenoideas de *C. macropomum*

Para avaliar o tempo de exposição e as concentrações de OE de *L. origanoides* que causam mortalidade em espécies de monogenoideas das brânquias de 24 *C. macropomum* ($11,9 \pm 2,9$ cm e $35,2 \pm 25,0$ g) foram conduzidos testes *in vitro*, de acordo a metodologia utilizada por Soares et al. (2016). Para tal, utilizou-se dois grupos controles, um com água do tanque e outro com água do tanque + álcool etílico absoluto, e seis diferentes concentrações de OE de *L. origanoides* (10, 20, 40, 80, 160 e 320 mg/L), usando três repetições para cada tratamento, de acordo com a metodologia utilizada em Soares et al. (2016). Este solvente foi usado na proporção de 1:10.

A partir dos resultados *in vitro* foram determinadas as concentrações usadas nos banhos terapêuticos com OE de *L. origanoides*, após um teste prévio da tolerância dos peixes.

2.4. Ensaio *in vivo* com *Colossoma macropomum* expostos ao óleo essencial de *L. origanoides*

Alevinos ($13,2 \pm 1,1$ cm e $42,4 \pm 10,1$ g), naturalmente parasitados, foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques de 100 L, mantidos em sistema aberto de água durante 48 horas. Para este ensaio, foram usados quatro tratamentos e três repetições, com 20 peixes por repetição, e os peixes foram mantidos em sistema estático de água (temperatura média $30,7 \pm 0,2$ °C, oxigênio dissolvido $5,6 \pm 0,4$ mg/L, pH $5,3 \pm 0,2$, amônia $0,4 \pm 0,2$ mg/L, alcalinidade $10,0 \pm 0$ mg/L e dureza $10,0 \pm 0$ mg/L). Os tratamentos são os seguintes: grupos controles com água do tanque ou com água + álcool etílico absoluto (1:10), o solvente usado para diluição do OE, 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides*. Os peixes submetidos à concentração de 20 mg/L e 40 mg/l foram expostos ao banho de OE de *L. origanoides* durante 60 e 30 minutos, respectivamente, enquanto que os peixes dos tratamentos controle permaneceram no banho por 60 minutos. Passados os

respectivos tempos de banho, a água dos tanques foi mantida em fluxo contínuo e 10 peixes de cada repetição, dos diferentes tratamentos, foram usados para coleta das brânquias, fixadas em formalina 5%, para quantificação e identificação dos parasitos. Os parasitos foram preparados para identificação usando recomendações prévias (Eiras et al., 2006). Após quantificação dos parasitos, foram calculados prevalência e intensidade média de infecção (Bush et al., 1997). A eficácia de cada tratamento foi calculada (Zhang et al., 2014).

A outra parte dos peixes foi usada para análises sanguíneas e histopatológicas. As concentrações *in vitro*, previamente testadas, mostram baixa tolerância dos peixes ao OE de *L. origanoides*; assim, somente concentrações 20 e 40 mg/L puderam ser usadas nos banhos terapêuticos.

2.5. Procedimentos de análises dos parâmetros sanguíneos de C. macropomum expostos ao óleo essencial de L. origanoides

Após os banhos terapêuticos de 60 e 30 minutos com as concentrações de 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides*, respectivamente, bem como para os grupos controle, cinco peixes de cada repetição (15 peixes por tratamento) foram usados para coleta sanguínea. De cada peixe foi colhida uma amostra de sangue por punção do vaso caudal, utilizando seringas com EDTA (10%), que foi dividida em duas alíquotas. Uma alíquota foi usada para contagem de eritrócitos totais em homocitômetro, determinação do hematócrito usando o método de microhematócrito e concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina. Com esses dados foram calculados índices hematimétricos de Wintrobe: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas pancromicamente com uma combinação de May Grünwald-Giemsa-Wright (Ranzani-Paiva et al., 2013) para contagem diferencial de leucócitos em até 200 células de interesse em cada extensão. A identificação e nomenclatura das populações de leucócitos seguiram as recomendações de Tavares-Dias et al. (1999). As extensões foram também usadas para contagem do número de leucócitos e trombócitos totais (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A segunda alíquota de sangue foi centrifugada a 75 G, para obtenção do plasma e para análise dos níveis de glicose e proteínas plasmáticas totais. A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico de glicose oxidase usando kit

comercial (Biotécnica, MG, Brasil). A concentração de proteínas plasmáticas totais foi determinada pelo método de biureto usando kit comercial (Biotécnica, MG, Brasil). Para ambas as análises bioquímicas, a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

2.6. Análises histopatológicas das brânquias de C. macropomum expostos ao óleo essencial de L. origanoides

Após os banhos terapêuticos de 60 e 30 minutos com 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides*, respectivamente, e para os grupos controle, 6 peixes por tratamento (2 peixes de cada repetição) foram usados para coleta dos arcos branquiais para análises histopatológicas. Após 24 h desses banhos terapêuticos, outros 6 peixes por tratamento (2 peixes de cada repetição) foram usados para coleta dos arcos branquiais para análises histopatológicas (recuperação). Esses peixes usados na recuperação estavam mantidos nos tanques com água de fluxo contínuo e foram alimentados.

O primeiro arco branquial direito de cada peixe foi coletado e fixado em formalina tamponada (10%), para análises histopatológicas. Os arcos branquiais foram desidratados através de uma série gradual de etanol e xilol e, em seguida, inclusos em parafina, para obtenção de cortes consecutivos seriados em micrótomo. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio de luz comum (Soares et al., 2016).

A análise histopatológica foi realizada de forma semiquantitativa usando o valor médio de alteração (VMA) (Schwaiger et al., 1997) e índice de alteração histopatológica (IAH) (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

2.7. Análises estatísticas

Todos os dados foram previamente avaliados nos pressupostos de normalidade e homocedasticidade usando Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Como os dados não seguiram o padrão de distribuição, foi usado Kruskal-Wallis seguido pelo teste Tukey, para comparação entre as medianas ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Ação antiparasitária, in vitro, do óleo essencial de L. origanoides contra monogenoideas

O teste antiparasitário *in vitro* contra monogenoideas (*A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri*) de brânquias de *C. macropomum* mostrou 100% de eficácia do OE de *L. organoides* em 30 e 60 minutos de exposição para as concentrações 320 e 160 mg/L, respectivamente. A concentração 80 mg/L foi cerca de 80% eficaz em 3 horas de exposição, atingindo 100% de eficácia em 6 horas de exposição, juntamente com a concentração 40 mg/L. As duas menores concentrações, 10 e 20 mg/L, demonstraram baixa eficácia, não atingindo 40% em 6 horas de exposição ao OE, e às 8 horas do ensaio não foram mais observados parasitos vivos nesses tratamentos. O início da mortalidade dos monogenoideas no controle usando somente água e água + álcool ocorreu em 3 e 1 hora do ensaio, respectivamente, com 100% mortalidade dos parasitos após 8 horas de ensaio (Figura 1 e Tabela 2).

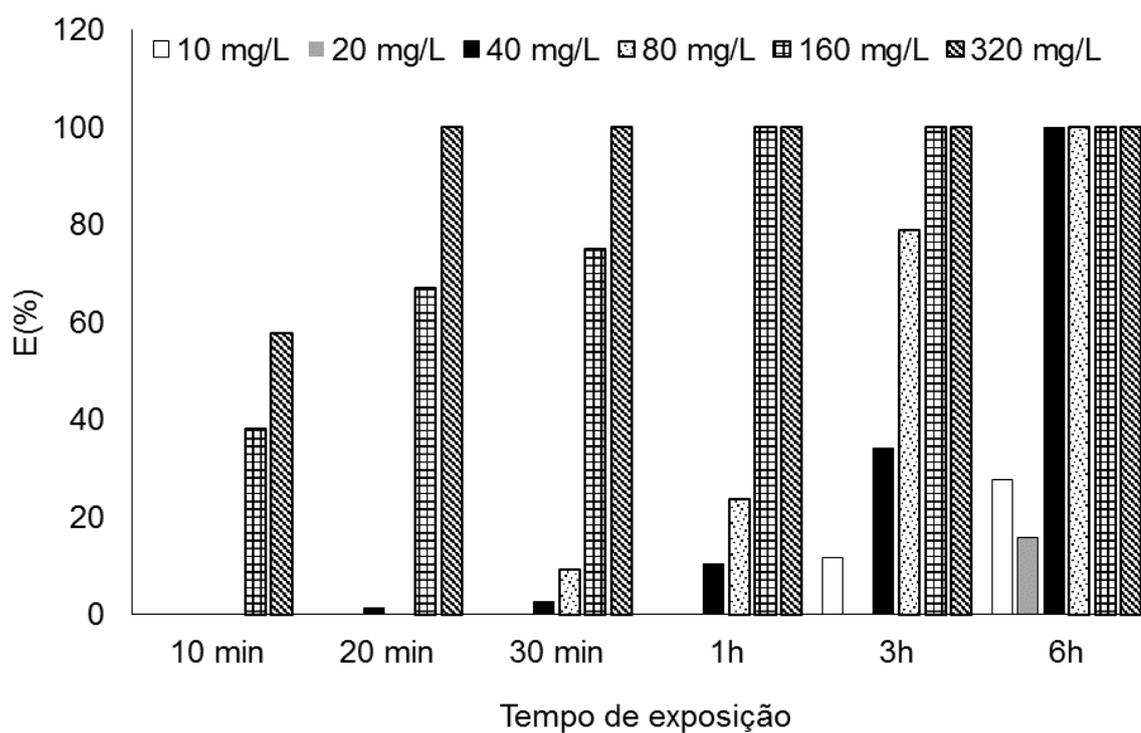


Figura 1. Eficácia *in vitro* das diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia organoides* contra monogenoideas das brânquias de *Colossoma macropomum*.

Tabela 2. Ação antiparasitária *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra parasitos de brânquias de *Colossoma macropomum*, em relação ao tempo de exposição.

Tempo	Tratamentos	Parasitos vivos	Mortalidade (%)
0h	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	20 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	40 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	80 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	160 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	320 mg/L	20,0 ± 0,0	0
10 min	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	20 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	40 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	80 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	160 mg/L	10,7 ± 4,2	48,3
	320 mg/L	5,3 ± 2,5	73,5
20 min	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	20 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	40 mg/L	19,7 ± 0,6	1,5
	80 mg/L	18,7 ± 2,3	9,7
	160 mg/L	3,7 ± 4,7	82,1
	320 mg/L	5,3 ± 2,5	73,5
30 min	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	20 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	40 mg/L	19,3 ± 1,2	3,5
	80 mg/L	17,7 ± 3,2	14,5
	160 mg/L	1,7 ± 2,9	91,8
	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
1 hora	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	22,0 ± 2,6	0
	10 mg/L	20,0 ± 0,0	0
	20 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	40 mg/L	19,0 ± 1,7	5
	80 mg/L	14,7 ± 2,1	29
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100

Tabela 2. Continuação...

	Água	25,3 ± 4,5	0
	Água + álcool	20,0 ± 5,0	9,1
	10 mg/L	17,0 ± 5,2	15
	20 mg/L	20,7 ± 1,2	0
	40 mg/L	10,0 ± 2,0	50
	80 mg/L	0,7 ± 1,2	96,6
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
3 horas	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	Água	4,7 ± 4,6	81,4
	Água + álcool	12,7 ± 10,7	42,3
	10 mg/L	4,3 ± 2,3	78,5
	20 mg/L	2,0 ± 1,0	90,3
	40 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	80 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
6 horas	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	Água	1,3 ± 2,3	94,9
	Água + álcool	1,3 ± 1,5	94,1
	10 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	20 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	40 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	80 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
8 horas	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	Água	0,0 ± 0,0	100
	Água + álcool	0,0 ± 0,0	100
	10 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	20 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	40 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	80 mg/L	0,0 ± 0,0	100
	160 mg/L	0,0 ± 0,0	100
9 horas	320 mg/L	0,0 ± 0,0	100

3.2. Ação antiparasitária em *C. macropomum* expostos ao óleo essencial de *L. origanoides*

As brânquias de *C. macropomum* estavam naturalmente parasitadas por monogenoídeas (*A. spatulathus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis*) e *I. multifiliis* não houve diferença na abundância desses ectoparasitos entre os tratamentos com OE de *L. origanoides* (Tabela 3), indicando que as concentrações de OE usadas não foram eficientes contra esses ectoparasitos de brânquias.

Durante os banhos terapêuticos foram observados os seguintes comportamentos: normal no controle com água, excitação moderada no controle com água + álcool e imobilização e submersão no fundo dos tanques nas concentrações 20 e 40 mg/L de OE. Após reposição do fluxo contínuo de água e remoção do OE, os peixes expostos ao OE de *L. origanoides* retornaram gradativamente a natação normal, não havendo qualquer mortalidade durante e após o ensaio.

Tabela 3. Prevalência (P%) e abundância média (AM) de espécies de monogenoideas nas brânquias de *Colossoma macropomum* expostos ao óleo essencial de *Lippia origanoides*. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). P: Prevalência, AM: Abundância média

Espécies de parasitos	Água (n = 30) 60 minutos		Água+álcool (n = 30) 60 minutos		20 mg/L (n = 30) 60 minutos		40 mg/L (n = 30) 30 minutos	
	P (%)	AM	P (%)	AM	P (%)	AM	P (%)	AM
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	96.3	80,3 ± 47,0ab	96.7	67,2 ± 38,5a	90	108,5 ± 79,9b	82.6	52,7 ± 59,1a
Monogenoidea	100	341,3 ± 67,3a	100	333,7 ± 86,9a	100	316,2 ± 79,3a	100	352,3 ± 67,3a

3.3. Efeitos nos parâmetros sanguíneos de *C. macropomum* expostos ao óleo essencial de *L. origanoides*

O uso de OE de *L. origanoides* em banho terapêutico em *C. macropomum*, nas concentrações de 20 e 40 mg/L, durante 60 e 30 minutos, respectivamente, aumentou os níveis de proteínas plasmáticas totais, número de monócitos e neutrófilos, e reduziu o hematócrito dos peixes, não havendo alteração nos outros parâmetros sanguíneos investigados. O banho terapêutico de 60 minutos usando água + álcool causou aumento do nível de hemoglobina em relação aos peixes dos demais tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros sanguíneos de *Colossoma macropomum* expostos ao óleo essencial de *Lippia origanoides*. Dados expressam valores médios \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Parâmetros	Água (n=15)	Água + álcool (n=15)	20 mg/L (n=15)	40 mg/L (n=15)
Peso (g)	42,4 \pm 11,5a	40,6 \pm 8,5a	41,2 \pm 8,9a	39,3 \pm 9,0a
Comprimento (cm)	13,6 \pm 1,2a	13,1 \pm 0,9a	12,9 \pm 1,0a	13,0 \pm 1,3a
Glicose (g/dL)	97,5 \pm 16,9a	104,2 \pm 25,4a	99,8 \pm 21,6a	99,4 \pm 21,6a
Proteínas (mg/dL)	2,5 \pm 0,4a	3,2 \pm 0,8a	3,6 \pm 1,1b	3,6 \pm 0,5b
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1,07 \pm 0,15a	1,13 \pm 0,23a	1,18 \pm 0,47a	0,96 \pm 0,17a
Hemoglobina (g/dL)	5,3 \pm 0,6a	5,6 \pm 0,5b	5,0 \pm 0,6a	5,0 \pm 0,5a
Hematócrito (%)	17,5 \pm 1,5a	17,7 \pm 2,4a	15,8 \pm 1,7b	15,1 \pm 1,8b
VCM (fL)	166,0 \pm 25,5a	160,9 \pm 28,9a	145,9 \pm 38,6a	162,2 \pm 37,8a
CHCM (g/dL)	30,4 \pm 2,6a	32,3 \pm 4,6a	31,7 \pm 2,5a	33,2 \pm 4,1a
Trombócitos (μL)	26.144 \pm 9.993a	22.980 \pm 7.965a	23.434 \pm 10.704a	20.325 \pm 5.129a
Leucócitos (μL)	10.114 \pm 2.524a	9.702 \pm 4.541a	12.895 \pm 5.465a	11.761 \pm 3.412a
Linfócitos (μL)	6.566 \pm 2.235a	5.695 \pm 2.398a	4.800 \pm 2.287a	5.499 \pm 2.040a
Monócitos (μL)	1.075 \pm 338a	1.150 \pm 549a	2.659 \pm 1.164b	1.661 \pm 960b
Neutrófilos (μL)	2.272 \pm 1.057a	2.444 \pm 1.521a	5.197 \pm 2.031b	4.489 \pm 2.012b
Eosinófilos (μL)	27 \pm 38a	9 \pm 28a	14 \pm 32a	22 \pm 43a
LG-PAS (μL)	173 \pm 306a	392 \pm 774a	324 \pm 396a	89 \pm 77a

3.4. Efeitos histopatológicos nas brânquias de *C. macropomum* expostos ao óleo essencial de *L. origanoides*

Após banhos terapêuticos com OE de *L. origanoides*, o VMA não mostrou diferenças entre os 4 tratamentos em cada período analisado, tanto após o banho quanto após 24 horas de

recuperação. O IAH também não mostrou diferenças entre tratamentos em cada momento analisado e entre os dois momentos de análises. Porém, logo após a exposição com OE de *L. origanoides*, a severidade das lesões nas brânquias de *C. macropomum* do controle exposto somente à água dos tanques variou de acordo com o IAH, com danos moderados a severos. Houve danos leves a moderados nas brânquias do controle exposto a água + álcool, e alterações severas nas brânquias dos peixes expostos a 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides*. Após 24 horas de recuperação dos peixes, as brânquias mostram severidade das lesões variando de danos leves a moderados nas brânquias dos peixes dos controles com água e água + álcool e nos peixes exposto a 40 mg/L de OE, mas as alterações foram severas nas brânquias dos peixes expostos a 20 mg/L de OE de *L. origanoides* (Tabela 5).

Alterações histológicas observadas nas brânquias dos peixes tais como hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio lamelar, aneurisma lamelar e ruptura epitelial com hemorragia são mostradas na Figura 2A-H. Além disso, houve edema, proliferação de células mucosas e células de cloreto, hipertrofia lamelar, congestão e necrose, alterações observadas com menor frequência.

Tabela 5. Valores médio de alteração (VMA) e índice de alteração histopatológica (IAH) em arcos branquiais de *Colossoma macropomum* após a exposição com óleo essencial de *Lippia origanoides* e após 24 horas da recuperação. Letras minúsculas similares, na mesma coluna, não indicam diferenças entre tratamentos, e letras maiúsculas similares na mesma coluna não indicam diferenças entre tempos de acordo com teste de Tukey ($P < 0,05$).

Logo após a exposição				
Tratamentos	N	VMA	IAH	Severidade das lesões de acordo com o IAH
Água	6	1,3 ± 0,5aA	46,3 ± 49,8aA	Alterações moderadas a severas nas brânquias
Água + Álcool	6	1,2 ± 0,4aA	16,5 ± 7,9aA	Danos leves a moderados nas brânquias
20 mg/L 60 min	6	1,8 ± 0,4aA	87,3 ± 59,6aA	Alterações severas nas brânquias
40 mg/L 30 min	6	1,7 ± 0,8aA	51,2 ± 54,6aA	Alterações severas nas brânquias
Recuperação de 24 horas				
Água	6	1,2 ± 0,4aA	16,0 ± 7,8aA	Danos leves a moderados nas brânquias
Água + Álcool	6	1,2 ± 0,4aA	18,2 ± 5,7aA	Danos leves a moderados nas brânquias
20 mg/L 60 min	6	1,5 ± 0,5aA	52,0 ± 53,7aA	Alterações severas nas brânquias
40 mg/L 30 min	6	1,3 ± 0,5aA	13,7 ± 9,7aA	Danos leves a moderados nas brânquias

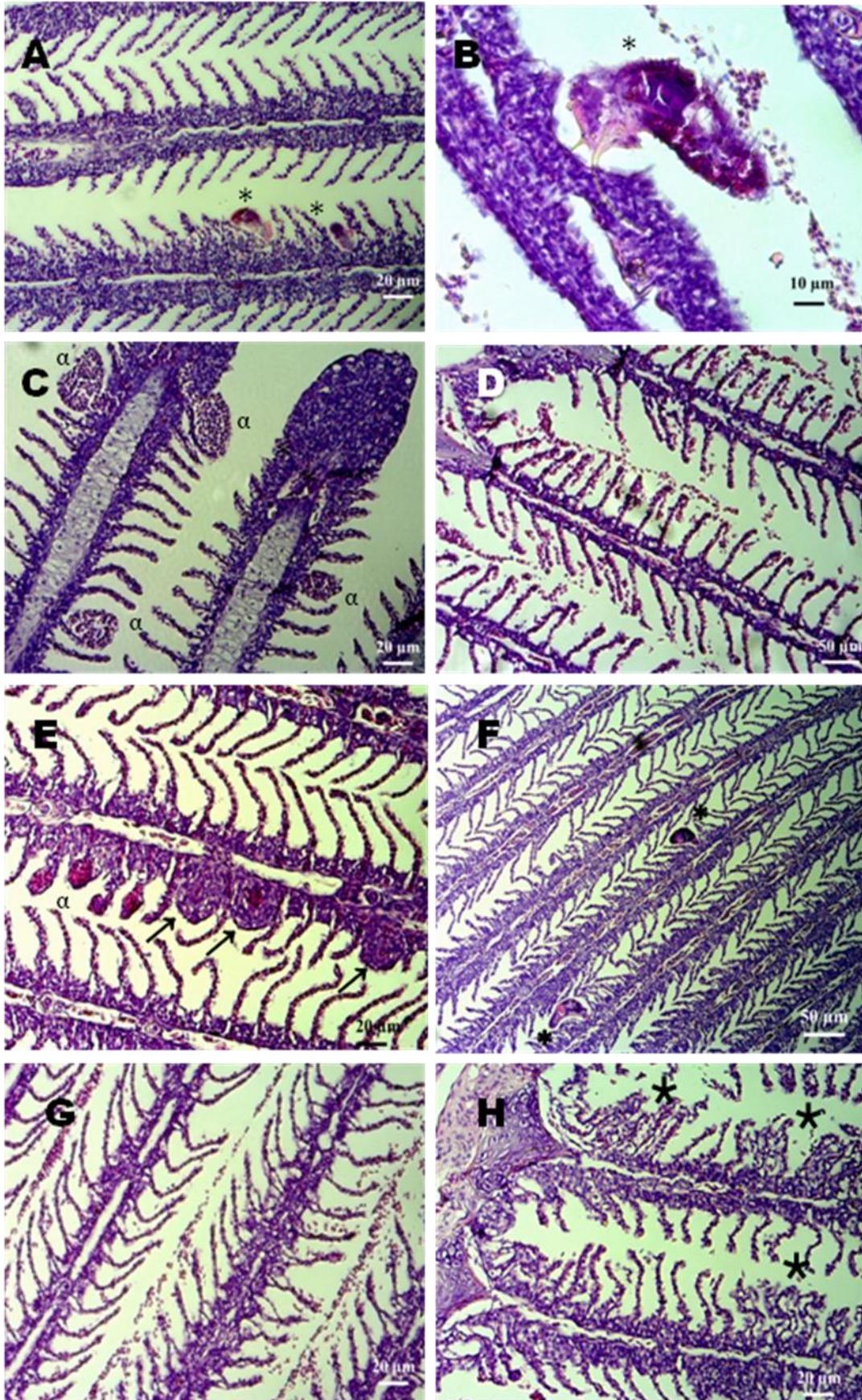


Figura 2A-H. Alterações histológicas das brânquias de *Colossoma macropomum* expostos a 20 e 40 mg/L de óleo essencial de *Lippia origanoides*, por 60 e 30 minutos, respectivamente. (A) Monogenoideas (*) e região com hiperplasia, em brânquias do tratamento com água do tanque. (B) Monogenoidea (*), em brânquias dos peixes do tratamento com 40 mg/L do de óleo essencial. (C) Aneurismas (α) em extremidades lamelares, em brânquias do controle com água+ álcool. (D) Ruptura epitelial com hemorragia disseminada, em brânquias dos peixes do tratamento com 20 mg/L de OE. (E) Aneurismas (α) e hiperplasia lamelar (seta) em brânquias dos peixes expostos a 20 mg/L do óleo essencial. (F) Monogenoidea (*), dilatação do vaso sanguíneo central e hiperplasia lamelar generalizada, em brânquias dos peixes do tratamento com 40 mg/L de OE após 24 h de recuperação. (G) Ruptura epitelial com hemorragia disseminada, em brânquias dos peixes do tratamento com 40 mg/L de OE. (H) Descolamento epitelial (*) em brânquias dos peixes expostos a 40 mg/L de OE após 24 h de recuperação.

4. Discussão

A análise química do OE de *L. origanoides* utilizado neste estudo indicou carvacrol, p-cimeno e timol como constituintes químicos majoritários. Resultados similares foram relatados em outros estudos com OE de *L. origanoides* (Teles et al., 2014; Ribeiro et al., 2014; Sarrazin et al., 2015; Vera et al., 2014; e Vicuña et al., 2010). O timol e carvacrol podem ser os compostos responsáveis pelos efeitos bioativos do OE de *L. origanoides*, uma vez que estudos mostraram atividades antimicrobiana (Nostro et al., 2004; Sarrazin et al., 2015a, 2015b), antigenotoxicidade (Vicuña et al., 2010) e antiprotozoário destes compostos (Escobar et al., 2010). Contudo, bioatividade pode ocorrer também devido ao sinergismo entre todos os componentes químicos do óleo essencial (Barreto et al., 2014a).

O teste antiparasitário *in vitro*, utilizado como “screening” para detectar se o OE de *L. origanoides* tem ação contra monogenoideas *A. spatulathus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis* das brânquias *C. macropomum* mostrou que as baixas concentrações (10, 20 e 40 mg/L) tiveram uma baixa eficácia esses ectoparasitos, enquanto as maiores concentrações (80, 160 e 320 mg/L) tiveram uma eficácia dose-dependente. Soares et al. (2016) usando 160, 320, 640, 1280 e 2560 mg/L de OE de *L. alba* contra esses mesmos monogenoideas de *C. macropomum* mostraram também que a eficácia foi dose-dependente. Ensaio com OE de *L. sidoides* nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 mg/L também mostrou que as maiores concentrações

(160 e 320 mg/L) foram efetivas contra monogenoideas *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis* das brânquias de *Oreochromis niloticus* (Hashimoto et al., 2016). Apesar de serem espécies congêneras, as diferentes concentrações e composições químicas podem ter influenciado na eficácia desses três óleos essenciais contra os parasitos *in vitro*.

No ensaio *in vivo*, foram usados 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides*, em banhos de 60 e 30 minutos, respectivamente, concentrações definidas após teste prévio da tolerância dos peixes. Durante esses banhos terapêuticos com ambas as concentrações foi observado efeito anestésico do OE de *L. origanoides* em *C. macropomum*. Efeito similar foi relatado para *C. macropomum* expostos ao 100 e 150 mg/L de OE de *L. alba* (Soares et al., 2016) e para *O. niloticus* expostos a 40 mg/L de OE de *L. sidoides* (Hashimoto et al., 2016). Além disso, os banhos terapêuticos com 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides* não apresentaram eficácia contra monogenoideas *A. spatulathus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis* e *I. multifiliis* em *C. macropomum*. Porém, para *Carassius auratus* banhos terapêuticos com extratos de *Caesalpinia sappan*, *Lysima chiachristinae*, *Cuscuta chinensis*, *Artemisia argyi*, e *Eupatorium fortunei* mostraram de eficácia contra *Dactylogyrus intermedius* (Huang et al., 2013). Ji et al. (2012) também encontraram atividade anti-helmíntica contra *D. intermedius* de *C. auratus* usando extratos de *Cinnamomum cassia*, *Lindera aggregata* e *Pseudolarix kaempferi*. Este é o primeiro estudo sobre atividades antiparasitárias do OE de *L. origanoides* em peixes.

Em *C. macropomum* expostos a 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides* ocorreu aumento nos níveis de proteínas plasmáticas, número de monócitos e neutrófilos, com redução do hematócrito. Para *C. macropomum* expostos a 100 e 150 mg/L de *L. alba* também houve redução do hematócrito e aumento de proteínas plasmáticas e número de neutrófilos (Soares et al., 2016). Hashimoto et al. (2015) também encontraram aumento no número de neutrófilos em *O. niloticus* expostos a 40 mg/L de OE de *L. sidoides*. Portanto, OE de espécies congêneras de *Lippia*, quando usados em baixas concentrações nos banhos terapêuticos, causam moderadas alterações sanguíneas nos peixes expostos.

Em relação ao VMA e IAH, no tecido branquial de *C. macropomum* expostos a 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides*, não foram observadas diferenças entre os tratamentos após o banho e após 24 horas da recuperação. Porém, no tocante à severidade das alterações branquiais, e acordo com o IAH, logo após a exposição ao OE ocorreram lesões severas, com

a recuperação após 24 horas. Contudo, para *C. macropomum* expostos a 100 e 150 mg/L de OE *L. alba* foram observadas lesões severas e irreparáveis nas brânquias (Soares et al., 2016). Essa menor toxicidade em peixes expostos ao OE de *L. origanoides* indica que esse óleo é pouco citotóxico, como tem sido demonstrado em células de ratos (Sarrazin et al., 2015b), insetos (Caballero-Gallardo et al., 2012) e outros mamíferos (Escobar et al., 2010).

Em *C. macropomum* expostos a 20 e 40 mg/L de OE de *L. origanoides*, as principais lesões observadas nas brânquias foram: hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, descolamento do epitélio lamelar e aneurisma lamelar e ruptura epitelial com hemorragia, havendo em menor frequência edema, proliferação de células mucosas e células de cloreto, hipertrofia lamelar, congestão e necrose. Tais lesões foram causadas provavelmente pelos parasitos presentes nas brânquias, uma vez que eles ocorreram em elevada abundância em todos os tratamentos e controles. Alterações branquiais similares também foram descritas para *Piaractus brachypomus* (Verján et al., 2001) e *Rachycentron canadum* (Guerra-Santos et al., 2012), parasitados por diferentes espécies.

Neste estudo, o diluente (álcool), usado no grupo controle exposto a água + álcool na mesma concentração empregada para diluir o OE de *L. origanoides*, não influenciou os resultados dos ensaios antiparasitários *in vivo* e *in vitro*. Além disso, não causou alterações sanguíneas e histopatológicas nas brânquias de *C. macropomum*, diferentemente de outros estudos com diferentes tipos de diluentes (Hashimoto et al., 2016; Steverding et al., 2005).

5. Conclusões

Óleo essencial de *L. origanoides* possui ação antiparasitária, *in vitro*, com efeito dose-dependente. Porém, as baixas concentrações testadas nos banhos terapêuticos, não podem ser indicadas no tratamento contra ectoparasitos devido à sua ineficácia e efeito anestésico, embora tenham causando poucas alterações sanguíneas e histopatológicas nos peixes expostos. Assim, devido ao potencial bioativo do OE de *L. origanoides*, *in vitro*, estudos utilizando os seus constituintes químicos majoritários deveriam ser conduzidos, para testar *in vivo* os efeitos desses constituintes contra parasitos de *C. macropomum*.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (#472054/2013-9) e pela bolsa PQ concedida a M. Tavares-Dias.

7. Referências

Barreto, H.M., Fontinele, F.C., Oliveira, A.P., Arcanjo, D.D.R., Santos, B.H.C., Abreu, A.P.L., Coutinho, H.D.M., Silva, R.A.C., Sousa, T.O., Medeiros, M.G.F., Citó, A.M.G.L., Lopes, J.A.D., 2014. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity *in vitro* by *Lippia origanoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, ID 305610, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/305610>.

Barreto, H.M., Lima, I.S., Coelho, K.M.R.N, Osório, L.R., Mourão, R.A., Santos, B.H.C., Coutinho, H.D.M., Abreu, A.P.L., Medeiros, M.G.F., Citó, A.M.G.L., Lopes, J.A.D., 2014. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. European Journal of Integrative Medicine, 6, 560–564.

Betancourt, L., Phandanavong, V., Patiño, R., Ariza-Nieto, C., Afanador-Téllez, G., 2012. Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia, 59(1), 21-31.

Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostack A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J. Parasitol. 83(4), 575-583.

Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E.E., 2012. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. Journal of Stored Products Research, 50, 62-65.

Dias, M.K.R., Neves, L.R., Marinho, R.G.B., Tavares-Dias, M., 2015. Parasitic infections in tambaqui from eight fish farms in Northern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67 (4), 1070-1076.

Eiras, J.C., Takemoto R.M., Pavanelli G.C., 2006. Métodos de estudos e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Editora UEM. Maringá, 173 pp.

Escobar, P., Leal, S.M., Herrera, L.V., Martinez, J.R., Stashenko, 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105 (2), 184-190.

Guerra-Santos, B., Albinati R.C.B., Moreira, E.L.T., Lima, F.W.M., Azevedo, T.M.P., Costa, D.S.P, Medeiros, S.D.C, Lira, A.D., 2012. Parâmetros hematológicos e alterações histopatológicas em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com amyloodinose. *Pesq. Vet. Bras.* 32 (11), 1184-1190.

Hashimoto, G.S.O., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Achille, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of *Nile tilapia*. *Aquaculture*. 450, 182-186.

Huang, A.G., Yi, Y.L., Ling, F., Lu, L., Zhang, Q.Z., Wang, G.X., 2013. Screening of plant extracts for anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res.* 112, 4065-4072.

Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G.X., Chen, P., 2012. Screening of 42 medicinal plants for *in vivo* anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res.* 111, 97-104.

Martins, M.L., Moraes, F.R., Fujimoto, R.Y., Nomura, D.T., Fenerick Jr., J., 2002. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho X *Colossoma*

macropomum Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. B. Inst. Pesca. 28(2), 195-204.

Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A.S., Alonzo, V., 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. FEMS Microbiology Letters, 230,191–195.

Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Leitão, S.G., 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chemistry, 101, 236–240.

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution, p.339-352. In: Muller R. & Lloyd R. (Eds), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Fishing News Books, Oxford.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Padua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análises hematológicas em peixes. EDUEM: Maringá, São Paulo. 135p.

Ribeiro, A.F., Andrade, E.H., Salimena, F.R.G., Maia, J.G.S., 2014. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. Biochemical Systematics and Ecology, 55, 249-259.

Sarrazin, S.L.F., Silva, L.A., Assunção, A.P.F., Oliveira, R.B., Calao, V.Y.P., Silva, R., Stashenko, E.E., Maia, J.G.S., Mourão, R.H., 2015. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. Molecules, 20, 1860-1871.

Sarrazin, S.L., Silva, L.A., Oliveira, R.B., Raposo, J.D.A., Silva, J.K.R., Salimena, F.R.G., Maia, J.G.S., Mourão, R.H.V., 2015. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. Health and Disease, 14:145.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6, 75-86.

Soares, B.V., Tavares-Dias, M., 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*, 3 (1), 109-123.

Soares, B.V., Neves, L.R., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Dias, M.K.R., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M., 2016. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, 452, 107-114.

Steverding, D., Morgan, E., Tkacynski, Walder, F., Tinsley, R., 2005. Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp., infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Dis. Aquat. Org.* 66, 29-32.

Tavares-Dias, M., Sandrin E.F.S., Campos Filho E., 1999. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. *Revista Brasileira de Zoologia*. 16, 175-84.

Teles, S., Pereira, J.A., Oliveira, L.M., Malheiro, R., Machado, S.S., Lucchese, A.M., Silva, F., 2014. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K.. *Industrial Crops and Products*, 59, 169–176.

Vásquez, S.P.F., Mendonça, M.S., Noda, S.N., 2014. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 44 (4), 457-472.

Vera, S.S., Zambrano, D.F., Méndez-Sánchez, S.C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E.E., Luna, J.E.D., 2014. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113, 2647–2654.

Verján, N., Iregui, C.A., Rey, A.L., Donado, P., 2001. Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente. Revista AquaTIC, n.15.

Vicuña, G.C., Stashenko, E.E., Fuentes, J.L., 2010. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. Fitoterapia, 81, 343–349.

Zhang, X.P., Li, W.X., Ai, T.S., Zou, H., Wu, S.G., Wang, G.T., 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). Aquaculture. 420-421, 302-307.

6. CONCLUSÕES

- Os óleos essenciais de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* possuem eficácia *in vitro* contra parasitos de brânquias de *C. macropomum* em diferentes concentrações.
- Os óleos essenciais *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* não possuem eficácia *in vivo* contra parasitos de brânquias de *C. macropomum* em banhos terapêuticos nas concentrações e tempos de exposição utilizados neste estudo.
- Diferenças nas concentrações usadas para avaliar a atividade antiparasitária entre os óleos essenciais de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* foram verificadas, devido a constituição química e teor de seus principais componentes majoritários.
- Concentrações de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* causaram efeitos hematológicos indesejáveis quando usadas para tratamento antiparasitário em tambaqui, sendo o óleo de *L. origanoides* o menos danoso.
- Concentrações dos óleos essenciais causaram efeitos histopatológicos indesejáveis nas brânquias de *C. macropomum*, onde *L. alba* e *L. sidoides* causaram alterações severas e danos irreversíveis, enquanto *L. origanoides* causou danos leves a moderados; assim, não podem ser recomendadas para banhos terapêuticos, devido a toxicidade.
- O efeito anestésico causado pelo óleo essencial de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* para *C. macropomum* impossibilitou o uso de concentrações mais elevadas nos banhos terapêuticos, levando a uma ineficácia dos tratamentos.
- O uso dos óleos essenciais de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* em banhos terapêuticos contra parasitos de brânquias de *C. macropomum* não pode ser recomendado para banhos terapêuticos devido a toxicidade nas concentrações usadas.
- Espécies de *Lippia* sp. têm potencial bioativo para uso na medicina veterinária e aquicultura, uma vez que possuem efeitos *in vitro* em diferentes animais descritos na literatura, e também em peixes.

ANEXO 1

Soares, B.V., Tavares-Dias, M., 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*, 3 (1), 109-123.

ANEXO 2

Soares, B.V., Neves, L.R., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Dias, M.K.R., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M., 2016. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, 452, 107-114.