

Avaliação in vitro da eficácia de formulações com produtos vegetais no controle do íctio

Carina Caroline Silva França¹, Rodrigo Yudi Fujimoto², Daniela Aparecida de Castro Nizio³, Paulo César Falanghe Carneiro⁴, Arie Fitzgerald Blank⁵, Alexandre Nizio Maria⁶

Resumo

O presente estudo visa avaliar a eficácia de formulações obtidas a partir de uma planta nativa do Estado de Sergipe no controle do íctio em peixes, a fim de obter um produto alternativo para o controle da doença. Esta pesquisa é de grande relevância, tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde humana. Foram testados três formulados (F1, F2 e F3) originados de plantas de uma mesma espécie que apresentavam três composições químicas diferentes. O ensaio in vitro foi realizado com duas fases do íctio: trofonte e tomonte, em diferentes concentrações, sendo 15 parasitas por tratamento com três repetições. A viabilidade do parasita foi verificada após uma hora de incubação determinada com um microscópio de epifluorescência, a emissão de fluorescência vermelha indica o parasita morto, enquanto a verde significa que o parasita está viável. O formulado F2 foi o que apresentou maior eficácia contra o íctio nesta fase, que proporcionou maior mortalidade aos protozoários em menor concentração comparada aos demais formulados. Na fase de tomonte, para os três formulados testados, a máxima mortalidade foi observada na maior concentração. Os formulados mostraram-se tóxicos para ambas as

¹ Graduanda em Ciências Biológicas Bacharelado, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

² Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

³ Engenheira-agrônoma, doutora em Biotecnologia, bolsista de pós-doutorado da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, professor da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

⁶ Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

fases do íctio, o que evidencia a ação antiprotozoária contra *I. multifiliis*, sendo potencialmente úteis no controle deste parasita.

Palavras-chave: aquicultura, ictiofitiríase, parasita, protozoário.

Introdução

A ictiofitiríase, conhecida como “doença dos pontos brancos”, é causada por um protozoário ciliado, *Ichthyophthirius multifiliis*, popularmente denominado de íctio. Este protozoário tem causado grandes perdas econômicas na indústria da piscicultura, seja em sistemas convencionais, de alta tecnologia, ou na produção de peixes ornamentais (MATTHEWS, 2005; HEINECKE; BUCHMANN, 2009; MARTINS et al., 2011). No Brasil, o íctio está entre os principais agentes causadores de enfermidades em peixes cultivados (MALTA et al., 2001; MARTINS et al., 2002; MARTINS; GHIRALDELLI, 2008; PINTO et al., 2009), sendo considerados obstáculos à produtividade dos animais em criação intensiva e isso tem feito com que os produtores se preocupem com a qualidade, sobrevivência e sanidade dos peixes.

Ultimamente o uso de plantas medicinais tem sido cada vez maior na aquicultura para tratamento de doenças causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas (HARIKRISHNAN et al., 2011; CHAKRABORTY; HANCZ, 2011) em função do seu vasto potencial terapêutico e dos resultados positivos obtidos com peixes e camarões em vários países do mundo como México, Índia, Tailândia e Japão (AURO DE OCAMPO; JIMENEZ, 1993; DEY; CHANDRA, 1995; DIREKBUSARAKOM et al., 1996; LOGAMBAL et al., 2000). Os óleos e extratos de plantas medicinais vêm sendo avaliados principalmente para reduzir ou evitar o emprego de quimioterápicos que provocam desenvolvimento de parasitos resistentes aos fármacos e impacto negativo no ambiente (DOUGHARI et al., 2009, PICÓN-CAMACHO et al., 2012).

Dessa forma, o presente estudo visa avaliar a eficácia de formulados obtidos a partir de uma planta nativa do Estado de Sergipe no controle do íctio a fim de obter um produto alternativo para o controle da doença.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados na Embrapa Tabuleiros Costeiros, para isso foram adquiridos peixes naturalmente infectados com *Ichthyophthirius multifiliis*, de uma piscicultura comercial de Aracaju, Sergipe-Brasil. Os parâmetros de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, e amônia) foram monitorados durante todo o período experimental.

Foram utilizados três formulados (F1, F2 e F3) obtidos a partir de uma planta endêmica no estado de Sergipe. Nos experimentos foram utilizadas duas fases do parasita: trofontes e tomontes encistados. Para obtenção dos tomontes, trofontes foram incubados por quatro horas a 24°C, conforme descrito por Fu et al., 2014.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos (concentrações da formulação) e um controle. O experimento foi realizado em triplicata. Para realização dos ensaios, 15 parasitas foram acondicionados em uma placa de Petri com água sendo a formulação adicionada logo em seguida. A viabilidade do parasita foi verificada após uma hora de incubação determinada com um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i, Tóquio, Japão), utilizando iodeto de propídio e SYBR-14 (Molecular Probes®). Os protozoários que emitiram fluorescência vermelha em microscópio de epifluorescência foram considerados mortos, enquanto os que emitiram fluorescência verde foram considerados viáveis (Figura 1).

As análises estatísticas foram do tipo descritivo, utilizando médias, desvio padrão e intervalo de confiança.

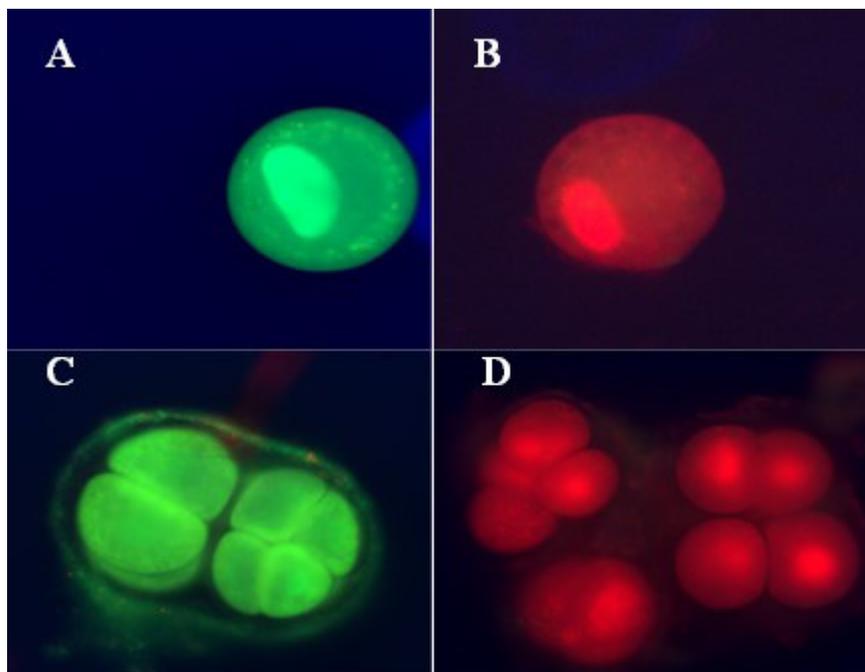


Figura 1. *Ichthyophthirius multifiliis* após coloração com os fluorocromos SYBR-14 e iodeto de propídio (IP). (A) Trofante emitindo fluorescência verde indicando a viabilidade do parasita. (B) Trofante com a membrana celular comprometida, emitindo fluorescência vermelha. (C) e (D) Em ambas as imagens, são possíveis identificar os produtos da divisão (tomites) no interior dos tomotes. (C) Tomote viável. (D) Tomote morto. As fotos estão em aumento de 100X.

Resultados e Discussão

Os parâmetros obtidos da água onde estavam os peixes foram: temperatura $23,8 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido $6,7 \pm 0,82$ mg/L, pH $7,7 \pm 0,9$ e amônia $0,40 \pm 0,21$ mg/L.

No experimento com trofontes, o formulado F2 foi o que apresentou maior eficácia contra o íctio nesta fase, que proporcionou maior mortalidade aos protozoários em concentração menor comparada aos demais formulados. Já para os tomotes, os formulados F1 e F3 apresentaram maiores taxas de

mortalidade em concentrações mais baixas que o formulado F2. Entretanto, na concentração mais alta os três proporcionaram máxima mortalidade.

Os formulados mostraram-se tóxicos contra as fases trofante e tomonte de *Ichthyophthirius multifiliis*. Os trofontes são mais difíceis de serem mortos do que o parasita na fase de vida livre (ZHANG et al., 2013), porque os trofontes são cobertos por uma camada de epiderme do hospedeiro e uma espessa camada de muco que os protegem das drogas adicionadas na água (DICKERSON, 2012). Os dados não foram disponibilizados devido ao sigilo exigido para fins de proteção da propriedade intelectual.

Conclusão

Através dos experimentos in vitro, as formulações F1, F2 e F3 foram tóxicas para as duas fases do íctio, o que evidencia a ação antiprotozoária contra *I. multifiliis*, sendo potencialmente úteis no controle deste parasita. Dessa forma, esses formulados poderão ser utilizados na agropecuária como uma alternativa aos quimioterápicos, visando o bem-estar do meio ambiente, animal e da saúde humana.

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.

CHAKRABORTY, S. B.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, p. 103-119, 2011.

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.

DICKERSON, H.W. *Ichthyophthirius multifiliis*. In: WOO, P. T. K.; KURT, B. (Ed.). **Fish parasites: pathobiology and protection**. Wallingford, England: CAB International, 2012. p. 55-72.

DIREKBUSARAKOM, S.; ANGKANA, H.; MAMORU, Y.; YOSHIO, E. 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.

FU, Y.W.; ZHANG, Q.Z.; XU, D.X.; LIANG, J.H.; WANG, B. Antiparasitic effect of cynaratoside-C from *Cynanchum atratum* against *Ichthyophthirius multifiliis* on grass carp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 7183-7189, 2014.

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

HEINECKE, R.D.; BUCHMANN, K. Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: dose-response studies. **Aquaculture**, v. 288, p. 32-35, 2009.

MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neochinorhynchus buttenerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001.

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.

MARTINS, M.L.; GHIRALDELLI, L. *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the State of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 169-172, 2008.

MARTINS, M.L.; XU, D.H.; SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 31, p. 774-780, 2011.

MATTHEWS, R.A. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. **Advances in Parasitology**, v. 59, p. 159-241, 2005.

PICÓN-CAMACHO, S. M.; MARCOS-LOPEZ, M.; BRON, J. E.; SHINN, A. P. An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. **Parasitology**, v. 139, p. 149-190. 2012.

PINTO, E.; GARCIA, A.M.; FIGUEIREDO, H.C.; RODRIGUES, M.P.; MARTINS, M.L. 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.

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