



Eficácia *in vitro* de óleos essenciais de espécies de Piperaceae no controle do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*

In vitro efficacy of essential oils of Piperaceae species in the control of acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*

Welliton Bezerra dos Santos¹, Cláudia Majolo^{2*}, Daniel Silva dos Santos³, Márcio Carvalho Rosa⁴, Patrícia Castro Monteiro⁵, Maria Juliete Souza Rocha⁶, Maria Inês Braga de Oliveira⁷, Francisco Célio Maia Chaves⁸, Edsandra Campos Chagas⁹

Resumo: Na criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) endoparasitos intestinais vem chamando a atenção pelo aumento de casos em peixes cultivados na região norte do Brasil. Este estudo investigou a eficácia *in vitro* dos óleos essenciais (OEs) de quatro espécies de plantas da família Piperaceae, sendo elas; *Piper hispidinervum*, *Piper hispidum*, *Piper marginatum* e *Piper callosum*, no controle do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* que acomete o tambaqui. As concentrações testadas de OE foram: 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg.mL⁻¹, em triplicata, em placas de petri contendo 10 parasitos por placa. Neste ensaio *in vitro*, todos os OEs estudados mostraram eficácia anti-helmíntica contra o acantocéfalo *N. buttnerae*. Houve maior mortalidade dos parasitos nas maiores concentrações e tempos de exposição aos OEs testados. As concentrações efetivas 50% (CE₅₀) foram obtidas através análise de probitos e avaliadas conforme o tempo de exposição em 2, 6 e 24 horas. O OE de *P. hispidinervum* apresentou menores valores de CE₅₀, de 0,56; 0,54 e 0,51 mg.mL⁻¹ comparados aos valores de obtidos para *Piper hispidum* (CE₅₀ de 5,44; 3,85 e 1,75 mg.mL⁻¹), *Piper marginatum* (CE₅₀ de 2,98; 1,3 e 1,27 mg.mL⁻¹) e *Piper callosum* (CE₅₀ de 2,66; 2,16 e 2,16 mg.mL⁻¹).

Palavra-chave: tambaqui, *Colossoma macropomum*, CE₅₀.

Abstract: In the creation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) intestinal endoparasites has been calling attention to the increase of cases in fish farmed in northern Brazil. This study investigated the *in vitro* efficacy of essential oils (OEs) of four species of plants of the family Piperaceae, these being; *Piper hispidinervum*, *Piper hispidum*, *Piper marginatum* and *Piper callosum*, in the control of *Neoechinorhynchus buttnerae* acanthocephalus that affect tambaqui. The tested concentrations of OE were: 0.19; 0.39; 0.78; 1.56; 3.125; 6.25; 12.5; 25 and 50 mg.mL⁻¹, in triplicate, into petri dishes containing 10 parasites per plate. In this *in vitro* assay, all OEs studied showed significant activity against the acanthocephal *N. buttnerae*. There was higher mortality of the parasites at the highest concentrations and times of exposure to the OEs tested. Effective concentrations of 50% (EC₅₀) were obtained through probit analysis and evaluated according to the exposure time in 2, 6 and 24 hours. The OE of *P. hispidinervum* showed lower values of EC₅₀ (0,56; 0,54 e 0,51 mg.mL⁻¹) compared to the values obtained for *Piper hispidum* (EC₅₀ de 5,44; 3,85 e 1,75 mg.mL⁻¹), *Piper marginatum* (EC₅₀ de 2,98; 1,3 e 1,27 mg.mL⁻¹) and *Piper callosum* (EC₅₀ de 2,66; 2,16 e 2,16 mg.mL⁻¹).

Key words: tambaqui, *Colossoma macropomum*, EC₅₀.

Recebido em 10.10.2018. Aceito 30.12.2118

Autor para correspondência: E-mail: claudia.majolo@embrapa.br

http

¹Graduando em Engenharia Ambiental, Universidade Nilton Lins, wbezerra16@hotmail.com;

^{2*}Doutora em Ciências Veterinárias, Embrapa Amazônia Ocidental, claudia.majolo@embrapa.br;

³Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), danssilva1203@gmail.com;

⁴Graduando em Ciências Biológicas, Centro Universitário do Norte (UNINORTE), marcio.jr1@outlook.com;

⁵Doutoranda em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pcmonteiro17@gmail.com;

⁶Doutoranda em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), juliete.sr@gmail.com;

⁷Doutoranda em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), maryabraga@hotmail.com;

⁸Doutor em Agronomia (Horticultura), Embrapa Amazônia Ocidental, celio.chaves@embrapa.br;

⁹Doutora em Aqüicultura, Embrapa Amazônia Ocidental, edsandra.chagas@embrapa.br

Introdução

O mercado mundial de pescado e aquicultura deve crescer 17% até 2025, passando de 166,8 milhões de toneladas registradas em 2013-15 para 195,9 milhões, e no Brasil, deve registrar um crescimento de 104% na produção da pesca e aquicultura no mesmo ano (FAO, 2016). Em 2016, a produção total da piscicultura brasileira foi de 507,12 mil toneladas, e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), muito cultivado na região norte, teve a segunda maior produção com 136,99 mil toneladas (IBGE, 2016).

Nos sistemas de criação, devem ser empregadas práticas de manejo adequadas que incluem a qualidade da água, qualidade nutricional e densidade dos animais no viveiro, caso contrário, podem ser ocasionados estresse e prejuízos ao sistema imunológico, que resultaria em patologias oportunistas, podendo levar o

animal à morte (WOO, 2006; XU et al., 2012).

Entre os principais grupos de parasitos nas pisciculturas brasileiras podemos destacar os protozoários, mixosporídeos, crustáceos e helmintos (MARTINS et al., 2001), e dentre os helmintos, os acantocéfalos vem chamando a atenção pelo aumento de casos em peixes cultivados na região norte do Brasil, possivelmente, decorrente da intensificação dos sistemas produtivos sem o emprego de boas práticas de manejo sanitário (CHAGAS et al., 2015). Segundo Kabata (1985) e Dezfuli et al. (2002), consequentes efeitos patológicos do acantocéfalo estão relacionados a sua probóscide, que ao fixar na parede intestinal do hospedeiro gera infecções, comprometendo o canal alimentar. Seu ciclo de vida ainda é indefinido e está relacionado a sua cadeia trófica, sendo

inicialmente necessário um artrópode como hospedeiro intermediário, e posteriormente um vertebrado (tambaqui) como definitivo.

Esta grande variedade de hospedeiros ajuda na maior dispersão destes parasitos nos ecossistemas aquáticos (SANTOS et al., 2013). As classes de acantocéfalos que parasitam os peixes são as Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala e Polyacanthocephala (AMIN, 1985; 1987). No Brasil os gêneros mais importantes são: *Echinorhynchus*, *Neoechinorhynchus* e *Polyacanthorhynchus* (EIRAS et al., 2010). Parasitando o tambaqui, há o registro do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* da classe Eoacanthocephala, que parasita o intestino delgado do animal, e pode viver em média um ano no seu hospedeiro definitivo (SANTOS et al., 2013).

Diante desta problemática, muitos produtos vêm sendo usados para o controle deste parasito, mas na sua maioria são tóxicos, trazendo risco para o animal, o homem e o meio ambiente (CHAGAS et al., 2015), e sendo o Brasil detentor da maior floresta tropical do mundo, com a mais rica biodiversidade de espécies de plantas do planeta, aproveitar essa riqueza para produzir fitoterápicos capazes de

controlar patógenos tem sido estimulado nos diferentes setores da produção animal (CORRAL, 2018).

No Brasil existem inúmeras espécies medicinais com uso terapêutico, principalmente aquelas que produzem óleos essenciais. O país possui uma alta diversidade de Piperaceae, com mais de 700 espécies, dentre as quais, 140-300 fazem parte da floresta úmida da Amazônia (FAZOLIN, et al, 2014). Além disso, os óleos essenciais vegetais são considerados fontes para o desenvolvimento de novos produtos naturais com grande potencial antiparasitário (BAKKALI et al., 2008). Há estudos positivos com óleos de Piperaceae na literatura, comprovando o potencial anti-helmíntico em ovinos e também em peixes como o pirarucu (CORRAL, 2018; GAINZA et al., 2017).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de quatro espécies de plantas da família Piperaceae no controle de *Neoechinorhynchus buttnerae* que acomete o tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Material e métodos

A Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental aprovou as atividades pertinentes a este trabalho sob o protocolo

nº 02/2017. A autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen) para uso de patrimônio genético foi a de nº AB1F0FA.

Extração do óleo

Após o corte e secagem das folhas, ramos e inflorescências das plantas, contendo de 20% a 30% da biomassa inicial foram usados para a extração dos óleos essenciais (OEs), que ocorreu por hidrodestilação em aparelho de Clevenger no Laboratório de Plantas medicinais e Fitoquímica na Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus-AM. Após a coleta, os óleos foram mantidos freezer a -18 °C.

A composição dos OEs foi determinada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas na Embrapa Agroindústria de Alimentos (RJ).

Obtenção dos parasitos

Os peixes utilizados neste trabalho foram adquiridos de fazendas com registro de acantocefalose, anestesiados com benzocaina a 10 % e em seguida eutanasiados por perfuração craniana, conforme CONCEA 2018. Posteriormente, para a coleta dos parasitos, foi realizada abertura na parte inferior dos peixes (cavidade visceral), para expor os órgãos internos. Em seguida, foi retirado o intestino e estômago de cada animal e

colocados em placas de petri. Por fim, abriu-se cuidadosamente os órgãos (intestinos delgado e grosso) parasitados, com auxílio de tesoura cirúrgica com ponta fina e pinça para retirada dos acantocéfalos.

Análise in vitro

A atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais (OE) foi testada no Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental. Os parasitos, inicialmente foram colocados em solução salina 0,9% para a sua lavagem, e, posteriormente, em um meio essencial mínimo (MEM). Foi adicionado ao MEM, com uma micropipeta, solução de 1 mL do OE já diluído em Tween 80 a 3%, em cada placa de petri contendo 10 parasitos. As concentrações testadas de OE foram: 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg.mL⁻¹, em triplicata. Os controles negativos foram com Tween 80 a 3% diluído em MEM e somente MEM.

Quanto a mortalidade, os parasitos foram observados por estereomicroscópio a cada 15 minutos durante sete horas para verificar a viabilidade dos parasitos, avaliada pela observação da motilidade, sendo considerados mortos os parasitos que não apresentaram movimentos, mesmo depois de um estímulo mecânico (SUTILI et al., 2014). Após 24 horas, fez-se a última quantificação da viabilidade dos

acantocéfalos.

A eficácia anti-helmíntica de cada tratamento foi calculada de acordo com a seguinte fórmula modificada de Wang et al. (2008): $AE = [C - T] \times 100\% / B$, onde AE é eficácia anti-helmíntica, C é o número médio de parasitos vivos de *N. buttnerae* no grupo controle (Tween 80 a 3% diluído em MEM) e T é o número médio de parasitos vivos no tratamento. A concentração letal (CE_{50}), capaz de ocasionar 50% de mortalidade do parasito, foi determinada para cada espécie de Piperaceae, para os períodos de 2, 6 e 24 horas usando o método Trimmed Spearman Karber (HAMILTON et al., 1977).

Resultados e discussão

Os óleos essenciais (OEs) das espécies de Piperaceae apresentaram como componentes majoritários os seguintes compostos: em *P. hispidinervum* o safrol (91,4%), em *P. hispidum*, γ -terpineno (30,9%), α -terpineno (14,4%) e p-cimeno (12,1%), em *P. Marginatum*, 3,4-metilenodioxipropiofenona (13,2%) e em *P. Callosum*, safrol (62,7%) e beta-pineno (9,4%).

Todos os OEs estudados mostraram eficácia anti-helmíntica *in vitro* contra o acantocéfalo *N. buttnerae*, com maior ocorrência de mortalidade nas maiores concentrações e no maior tempo de exposição (Figura 1). Para o OE de *P.*

hispidinervum, 100% de eficácia foi observada nas maiores concentrações (3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 $mg.mL^{-1}$), após 15 minutos de exposição (Figura 1a). Para o OE de *P. hispidum* após 2 h de exposição, a mortalidade de todos os parasitos só foi observada na maior concentração (50 $mg.mL^{-1}$), entretanto após 6h de exposição, 100% de eficácia foi observada nas quatro maiores concentrações (6,25; 12,5; 25 e 50 $mg.mL^{-1}$) (Figura 1 b). Já para o OE de *P. marginatum* (Figura 1c) e *P. callosum* (Figura 1d) 100% de eficácia também foi observada após 2 horas de exposição nas maiores concentrações testadas, com alcance de mortalidade máxima nas demais concentrações (de 3,125 a 50 $mg.mL^{-1}$) após 6 horas de exposição e também de 1,56 $mg.mL^{-1}$ após 24 h.

Menores valores de CE_{50} foram obtidos para o OE de *P. hispidinervum*, sendo estes semelhantes nos tempos de observação avaliados. Este óleo é composto majoritariamente de safrol (91,4%) seguido do OE de *P. callosum* (62,7%). Assim como o safrol, os compostos químicos eugenol e dilapiol também são classificados fenilpropenos e suas atividades anti-helmínticas já foram extensamente comprovada (ASHA et al., 2001; PESSOA et al., 2002; QUEIROZ et al., 2013; SUTILI et al., 2014; BOJINK et al., 2015). Portanto, sugere-se que a

presença de safrol em altas quantidades deva ter potencializado a atividade anti-helmíntica no OE de *P. hispidinervum*.

Alguns trabalhos já avaliaram o potencial anti-parasitário de diferentes óleos de *Piper*, como no caso de sementes de *Piper cubeba* contra *Schistosoma mansoni* em que o óleo apresentou-se eficaz nas várias fases do desenvolvimento ou do ciclo de vida do parasito, incluindo a dos vermes adultos (MAGALHÃES et al.,

2011). Ekanem et al. (2004) avaliando a atividade *in vitro* do extrato de sementes de *Piper guineense* contra parasitos de brânquias em *Carassius auratus*, observou nas concentrações de 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹, 80 e 100% de mortalidade, respectivamente. Já em pirarucu, o OE de *P. aduncum* demonstrou potencial anti-helmíntico no controle de larvas de nematoides sem afetar a homeostase dos peixes (CORRAL et al., 2018).

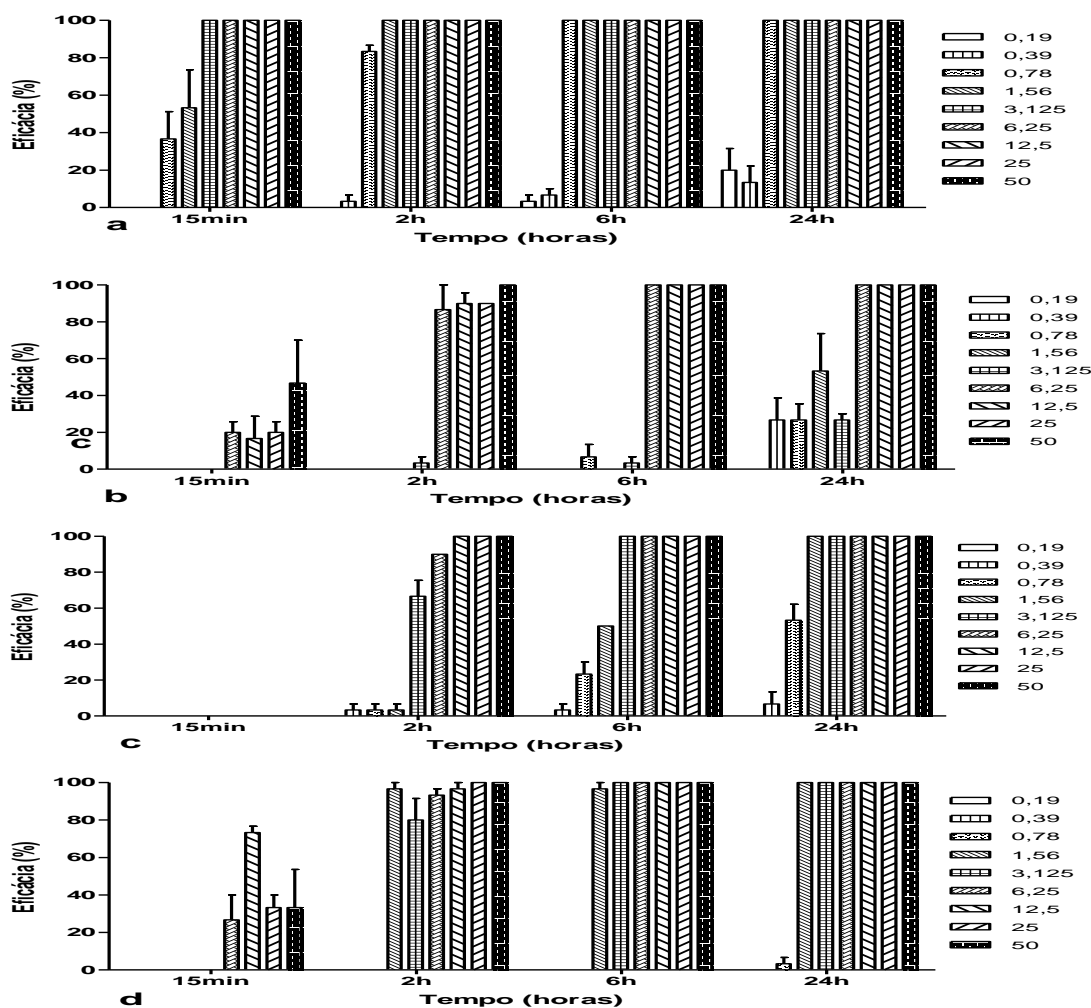


Figura 1. Eficácia anti-helmíntica *in vitro* dos OEs em diferentes concentrações e tempos de exposição: a) *Piper hispidinervum*; b) *Piper hispidum*; c) *Piper marginatum* e d) *Piper callosum*. C: controle; C+T: controle+Tween; todas as concentrações testadas estão em mg.mL⁻¹

As concentrações efetivas 50% (CE₅₀), estimadas conforme a mortalidade dos parasitos após 2, 6 e 24 horas de exposição aos OEs estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações efetivas 50% (CE₅₀) do óleo essencial das espécies de Piperaceae sobre o acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*.

Óleo essencial de	Tempo de exposição	CE ₅₀ µg/mL (intervalo de confiança)
<i>P. hispidinervum</i>	2 h	0,59 (0,53 – 0,66)
	6 h	0,51 (0,46 – 0,56)
	24h	0,51 *
<i>P. hispidum</i>	2 h	5,44 (4,71 – 6,29)
	6 h	4,12 (3,81 – 4,46)
	24h	1,75 (1,38 – 2,21)
<i>P. marginatum</i>	2 h	2,78 (2,36 – 3,27)
	6 h	1,29 (1,09 – 1,54)
	24h	0,67 (0,57 – 0,59)
<i>P. callosum</i>	2 h	2,78 (2,42 – 3,20)
	6 h	2,26 (2,16 – 2,36)
	24h	2,16 (2,06 – 2,26)

*Proporção de mortalidades não foram monotonicamente crescentes para determinação dos intervalos de confiança.

Estudos sugerem que os óleos essenciais também poderiam ser eficazes no tratamento ou prevenção de doenças parasitárias devido a propriedades como baixa densidade e rápida difusão através das membranas celulares (devido à sua solubilidade lipídica), que podem danificar suas estruturas e membranas celulares e conduzir à lise celular. Alguns óleos vegetais têm efeitos imunomoduladores que podem modificar a imunobiologia do hospedeiro-parasita, e a lipossolubilidade

dos óleos vegetais pode oferecer vias de entrega alternativas e transcutâneas, sendo que o surgimento de parasitas resistentes às quimioterapias atuais destaca a importância dos óleos essenciais das plantas como novos agentes antiparasitários (ANTONY et al., 2005).

Como nenhum trabalho até o momento avaliou a atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de *Piper* frente à *Neoechinorhynchus buttnerae*, os dados revelados no presente estudo

indicam usos promissores destes metabólitos secundários. Sugere-se agora uma avaliação de níveis de toxicidade e palatabilidade para futuras aplicações em rações visando testes *in vivo* para controle deste parasito emergente no cultivo do tabaqui, principalmente com relação à *Piper hispidinervum*.

5 Conclusões

Os OEs das Piperaceae estudados neste trabalho apresentaram eficiência como antiparasitário de acantocéfalos de tabaquis. O óleo da *P. hispidinervum* foi o que resultou em maior mortalidade em menor tempo de exposição *in vitro*. Portanto, os óleos essenciais apresentaram-se como fonte alternativa para o uso direto ou no desenvolvimento de anti-helmínticos fitoterápicos, requerendo avanço nos estudos para tratamento *in vivo*.

6 Agradecimentos

Agradecemos à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (MP2 - 02.13.09.003.00.00) pelo suporte financeiro, à FAPEAM pela bolsa concedida, à técnica Irani da Silva de Moraes por todo apoio prestado durante os experimentos e ao analista Marcelo Róseo de Oliveira pela extração dos óleos essenciais.

7. Referências bibliográficas

1. AMIN, O.M. Classification. In: CROMPTON, D.W.T.; NICKOL, B.B. (Ed.).

Biology of the Acanthocephala. Cambridge: Cambridge University Press, 1985, p. 27-72.

2. AMIN, O.M. Key to the families and subfamilies of *Acanthocephala*, with the erection of a new class (*Polyacanthocephala*) and a new order (*Polyacanthorhynchida*). **Journal of Parasitology**, v.73, p.1216-1219, 1987.

3. ANTHONY, J.; FYFEL, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v.21, n.10, p.462-468, 2005.

4. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

5. BOIJINK, C. de L.; DA CUNHA MIRANDA, W.S; CHAGAS, E.C.; DAIRIKI, J.K.; INOUE, L.A.K.A. Anthelmintic activity of eugenol in tabaquis with monogenean gill infection. **Aquaculture**, v. 438, p. 138-140, 2015.

6. CHAGAS, E.C.; MACIEL, P.O.; AQUINO-PEREIRA, S.L. Infecções por acantocéfalos: um problema para a produção de peixes. In: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Aspectos biológicos, fisiológicos e sanitários de organismos aquáticos. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. v. 1. p. 305-328.

7. CORRAL, A.C.T.; QUEIROZ, S.M. de; MOREY, G.A.M.; CHAVES, F.C.M.; FERNANDES, V.L.A.; ONO, E.A.; AFFONSO, E.G. Control of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. **Aquaculture**, v. 494, p. 37-44, 2018.

8. DEZFULI, B.S.; GIARI, L.; SIMONI, E.; BOSI, G., MANERA, M. Histopathology, immunohistochemistry and ultrastructure of the intestine of *Leuciscus cephalus* (L.) naturally infected with *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p.7-14, 2002.

9. EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. **Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Clichetec, 2010.
10. EKANEM, A.; WANG, M.; SIMON, J.; OBIEKEZIE, A.; MORAH, F. *In vivo* and *in vitro* activities of the seed extract of *Piper guineense* Schum. and Thonn. against skin and gill monogenean parasites of goldfish (*Carassius auratus auratus*). **Phytotherapy Research**, v.18, p.793-797, 2004.
11. FAO. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO, 2016a. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/423722/>> Acesso em: 06 Ago. 2018.
12. FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L.V.; YAMAGUCHI, K.K.L.; PIERI, F.A.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Amazon *Piperaceae* with Potential Insecticide Use. **Medicinal Plants: Phytochemistry, Pharmacology and Therapeutics**, v.3, p.423-440, 2014.
13. GAINZA, Y.A.; LOPES, L.G.; SILVA, M.H.; GIRALDELO, L.A.; BIZZO, H.R.; GAMA, P. E.; CHAGAS, A. Estudo comparativo da atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de *Piper* sobre o nematoide parasita de ovinos, *Haemonchus contortus*. In Embrapa Agroindústria de Alimentos-Resumo em anais de congresso (*ALICE*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 9., 2017, Caxias do Sul, RS. **Inovação e Sustentabilidade**. [Caxias do Sul: UCS, 2017].
14. HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURTON, R.V. 1977. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, v.11, n. 7, p.714-719, 1977.
15. IBGE, Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>> Acesso em: 06 Ago, 2018.
16. KABATA, Z. Diseases caused by worms—II—Nematoda and Acanthocephala. In: KABATA, Z. (Ed.). **Parasites and diseases of fish cultured in the tropics**. London & Philadelphia: International Development Research Council, p. 201-226, 1985.
17. MAGALHÃES, L.G., DE SOUZA, J.M., WAKABAYASHI, K.A., LAURENTIZ, R.D.S., VINHÓLIS, A.H., REZENDE, K.C., FERREIRA, D. S. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L.(*Piperaceae*) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, v.110, n.5, 1747-1754, 2012.
18. MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y. Mebendazole treatment against *Anacanthorus penlabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. **Acta Parasitologica**, v. 46, p.332-336, 2001.
19. PESSOA, L.M.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; LUCIANO, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.1–2, p.59–63, 2002.
20. QUEIROZ, M.N. de; DE ALMEIDA, Z.T.; AFFONSO, E.G. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA *Piper aduncum* L EM MONOGENÉTICOS E NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* CUVIER 1818. In: II Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq-PAIC/FAPEAM. **Anais eletrônicos...** Manaus, 2013. Disponível em: <<http://repositorio.inpa.gov.br/handle/123/714>>. Acesso em: 7 jul. 2018.
21. SANTOS, C.P.; MACHADO, P.M.; SANTOS, E.G.N. Acanthocephala. In: PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R.M.; EIRAS, J.C. **Parasitologia: Peixes de Água Doce**. Maringá, Eduem, p.353-370, 2013.
22. SUTILI, F.J.; GRESSLER, L.T.; BALDISSEROTTO, B. Anthelmintic activity of the phytochemical eugenol against the fish parasite *Gyrodactylus* sp. and acute toxicity in *Daphnia pulex*. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v.9, n.3, p.223–227, 2014.

23. WANG, G.X.; ZHOU, Z.; CHENG, C.; YAO, J.Y.; YANG, Z.W.; Osthon and isopimpinellin from *Fructus cnidii* for the control of *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. **Veterinary Parasitology**, v.158, p.144–151, 2008.

24. WOO, P.T.K. **Fish Diseases and Disorders**. 2nd. ed. Canadá: University of Guelph, 2006. v. 1: Protozoan and Metazoan Infections.

25. XU, D.; SHOEMAKER, C.A.; MARTINS, M.L.; PRIDGEON, J.W.; KLESIOUS, P.H. Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium *Edwardsiella ictaluri* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Microbiology**, v.158, p.216-219, 2012.