

# Efeito de Óleo Essencial de Alfavaca Cravo (*Ocimum gratissimum*) no Controle de Parasitos Monogenóides de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

**Juliana Oliveira Meneses<sup>1</sup>, Edsandra Campos Chagas<sup>2</sup>, Francisco Celio Maia Chaves<sup>3</sup>, Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>4</sup>**

## Resumo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* para o controle de monogenóides em tilápias (*O. niloticus*). O ensaio *in vitro* foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 3 repetições : controle 1 (água de confinamento), controle 2 (água + álcool 70%), tratamento 1 (40 mg/L de óleo de alfavaca cravo), tratamento 2 (160 mg/L de óleo) e tratamento 3 (320 mg/L de óleo) utilizando 5 monogenóides por tratamento. A mortalidade dos parasitas foi avaliada durante 5 horas. Para o  $CI_{50}$ , o teste definitivo utilizou 18 recipientes, 4 peixes em cada e durou 96 horas. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 concentrações de óleo de alfavaca cravo (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L) e um controle, e 3 repetições por concentração. A mortalidade foi avaliada a cada 6 horas com a remoção dos peixes mortos. Para o ensaio *in vivo* foram utilizadas 4 concentrações: 9 mg/L de alfavaca cravo, 40 mg/L (em banhos longos), 160 e 320 mg/L em banhos terapêuticos curtos. As tilápias foram distribuídas em 15 aquários de 90 l, contendo 5 peixes em cada. Foi utilizado DIC com 5 tratamentos (sendo 1 controle) e 3 repetições. Os banhos terapêuticos longos duraram 48 horas, e os curtos 3 tardes consecutivas com duração de 5 minutos (320 mg/L) e 10 min (160 mg/L). Para avaliar a eficácia

<sup>1</sup> Estudante de Graduação Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, juliana\_mns27@hotmail.com

<sup>2</sup> Engenheira de pesca, doutora em Aquicultura, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, edsandra.chagas@embrapa.br.

<sup>3</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Horticultura, pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, celio.chaves@embrapa.br.

<sup>4</sup> Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, rodrigo.fujimoto@embrapa.br.

15 peixes do controle e 3 de cada tratamento foram sacrificados para retirada de brânquias e fixadas em formol 10%. A quantificação dos monogenóides foi feita com auxílio do estereomicroscópio e os resultados foram utilizados para calcular a prevalência, intensidade média de infestação, total de parasitos, sobrevivência bem como a eficácia. No *in vitro* a concentração mais eficiente no controle de monogenóides foi 320 mg/L, o  $CL_{50}$  foi de 40,70 mg/L e no ensaio *in vivo* a melhor eficácia foi no tratamento 320 mg/L (88,73%) e a infestação foi menor no 320 e 160mg/L, sendo as concentrações indicadas para o controle de monogenóides em tilápias.

**Palavras-chave:** helmintos, óleo essencial, tratamento.

## Introdução

Com o aumento do número de pisciculturas em todo o Brasil associado à intensificação da produção tem-se observado surtos e altas mortalidades decorrentes de doenças pois o limiar de equilíbrio entre os agentes patogênicos, o ambiente e o hospedeiro, pode ser facilmente quebrado. Dentre essas doenças, as causadas pelos helmintos monogenóides estão entre os principais agentes causadores de enfermidades em peixes cultivados no Brasil (MARTINS et al., 2002; PINTO et al., 2009), sendo considerados obstáculos à produtividade dos animais em criação intensiva. Assim, o emprego de medidas mitigadoras nessas etapas do processo de produção é de extrema importância.

Nos últimos anos, em função do seu vasto potencial terapêutico e dos bons resultados obtidos com peixes e camarões em vários países do mundo como México, Índia, Tailândia e Japão (AURO DE OCAMPO e JIMENEZ, 1993; DEY e CHANDRA, 1995; DIREKBUSARAKOM et al., 1996; LOGAMBAL et al., 2000), o uso de plantas medicinais também tem sido priorizado na aquicultura para o tratamento de doenças causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitos (CHAKRABORTY e HANCZ, 2011). No tratamento das doenças ocasionadas por monogenóides, os óleos e extratos de plantas medicinais vêm sendo avaliados principalmente para reduzir ou evitar o emprego de quimioterápicos que provoca desenvolvimento de parasitos resistentes aos fármacos e impacto negativo no ambiente (DOUGHARI et al., 2009).

Nesse cenário destaca-se o *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo) espécie amplamente distribuída em regiões tropicais, tem como componente

majoritário do seu óleo essencial o eugenol, apresentando atividade analgésica, antimicrobiana, imunoestimulante e antifúngica (MATOS, 1998; RODRIGUES et al., 2006, SILVA et al., 2012). Em tambaquis, o emprego de banhos terapêuticos com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* apresentou eficácia no controle de monogenóides (MIRANDA et al., 2010; SOLDERA et al., 2011). Assim, o presente trabalho avaliou a eficácia do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* para o controle de monogenóides em tilápias (*O. niloticus*).

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados na Embrapa Tabuleiros costeiros. Os peixes naturalmente infectados foram adquiridos de produtores da região. O óleo essencial foi preparado de *Ocimum gratissimum*, o qual foi enviado para a Embrapa Tabuleiros Costeiros pela Embrapa Amazônia Ocidental. Em todos os experimentos utilizou-se a diluição do óleo em álcool (1/3 óleo: 2/3 álcool 70%) para melhorar sua dispersão na água. Essa mistura foi agitada vigorosamente por 1 minuto em vortex, até completa homogeneização.

Os peixes foram aclimatados em caixas de 500 L com sistema de recirculação e aeração artificial, a alimentação foi realizada com ração comercial extrusada para peixes onívoros com 28% de proteína bruta em duas alimentações diárias. Os parâmetros de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e amônia) de confinamento e dos experimentos foram monitorados durante os experimento e mantidos em condições ideais para o cultivo da espécie. Após aclimação os peixes foram utilizados em três ensaios experimentais: teste *in vitro*, determinação da concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>) e o ensaio *in vivo*.

### **Ensaio In vitro**

Inicialmente 10 peixes foram eutanasiados por concussão cerebral e os monogenóides (*Cichlidogyrus tilapiae*) foram coletados de arcos branquiais, com peso médio de 30-50 g. Para o ensaio "*in vitro*" foi preparada a solução mãe, composta de óleo de alfavaca-cravo e álcool 70%, 650 µl e 350 µl respectivamente. O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 3 repetições: Controle 1 (água do ambiente de confinamento); Controle 2 (água + álcool 70%); Tratamento 1 (40 mg/L do óleo de alfavaca-cravo); Tratamento 2 (160 mg/L do óleo de alfavaca-cravo) e Tratamento 3 (320 mg/L do óleo de alfavaca-cravo). Foram utilizados 5 monogenóides

por placa de petri e as mortalidades foram observadas a cada hora, através do estereomicroscópio, totalizando um período de 5 horas. A morte dos parasitas foi considerada quando os mesmos já não apresentavam nenhuma movimentação, tanto ao toque da pinça quanto na transferência para água sem óleo.

#### ***Toxicidade aguda do óleo de alfavaca cravo: Determinação do $Cl_{50}$***

Anteriormente ao ensaio definitivo foi realizado um teste preliminar (Screening) para determinação da menor concentração que causa 100% de letalidade. A partir dessa concentração foram determinadas as concentrações para o ensaio definitivo. Para o ensaio definitivo foram utilizadas 72 tilápias distribuídas em 18 recipientes contendo biomassa média de  $11,97 \pm 1,75$  g. Os testes foram conduzidos em sistema estático, com duração de 96 horas e em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 concentrações de óleo de alfavaca cravo (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L) e um controle, com 4 peixes por tratamento e 3 repetições por concentração. A mortalidade foi avaliada a cada 6 horas com a remoção dos peixes mortos.

#### ***Ensaio *in vivo****

Os melhores resultados no ensaio *in vitro* (320 e 160 mg/L), a dosagem observada na literatura para controle de monogenóides em tambaqui (9 mg/L) (SOLDERA et al., 2012), assim como o  $CL_{50}$  (40 mg/L) foram aplicados em banhos terapêuticos longos e curtos. As tilápias ( $61,27 \pm 25,81$ g;  $14,63 \pm 2,06$  cm) foram distribuídas em 15 aquários de 90 L, dotados de sistema estático, com aeração constante, contendo 5 peixes em cada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos foram: controle (água), T1 (9 mg/L de óleo de alfavaca cravo), T2 (40 mg/L de óleo de alfavaca cravo), T3 (160 mg/L de óleo de alfavaca cravo) e T4 (320 mg/L de alfavaca cravo). Os banhos terapêuticos foram aplicados por meio da diluição do óleo essencial na água dos aquários dos tratamentos 1 e 2 (9 mg/L e 40 mg/L) durante 48 horas, e nos tratamentos 3 e 4 (160 mg/L e 320 mg/L) o óleo foi aplicado em baldes de 5 L e as tilápias imersas durante 10 e 5 min em três tardes consecutivas, respectivamente. Para os tratamentos 3 e 4 foi feita recuperação dos peixes a cada banho, sendo estes repostos para os aquários novamente.

Após o ensaio, 15 peixes do controle e 3 de cada tratamento foram sacrificados por comoção cerebral e as brânquias coletadas e acondicionadas em frascos contendo formol 10%. Posteriormente, foram analisados os arcos branquiais em placa de Petri, e então efetuada a quantificação dos monogenóides (*Cichlidogyrus tilapiae*) com auxílio do estereomicroscópio. Com estes resultados foram calculados os índices parasitários de prevalência, intensidade média de infestação de acordo com Bush et al., 1997, o total de parasitos e a sobrevivência bem como a eficácia dos banhos terapêuticos de acordo e Martins et al., 2001.

### ***Testes Estatísticos***

Para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk, sendo distribuição normal os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando F foi significativo foi aplicado o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias (ZAR, 1999). A estimativa da concentração letal ( $CL_{50}$ ; 96h) foi realizada pela metodologia de Trimmed Spearman Karber (HAMILTON et al., 1977).

## **Resultados e Discussão**

### ***Ensaio in vitro***

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da água foram: temperatura  $27,1 \pm 0,07$  °C, oxigênio dissolvido  $6,8 \pm 0,92$  mg/L, pH  $6,5 \pm 0,91$  e amônia  $0,50 \pm 0,19$  mg/L. Tais valores estão de acordo com os encontrados por Mercante et al., 2007 ao avaliar a qualidade de água em viveiros de tilápia.

O teste realizado *in vitro* mostrou que o tratamento 3 (320 mg/L de óleo de alfavaca cravo) foi o mais eficiente. Na primeira hora obteve-se mortalidade de 87% porém sem diferença dos demais tratamentos e na segunda hora obteve-se eficácia de 100% com diferenças significativas em relação ao controle. Na terceira hora de exposição, os dois últimos tratamentos (T2 e T3) apresentaram eficiência no controle da carga parasitária. O tratamento 2 (160 mg/L de óleo de alfavaca cravo) apresentou eficácia de 33% e 87%, nas primeira e segunda horas respectivamente. Já o tratamento 1 (40 mg/L óleo de alfavaca cravo) mostrou eficiência somente nas duas últimas horas alcançando mortalidade de (80%) (Figura 1). Porém, foi observado que nas duas últimas horas, tanto os controles quanto os tratamentos não

apresentaram diferenças significativas no efeito sobre os monogênoides, devido principalmente a mortalidade dos próprios monogênoides fora do corpo dos hospedeiros (Figura 2). Na literatura que foi possível compilar não há registro de trabalhos sobre a eficácia *in vitro* sobre monogênoides. Porém em estudo realizado com outros parasitas *Argulus* spp, Mamadou et al., 2013 determinaram mortalidades 100% somente após 30 horas na concentração de 800 mg/L de extrato da planta, concentração acima da encontrada no presente trabalho com óleo essencial.

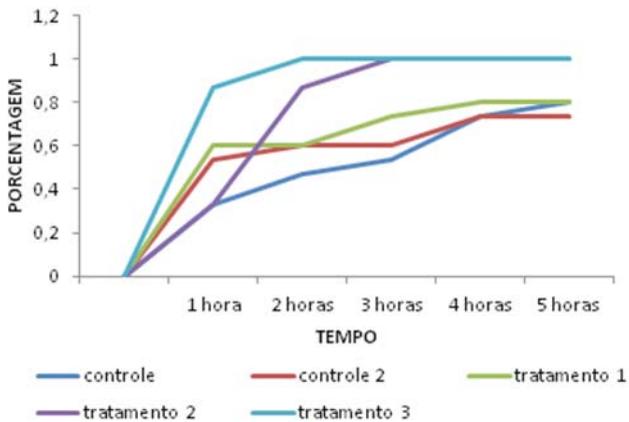


Figura 1. Valores de mortalidade acumulada de monogênoides de acordo com o tempo.

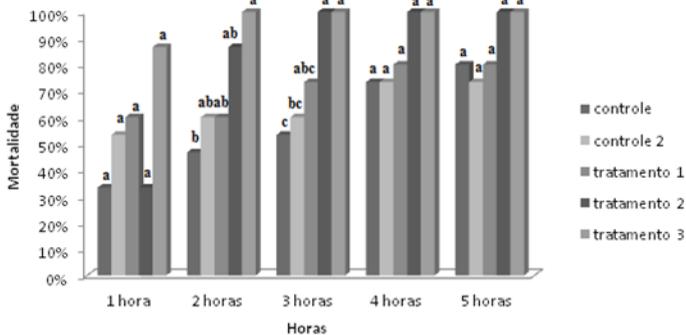


Figura 2. Valores de mortalidade (%) de monogênoides submetidas à diferentes concentrações do óleo de alfava cravo. Média. Valores da mesma coluna com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Assim, as concentrações de 160 mg/L e 320 mg/L que apresentaram eficácias de 100% poderiam ser utilizadas no controle *in vivo* dependendo da estratégia de aplicação pois, SILVA et al., 2012 afirmaram que concentrações acima de 30 mg/L são anestésicas nesta espécie e podem provocar mortalidades. Ao mesmo tempo, os autores também ressaltaram que em *Rhamdia quelen*, concentrações mais altas como 300 mg/l poderiam ser utilizadas em banhos de curta duração (4 minutos) para anestesiar sem causar prejuízos fisiológicos para os peixes ou mortalidades, podendo então ser uma estratégia para aplicação da terapia com óleo no controle de monogenóides. Um manejo estratégico onde se combine uma ação anestésica juntamente com a profilaxia, reduzindo o número de parasitas branquiais (monogenóides), seria interessante levando em conta a questão do bem estar animal. Utilizar o óleo como anestésico para realização de biometrias e juntamente estar prevenindo surtos de doenças por esse parasita.

#### ***Toxicidade aguda do óleo de alfavaca cravo***

Durante da realização do teste de toxicidade aguda o pH variou de 7,7 a 8,1, a temperatura de 24,7 a 26,9 °C, oxigênio dissolvido variou de 4,7 a 7,9 mg/L e o valor médio da amônia foi de 0,6 mg/L no entanto nenhuma das variáveis foi restritiva para a manutenção dos peixes nesta condição (Mercante et al., 2007).

A concentração letal 50% ( $CL_{50}$ , 96h) estimada do óleo de alfavaca cravo para a tilápia foi de 40, 700 mg/L com limite superior de 51,44 mg/L e inferior de 32,20 mg/L. As taxas de mortalidade encontradas foram de 33,33%, 50%, 75%, 83,33% e 100% para as concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L, respectivamente. Ressalta-se que nas seis primeiras horas de exposição ao óleo ocorreu mortalidade de 83,33% dos peixes na concentração de 100 mg/L. Trabalhos com esta planta em peixes ainda são escassos. Mamadou et al., 2013 utilizando extrato da planta determinou  $Cl_{50}$  1.271,22 mg/L, valor acima do encontrado no presente trabalho.

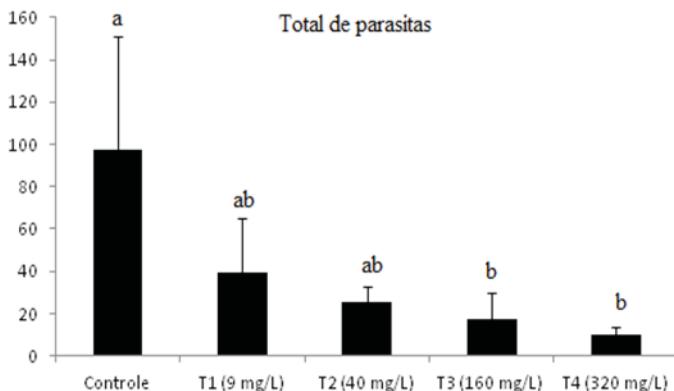
Outros estudos utilizando o componente principal do óleo essencial, o eugenol (73,6%) (SILVA et al., 2012), determinaram valores de  $Cl_{50}$  de 184,26 mg/L (VIDAL et al., 2008) e 71,68 mg/L (PRATTE-SANTOS e CARRIELO, 2010), para tilápias com 5,34 g e 0,44g, respectivamente. Demonstrando que o óleo essencial de *O.gratissimum* é mais tóxico que o eugenol para tilápias.

### Ensaio *in vivo*

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da água no ensaio *in vivo* foram: temperatura  $25,47 \pm 0,45$  °C, oxigênio  $5,77 \pm 1,77$  mg/L, pH  $7,59 \pm 0,16$  e condutividade  $1.305,733 \pm 389,6$   $\mu$ S/cm, valores estes não prejudiciais a tilápia.

Não houve diferença na sobrevivência entre os peixes submetidos ao óleo essencial em relação ao controle. Porém, observou-se comportamento semelhante ao encontrado por Miranda et al. (2010) com tambaquis, onde as tilápias submetidas ao banho de curta duração também ficaram anestesiadas mas retornaram a condição normal após serem recolocadas em água sem óleo. Este comportamento deve-se ao fato de que o eugenol é um anestésico bastante utilizado na aquicultura e é metabolizado e excretado de forma rápida (MIRANDA et al., 2010 citado por DERIGGI et al., 2006).

Com relação ao controle de parasitas, não foi observada diferença significativa entre os índices parasitários (prevalência e intensidade média) entre os tratamentos 1, 2, 3 e 4. No entanto os tratamentos com 320 mg/L e 160 mg/L na forma de banho curto apresentaram as maiores reduções na carga parasitária com eficácias de 88,73% e 82,25% ( $p < 0,01$ ), respectivamente (Figura 3).



**Figura 3.** Valores do número total de parasitas das tilápias submetidas aos banhos longos (T1 e T2: 9 mg/L e 40 mg/L) e banhos curtos (T3 e T4 : 160 mg/L e 320 mg/L).

Em trabalho realizado para controle de monogenóides em tambaquis utilizando *Ocimum gratissimum*, as maiores eficácias (93,75% e 100%) foram observadas nas concentrações de 10 mg/L e 15 mg/L (MIRANDA et al., 2010), concentrações essas estas muito menores do que os obtidos neste estudo (160 e 320 mg/L) porém o tempo de duração de exposição ao óleo foi de 15 dias, tempo de exposição maior do que o presente trabalho. Em tempo de exposição menores (3 horas) o óleo na água de transporte do tambaqui (*Colossoma macropomum*) reduziu a intensidade média de monogenóides (de 40 para 29 parasitas), na concentração de 3 mg/L (SOLDERA et al., 2012), valores mais baixos que o presente trabalho. Porém, a concentração, assim como o tempo de exposição interferem na eficácia do tratamento, assim como a sensibilidade de monogenóides é espécie-específico (FAJER-AVILA et al., 2003).

## Conclusões

A utilização de banhos curtos (T1: 160 mg/L – 10 min e T2: 320 mg/L – 5 min) são os mais indicados para o controle de monogenóides em tilápias.

## Agradecimentos

Piscicultura Santa Clara, localizada no Município de Propriá, Sergipe; José Júlio dos Santos (“Seu Tenente”), piscicultor.

## Referências

- AURO DE OCAMPO, A.; JIMENEZ, E.M. Herbal medicines in the treatment of fish diseases in Mexico. **Veterinaria México**, v. 24, p. 291-295, 1993.
- BUSH, A. O. et al. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575-583, 1997.
- CHAKRABORTY, S. B.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Rewiews in Aquaculture**, v. 3, p. 103-119, 2011.
- DERIGGI, G. F. ; INOUE, L. A. K. A. ; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientarium**, Biological Sciences, Maringá, v. 28, n. 3, p. 269-274, July/Sept., 2006.

- DEY, R.K.; CHANDRA, S. Preliminary studies to raise disease resistant seed (fry) of Indian major carp *Catla catla* (Ham.) through herbal treatment of spawn. **Fishing Chimes**, v. 14, p. 23-25, 1995.
- DIREKBUSARAKOM, S. et al. Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against pathogenic viruses. **Fish Pathology**, v. 31, p. 209-213, 1996.
- DOUGHARI, J.H., HUMAN, I.S., BENNADE, S., NDAKIDEMI, P.A. Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, p. 839-848, 2009.
- FAJER-ÁVILA, E.J.; PARRA, I.A.; AGUILAR-ZARATE, G.; CONTRERAS-ARCE, R.; ZALDÍVAR-RAMÍREZ, J.; BETANCOURT-LOZANO, M. Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. **Aquaculture**, v. 223, p. 41-50, 2003.
- FAO FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONSTHE. **State of World fisheries and aquaculture**, Roma, 2012.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C.; THURSTON, V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Techonology**, Iowa, v. 7, p. 714-719, 1997.
- JANSEN, H.; BACHTALER, E.; FOLSTER, E. et al. **Gartnerischer pflanzenban**. 2 ed. Stuttgart: Ulmer, 1989, 467 p.
- LOGAMBAL, S.M.; VENKATALAKSMI, S.; MICHAEL, R.D. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (peters). **Hydrobiologia**, v. 430, p. 113-120, 2000.
- MALTA, J. C. O. et al. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neochinorhynchus buttenerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001.
- MAMADOU, K. ; MOUSSA, C. ; KOUAMÉ, A. ; ELENA, S. R. ; AGATHE, F. ; LIVUI, M. D. In vivo antiparasitic effects of an African's traditional plant *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1758) on fish louse *Argulus spp.* infesting the Nile tilapia males *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in fish farming. **Open Science Repository Veterinary Medicine**, 2013.
- MARTINS, M.L., ONAKA, E.M., MORAES, F.R., BOZZO, F.R., MELLO, A., PAIVA, F.C., GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 24, p. 981-985, 2002.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 1998. 220 p.

MERCANTE, C.T.J.; MARTINS, Y.K.; CARMO, C.F.do; OSTI, J.S.; PINTO, C.S.R.M.; TUCCI, A. Qualidade da água em viveiro de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização diurna de variáveis físicas, químicas e biológicas, São Paulo, Brasil. **Bioikos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 79-88, 2007.

MIRANDA, W. S. DA C.; BOIJINK, C. de L.; CARVALHO, E.; INOUE, L. A. K. A.; CHAVES, F. C. M. Potencial do óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) no controle de monogenóides em tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 6., 2010, Manaus. **Anais...** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2010. p. 118-125.

PINTO, E. et al. Primeiro relato de *Tripartiella* sp. (Ciliophora: Peritrichia) em *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes: Pimelodidae) cultivado no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, com descrição de nova espécie. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p. 91-97, 2009.

PRATTE-SANTOS, R. ; CARRIELO, F. A. D. Toxicidade aguda de eugenol em juvenis I de Tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Científica da Faminas**, v. 5, n. 3, set-dez. 2010.

RODRIGUES, E. A. et al. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, p. 213-220, 2006.

SILVA, L. de L.; PARODI, T. V.; RECKZIEGEL, P.; GARCIA, V. de. O; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; MALMANN, C.A.; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B.M. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, p. 350-353, 2012.

Imagem marcado/desmarcado SOLDERA, J. L.; CHAGAS, E. C.; DAIRIKI, J. K.; BOIJINK, C. de L.; INOUE, L. A. K. A.; CHAVES, F. C. M. Uso do óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) na água de transporte do tambaqui (*Colossoma macropomum*) para controle de monogenóides. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 5., 2012, Palmas. **Unir, consolidar e avançar: anais**. Palmas: AQUABIO, 2012. 1 CD-ROM.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; LIRA, A. D.; ALMEIDA, T. R.; SANTOS, G. B. Eugenol como anestésico para a tilápia-donilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663 p.