

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Anelise Levay Murari

**ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIPARASITÁRIOS CONTRA *Gyrodactylus*
liliana E *Ichthyophthirius multifiliis***

Santa Maria, RS
2016

Anelise Levay Murari

ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIPARASITÁRIOS CONTRA *Gyrodactylus lilianae* E *Ichthyophthirius multifiliis*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada a Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Berta Maria Heinzmann
Coorientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Murari, Anelise Levay
Óleos essenciais como antiparasitários contra
Gyrodactylus lilianae e Ichthyophthirius multifiliis /
Anelise Levay Murari.-2016.
181 p.; 30cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann
Coorientador: Bernardo Baldisserotto
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. Aloysia gratissima 2. Nectandra megapotamica 3.
Nectandra grandiflora 4. Gyrodactylus lilianae 5.
Ichthyophthirius multifiliis. Rhamdia quelen I.
Heinzmann, Berta Maria II. Baldisserotto, Bernardo III.
Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Anelise Levay Murari. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: aneliselm@gmail.com

Anelise Levay Murari

ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIPARASITÁRIOS CONTRA *Gyrodactylus lilianae* E *Ichthyophthirius multifiliis*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada a Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**.

Aprovada em 18 de março de 2016.

Berta Maria Heinzmann, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Joaber Pereira Junior, Dr. (FURG)

Lenise de Lima Silva, Dra. (URI)

Luciano de Oliveira Garcia, Dr. (FURG)

Mauro da Cunha, Dr. (UFSM)
MUDAR

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

À minha mãe pela dedicação de educar os seus filhos e alunos.

À minha orientadora pela oportunidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela possibilidade de ingressar no Doutorado.

A minha orientadora, Professora Dra. Berta Maria Heinzmann, pela dedicação e confiança, pelo carinho e por me ensinar que é preciso sempre ser forte.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Bernardo Baldisserotto, pelo apoio sempre gentil na colaboração com este trabalho.

Ao professor Dr. Solon Jonas Longhi, pela valiosa identificação do material vegetal deste estudo.

Ao professor Dr. Walter Boeger, pela disponibilidade na importante identificação da nova espécie de *Gyrodactylus*.

Ao professor Luciano de Oliveira Garcia pelos ensinamentos iniciais sobre a ictiofitiríase.

Aos membros da banca pela disposição em avaliar este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM pela disposição em contribuir para a minha formação, em especial Maria Amália Pavanato, Kátia Padilha Barreto, Sílvia Gonzalez Monteiro, Sydney Hartz Alves e Carlos Fernando de Mello.

Aos professores Rolando Estrada, Clarice Rolim e Anaelena Bragança de Moraes pelos conselhos.

Ao Hospital Universitário de Santa Maria pelo incentivo a esta qualificação com redução da carga horária do meu trabalho em 4 horas semanais.

Aos meus alunos de iniciação científica, Marcelle Moreira Peres, Daniele Beutinger, Césare Mattioda Machado, Samantha Spall e Patrícia Rodrigues pelo auxílio no laboratório e por me permitirem exercitar a orientação.

Aos estagiários de laboratório e depois colegas de pós-graduação Murilo Sander de Abreu e Thiago Acosta Oliveira cuja parceria tornou os trabalhos laboratoriais mais agradáveis.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes, Alexssandro Geferson Becker, Mauro Alves da Cunha, Carla Cristina Zeppenfeld, Thaylise Vey Parodi, Luciane Tourem Gressler, Geisa Sorezina Dolci, Cândida Toni, Jaqueline Ineu Golombieski, Joseânia Salbego, Ana Paula Gottlieb, Carine de Freitas, Ronaldo Lima de Lima, Alessandra Janaina Becker, Sheron Martins, Tanise Pês e Giovana de Moraes Ourique, pelo coleguismo e agradável convivência. Ao Fernando Jonas Sutilli, pelas discussões e estímulo para buscar soluções aos desafios experimentais.

Aos colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais, em especial Lenise de Lima Silva, Carlos Garrido Pinheiro, Luana Balconi, Luana Pires, Nadia Bianchini, Bruno Silva de Oliveira, Bibiana Batista e Jesica Três pelo companheirismo no laboratório.

À minha família em especial meus irmãos, Jean Carlos Levay Murari e Marcelo Cristian Levay Murari pelo apoio nos momentos difíceis e pela compreensão de minhas ausências durante a realização deste trabalho.

À minha dedicada mãe Lilian por sempre me estimular a buscar os meus sonhos e estudos... minha primeira professora de ciências e minha auxiliar técnica de laboratório nas madrugadas de experimentos... Deus me permitiu prestar-lhe uma homenagem ao batizar o novo parasito *Gyrodactylus lilianae*.

Ao Helon Albrecht Ludwig por acompanhar meu esforço na metade final do trabalho com companheirismo.

Ao meu padrasto Paulo Figueró, pelas caronas e conversas motivadoras.

Às minhas amigas, Clair Walker e Denise Andréia Szymczak por ouvirem meus medos e incertezas e compartilharem as suas, de modo que todas saíssem fortalecidas desta experiência que é ser doutoranda.

À minha prima e madrinha Eliane Marcello Pupim pelo incentivo em fazer doutorado e me hospedar em Curitiba durante o estágio na UFPR.

Enfim a todos que aqui não mencionados, mas que de alguma forma colaboraram muito obrigada.

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.”

“Seu tempo é limitado, então não percam tempo vivendo a vida de outro. Não sejam aprisionados pelo dogma – que é viver com os resultados do pensamento de outras pessoas. Não deixe o barulho da opinião dos outros abafar sua voz interior. E mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar. Tudo o mais é secundário.”

Steve Jobs

RESUMO

ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIPARASITÁRIOS CONTRA *Gyrodactylus lillianae* E *Ichthyophthirius multifiliis*

AUTORA: ANELISE LEVAY MURARI
ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMANN

A girodactilose e ictioftiríase resultam em importantes prejuízos econômicos na piscicultura. Vários produtos já foram usados no tratamento destas doenças e poucos apresentaram eficácia antiparasitária satisfatória. Assim, este trabalho visou obter novos produtos antiparasitários a partir de óleos essenciais (OEs) das plantas medicinais nativas: *Aloysia gratissima* (AEO), *Nectandra megapotamica* (MEO) e *Nectandra grandiflora* (GEO). Os OEs foram obtidos por hidrodestilação, analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e ao detector por ionização em chama. Foram conduzidos testes *in vitro* frente à *Gyrodactylus lillianae* e as concentrações testadas foram de 9 a 90 mg L⁻¹ (AEO), de 50 a 500 mg L⁻¹ (MEO) e 10 a 100 mg L⁻¹ (GEO), sendo determinada a concentração efetiva (CE) ao longo do tempo de exposição. A partir dos resultados *in vitro*, foram propostos protocolos de tratamentos *in vivo* para cada OE por banhos de imersão para girodactilose. Os juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) foram submetidos a dois banhos de 90 mg por 2 h (AEO) e 1 h com 200 mg L⁻¹ (MEO) e 50 mg L⁻¹ (GEO) sendo o intervalo de 24 h entre eles. A atividade antiparasitária frente aos tomontes do parasita *Ichthyophthirius multifiliis* foi avaliada *in vitro* para AEO (9 a 750 mg L⁻¹), enquanto que, para MEO e GEO, as concentrações testadas foram equivalentes às usadas contra *G. lillianae*. O protocolo de tratamento da ictioftiríase consistiu em banhos com duração de cinco dias a uma concentração constante de AEO (9 e 15 mg L⁻¹), enquanto que para GEO a concentração foi de 15 mg L⁻¹. Os principais constituintes do AEO foram: germacreno D (19,98%), β-cariofileno (12,97%) e p-cimeno (11,88%). Já para MEO os componentes majoritários foram α-pineno (25,5%), β-pineno (15,4%) e globulol (10,5%), enquanto que GEO apresentou dehidrofuquinona (17,08%), biciclogermacreno (11,47%) e α-pineno (4,98%) como principais constituintes. Todos os OEs testados apresentaram atividade antiparasitária contra *G. lillianae* e *I. multifiliis* nos ensaios *in vitro*. Os protocolos aplicados para girodactilose apresentaram eficácia de 98,4% (AEO), 90,7% (MEO) e 95,6% (GEO) após o primeiro banho, enquanto que após o segundo banho a eficácia anti-helmíntica foi de 100% para todos os OEs. Dos três OEs testados *in vivo* frente a *G. lillianae*, apenas GEO provocou mortalidade dos juvenis (8,33% após o segundo banho). O AEO não demonstrou ser eficaz para o tratamento da ictioftiríase, já GEO foi capaz de aumentar a sobrevivência dos peixes tratados. Os AEO e MEO apresentam potencial para o desenvolvimento de novos antiparasitários comerciais para o tratamento da girodactilose, enquanto GEO tem potencial utilização para o controle da ictioftiríase.

Palavras-chave: *Aloysia gratissima*. *Nectandra megapotamica*. *Nectandra grandiflora*. *Gyrodactylus lillianae*. *Ichthyophthirius multifiliis*. *Rhamdia quelen*.

ABSTRACT

ESSENTIAL OILS AS ANTIPARASITICS AGAINST *Gyrodactylus lillianae* AND *Ichthyophthirius multifiliis*

AUTHOR: ANELISE LEVAY MURARI
ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

Gyrodactylosis and ichthyophthiriasis resulted in significant economic losses in fish farming. Several products have been used in the treatment of these diseases and few showed satisfactory antiparasitic efficacy. Thus, this work aimed to obtain new antiparasitic drugs from essential oils (EOs) of native medicinal plants: *Aloysia gratissima* (AEO), *Nectandra megapotamica* (MEO) e *Nectandra grandiflora* (GEO). The essential oils were obtained by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and to flame ionization detector. *In vitro* assays against *Gyrodactylus lillianae* were conducted and the concentrations tested were 9 to 90 mg L⁻¹ (AEO) 50 to 500 mg L⁻¹ (MEO) and 10 to 100 mg L⁻¹ (GEO), aiming to determine the effective concentration (EC) over the exposure time. From the *in vitro* results, *in vivo* treatment protocols for gyrodactylosis have been proposed for each EO, using immersion baths. Juvenile silver catfish (*R. quelen*) were subjected to two baths with a 24 hour interval between them, at concentrations of 90 mg L⁻¹ for 2 h (AEO), 200 mg L⁻¹ (MEO) and 50 mg L⁻¹ (GEO), both for 1 h. The antiparasitic activity against the tomites of *Ichthyophthirius multifiliis* was evaluated *in vitro* for AEO (9 to 750 mg L⁻¹), while for MEO and GEO the concentrations tested were equivalent to those used against *G. lillianae*. The treatment protocol against is ichthyophthiriasis consisted of bath lasting five days at a constant concentration of AEO (9 and 15 mg L⁻¹), while for GEO the concentration tested was 15 mg L⁻¹. The main constituents of the AEO were: germacrene D (19.98%), β -caryophyllene (12.97%) and p-cymene (11.88%). However, for MEO α -pinene (25.5%), β -pinene (15.4%) and globulol (10.5%) were the major components, while GEO presented dehydrofukinone (17.08%), bicyclogermacrene (11.47 %) and α -pinene (4.98%) as the main components. All tested EOs showed antiparasitic activity against *G. lillianae* and *I. multifiliis* in *in vitro* assays. The protocols applied to gyrodactylosis showed efficacy of 98.4% (AEO), 90.7% (MEO) and 95.6% (GEO) after the first bath, while the anthelmintic effectiveness was 100% for all EOs after the second bath. Of the three EOs tested *in vivo* against *G. lillianae*, only GEO caused mortality of juveniles (8.33% after the second bath). AEO was not effective for treating ichthyophthiriasis, however GEO was able to increase the survival of treated fish. AEO and MEO have potential for development of new commercial antiparasitic drugs for the treatment of gyrodactylosis, while GEO have potential use for the control of ichthyophthiriasis.

Keywords: *Aloysia gratissima*. *Nectandra megapotamica*. *Nectandra grandiflora* *Gyrodactylus lillianae*. *Ichthyophthirius multifiliis*. *Rhamdia quelen*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Contribuição relativa da aquicultura e pesca de captura para obtenção de peixe para consumo alimentar no período de 1970 a 2012. (Percentagem de pescado kg/per capita) | 24 |
| Figura 2 | Imagem fotográfica de <i>Rhamdia quelen</i> (adulto)..... | 26 |
| Figura 3 | Micrografia eletrônica de varredura de <i>Gyrodactylus salaris</i> na pele de <i>Salmo salar</i> , as setas demonstrando as lesões na epiderme, causadas pela atividade do parasito..... | 31 |
| Figura 4 | Ilustração de <i>Gyrodactylus lilianae</i> . 1. Holótipo (ventral). 2. Órgão copulador masculino. 3. Haptor (ventral). 4. Gancho. 5. Âncora..... | 34 |
| Figura 5 | <i>Gyrodactylus lilianae</i> (ventral) A: holótipo corado com Tricrômio de Gomori; B: clarificado com Hoyer. Barra = 50 µm..... | 35 |
| Figura 6 | Haptor clarificado com Hoyer de <i>G. lilianae</i> , barra = 10 µm..... | 36 |
| Figura 7 | Ganchos de <i>Gyrodactylus lilianae</i> em diferentes preparações clarificadas com Hoyer, barra = 10 µm..... | 36 |
| Figura 8 | Detalhe do órgão copulador masculino de <i>Gyrodactylus lilianae</i> , vista frontal, clarificado com Hoyer. Barra = 50 µm..... | 37 |
| Figura 9 | Detalhes do órgão copulador masculino de <i>Gyrodactylus lilianae</i> , vista frontal: A, B, C e D; vista lateral: E e F; A: Corado com Tricrômio de Gomori, B,C,D,E,F: Clarificado com Hoyer. Barra = 1 µm..... | 37 |
| Figura 10 | Detalhe do germário de <i>Gyrodactylus lilianae</i> , A: com Tricrômio de Gomori e B: corado clarificado com Hoyer. Barra = 10 µm.... | 38 |
| Figura 11 | Detalhe dos bulbos da faringe de <i>Gyrodactylus lilianae</i> , clarificado com Hoyer. Barra = 10 µm..... | 38 |
| Figura 12 | <i>Gyrodactylus lilianae</i> grávido, detalhes mostrando os ganchos do primeiro e segundo embriões, clarificado com Hoyer. Barra = 50 µm..... | 39 |
| Figura 13 | <i>Gyrodactylus lilianae</i> fixos em barbilhão de <i>R. quelen</i> (A) e livres (B). Barra = 400 µm..... | 39 |
| Figura 14 | Juvenil de <i>Rhamdia quelen</i> altamente parasitado com <i>G. lilianae</i> , com lesões na derme (aumento de 4x)..... | 40 |
| Figura 15 | Juvenis de <i>Rhamdia quelen</i> altamente parasitados com <i>G. lilianae</i> . (A) Debilitado com lesões na cavidade bucal e ausência de barbilhões. (B) Debilitado com lesões e pontos necróticos na cavidade bucal, nadadeiras e cauda. (C) Morto em decorrência da girodactilose (lesões na cavidade bucal, ausência de barbilhões e áreas despigmentadas na pele)..... | 40 |
| Figura 16 | Ciclo de vida do <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> | 47 |
| Figura 17 | Juvenil de <i>Rhamdia quelen</i> com ictioftiríase..... | 48 |
| Figura 18 | <i>Aloysia gratissima</i> (Gillies et Hook) Troncoso | 55 |
| Figura 19 | <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez, em Santa Maria, RS, Brasil..... | 61 |
| Figura 20 | <i>Nectandra grandiflora</i> Nees..... | 65 |

| | | |
|----------|--|-----|
| | Artigo 1 | |
| Figura 1 | Effect of <i>A. gratissima</i> essential oil on <i>Gyrodactylus lillianae</i> (Means \pm SD). (A) <i>In vitro</i> assay. Bars with the same capital letters at the same time and lower case letters at the same concentration do not differ (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test, $P < 0.05$). (B) <i>in vivo</i> assay. (*) indicates significant from control and ethanol groups at the same time (multiple comparisons, Kruskal-Wallis, $P < 0.05$)..... | 100 |
| Figura 2 | Survival of silver catfish infected with <i>I. multifiliis</i> and treated with different concentrations of <i>Aloysia gratissima</i> essential oil (AEO). (*) indicates significant difference from the control group (0.0 mg L ⁻¹ AEO) and (#) indicates significant difference from the positive control group (4 g L ⁻¹ NaCl) at the same period (Kaplan–Meier survival analysis with Log-rank test, $P < 0.001$ and Holm-Sidak method, $P < 0.05$) (B) AEO effect on trophonts of infected silver catfish fish as a function of time. Different letters indicate significant difference at the same time of analysis (Scheirer-Ray-Hare extension of Kruskal-Wallis followed by Nemenyi test, $P < 0.05$)..... | 101 |
| | Graphical abstract..... | 102 |
| | Artigo 2 | |
| Figura 1 | Average number of parasites of the species <i>Gyrodactylus lillianae</i> per fish in relation to each bath. A: Treatment protocol with 200 mg L ⁻¹ essential oil of <i>N. megapotamica</i> (MEO); B: Treatment protocol with 50 mg L ⁻¹ essential oil of <i>N. grandiflora</i> (GEO); (*) Indicates significant difference between controls and treatment with the essential oil after bathing protocol (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$)..... | 126 |
| Figura 2 | (A) Survival of silver catfish infected with <i>I. multifiliis</i> and treated with <i>Nectandra grandiflora</i> essential oil (GEO). (#) indicates significant difference among the GEO groups and positive control at the same time. (*) indicates significant difference among the GEO groups and the negative control at the same time. Kaplan–Meier analysis of survival with Log-rank test ($P < 0.001$) and Holm-Sidak method ($P < 0.05$) (B) Effect of treatment on the infestation intensity (trophonts number in the body of the fish / number of infected fish) as function of time. (C) Infestation prevalence (%) as function of time. Different letters indicate differences between groups (Scheirer-Ray-Hare extension of Kruskal-Wallis test, with Nemenyi <i>post hoc</i> test, $P < 0.05$)..... | 127 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|-----|
| Tabela 1 | Espécies de Gyrodactylidae encontradas em <i>Rhamdia</i> sp..... | 30 |
| Artigo 1 | | |
| Table 1 | Chemical composition of the essential oil of <i>Aloysia gratissima</i> (AEO) | 98 |
| Table 2 | Antiparasitic activity of essential oil of <i>Aloysia gratissima</i> against <i>G. liliana</i> <i>in vitro</i> (P<0.05). Probit Analysis (Finney, 1971)..... | 99 |
| Artigo 2 | | |
| Tabela 1 | Chemical composition of the essential oils of <i>Nectandra megapotamica</i> (MEO) e <i>Nectandra grandiflora</i> (GEO) leaves..... | 122 |
| Tabela 2 | <i>In vitro</i> antiparasitic activity of essential oils of <i>Nectandra megapotamica</i> (MEO) and <i>Nectandra grandiflora</i> (GEO) against <i>G. liliana</i> . Probit Analysis (P<0.05) (Finney, 1971)..... | 124 |
| Tabela 3 | <i>In vitro</i> antiparasitic activity of essential oils of <i>Nectandra megapotamica</i> (MEO) and <i>Nectandra grandiflora</i> (GEO) against <i>I. multifilis</i> in 26 hours. Probit Analysis (P<0.05) (Finney, 1971)..... | 125 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| AChE | Acetilcolinesterase |
| AEO | Óleo essencial de <i>Aloysia gratissima</i> |
| CE | Concentração efetiva |
| CI | Concentração inibitória |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GABA _A | Receptor do tipo A do ácido gama-aminobutírico |
| GEO | Óleo essencial de <i>Nectandra grandiflora</i> |
| MEO | Óleo essencial de <i>Nectandra megapotamica</i> |
| OE | Óleo essencial |
| OEs | Óleos essenciais |
| RS | Rio Grande do Sul |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTROUÇÃO GERAL | 23 |
| 1.1 | AQUICULTURA E PRODUTOS NATURAIS | 23 |
| 1.2 | <i>Rhamdia quelen</i> (TELEOSTEI, SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) | 26 |
| 1.3 | PARASITOSSES NO CULTIVO DE <i>Rhamdia quelen</i> | 27 |
| 1.3.1 | Parasitas monogénéticos | 29 |
| 1.3.1.1 | <i>Gyrodactylus lilianae</i> | 32 |
| 1.3.1.2 | Tratamentos convencionais da girodactilose..... | 41 |
| 1.3.1.3 | Tratamentos com extratos vegetais para girodactilose..... | 44 |
| 1.3.2 | <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> | 46 |
| 1.3.2.1 | Tratamentos convencionais para ictiofitiríase..... | 48 |
| 1.3.2.2 | Tratamentos com extratos vegetais para ictiofitiríase..... | 51 |
| 1.4 | ÓLEOS ESSENCIAIS NA AQUICULTURA | 52 |
| 1.5 | ESPÉCIES VEGETAIS ESTUDADAS | 55 |
| 1.5.1 | <i>Aloysia gratissima</i> | 55 |
| 1.5.2 | Lauraceae | 60 |
| 1.5.2.1 | <i>Nectandra megapotamica</i> | 61 |
| 1.5.2.2 | <i>Nectandra grandiflora</i> | 64 |
| 1.6 | JUSTIFICATIVA..... | 66 |
| 1.7 | OBJETIVOS | 67 |
| 1.7.1 | Objetivo Geral | 67 |
| 1.7.2 | Objetivos específicos | 68 |
| 2 | ARTIGO 1 | |
| | Antiparasitic activity of the essential oil of <i>Aloysia gratissima</i> against monogenean infections and ichthyophthiriasis in silver catfish | 69 |
| | ABSTRACT | 70 |
| | 1 Introduction | 71 |
| | 2 Materials and methods | 73 |
| | 2.1 Plant material, isolation of essential oil and determination of its chemical composition | 73 |
| | 2.2 Animals and water quality | 74 |
| | 2.3 Experiment 1- Evaluation of antiparasitic activity against <i>Gyrodactylus lilianae</i> | 75 |
| | 2.3.1 <i>In vitro</i> assay | 75 |
| | 2.3.2 <i>In vivo</i> assay | 75 |
| | 2.4 Experiment 2- Evaluation of antiparasitic activity against <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> | 76 |
| | 2.4.1 <i>In vitro</i> assay | 76 |
| | 2.4.2 <i>In vivo</i> assay | 77 |
| | 2.5 Ethical | 77 |
| | 2.6 Statistical analysis | 78 |
| | 3 Results | 79 |
| | 3.1 Yield, density and chemical composition of essential oil | 79 |
| | 3.2 <i>In vitro</i> assay of AEO against <i>G. lilianae</i> | 79 |
| | 3.3 <i>In vivo</i> assay of AEO against <i>G. lilianae</i> | 79 |
| | 3.4 <i>In vitro</i> assay of AEO against <i>I. multifiliis</i> | 80 |

| | | |
|----------|--|------------|
| | 3.5 <i>In vivo</i> assay of AEO against <i>I. multifiliis</i>..... | 80 |
| | 4 Discussion | 81 |
| | 5 Conclusion..... | 85 |
| | Conflict of interest statemen..... | 86 |
| | Acknowledgment | 86 |
| | References..... | 86 |
| 3 | ARTIGO 2 | |
| | ANTIPARASITIC ACTIVITY OF LAURACEAE ESSENTIAL OILS | 103 |
| | Abstract | 104 |
| | Introduction | 105 |
| | Materials and methods | 106 |
| | Plant material, extraction of <i>Nectandra megapotamica</i> and <i>N. grandiflora</i> essential oils, and determination of their chemical composition | 106 |
| | Animals | 107 |
| | Assays against <i>Gyrodactylus lillianae</i>..... | 107 |
| | <i>In vitro</i> | 107 |
| | <i>In vivo</i>..... | 108 |
| | Assays against <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> | 108 |
| | <i>In vitro</i> | 108 |
| | <i>In vivo</i>..... | 108 |
| | Statistical analysis | 109 |
| | Results and Discussion..... | 109 |
| | Ethical approval | 113 |
| | Conflict of Interest | 113 |
| | References..... | 113 |
| 4 | DISCUSSÃO GERAL | 129 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 137 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 139 |
| | ANEXO A – DESCRIÇÃO DE <i>Gyrodactylus lillianae</i> n. sp. | 167 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho consiste na apresentação dos resultados obtidos durante o curso de Doutorado em Farmacologia. Inicialmente, na introdução, é apresentado um breve referencial teórico sobre os aspectos importantes do estudo, como a aquicultura e os produtos naturais, a espécie *Rhambdia quelen* e o parasitismo, os óleos essenciais e as espécies vegetais *Aloysia gratissima*, *Nectandra megapotamica* e *Nectandra grandiflora*. Adicionalmente, também são apresentados a justificativa, os objetivos gerais e específicos. O desenvolvimento do estudo apresenta a metodologia, os resultados e a discussão, que se encontram nos manuscritos a serem submetidos a periódicos da área. Subsequentemente, são apresentadas as discussões, as conclusões e as referências bibliográficas.

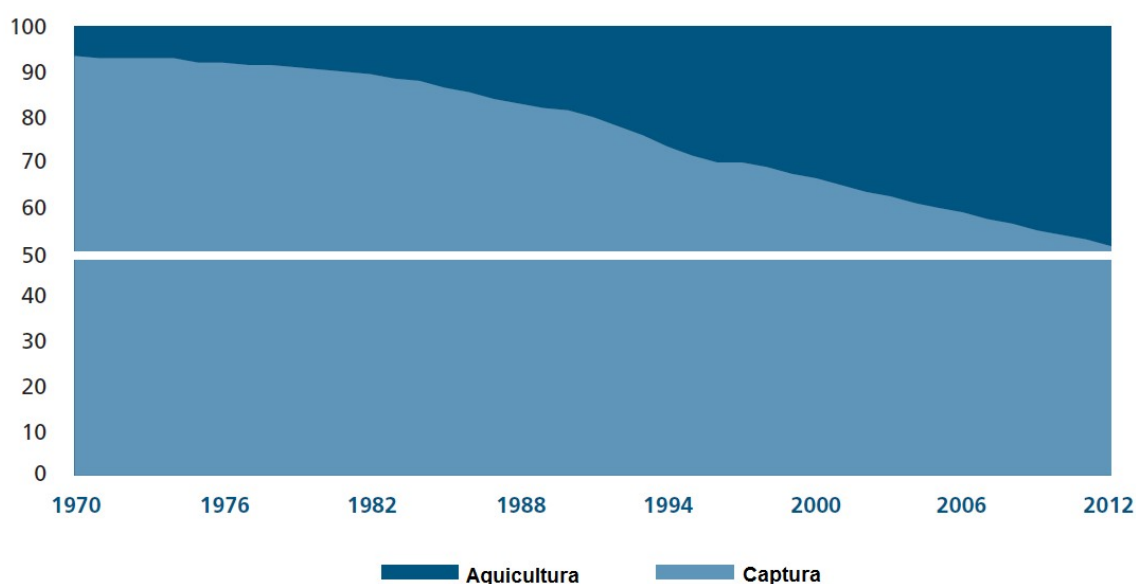
1.1 AQUICULTURA E PRODUTOS NATURAIS

Muitos estudos demonstram que a adição de carne de peixe na alimentação está relacionada a vários efeitos benéficos para a saúde humana (MOZAFFARIAN; WU, 2011; SALA-VILLA; CALDER, 2011; FAO, 2014) o que, por sua vez, tem favorecido a aquicultura. Além disso, a produção aquícola também é importante fonte de alimentos para animais e matéria-prima para a produção de nutracêuticos e bioativos. Um exemplo é o óleo de peixe, que apresenta ácidos graxos de cadeia longa poli-insaturados (ômega 3) e possui demanda crescente anual de 15-20 % (FAO, 2014). Esta tem sido considerada a indústria de produção de alimentos de maior crescimento nas últimas décadas, devido a investimentos governamentais e tecnológicos aliados ao crescimento populacional (GRIGORAKIS; RIGOS, 2011; TROELL et al., 2014; FAO, 2014).

Estima-se que em torno de 10 a 12 por cento da população mundial dependa da pesca e da aquicultura para a sua subsistência. Entretanto, a aquicultura, nos últimos anos, é a que mais tem se desenvolvido (Figura 1). Dados revelam que a produção aquícola global em 2012 atingiu um recorde histórico de 90,4 milhões toneladas (peso vivo equivalente), os quais incluíram em torno de 66,6 milhões toneladas de peixes e 23,8 milhões de toneladas de algas aquáticas. Em consequência, o montante de recursos gerados também foi grande e correspondeu a aproximadamente 144,4 milhões dólares americanos. A taxa de crescimento da

produção mundial aquícola de peixes entre os anos de 2000-2012 foi de 6,2%. As espécies de peixes teleósteos (Teleostei) corresponderam a dois terços (44,2 milhões de toneladas) da produção da aquicultura de interiores. O Brasil tem melhorado a sua posição no ranking dos principais países produtores, além de possuir um atrativo mercado consumidor (FAO, 2014).

Figura 1 – Contribuição relativa da aquicultura e pesca de captura para obtenção de peixe para consumo alimentar no período de 1970 a 2012. (Percentagem de pescado kg/per capita)



Fonte: Adaptado de FAO (2014).

A intensificação da aquicultura mundial têm-se demonstrado vulnerável, principalmente a surtos de doenças que resultam em importantes perdas parciais ou totais (BONDAD-REANTASO et al., 2005). Os principais fatores desencadeantes das doenças são a alta densidade populacional, manipulação periódica dos animais, baixa qualidade da água, alterações bruscas de temperatura, deficiências nutricionais e falta de controle sanitário. Estes fatores resultam em alterações fisiológicas nos animais como estresse e imunossupressão, favorecendo o aparecimento de doenças (NAYLOR et al., 2000; CABELLO, 2006; QUESADA; PASCHOAL; REYES, 2013).

A expansão da aquicultura passou a exigir a atualização da legislação brasileira para garantir o bem-estar animal, ambiental e a segurança do consumidor. Isso é especialmente válido para os sistemas de cultivo orgânico, que exigem uma produção de menor impacto ambiental e um produto final ao consumidor de maior

valor agregado. Com isso, as normas técnicas para os sistemas orgânicos de produção aquícola passaram a regulamentar os produtos farmacológicos veterinários que podem ser utilizados na profilaxia e tratamento de enfermidades ou pragas. Dentre os produtos permitidos, estão os fitoterápicos e os extratos vegetais, tornando o mercado dos produtos veterinários promissor para esta classe de produtos farmacêuticos (BANSEMIR et al., 2006; BRASIL, 2011). Fitoterápicos são medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Na composição dos fitoterápicos, não são permitidas substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas, sejam elas sintéticas, semissintéticas ou naturais, e nem as associações dessas com outros extratos, sejam eles vegetais ou de outras fontes, como a animal (BRASIL, 2014). Adicionalmente, a pesquisa de plantas medicinais pode dar origem também a fitofármacos, denominação dada aos produtos oriundos de metabólitos secundários úteis na terapêutica, utilizados na forma isolada (RATES, 2001).

As plantas medicinais e os extratos vegetais têm se mostrado muito eficazes em operações aquícolas, pelas suas propriedades: antiestresse, promotoras de crescimento, estimulantes do apetite, imunoestimulantes, promotores da maturação das espécies de cultivo e antipatogênicos para peixes e camarões. Essas atividades são atribuídas a diferentes classes de metabólitos secundários, como: alcaloides, terpenoides, taninos, saponinas, flavonoides, compostos fenólicos, esteroides e óleos essenciais (CITARASU, 2010; CHAKRABORTY; HANCZ, 2011). Isso se deve ao fato de que a utilização dos extratos vegetais para fins farmacológicos tender a reduzir: 1) os custos de produção; 2) os efeitos secundários da aplicação de substâncias sintéticas ao meio ambiente, uma vez que os produtos naturais tendem a serem biodegradáveis que os de origem sintética; 3) a produção de resistência pelos patógenos aos agentes terapêuticos, devido à presença da alta diversidade de moléculas com mecanismos de ação diversos em um extrato vegetal; 4) toxicidade. Portanto, o emprego de extratos vegetais e fitoterápicos na aquicultura, em especial os obtidos de plantas medicinais, pode resultar em menor resistência antimicrobiana por apresentarem ampla diversidade de moléculas com distintos mecanismos de ação (LOGAMBAL; VENKATALAKSHMI; MICHAEL, 2000; OLUSOLA; EMIKPE; OLAIFA, 2013; REVERTER et al., 2014).

Os antimicrobianos de origem sintética são amplamente utilizados para prevenir ou tratar infecções nos animais e no homem e são utilizados para acelerar o crescimento e desempenho dos animais, inclusive na aquicultura (KUMMERER, 2004). O uso abusivo destes fármacos está associado a diversos problemas, como a presença de resíduos na carne e outros derivados, além de desenvolver resistência de microorganismos a drogas convencionais, gerando um risco potencial à saúde humana e animal (SCHMIDT et al., 2000; AKINBOWALE et al., 2006; CABELLO, 2006; CARRASCHI et al., 2011).

1.2 *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)

Rhamdia abriga pelo menos 11 espécies, dentre as quais se destaca *R. quelen*, popularmente conhecida como jundiá (Figura 2). Esta espécie é endêmica da América do Sul, sendo encontrada desde o centro da Argentina até o sul do México, onde habita lagos e poços fundos dos rios, preferindo locais com águas calmas, fundo de areia e lama, junto a margens e vegetação. A sobrevivência normalmente ocorre em temperaturas entre 3 e 32°C, desde que adaptado lentamente. A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade em ambos os sexos e o seu período reprodutivo na natureza ocorre entre os meses de agosto e março, podendo apresentar variações. A desova é assincrônica, os ovos são recrutados de populações heterogêneas com os oócitos em desenvolvimento e liberados em várias ocasiões do período reprodutivo. Seus ovos são demersais e não aderentes (BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004).

Figura 2 – Imagem fotográfica de *Rhamdia quelen* (adulto)



Fonte: <http://www.fishbase.org/> Autor: Cláudio Dias Timm.

Na natureza, um adulto pode atingir 50 cm de comprimento e 3 quilos de massa corporal, sendo o tempo de vida teórico para as fêmeas de 21 anos e os machos, 11 anos. *R. quelen* é onívora, preferencialmente carnívora (GOMES et al., 2000). Quando cultivada pode atingir 500-600 g de peso corporal em seis a oito meses (BARCELLOS et al., 2001).

Seu cultivo está se intensificando no sul do Brasil, pois sua reprodução induzida apresenta bons resultados, facilidade de adaptação a diferentes ambientes, dietas artificiais e facilidade ao manuseio. Além disso, apresenta boa aceitação no mercado consumidor, boa produtividade em açudes e um alto potencial de comercialização, tornando-se uma ótima opção para o fomento da aquicultura (ZANIBONI FILHO, 2004). Esta é a principal espécie nativa na aquicultura continental no Estado do Rio Grande do Sul (BALDISSEROTTO, 2009), adicionalmente também é a espécie de maior potencial para o cultivo no estado (CIGANA, 2014).

Dados do Ministério da Pesca e da Aquicultura, a produção do jundiá na aquicultura passou de 911,0 toneladas em 2008 (BRASIL, 2012) para 1.747,3 toneladas em 2011 (BRASIL, 2013). Neste mesmo ano foram computadas 354,7 toneladas de pescado provenientes da pesca extrativa. O desenvolvimento da aquicultura do jundiá favorece o fortalecimento da agricultura familiar no Estado do Rio Grande do Sul (CIGANA, 2014). Além disso, permite o fornecimento de peixe de forma interrupta, o que favorece a adesão do mercado consumidor. Apesar das várias qualidades de *R. quelen* para o cultivo, como ocorre com qualquer espécie cultivada são necessários cuidados contra as enfermidades que possam afetar a produção (GARCIA et al., 2007).

1.3 PARASITOSSES NO CULTIVO DE *Rhamdia quelen*

O parasitismo é uma das principais fontes de mortalidade na natureza (DARGENT et al., 2013). A aquicultura intensiva que privilegia altas densidades populacionais como forma de maximizar a relação custo/benefício, favorece grandemente a disseminação e agravamento das parasitoses, resultando em prejuízos econômicos significativos (CUESTA et al., 2006; HANSON et al., 2008). Além dos danos diretos causados pelos parasitos, estes ainda podem estar envolvidos na ocorrência de bactérias, fungos e/ou vírus responsáveis por patologias

na aquicultura. De modo indireto, os mesmos podem acarretar redução nas taxas de assimilação, crescimento do animal e a diminuição do valor do produto final comercializável; conseqüentemente, podem levar à limitação drástica na sua exploração econômica (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002).

Os principais grupos de parasitos que causam doenças na aquicultura compreendem os dinoflagelados, os protozoários, os mixosporídeos, os monogenéticos e os crustáceos que, ao encontrarem condições adequadas, se proliferam causando as doenças (TAVECHIO, 2009). No estudo de Martins et al. (2000) realizado no estado de São Paulo (Brasil), em peixes provenientes de pisciculturas e pesque-pague que apresentavam acúmulo de animais nas bordas dos tanques ou açudes e progressiva mortalidade, as principais doenças detectadas foram ocasionadas por monogenéticos (36,6%), *Ichthyophthirius multifiliis* (29,5%), *Piscinoodinium pillulare* (18,0%), copepodídeos (15,2%) e adultos de *Lernaea cyprinacea* (13%), além de infecções secundárias por bactérias (20%) e fungos (17%). O estudo de Moyses et al. (2015) revelou que com peixes ornamentais que apresentavam lesões cutâneas, provenientes de pisciculturas ornamentais, também do estado de de São Paulo (Brasil), revelou os principais parasitos presentes nas lesões cutâneas como sendo: *I. multifiliis* (100%), *Trichodina* sp. (100%), *Epistylis* sp. (100%) e girodactilídeos (93,4%). Já nas brânquias desses peixes foram identificados: *I. multifiliis* (100%), e girodactilídeos (83,4%) e *Trichodina* sp. (73,4%). O parasitismo múltiplo por protozoários e platelmintos, com ou sem lesão aparente, pode ser fatal em peixes, principalmente se cultivados em condições ambientais precárias. Quando instaladas na aquicultura, as parasitoses exigem grandes esforços financeiros e de manejo que envolve altos custos com produtos, incluindo a mão de obra especializada, para que sejam eliminadas dos viveiros (TAVECHIO, 2009).

Uma diversidade muito grande de parasitos já foi reportada para *Rhamdia* spp., tanto no Brasil como em outros países (KOHN; COHEN, 1998; MOREIRA, 2000). *Rhamdia quelen* é muito suscetível a infestações por *Ichthyophthirius multifiliis*, podendo os juvenis morrerem em poucos dias se não forem tratados (GARCIA et al., 2007). Os parasitos monogenéticos também apresentam potencial para ocasionar perdas econômicas na produção de *Rhamdia quelen* (MARCHIORI et al., 2013). Assim, este trabalho procurou desenvolver alternativas para o tratamento de ictiofitiríase (agente etiológico é o *Ichthyophthirius multifiliis*) e

girodactilose (agente etiológico: *Gyrodactylus lillianae*) a partir de produtos da biodiversidade brasileira, sendo que na sequência é apresentada uma revisão destas doenças.

1.3.1 Parasitos monogenéticos

Rhamdia quelen é susceptível aos parasitos monogenéticos os quais podem causar danos à produção (MARCHIORI et al., 2013). Em um levantamento de registros, foram identificadas 523 espécies de monogenéticos reportados na América do Sul, sendo que destes, 252 espécies com ocorrência no Brasil. Adicionalmente, os principais registros em *Rhamdia* spp. ocorreram no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e na bacia do Rio Amazonas (KOHN; COHEN, 1998). Em *R. quelen* já foram relatadas infestações nas brânquias por *Aphanoblastella juizforense* (Dactylogyridae) (CARVALHO et al., 2009), *Scleroductus* sp. (Gyrodactylidae), *Urocleidoides mastigatus* (Dactylogyridae) (FERRARI-HOEINGHAUS et al., 2006) e *Aphanoblastella mastigatus* (MARCHIORI et al., 2013). Na bexiga urinária e ureteres do jundiá, foi descrita a presença da espécie *Kristyska moravecii* (Dactylogyridae) (KOHN; COHEN, 1998).

Gyrodactylidae van Beneden et Hesse, 1863 e Dactylogyridae Bychowsky, 1933 são duas grandes famílias de Monogenoidea, sendo que a primeira é composta, em sua maioria, por espécies vivíparas, e a segunda por espécies ovíparas (KUBITZA; KUBITZA, 1999). A família inclui grande parte das espécies vivíparas de Monogenoidea (BAKKE et al., 1992; KUBITZA; KUBITZA, 1999) e possui representantes ovíparos, com sete gêneros e apenas 21 espécies conhecidas (VIANNA, 2007). Representantes de Gyrodactylidae já foram descritos em *Rhamdia* spp., e encontram-se descritos na Tabela 1.

Em Gyrodactylidae as espécies vivíparas formam o maior grupo, com 25 gêneros e dentre os vivíparos, *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 é o gênero mais diverso, com mais de 450 espécies descritas (BOEGER et al., 2003; HARRIS et al., 2004; BAKKE et al., 2007). Entretanto, há estimativas de que existam, aproximadamente, 20.000 espécies de *Gyrodactylus* em todo o mundo (BAKKE et al., 2002). Muitas dessas espécies causam sérias ameaças à manutenção de populações de peixes na natureza e em cativeiro (BAKKE et al., 2002; GARCIA-VÁSQUEZ et al., 2007).

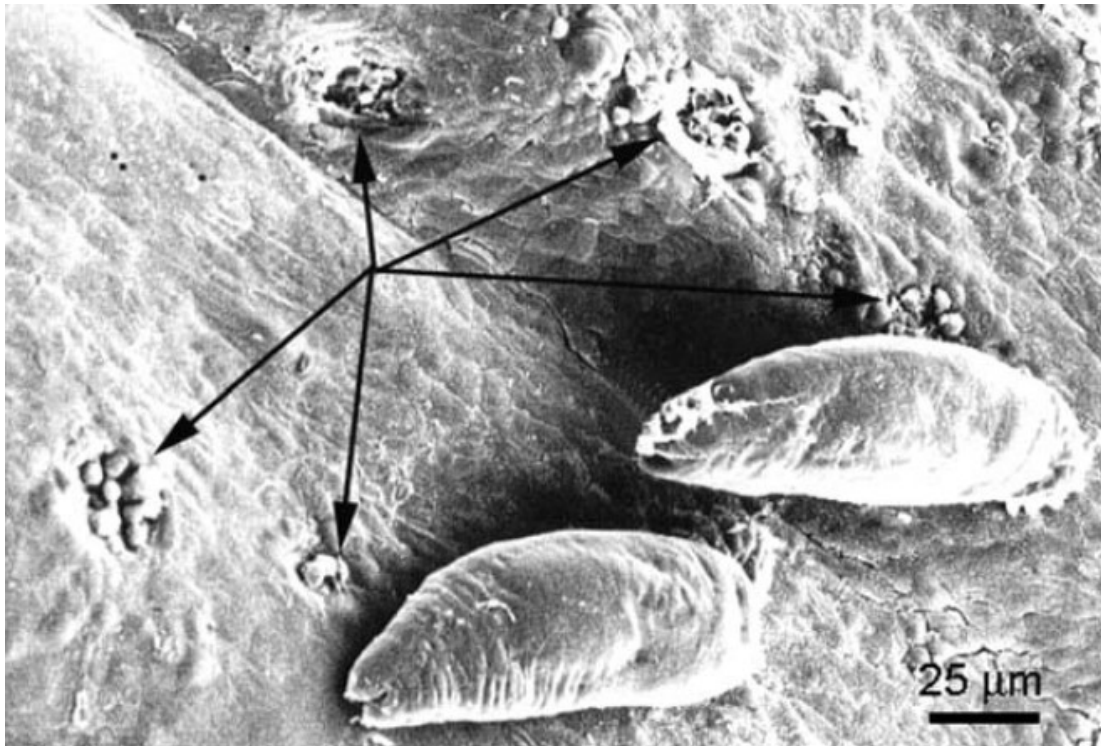
Tabela 1 – Espécies de Gyrodactylidae encontradas em *Rhamdia* sp.

| Espécie | Hospedeiro | Localização | Referências |
|-----------------------------------|---|--|----------------------------------|
| <i>Scleroductus</i> sp. | <i>Rhamdia quelen</i> "Quoy and Gaimard" | Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil | KRITSKY et al., 1995. |
| <i>Scleroductus</i> sp. | <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824) | Rio São Francisco Verdadeiro, Paraná, Brasil | FERRARI-HOEINGHAUS et al., 2006. |
| <i>Scleroductus</i> sp. | <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy and Gaimard, 1824) | Aquicultura Panamá, Paulo Lopes, SC, Brasil. | FIGUEREDO et al., 2014. |
| <i>Scleroductus lyrocleithrum</i> | <i>Rhamdia guatemalensis</i> (Günther) | Ixin-há Cenote, Yucatan Peninsula, Mexico | KRISTSKY et al., 2013. |
| <i>Scleroductus</i> sp. | <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1982) | Rio Iguaçu, Água Azul, Lapa, Paraná, Brasil. | KRISTSKY et al., 2013. |

Dentre os parasitos monogenéticos, o gênero mais importante economicamente é o *Gyrodactylus*, que apresenta distribuição mundial e ocorre tanto no ambiente natural quanto em cativeiro, atingindo espécies marinhas e de água doce (POPAZOGLO; BOEGER, 2000; ZIĘTARA; LUMME, 2002; MEINILÄ et al., 2004). Estes parasitam predominantemente as brânquias e a superfície corporal de seus hospedeiros (POULIN, 2002). As lesões causadas pela aderência do parasito causam alterações osmorregulatórias no hospedeiro, tornando-o mais suscetível a infecções causadas por bactérias, fungos e outros parasitos (COLLINS et al., 2002; MARTINS et al., 2011; PETTERSEN et al., 2013).

Os mecanismos de interação imunológica entre monogenéticos e peixes ainda não foram bem descritos. No entanto, a girodactilose parece estar envolvida em alterações nas células produtoras de muco, com possível relação na proteção do peixe contra o ataque pelo parasito (ESTEBAN, 2012).

Figura 3 – Micrografia eletrônica de varredura de *Gyrodactylus salaris* na pele de *Salmo salar*. As setas demonstram as lesões na epiderme causadas pela atividade do parasito



Fonte: Bakke et al., (2007).

Algumas espécies são responsáveis por formas graves de girodactilose, como é o caso de *Gyrodactylus salaris* Malmberg (Figura 3), que teve um efeito devastador sobre populações de salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) da Noruega. Sua introdução neste país ocorreu na década de 1970 e de forma acidental, provavelmente por salmões importados da Suécia (BAKKE et al., 2002; BAKKE et al., 2007). *Gyrodactylus salaris* devastou a indústria do salmão norueguês, matando 86% dos salmões dos rios devido a esta infestação e causando prejuízos econômicos em torno de 500 milhões de euros (BAKKE et al., 2007). Dados mais recentes estimam perdas de 326 milhões de reais/ano apenas na Noruega ocasionadas pelo *G. salaris* (PALLADINI, 2012). *Gyrodactylus salaris* é um parasita obrigatório e de ciclo direto (OIE, 2012), onde a sua transmissão se dá de forma horizontal, direta ou indiretamente (FIGUEIREDO, 2010). Em temperaturas entre 0 e 25°C o parasita sobrevive bem. Fora do hospedeiro, sua capacidade de sobrevivência também varia de acordo com a temperatura, pois quando exposto a 3°C, o mesmo resiste no ambiente ou na carcaça dos peixes abatidos por 132 e 365

horas, respectivamente. Congelamento, dessecação e pH menor que 5 inativam o patógeno (OIE, 2012).

Conseqüentemente, esta grave girodactilose passou a ser considerada uma doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial para da Saúde Animal (OIE, 2012) e vários países tomaram medidas de precaução para evitar a introdução do parasita. Por conseguinte, a Comissão Europeia restringiu a importação de salmonídeos que são suscetíveis a *G. salaris* para áreas com um estatuto sanitário equivalente (COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2004). A espécie *G. salaris* pode se reproduzir e sobreviver tanto em salmonídeos quanto não-salmonídeos, entretanto, a forma clínica grave foi observada apenas em *Salmo salar* (PEELER et al., 2006). Assim autoridades governamentais empregaram esforços durante anos para controlar a dissiminação do parasito tanto em rios como pisciculturas, a fim de se evitar maiores perdas econômicas (PEELER et al., 2006; BAKKE et al., 2007).

1.3.1.1 *Gyrodactylus lilianae*

Gyrodactylus lilianae (Figuras 4-15) foi descrita primeiramente por este trabalho (BOEGER et al., 2016) sendo isolada em juvenis de *Rhamdia quelen* provenientes da piscicultura Barragem do Chasqueiro, Pelotas, RS, Brasil. A identificação de espécies de *Gyrodactylus* pode ser feita pela sua morfologia, observando os indivíduos vivos ou fixados por meio de microscopia, enquanto a identificação filogenética é realizada por meio de análise molecular (OIE, 2012). A morfologia da espécie foi estudada com espécimes do parasito através da montagem de lâminas. Parte corada em tricrômico de Gomori para observação de partes moles, e parte clarificada em Hoyer para observação das estruturas esclerotizadas (HUMANSON, 1979). Na descrição o holótipo foi desenhado (Figuras 4, 5). As estruturas de importância na descrição igualmente foram desenhadas e medidas o haptor (Fig. 6), ganchos (Fig. 7), órgão copulador masculino (Fig. 8 e 9), germário (Fig. 10) e faringe (Fig. 11). A descrição detalhada dessa espécie encontra-se no artigo Boeger et al. (2016) (ANEXO).

G. lilianae é vivípara, ou seja, um ectoparasito poliembriônico (Figura 12). Esta característica reprodutiva desses monogenéticos originou o nome popular “Russian dools” ou “boneca russa” em alusão às bonecas tradicionais russas; onde

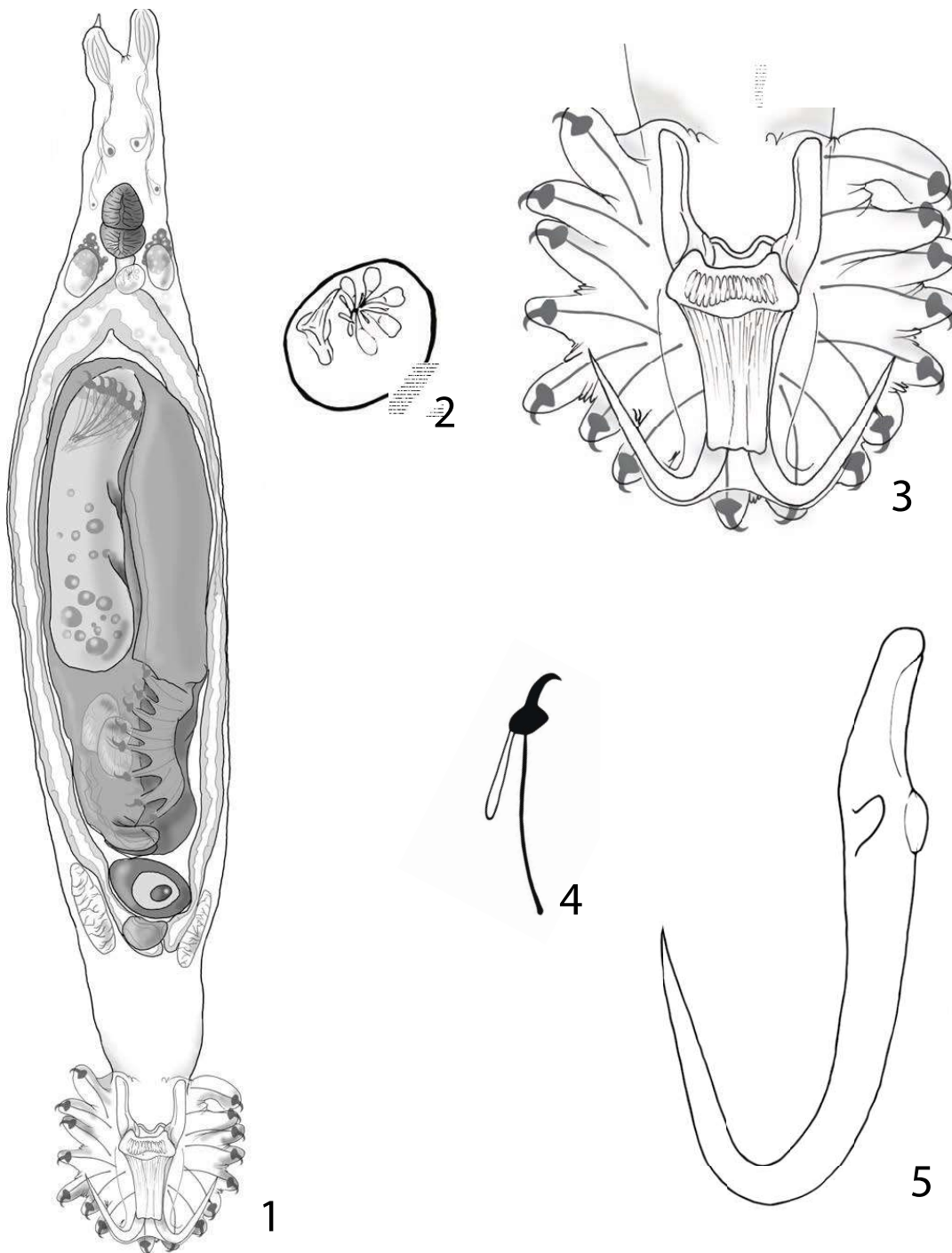
bonecas de tamanhos decrescentes são colocadas uma dentro da outra (BAKKE et al., 2007). O primeiro embrião contém em seu útero um segundo embrião, o qual inclui um terceiro embrião, podendo atingir até quatro gerações, uma dentro da outra. Essa hiperviviparidade e a capacidade de alterar entre a reprodução sexuada e assexuada permite um crescimento populacional exponencial em um curto período de tempo (CABLE; HARRIS, 2002).

Os peixes infestados apresentavam o parasito nas nadadeiras, barbilhões (Figura 13), pele (Figura 14), brânquias, olhos e cavidades corporais. Os parasitos também foram capazes de infestar peixes de diferentes faixas etárias. Entretanto, a infestação demonstrou ser mais severa em juvenis de *R. quelen* que, ao apresentarem intensidade de infestação (Bush et al., 1997) em torno de 300 parasitos/peixe, demonstraram alterações comportamentais como: perda do apetite, natação com choque na parede dos tanques e procura do aerador ou superfície da água. Essa movimentação dos juvenis frequentemente resultava em lesões na cavidade bucal (Figura 15). Significativo aumento na produção de muco é facilmente evidenciado pelo acúmulo deste nas paredes dos tanques, sendo que estas alterações já foram descritas para infecções de outras espécies de *Gyrodactylus* (ESTEBAN, 2012).

No desenvolvimento da infecção, os peixes começaram a apresentar ausência dos barbilhões, diminuição no tamanho das nadadeiras e lesões na derme, devido às agressões do parasito no peixe e o comportamento dos juvenis ao chocar-se contra as paredes do aquário (Figura 15). As alterações comportamentais da girodactilose ocasionada por *G. lillanae* são semelhantes às causadas por outros parasitos do gênero (VAN OOSTERHOUT; HARRIS; CABLE, 2003; OIE 2012).

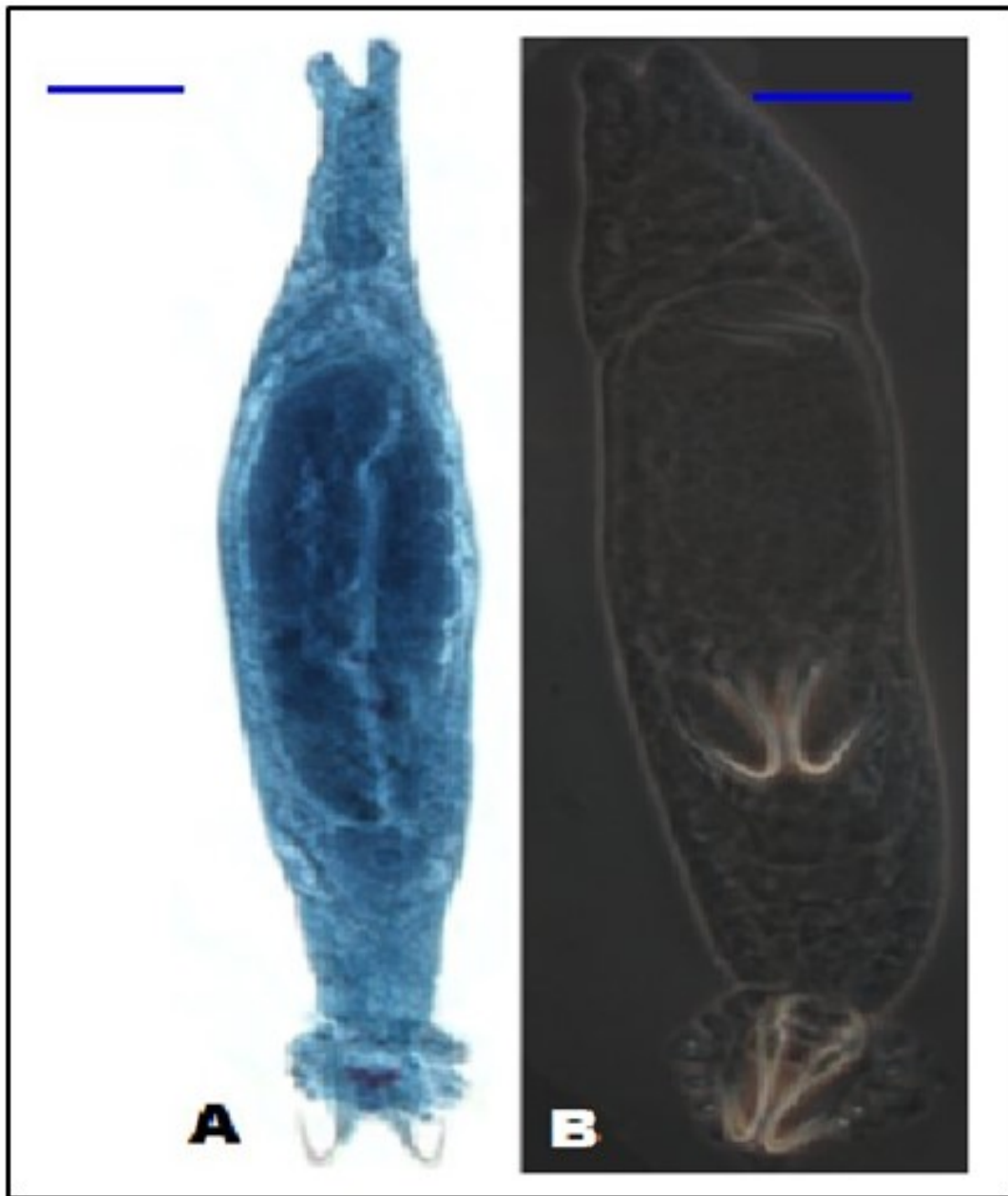
Rhamdia quelen altamente parasitados (1000-2500 parasitos/peixe) apresentaram mortalidade de $36,5 \pm 0,71\%$ nos primeiros 30 dias de infecção, sendo excluídas outras possíveis causas como outras espécies de parasitos e bactérias, através de análises microscópicas e microbiológicas. Entretanto, no decorrer da parasitose ficam mais propensos a coinfeções pelo protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* e bactérias *Aeromonas hydrophyla*, resultando em um aumento da taxa de mortalidade (BOEGER et al., 2016).

Figura 4 – Ilustração de *Gyrodactylus lilianae*. 1. Holótipo (ventral). 2. Órgão copulador masculino. 3. Haptor (ventral). 4. Gancho. 5. Âncora



Fonte: Arquivo pessoal. Arte gráfica: Walter Antônio Boeger.

Figura 5 – *Gyrodactylus lilianae* (ventral) A: holótipo corado com Tricrômio de Gomori; B: clarificado com Hoyer, barra = 50 μ m



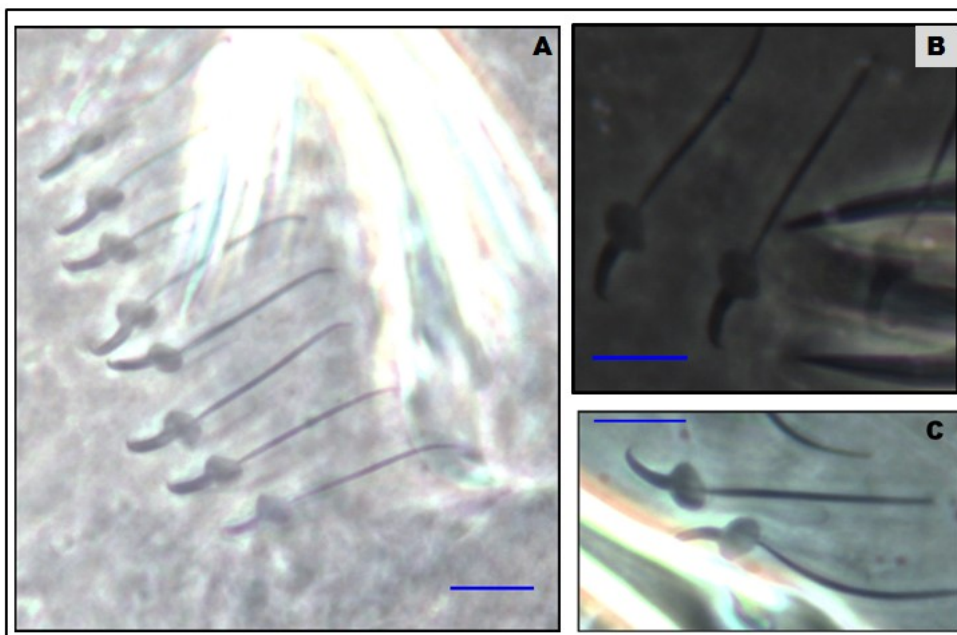
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6 – Haptor clarificado com Hoyer de *G. liliana*, barra = 10 μ m



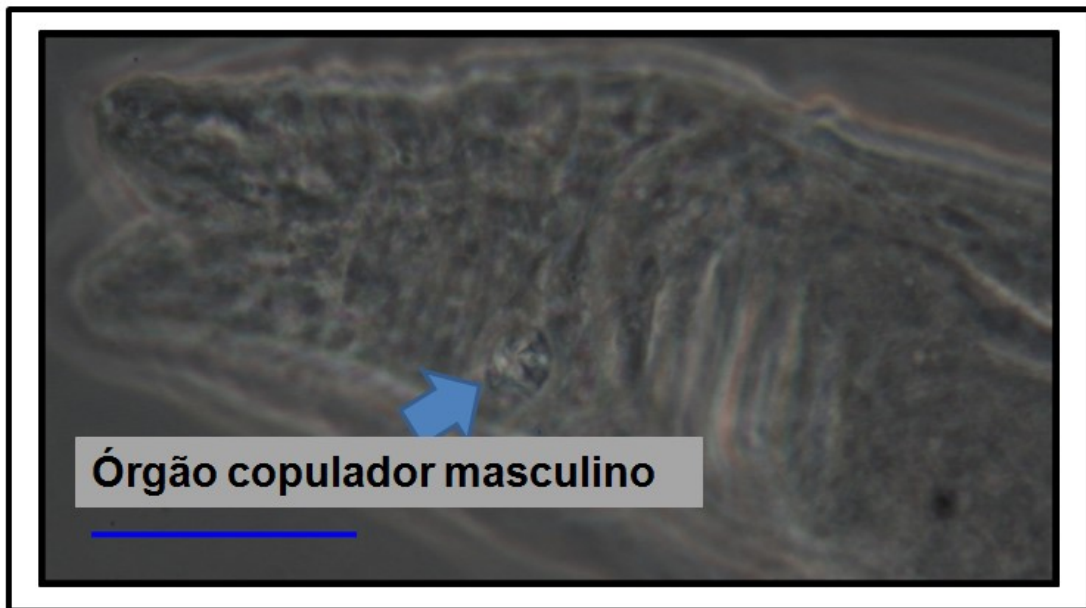
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7 – Ganchos de *Gyrodactylus liliana* em diferentes preparações clarificadas com Hoyer, barra = 10 μ m



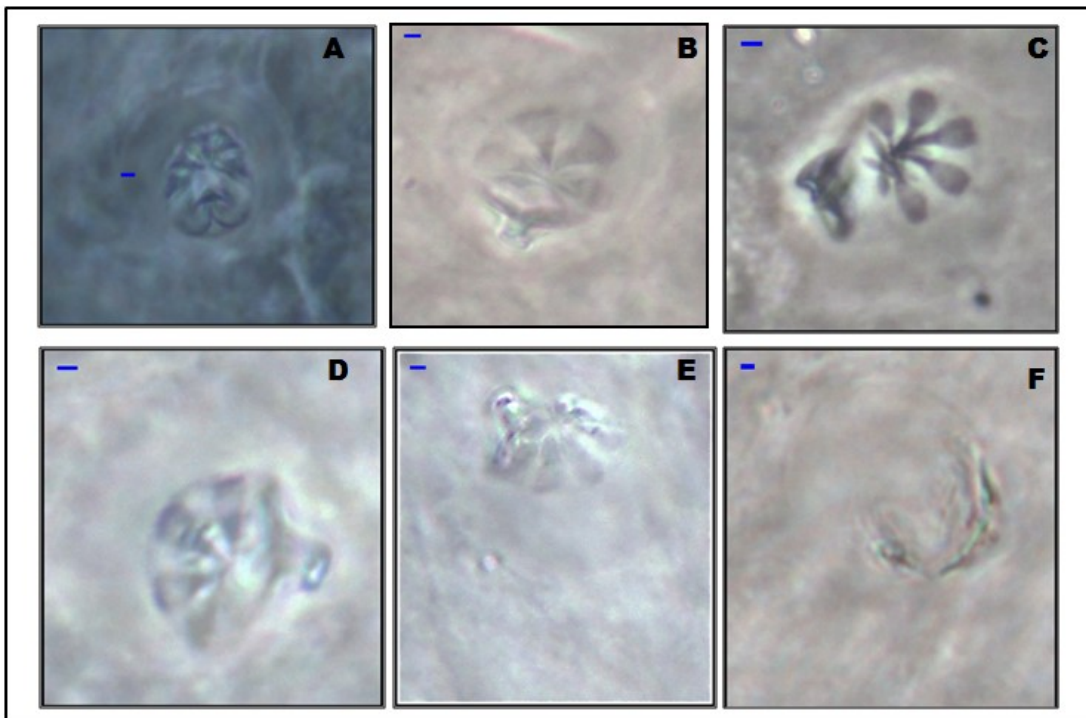
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 – Detalhe do órgão copulador masculino de *Gyrodactylus lilianae*, vista frontal, clarificado com Hoyer, barra = 50 μ m



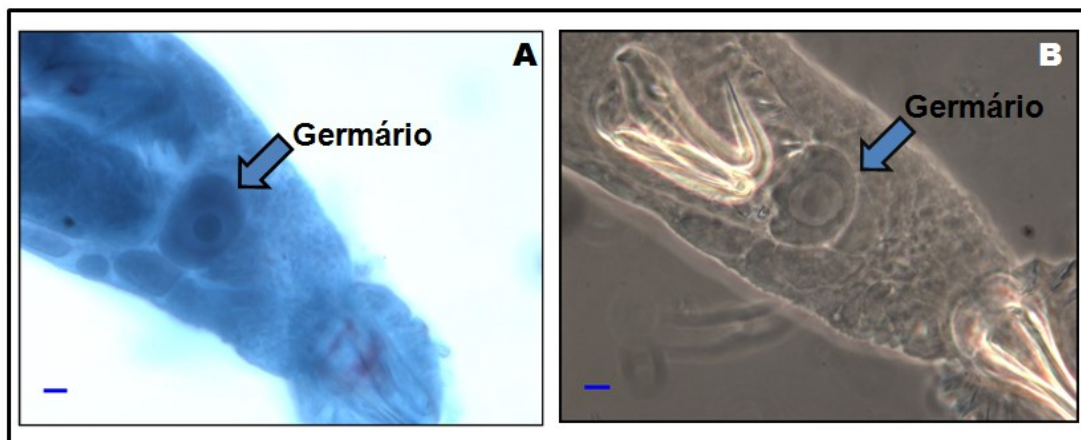
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 9 – Detalhes do órgão copulador masculino de *Gyrodactylus lilianae*, vista frontal: A, B, C e D; vista lateral: E e F; A: Corado com Tricrômio de Gomori, B,C,D,E,F: Clarificado com Hoyer, barra = 1 μ m



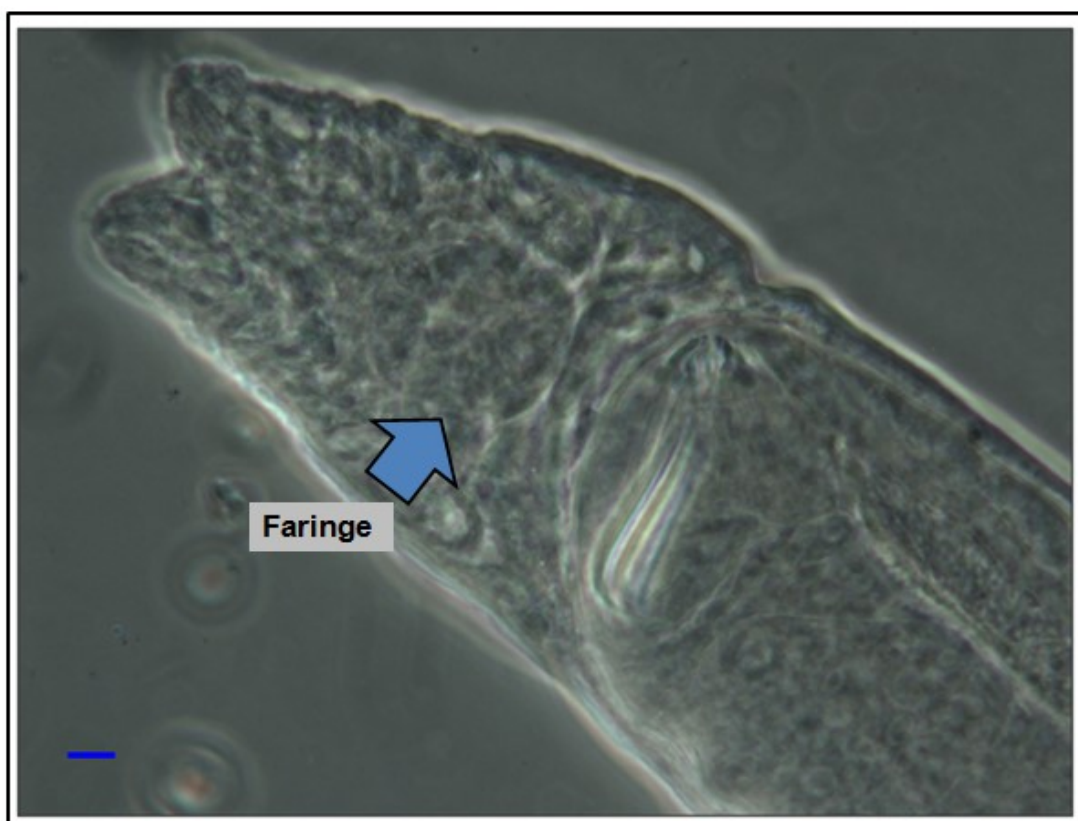
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10 – Detalhe do germário de *Gyrodactylus lilianae*, A: com Tricrômio de Gomori e B: corado clarificado com Hoyer, barra = 10 μ m



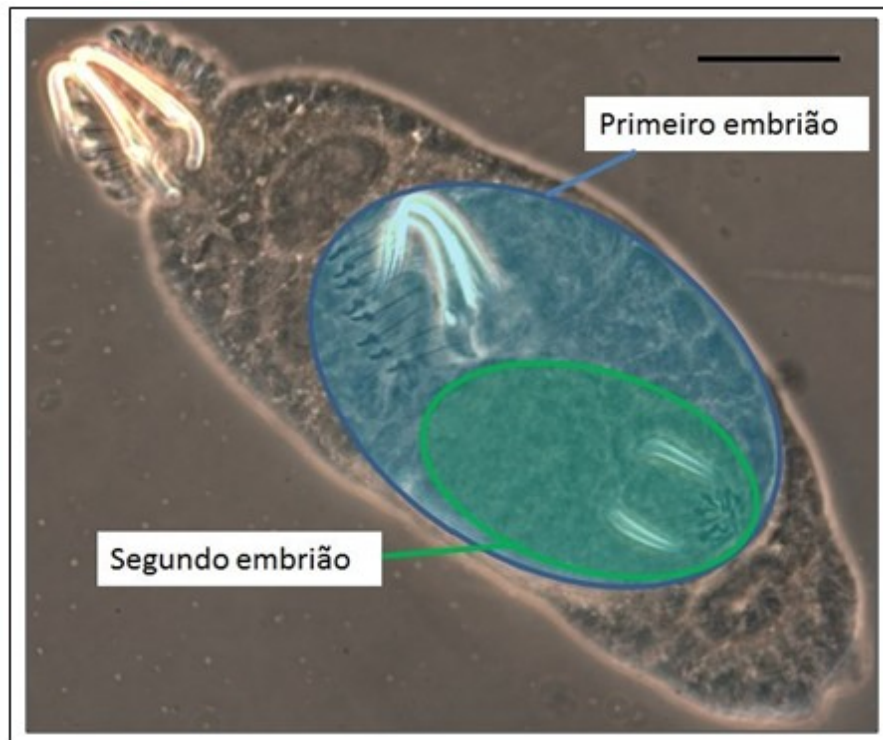
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11 – Detalhe dos bulbos da faringe de *Gyrodactylus lilianae*, clarificado com Hoyer, barra = 10 μ m



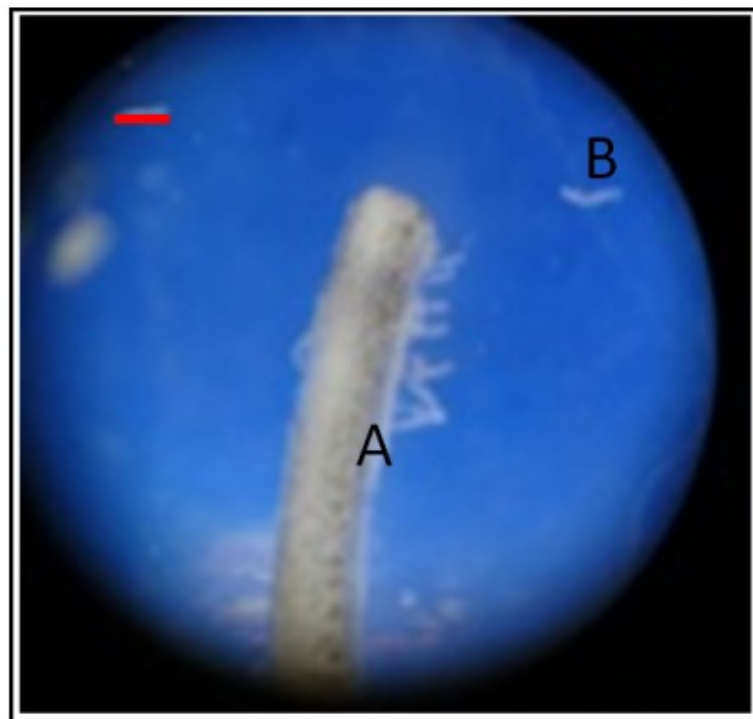
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 12 – *Gyrodactylus lilianae* grávido, detalhes mostrando os ganchos do primeiro e segundo embriões, clarificado com Hoyer, barra = 50 μ m



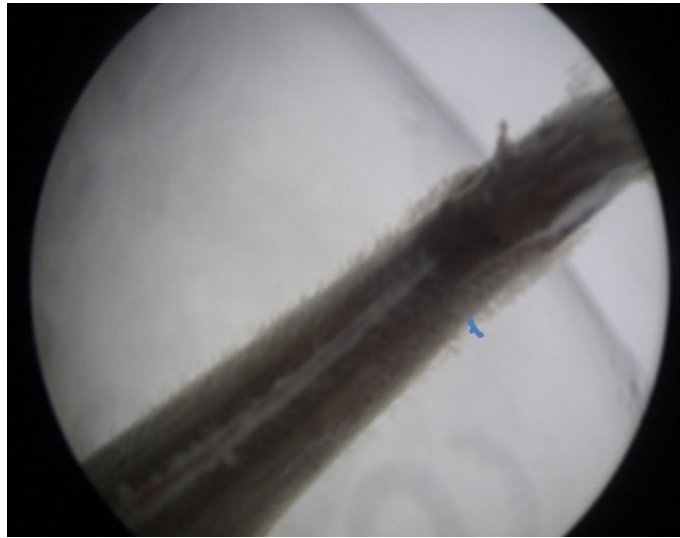
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 13 – *Gyrodactylus lilianae* fixos em barbilhão de *R. quelen* (A) e livres (B), barra = 400 μ m



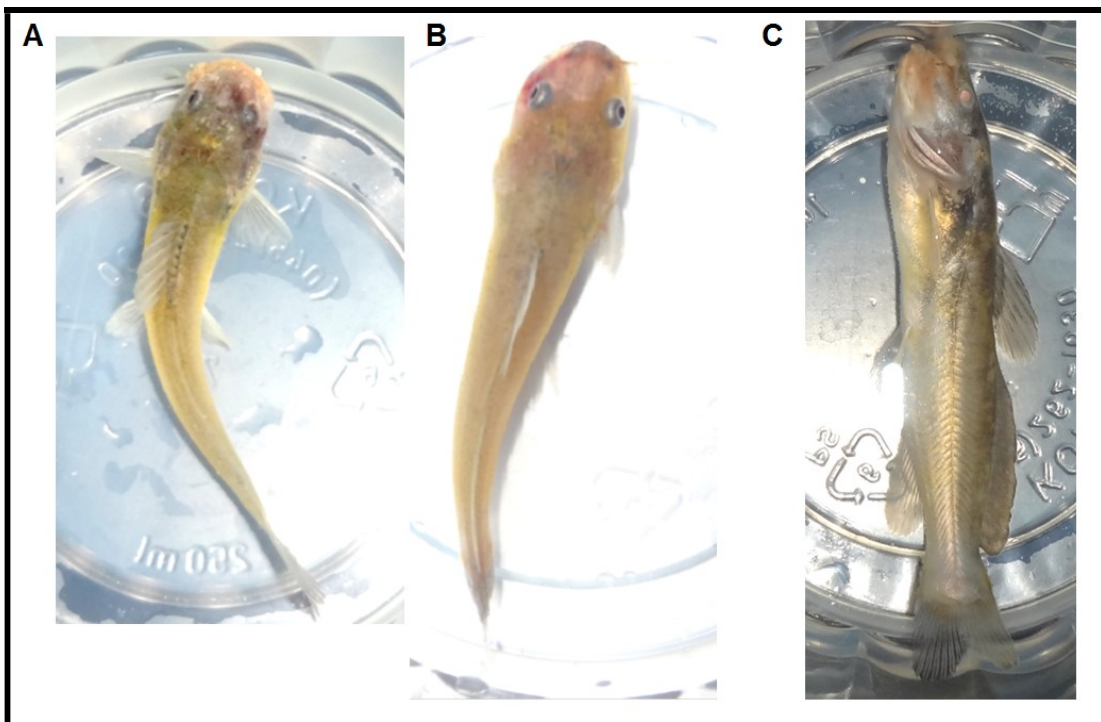
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 – Juvenil de *Rhamdia quelen* altamente parasitado com *G. lillanae*, com lesões na derme (aumento de 4 x)



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 15 – Juvenis de *Rhamdia quelen* altamente parasitados com *G. lillanae*. (A) Debilitado com lesões na cavidade bucal e ausência de barbilhões. (B) Debilitado com lesões e pontos necróticos na cavidade bucal, nadadeiras e cauda. (C) Morto em decorrência da girodactilose (lesões na cavidade bucal, ausência de barbilhões e áreas despigmentadas na pele)



Fonte: Arquivo pessoal.

1.3.1.2 Tratamentos convencionais da girodactilose

A prevenção da girodactilose é a mais importante forma de controle desta parasitose, uma vez que os tratamentos existentes são de baixa eficácia, dispendiosos e nem sempre seguros para o hospedeiro ou para o manipulador (SCHELKLE et al., 2009). O tratamento de infecções causadas por girodactilídeos pode ser dividido em diferentes formas de controle: 1) mecânico, 2) biológico e 3) químico.

O controle mecânico pode ser realizado através de sistemas de filtração de água (WHITTINGTON; CHISHOLM, 2008), alterações na temperatura da água dos viveiros (JANSEN; BAKKE, 1991; BAKKE et al., 2007) e remoção manual dos parasitos (SCHELKLE et al., 2009). Esse tipo de controle acaba se limitando à escala laboratorial e aos sistemas de cultivo de peixes ornamentais domésticos (WHITTINGTON; CHISHOLM, 2008).

O controle biológico consiste na introdução de espécies de peixes predadores dos peixes parasitados, resultando na eliminação das espécies suscetíveis ao parasito (WHITTINGTON; CHISHOLM, 2008). O tratamento de parasitoses causadas por *Gyrodactylus salaris*, espécie mais estudada do gênero, é difícil, sendo que estratégias drásticas já foram tomadas na Noruega, como o extermínio de peixes suscetíveis ao parasito em rios, utilizando-se rotenona. A rotenona é um produto natural, pertencente à classe dos flavonoides que derivam de cadeias de poliacetato e do ácido chiquímico. A rotenona é rapidamente absorvida pelo epitélio branquial e inibe a fosforilação oxidativa, ocasionando a morte do animal. Peixes expostos podem ter intoxicação revertida ao serem transferidos para água isenta de rotenona (FAJT; GRIZZLE, 1998; WHITTINGTON; CHISHOLM, 2008; DAVIDSEN et al., 2013).

O controle químico pode utilizar a via de administração tópica (substâncias aplicadas diretamente na água, através de banho) ou por via oral, então adicionada à alimentação dos peixes (ração). Ambas vias de administração apresentam desvantagens: a aplicação tópica exige a manipulação dos peixes e o produto utilizado pode ser um contaminante da água (SCHOLZ, 1999; SCHELKLE et al., 2009). Já a via oral não permite o controle exato da dose ingerida por cada peixe, já que geralmente na girodactilose os peixes perdem o apetite (VAN OOSTERHOUT et al., 2003; OIE, 2012; BOEGER et al., 2016). Além disso, alguns fármacos podem

ser ineficazes por via oral quando inibem o apetite ou então pelas suas características farmacocinéticas (SANTAMARINA et al., 1991; TOJO; SANTAMARINA, 1998).

Especificamente para a patologia ocasionada para *G. lilliana*, ainda não são relatadas opções de tratamento, uma vez que este trabalho apresenta o primeiro relato desta espécie. Para o tratamento tópico de girodactiloses geralmente é preconizado o formaldeído (1:4000) para banhos de curta duração (uma hora) (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002). Este desinfetante também pode ser utilizado para o tratamento de parasitoses em peixes marinhos ou de estuário (PAHOR-FILHO; MIRANDA-FILHO; PEREIRA-JÚNIOR, 2012). Em experimentos laboratoriais (dados não publicados) *G. lilliana* se mostrou suscetível ao formaldeído, para o tratamento de juvenis de *R. quelen* com cargas parasitárias que variaram de um a 1000 parasitos/peixe. Entretanto, o formaldeído não pode ser empregado no cultivo orgânico (BRASIL, 2011) e o seu uso em escala comercial pode causar severos danos ao meio ambiente e ao manipulador (SRIVASTAVA et al., 2004; ROWLAND et al., 2009).

Alternativas de tratamento para girodactilose consistem em banhos com cloreto de sódio (para animais de água doce) ou banhos com água sem cloreto de sódio (animais marinhos). No geral, banhos de curta duração (15 minutos) com concentrações de 25 g L⁻¹ para adultos de *Poecilia reticulata* e 5 minutos na mesma concentração para peixes juvenis permite a remoção de 100% de *G. turnbulli* ou 72% de *G. bullatarudis* (SCHELKLE; DOETJES; CABLE, 2011). O cloreto de sódio atua causando um desequilíbrio osmótico no parasito (BAKKE et al., 2007). Entretanto, *G. salinae* já demonstrou apresentar capacidade de adaptação a diferentes salinidades (PALLADINI et al., 2011).

Para uso tópico, Poléo et al. (2004) verificaram que concentrações de 200 µg L⁻¹ de alumínio e 400 µg L⁻¹ de zinco mantidas constantes por três dias apresentaram eficácia de 100% contra *G. salaris*. Estas concentrações são bem toleradas por hospedeiros salmonídeos. A adição destes compostos que são tolerados pelos peixes e eliminam o parasito é uma alternativa para o tratamento da parasitose em rios (POLÉO et al., 2004; GUO; WOO, 2009). Entretanto, o alumínio aquoso reage em meio acidificado ou na presença de moléculas orgânicas, tornando o Al³⁺, biodisponível a interações que podem induzir aberrações patofisiológicas em humanos, principalmente as doenças neurodegenerativas (Doença de Alzheimer)

(SALIFOGLOU, 2002; CAITO; ASCHNER, 2015), além disso, podem ocasionar danos ambientais.

O peróxido de hidrogênio no estudo de Rach et al. (2000) já apresentou eficácia de 100% na eliminação de *Gyrodactylus* sp. em juvenis de *Oncorhynchus mykiss*, em um protocolo de administração de banhos de 30 minutos, com três repetições em dias alternados, para as concentrações de 170, 280 e 580 mg L⁻¹. No estudo de Bowker et al. (2012), com adultos de *O. mykiss* naturalmente infectados com *G. salmonis*, foi utilizada a concentração de 50 mg L⁻¹ em banhos estáticos com duração de 30 minutos/dia em dias alternados, com o total de três banhos, reduzindo significativamente o número de parasitos/peixe comparado ao grupo controle. No entanto, a exposição a concentrações de 300 mg L⁻¹ por 10 minutos ao peróxido de hidrogênio pode causar alterações nos parâmetros sanguíneos (pH, lactato e osmolalidade) em peixes (MANSELL et al., 2005). O percarbonato de sódio (composto que libera peróxido de hidrogênio) foi testado frente a *G. derjavini* em *O. mykiss* e após 18 h de exposição a concentrações de 80 mg L⁻¹ ou superiores, todos os parasitos foram erradicados (BUCHMANN; KRISTENSSON, 2003).

O bitionol, um antiparasitário de uso veterinário e, em um estudo laboratorial, demonstrou ser 100% efetivo na concentração de 20 mg L⁻¹ em banho por 3 horas contra *G. salaris* em *O. mykiss*, sem apresentar sinais de toxicidade mínúsculas (SANTAMARINA et al., 1991). Entretanto quando administrado via oral na concentração de 40 g kg⁻¹ de ração pelo período de 10 dias na mesma espécie de peixe, não foi efetivo (TOJO; SANTAMARINA, 1998). Esse antiparasitário parece possuir a capacidade de lesionar o tegumento de parasitos (HAMAJIMA et al., 1971), desacoplar o transporte de elétrons (REW, 1978), agir sobre a cadeia respiratória mitocondrial (IGLESIAS et al., 2002) e auxiliar na supressão de adenosina-5'-trifosfato (ATP) (HARDER, 2002).

Outro fármaco o closantel é um antihelmíntico que também atua descoplando o transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial (SKUCE; FAIRWEATHER, 1990). Demonstrou-se muito eficaz contra *G. salaris* quando administrado em banhos de 3 horas de duração na concentração 0,25 mg L⁻¹ (SANTAMARINA et al., 1991).

O mebendazol pertence ao grupo dos benzimidazois, que atuam inibindo a polimerização dos microtúbulos ao unir-se à β -tubulina, e possui um amplo espectro anti-helmíntico (MARTIN, 1997; MARTIN et al., 2014), apresentou eficácia na

eliminação de *G. elegans* em *Carassius auratus* na concentração de 0,1 mg L⁻¹, em um banho de 24 horas. Entretanto, causou mortalidade nos peixes (GOVEN; AMEND, 1982). No estudo de Tojo e Santamarina (1992), a adição do mebendazol na ração (40 g kg⁻¹) não foi capaz eliminar *Gyrodactylus* sp. em *O. mykiss*.

O levamisol, um dos representantes da classe de derivados sintéticos do imidazotiazol, apresentou capacidade de eliminar completamente *G. turnbulli* em *Poecilia reticulata*, com o protocolo de tratamento de banho de 0,01 mL mL⁻¹ em 24 horas (SCHELKLE et al., 2013). O levamisol atua seletivamente nos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) na junção neuromuscular dos parasitos, produzindo despolarização e paralisia espástica (MARTIN; ROBERTSON, 2007).

Outros fármacos já foram testados na forma de banhos contra a girodactilose como: ivermectina, niclofolan (SANTAMARINA et al., 1991), albendazol, fenbendazol (TOJO et al., 1992), mebendazol e niclosamida (TOJO; SANTAMARINA, 1998). Entretanto, estes não apresentaram eficácia de 100% *in vivo* e/ou produziram mortalidade do hospedeiro.

Até o momento, não existem vacinas disponíveis para controle da girodactilose. Métodos de controle baseiam-se na prevenção da exposição ao parasito, através da implementação de políticas de controle e adoção de medidas de biossegurança (OIE, 2012).

1.3.1.3 Tratamentos com extratos vegetais para girodactilose

Na última década, o número de publicações avaliando extratos vegetais com possível uso no tratamento de doenças parasitárias na aquicultura tem aumentado (REVERTER et al., 2014; VALADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2015). Segundo os portais de busca de patentes (ORBIT, Esp@cenet, WIPO, INPI, USPTO) apresentaram produtos fitoterápicos para o tratamento da girodactilose com óleos essenciais das seguintes espécies vegetais: *Pimenta racemosa* (EP2461698, CA2769615A1, CA2769615C, EP2461698A1, US20120276227, WO2011015668A1), *Melaleuca alternifolia* (WO1998000025A1, WO2002069989A2, WO2008010188A2, WO2007122619), *Melaleuca cajuputi* (EP2461698B1), *Ocimum americanum* (BR1020150165986), *Aloysia gratissima* (BR1020150165978) e *Nectandra megapotamica* (BR1020150165994). Esses três últimos produtos foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa LABEVE/UFSM (Laboratório de Extrativos

Vegetais). O produto obtido a partir do óleo essencial (OE) de *A. gratissima* tem seus dados experimentais relatados neste trabalho, no artigo 1. Já os dados experimentais do produto obtido a partir do OE de *N. megapotamica* estão descritos no artigo 2.

Além dos produtos obtidos a partir de óleos essenciais (OEs), outros tipos de extrato podem ser empregados para o desenvolvimento de produtos para tratamento da girodactilose. Por exemplo, o extrato etanólico líquido de sementes de *Cynanchum komarovii* também já foi patenteado (CN1739359), sendo indicado seu uso após diluição (1:1000) por pulverização nos tanques de peixes, na concentração de $0,5 \mu\text{L L}^{-1}$.

No momento há dois produtos comerciais, Melafix[®] e Pimafix[®], que não são comercializados no Brasil, mas que possuem indicação principal para o tratamento de doenças bacterianas e fúngicas, principalmente para cultivo de espécies de peixes ornamentais. Estes produtos foram avaliados por Schelkle et al. (2015) para o tratamento da girodactilose causada pelo *Gyrodactylus turnbulli* em *Poecilia reticulata*. O Melafix[®] é formulado com o OE de *Melaleuca cajuputi* e um emulsionante, o Crovol PK 70. A concentração de $132 \mu\text{L L}^{-1}$ adicionada à água por um período de sete dias de exposição resulta numa eficácia antiparasitária de 65,2%. Pimafix[®], que é constituído do OE de *Pimenta racemosa* e Crovol PK 70, na concentração de $132 \mu\text{L L}^{-1}$ apresenta eficácia antiparasitária de 32%. O uso concomitante de Melafix[®] e Pimafix[®] numa concentração de $132 \mu\text{L L}^{-1}$ (cada) atinge eficácia de 95%. No entanto, o agente emulsionante quando avaliado nas concentrações presentes nos dois produtos também se mostrou efetivo, o que demonstra que a atividade do Melafix[®] e Pimafix[®] não podem ser atribuídas apenas aos OEs das formulações. Outros estudos demonstraram que os óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* também apresentam atividade antiparasitária frente a monogenéticos (SOARES et al., 2016; HASHIMOTO et al., 2016).

Produtos derivados do alho (*Allium sativum*) também já foram avaliados e apresentaram atividade contra *Gyrodactylus turnbulli*, *in vitro*, reduzindo significativamente o tempo médio de sobrevivência do parasito, de 13 h para <1 h. O alho na forma de liofilizado em pó (1 mg mL^{-1}) e na forma de granulado ($0,03 \text{ mg mL}^{-1}$) apresentaram eficácia semelhante ao levamisol ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) (SCHELKLE et al., 2013).

1.3.2 *Ichthyophthirius multifiliis*

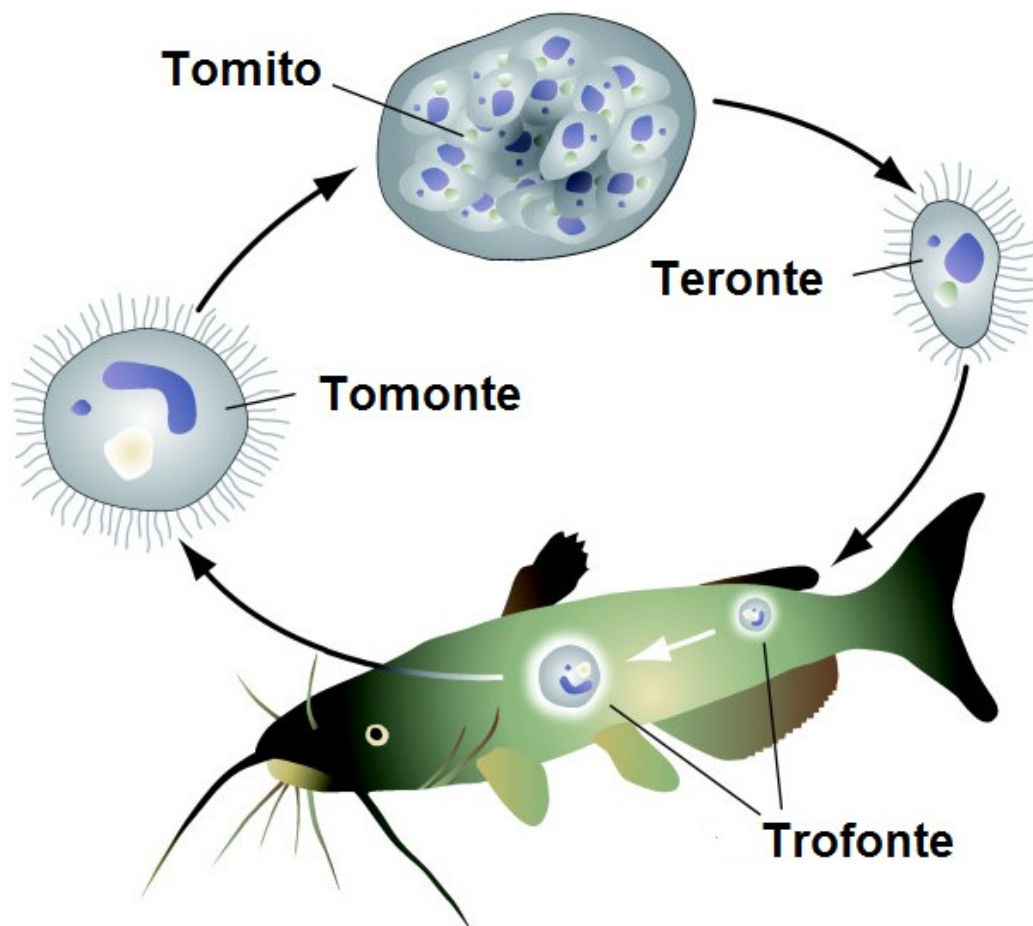
Ichthyophthirius multifiliis é um protozoário ciliado, provavelmente o parasito mais comum e importante em peixes teleósteos de água doce. Possui uma distribuição geográfica mundial e é responsável por muitas perdas econômicas no cultivo de peixes, uma vez que a parasitose apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade. Representa assim, uma ameaça significativa para o crescimento da indústria da aquicultura em todo o mundo (MATTHEWS, 2005; GARCIA et al., 2007; HANSON et al., 2008; CASSIDY-HANLEY et al., 2011; COYNE et al., 2011; FORWOOD et al., 2015).

Rhamdia quelen é muito suscetível a infestações por *I. multifiliis*, parasito de ciclo de vida direto ou monoxênico, ou seja, sem hospedeiros intermediários, apresentando as fases: teronte, trofote, tomonte e tomito (Figura 16). Na fase trofote (infectante), o parasito se aloja entre a derme e a epiderme da pele e brânquias de peixes, provocando a ictioftiríase (popularmente conhecida como doença dos pontos brancos, ictio ou “ich”) (Figura 17). Neste período, o trofote se alimenta de secreções, fragmentos de células epidérmicas e sangue do hospedeiro, podendo atingir centenas de microns de diâmetro, ficando assim, o trofote visível a olho nú (origem do nome popular “doença dos pontos brancos”). Terminado o seu desenvolvimento, que pode levar entre quatro a sete dias, o parasito, já na fase tomonte, perfura a pele do peixe para atingir o meio externo, podendo nadar por um breve período de tempo, até encontrar um substrato inerte onde se adere. Nesse momento inicia o desenvolvimento de uma cápsula gelatinosa, dentro da qual passa por inúmeras divisões podendo dar origem de 100-1000 tomitos, que se diferenciam em terontes infecciosos em um prazo de tempo que pode variar de 18 a 24 horas em temperatura ambiente e se estes não infestarem um hospedeiro, morrem. A saída do parasito (tomonte) do peixe causa lesão na pele do hospedeiro, tornando-o vulnerável a infecções secundárias ocasionadas por fungos, bactérias e vírus, que o debilitam ainda mais (MATTHEWS, 2005; CASSIDY-HANLEY et al., 2011; COYNE et al., 2011; SHINN et al., 2012). Cada isolado de *I. multifiliis* tem variações no tempo de ciclo de vida (duração e tamanho de cada fase, bem como o número de terontes originado a partir de um tomonte) dependendo da sua origem geográfica, uma vez que sofre a influência de diferentes fatores abióticos, a exemplo das

condições de água, tais como temperatura e salinidade (ELSAYED et al., 2006; FORWOOD et al., 2015).

Em casos de infestações severas, as mortes ocorrem principalmente por comprometimento respiratório (WEI et al., 2013). Lesões microscópicas como úlceras e necrose de tegumento e brânquias, associadas à severa resposta inflamatória são comumente descritas nesta enfermidade (MATTHEWS, 2005; ELSAYED et al., 2006; WEI et al., 2013). Quando a parasitose não é tratada, os juvenis morrem em poucos dias, uma vez que seu sistema imunológico é imaturo (KIRKAN et al., 2003; GARCIA et al., 2007; COYNE et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

Figura 16 – Ciclo de vida do *Ichthyophthirius multifiliis*



Fonte: Adaptado de Coyne et al., (2011).

Figura 17 – Juvenil de *Rhamdia quelen* com ictiofitíriase

Fonte: Arquivo pessoal.

1.3.2.1 Tratamentos convencionais para ictiofitiriasis

O tratamento da ictiofitiriasis em viveiros é extremamente difícil, uma vez que os parasitos localizados sob o epitélio do hospedeiro (trofonte) e aqueles protegidos dentro do cisto de proteção secretado pelo tomonete sofrem pouca ou nenhuma ação dos fármacos administrados. Assim, a fase infectante (teronte) geralmente é a única suscetível ao tratamento farmacológico. Desta forma diferentes estratégias de controle podem ser empregadas: 1) químico, 2) mecânico e 3) biológico (PÁDUA et al., 2012; PICÓN-CAMACHO et al., 2012a).

Atualmente, não existe um tratamento quimioterapêutico capaz de tratar a ictiofitiriasis de modo efetivo e economicamente viável (ZHANG et al., 2013). Um dos principais quimioterápicos utilizados por décadas no tratamento da ictiofitiriasis é o verde malaquita, que é altamente eficiente, tem um baixo custo, porém foi banido em diversos países da Europa e em outros continentes por seu impacto sobre a saúde dos humanos (SRIVASTAVA et al., 2004; ROWLAND et al., 2009; YI et al., 2012). O verde de malaquita (trifenilmetano) e a mistura de verde de malaquita e formalina são as opções que se mostram mais efetivas (BUCHMANN et al., 2003; YI et al., 2012). O verde de malaquita e seus derivados são conhecidos por serem altamente

persistentes no meio ambiente, bio-acumulando nos ecossistemas e tecidos de peixes (HENDERSON et al., 1997). A principal vantagem na utilização destes compostos é que eles atuam sobre todas as fases da vida de *I. multifiliis* (BUCHMANN et al., 2003).

O formaldeído atua sobre formas de vida livre de *I. multifiliis* sendo empregado na forma de banhos (30-60 minutos) na concentração de 100 mg L⁻¹, sendo necessários diversos banhos em dias consecutivos para apresentar boa efetividade (SHINN; TAYLOR; WOOTTEN, 2005; LAHNSTEINER; WEISMANN, 2007; HEINECKE; BUCHMANN, 2009). Além disso, estimula a diminuição na produção de muco em algumas espécies de peixes, prevenindo infecções secundárias por bactérias (BUCHMANN; BRESCIANI; JAPPE, 2004). É rapidamente metabolizado por organismos aquáticos e apresenta baixa bioacumulação, entretanto, devido ao seu potencial cancerígeno para humanos o seu uso foi banido (HOHREITER; RIGG, 2001; WHO, 2006). O jundiá apresenta alta sensibilidade a esta substância, que quando utilizada na forma de formalina comercial concentrações de 0,2 mL L⁻¹ causa mortalidade logo após o primeiro banho (CARNEIRO et al., 2005; CARNEIRO; CIRIO; SCHORER, 2006).

O cloreto de sódio é considerado um dos principais produtos utilizados no tratamento da ictioftiríase, pois, atua desidratando os tomites e terontes diminuindo a sua sobrevivência (AIHUA; BUCHMANN, 2001; SHINN et al., 2005). Além disso, contribui para a regulação osmótica dos peixes debilitados pela parasitose (LAHNSTEINER; WEISMANN, 2007). *Rhamdia quelen* tolera concentrações de até 10 g L⁻¹ de cloreto de sódio (MARCHIORI; BALDISSEROTTO, 1999) o que favorece a sua administração na dieta animal (GARCIA et al., 2007) e na forma de banhos que parecem ser mais efetivos, podendo ser empregadas baixas concentrações (1-5 g L⁻¹) em banhos de longa duração (dias) ou altas concentrações (15-20 g L⁻¹) em curtos períodos de tempo (20-60 minutos) (MIRON et al., 2003; LAHNSTEINER; WEISMANN, 2007; BALTA; KAYIS; ALTINOK, 2008). Embora o custo econômico do tratamento não seja demasiado caro, o emprego desta substância é mais limitado a cultivos ornamentais e laboratoriais, devido aos impactos na água que podem torná-la imprópria para a agricultura (CARNEIRO et al., 2005; GHEIY; DIAS; LACERDA, 2010).

O sulfato de cobre, utilizado como algicida, também apresenta efetividade para o tratamento da ictioftiríase (LING; SIMB; LAMB, 1993; STRAUS et al., 2009;

FARMER et al., 2013). Uma concentração de 0,63 mg L⁻¹, utilizada através de banho por 192 horas, apresentou eficácia muito semelhante ao verde de malaquita para o tratamento de juvenis de jundiá (CARNEIRO et al., 2005).

Outro algicida muito utilizado, o permanganato de potássio, também é empregado no tratamento de parasitoses (STRAUS; GRIFFIN, 2002; RINTAMÄKI-KINNUNEN et al., 2005ab). Contudo, para o tratamento da ictiofitíriase em jundiás a concentração de 1,3 mg L⁻¹, utilizada em um banho estático de 192 horas, resultou em um aumento no número de trofontes e alta mortalidade, sugerindo a baixa efetividade dessa substância para esta espécie de peixe (CARNEIRO et al., 2005).

Outras substâncias químicas que já foram estudadas como alternativas de tratamento e se mostraram efetivas foram peróxido de hidrogênio (LAHNSTEINER; WEISMANN, 2007), cloramina-T (RINTAMÄKI-KINNUNEN et al., 2005ab), metronidazol (TOJO; SANTAMARINA, 2001; TOKŞEN; NEMLI, 2010), ácido peracético (STRAUS; MEINELT, 2009; SUDOVÁ et al., 2010), bronopol (SHINN et al., 2012; PICÓN-CAMACHO et al., 2012b), doxiciclina e toltrazuril (ABDEL-HAFEZ; LAHNSTEINER; MANSOUR, 2014). Porém, estas substâncias são viáveis apenas para utilização laboratorial, já que seu uso em tanques de cultivo poderia resultar em sérios prejuízos ao meio ambiente e custos elevados ao produtor, além de algumas serem altamente prejudiciais a saúde humana (CARNEIRO et al., 2005; WHO, 2006).

Picón-Camacho et al. (2012a) revisaram 116 compostos aplicados para controle de *I. multifiliis* desde 1980, sendo que destes, 81 foram testados apenas *in vivo* (43 na forma de tratamento por banhos e 51 adicionados à ração). Além disso, a grande maioria é de origem sintética, altamente indesejável para uso em cursos de água, o que pode justificar a escassez de produtos comerciais, apesar dos inúmeros estudos já publicados.

Para o tratamento mecânico, podem ser empregados filtros de baixa micragem nos sistemas de entrada e saída de água dos tanques, além do uso de lâmpadas ultravioleta e/ou eletroterapia (FARLEY; HECKMANN, 1980), que são efetivas para a fase de tomonte (PADUÁ et al., 2012). Já nos cultivos laboratoriais e domésticos, a elevação da temperatura da água dos aquários também favorece o tratamento da ictiofitíriase (BODENSTEINER et al., 2000; CARNEIRO et al., 2005; SHINN et al., 2009).

Filtros biológicos com o emprego de macrófitas aquáticas na água de abastecimento e saída promovem uma limpeza das formas de vida livre do parasito. Entretanto, as macrófitas podem também atuar como substrato, sendo necessário o emprego concomitante de radiação ultravioleta (PADUÁ et al., 2012).

Apesar de intervenções não-medicamentosas ou medicamentosas, peixes expostos a infecções por *I. multifiliis* podem adquirir uma imunidade protetora, que pode durar de alguns meses a um ano, o que estimula o desenvolvimento de vacinas. No entanto, esbarram na dificuldade de se produzir antígenos em larga escala pelos métodos tradicionais, uma vez que os trofontes são parasitos obrigatórios e não se desenvolvem em meios de culturas convencionais. Assim, uma alternativa é a utilização da tecnologia do DNA recombinante (BURKART; CLARK; DICKERSON, 1990; MATTHEWS, 2005; SOMMERSET et al., 2005; PICÓN-CAMACHO et al., 2012a; DICKERSON; FINDLY, 2014).

Pela dificuldade de tratamento da ictiofitiríase, a adoção de práticas criteriosas de desinfecção de instrumentos utilizados na rotina da piscicultura, bem como a antisepsia das mãos dos funcionários que entram em contato com os cultivos devem ser observadas. Esses procedimentos preventivos devem ser aliados a quarentenas, avaliação periódica do plantel e o monitoramento da qualidade da água, uma vez que são medidas que garantem a sanidade dos peixes (PADUÁ et al., 2012).

1.3.2.2 Tratamentos com extratos vegetais para ictiofitiríase

A dificuldade de tratamento da ictiofitiríase com fármacos convencionais tem estimulado a pesquisa de alternativas empregando extratos vegetais. Os extratos vegetais podem ser utilizados incorporados à alimentação ou então através da sua adição à água (banhos) (TAVECHIO et al., 2009; PICÓN-CAMACHO et al., 2012a; REVERTER et al., 2014). No Brasil existe uma patente registrada para o tratamento de *Ichthyophthirius* sp. (PI 0922458-0), sendo o produto obtido a partir de extratos purificados de clorofila, todavia não existem produtos fitoterápicos comercializados especificamente para esta finalidade.

Alguns novos tratamentos propostos envolvem o uso de extratos de plantas tais como as de alho, *Allium sativum* L., que demonstraram ser eficazes contra tomontes nas concentrações de 117 mg L⁻¹ e 570 mg L⁻¹ após 24 horas de teste

in vitro (BUCHMANN et al., 2003). No entanto, quando incorporados na ração e testados *in vivo*, estes extratos não conseguiram reduzir significativamente os níveis de infecção quando em comparação com grupos controle (PICÓN-CAMACHO et al., 2012a).

Após estudo com 30 plantas medicinais, Yi et al. (2012) concluíram que os extratos metanólicos de *Magnolia officinalis* e *Sophora alopecuroides* apresentam alta atividade antiprotozoária contra terontes, com concentração letal (CL₅₀ em 4h) estimada em 2,45 e 3,43 mg L⁻¹, respectivamente. Ainda, 20 mg L⁻¹ do extrato de *M. officinalis* resultou em 100% de mortalidade dos tomontes após 20 horas de exposição; a mesma taxa de mortalidade foi observada para a concentração de 320 mg L⁻¹ do extrato de *S. alopecuroides*. O extrato aquoso de *Capsicum frutescens* administrado em banhos com duração de 4 horas também é capaz de reduzir a prevalência da parasitose (LING et al., 2012).

Substâncias isoladas de extratos vegetais também já apresentaram atividade antiparasitária *in vivo*. A sanguinarina isolada de *Macleaya cordata* na concentração de 0,9 mg L⁻¹ (banho de 48 h) apresentou eficácia de 96,8% comparada com o grupo não tratado de *Carassius auratus* (YAO et al., 2010). Da espécie de *Macleaya microcarpa* foram isoladas a di-hidrosanguinarina e a di-hidrocheleritrina que utilizadas em banhos de 48 h, no hospedeiro *Squaliobarbus curriculus*, apresentaram CE₅₀ de 5,18 mg L⁻¹ e 9,43 mg L⁻¹, respectivamente. De *Toddalia asiatica* foram isoladas cheleritrina e cloroxilonina, que nas concentrações de 1,8 mg L⁻¹ e 8 mg L⁻¹, respectivamente, administradas na forma de banho com duração de 72 horas, reduziram a prevalência da parasitose em *Carassius auratus* (XIAO-FENG et al., 2014). Alguns trabalhos com óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (VALLADÃO et al., 2016) e *Lippia alba* (SOARES et al., 2016) demonstraram a capacidade de reduzir o parasitismo e aumentar a sobrevivência de peixes com ictiofitiríase.

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS NA AQUICULTURA

Óleos essenciais são misturas complexas de constituintes voláteis naturais, lipofílicas e líquidas à temperatura ambiente, caracterizadas por um odor intenso, sendo sintetizados por plantas aromáticas. Como também ocorre com outros metabólitos secundários na natureza, os óleos voláteis desempenham um

importante papel na proteção das plantas, atuando como antibacterianos, antifúngicos, inseticidas e repelentes frente a herbívoros (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES; SPITZER, 2004). Por apresentarem atividades biológicas variadas e por suas características físicas e organolépticas, são empregados industrialmente em gêneros alimentícios, medicamentos, cosméticos, perfumes e produtos de limpeza e higiene, sendo também utilizados na aromaterapia (PAULI, 2001).

Os terpenoides aparecem nas plantas como constituintes principais dos óleos essenciais. Os constituintes mais frequentes dessa classe nos óleos essenciais são os monoterpenoides (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenoides. Também podem estar presentes diterpenoides, juntamente com uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos (lineares, ramificados, saturados e insaturados), ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos, lactonas e ainda excepcionalmente, substâncias com nitrogênio e enxofre, cumarinas e homólogos, bem como fenilpropanoides (DORMAN; DEANS, 2000; BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais podem ser encontrados na maioria das vezes em todos os órgãos vegetais (folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, cascas ou sementes), sendo secretados e armazenados em estruturas especializadas como tricomas glandulares, células parenquimáticas diferenciadas e canais oleíferos. A produção de óleos essenciais ocorre em espécies de várias famílias vegetais, dentre elas Lauraceae e Verbenaceae (SIMÕES; SPITZER, 2004; HENRIQUES et al., 2007).

A composição química dos óleos bem como o rendimento obtido são determinados por fatores exógenos (localização geográfica, época da coleta, forma de cultivo, condições climáticas, período e condições de armazenamento, métodos extrativos) e fatores endógenos (características genéticas, anatômicas e fisiológicas, assim como o estágio de desenvolvimento do vegetal). A exposição prolongada aos fatores exógenos pode afetar os genes responsáveis pela produção de seus constituintes e levar à existência de quimiotipos ou raças químicas dentro de uma mesma espécie (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008; BARRA, 2009).

Várias técnicas podem ser utilizadas para extrair óleos essenciais das plantas aromáticas. Dentre elas, destacam-se a hidrodestilação, arraste de vapor, extração com solventes, expressão ou prensagem e extração por fluido supercrítico. O tipo de extração interfere quali e quantitativamente na constituição química do OE obtido e também na estereoquímica das moléculas extraídas. Os OEs para uso na indústria

farmacêutica ou de alimentos são, preferencialmente, extraídos através de destilação por arraste de vapor ou expressão (BAKKALI et al., 2008). Em laboratório, a técnica mais utilizada é a hidrodestilação, realizada com o auxílio de um aparelho do tipo Clevenger (BRASIL, 2010).

Para os diferentes tipos de óleos essenciais, foram realizados inúmeros estudos, sendo relatadas, além das atividades antiparasitárias (BAKKALI et al., 2008; VAN VUUREN et al., 2010; ARAÚJO et al., 2011; ELLSE; WALL, 2014), as atividades repelente, inseticida (MENDONÇA et al., 2005; LIU et al., 2006) e antimicrobiana (DORMAN; DEANS, 2000; PONCE et al., 2003). Óleos essenciais também apresentaram as atividades antioxidante (GARCEZ et al., 2009, HUI et al., 2006), antiviral (KHAN et al., 2005), antifúngica (SIMIC et al., 2004), acaricida (MACCHIONI et al., 2006), antileishmaniose (UEDA-NAKAMURA et al., 2006), anticancerígena (SYLVESTRE et al., 2006), entre outras.

Óleos essenciais também podem fornecer fitofarmacos. Neste caso, deve-se considerar que para obter um produto farmacêutico a partir de um óleo essencial, além da seleção da planta, são necessárias várias etapas, tais como: obtenção do óleo essencial, purificação e identificação dos constituintes químicos e eventuais modificações estruturais, a avaliação das correlações entre estrutura química e atividades biológicas, estudos farmacológicos e toxicológicos, desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (RATES, 2001; PEDROSA et al., 2001).

Os benefícios da utilização de óleos essenciais na aquicultura estão tendo um destaque cada vez maior na literatura, que apresenta artigos recentes sobre seus efeitos protetores contra substâncias genotóxicas (KHALIL et al., 2011), para a prevenção do estresse durante os processos de manejo e transporte (BECKER et al., 2012), para prevenir o estresse oxidativo resultante da hipóxia ou hiperóxia (AZAMBUJA et al., 2011), como imunoestimulantes (CHAKRABORTY; HANCZ, 2011), entre outros. Sendo assim, os óleos essenciais ou seus constituintes são uma alternativa potencialmente promissora para o desenvolvimento de antiparasitários (SCHELKLE et al., 2015; TRAILOVIĆ et al., 2015; SOARES et al., 2016; VALLADÃO et al., 2016).

1.5 ESPÉCIES VEGETAIS ESTUDADAS

1.5.1 *Aloysia gratissima*

Aloysia gratissima (Figura 18) pertence à família Verbenaceae, que apresenta cerca de 100 gêneros e aproximadamente 2600 espécies de ervas, arbustos ou pequenas árvores, as quais estão distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Espécies desta família têm despertado interesse tanto pelo potencial biológico quanto pelo uso na medicina popular, principalmente os gêneros *Aloysia*, *Lantana* e *Lippia* (BONZANI et al., 1997; BARROSO et al., 2002).

Figura 18 – *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso



Fonte: Simone Benovit.

O gênero *Aloysia* é constituído de aproximadamente trinta espécies de arbustos com inflorescências aromáticas, conhecidas principalmente por seus óleos essenciais (HERNANDEZ et al., 2003). *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso (Verbenaceae) (Figura 18) é uma espécie nativa da América do Sul e tem como sinônimos *Verbena gratissima* Gillies & Hook.; *Lippia gratissima* (Gillies & Hook.) L. D. Benson; *L. lycioides* (Cham.) Steud, entre outros (SALINEMA et al., 2012). Conhecida popularmente como alfazema-brasileira, jurema, guarupa, “erva-de-

nossa-senhora”, “erva-da-graça”, “erva-santa” e “lavanda brasileira” (BERSAN et al., 2014) dentre outros, é um arbusto de até 3 m de altura, muito ramificado e espinescente nos ápices. O cultivo de *A. gratissima* já foi objeto de estudos no que se refere aos possíveis patógenos associados à espécie (CORDO; DELOACH, 1995), as condições de sombreamento (PINTO et al., 2007), a propagação sexuada e assexuada (SANTOS et al., 2009), enraizamento de estacas (MOTA; ARAÚJO, 2009), crescimento e biomassa (SANTOS et al., 2011) e suas variedades (MORONI et al., 2015).

As folhas e inflorescências desta espécie são usadas no preparo de expectorantes e sua principal descrição etnofarmacológica relata o uso em afecções pulmonares, gripes, dor de ouvido, cólicas em bebês, dores de cabeça e, popularmente, para o tratamento de “problemas nos nervos” (ALICE et al., 1995; PINTO et al., 2007; SOUZA; WIEST, 2007). Apenas as folhas são popularmente utilizadas como digestivos e antiespasmódicos (BERSAN et al., 2014). Além disso, devido às propriedades aromáticas desta espécie, estima-se que ela esteja presente em 1% das preparações à base de plantas comercializadas na Argentina (JULIANI et al., 2004).

Extratos de *A. gratissima* obtidos com solventes de diferentes polaridades demonstraram atividade inibitória frente a bactérias causadoras de pneumonias em animais e humanos (SOUZA; WIEST, 2007). O extrato aquoso de suas partes aéreas, quando administrado por via oral, apresentou ação antidepressiva e efeitos neuroprotetores em camundongos Swiss machos, mediados pela inibição do sistema glutamatérgico e neuroproteção pela ativação dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e também, pelo envolvimento na via L-arginina-NO-GMPc (ZENI et al., 2011). Zeni et al. (2013a) verificaram em ratos que a ação antidepressiva do extrato aquoso, administrado via oral na dose de 10 mg/kg, é dependente da sua interação com os sistemas receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A} e 5-HT_{2A / 2C}), adrenérgicos (α_1 e α_2 -adrenoceptores) e dopaminérgicos (D₁ e D₂). Farahani et al. (2015) sugeriram que esta espécie vegetal possui potencial para o desenvolvimento de novos antidepressivos.

O extrato aquoso obtido por decocção e uma tintura etanólica obtida por maceração à base de *A. gratissima*, ambas na concentração de 20% (massa de partes aéreas/volume de solvente), apresentaram efeito antiespasmódico, em experimento *ex vivo* em ratos. Ambos os extratos atuaram por mecanismo não

competitivo, inibindo a curva dose resposta da acetilcolina (ACh) e impedindo o influxo de Ca^{+2} no duodeno e íleo de ratos. O efeito maior da tintura é atribuído à presença dos flavonoides e constituintes de OEs (CONSOLINI et al., 2011). O extrato aquoso obtido por decocção apresenta compostos fenólicos e carotenoides, cujas concentrações variam conforme as estações do ano. Este extrato demonstrou atividade antioxidante *in vitro* (CE_{50} = concentração efetiva 50% de 1 mg mL⁻¹). *In vivo* apresenta a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica em cérebro de ratos quando administrado por via oral e não apresenta toxicidade aguda até a dose de 2000 mg kg⁻¹ (ZENI et al., 2013b).

A análise fitoquímica de folhas de *A. gratissima* resultou no isolamento do α -bisabolol, dos triterpenoides α -amirina e dos ácidos betulínico, oleanólico e ursólico, dos flavonoides genkwanina; 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiapigenina; 5-hidróxi-7,3',4'-trimetoxiluteolina e rutina, além do caurano e de dois feniletanoides (verbascosídeo e arenariosídeo). O extrato etanólico apresentou atividade antiedematogênica na orelha de camundongos na dose de 5mg/orelha (SILVA et al., 2006; VANDRESEN et al., 2010).

A obtenção do OE de *A. gratissima* por métodos distintos, a hidrodestilação e a extração por fluido supercrítico (EFS-CO₂), foi estudada por Silva et al. (2007). Por hidrodestilação os principais constituintes foram: *E*-pinocanfona (13,5-16,3%), β -pineno (10,5-12,0%) e α -guaiol (6,6-8,7%). Na EFS, os principais compostos foram guaiol (16,7%), β -cariofileno (9,2%) e germacreno D (8,6%). Ambos os extratos apresentaram fraca atividade antioxidante.

Franco et al. (2007) determinaram como principais constituintes do OE obtido das folhas de *A. gratissima*: *E*-pinocanfona (18,42%), acetato de *E*-pinocarvila (13,55%) e β -pineno (14,06%). O OE apresentou atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, equivalente ao cloranfenicol. Já no estudo de Santos et al. (2013), o OE apresentou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = concentração mínima inibitória de 0,80 mg mL⁻¹), *Streptococcus pneumoniae* (CIM 0,60 mg mL⁻¹) e *Candida albicans* (CIM 0,90 mg mL⁻¹). Já o OE das flores demonstrou maior espectro de atividade contra *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (CIM 0,15 mg mL⁻¹), *S. pneumoniae* e *C. albicans* (CIM 0,02 mg mL⁻¹) e *S. aureus* (CIM 0,25 mg mL⁻¹). Neste OE foi observada maior concentração de sesquiterpenoides, sendo os principais constituintes: guaiol (19,5%), germacreno B (10,5%) e bulnesol

(10%), *E*-cariofileno (8,9%). Entretanto, o OE das folhas teve como majoritários acetato de *E*-pinocarveol (17,6%), *E*-pinocanfona (16,3%) e guaiol (11,5%).

O OE das folhas de *A. gratissima* possuindo como principais constituintes *E*-pinocanfona (16%), β -pineno (12%), acetato de *E*-pinocarvila (8,2%) e guaiol (8,5%) apresentou CIM de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM (concentração bactericida mínima) de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Streptococcus mutans* (GALVÃO et al., 2012). O mesmo OE apresentou atividade antimicrobiana e capacidade de inibir a formação de biofilmes dos microrganismos *Candida albicans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Porphyromonas gingivalis* (BERSAN et al., 2014). Uma fração do OE das folhas contendo guaiol (29,63%), *E*-pinocarveol (13,16%), bulnesol (11,74%), mirtenol (5,3%), acetato de *E*-pinocarvila (8,2%) e guaiol (8,5%) demonstrou possuir a capacidade de alterar a integridade do biofilme microbiano e inibir o desenvolvimento dos polissacarídeos extracelulares (FREIRES et al., 2015).

Santos et al. (2015) descreveram como constituintes majoritários do OE das folhas de *A. gratissima*: eucaliptol (13,7%), germacreno D (13,4%), β -cariofileno (12,7%) e β -pineno (11,7%). O OE demonstrou atividade contra *Bacillus cereus* (CIM 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Trichophyton mentagrophytes* (CIM 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), entretanto no ensaio de atividade antioxidante foi menos efetivo que o BHT (hidroxitolueno butilado).

O OE de *A. gratissima* obtido das partes aéreas por hidrodestilação já foi estudado por Soler et al. (1986), que relataram a presença majoritária de hidrocarbonetos sendo o sabineno (29,95%), β -pineno (9,66%) e β -bisaboleno (5,81%) descritos como principais constituintes. Os estudos de Trovati et al. (2009a,b) revelaram a presença de guaiol, limoneno, elemol, isopinocanfona, acetato de *Z*-pinocarvila e acarenona como constituintes majoritários. Arze et al. (2013) descreveram como constituintes majoritários: 6 α -hidroxigermacra-1(10),4-dieno, β -cariofileno, cubebol, δ -cadieno. A variação da constituição química do OE devido às variações sazonais foi significativa em um estudo conduzido na Argentina e os principais constituintes do óleo foram: β -elemeno, viridiflorol, β -cariofileno, α -tujona, 10-epi-cubelol, biciclogermanceno, nerolidol e germacreno D (RICCIARDI et al., 2006).

No estudo de da Silva et al. (2014), o OE das partes aéreas de *A. gratissima* teve como constituintes majoritários: β -pineno (27,05%), *E*-pinocanfona (11,93%), acetato de *E*-pinocarvila (8,94%) e guaiol (6,23%). Uma emulsão (preparada com o

OE nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1% e um decocto (preparado nas concentrações de 25, 50 e 75% a partir do resíduo do material vegetal oriundo do processo de hidrodestilação por Clevenger) apresentaram atividade antifúngica direta sobre as hifas e conídios de *Oidium eucalypti* em testes *in vitro* e *in vivo*. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com os antifúngicos comerciais: piraclostrobina e epoxiconazol. Este mesmo OE demonstrou atividade contra *Colletotrichum truncatum* em concentrações superiores a 1%, sendo semelhantes ou melhores que o fungicida comercial carbendazim (DA SILVA et al., 2012).

O emprego do OE das partes aéreas de *A. gratissima* como anestésico e sedativo na aquicultura já foi estudado por Benovit et al. (2012), sendo que uma concentração de 900 mg L⁻¹ foi capaz de induzir a anestesia em 4 minutos em juvenis de linguado brasileiro (*Paralichthys orbignyanus*). Todavia o tempo de recuperação anestésica foi superior a 30 minutos. Na concentração de 270 mg L⁻¹ foram observados efeitos adversos, como paralisia de alguns juvenis seguida de morte em um período de 24 horas. Com a mesma espécie de peixe foi realizado um experimento de transporte com duração de 7 horas, neste o OE não foi capaz de reduzir ou manter os níveis de glicose plasmática, sendo um indicativo de que não é capaz de prevenir o estresse. Além disso, as concentrações de 90 e 135 mg L⁻¹ produziram mortalidade de 8,3 e 100%, respectivamente. Entretanto, o trabalho não determinou a composição química do OE.

Um OE obtido das partes aéreas de *A. gratissima*, possuindo como principais constituintes eucaliptol (18,54%), sabineno (9,5%), guaiol (6,79%), biciclogermacreno (5,12%), germacreno B (4,15%) e germacreno D (3,91%), apresentou capacidade de indução anestésica na concentração de 900 mg L⁻¹ e a recuperação anestésica em aproximadamente 12 minutos em juvenis de *Rhamdia quelen*. Entretanto, estes juvenis apresentaram contrações musculares involuntárias e mortalidade. Juvenis expostos durante 30 minutos a concentrações de 90, 300 e 450 mg L⁻¹ do OE não apresentaram inibição da atividade da acetilcolinesterase de cérebro e músculo. A concentração de 90 mg L⁻¹ foi capaz apenas de induzir sedação. Foi realizado um fracionamento bioguiado, sendo atribuída a *E*-(-)-pinocanfona os efeitos adversos do OE. Os isolados (-)-óxido de cariofileno, (-)-guaiol e (+)-espatulenol demonstraram apenas efeitos sedativos nas concentrações proporcionais ao OE. O (+)-espatulenol (51,2 mg L⁻¹) promoveu anestesia profunda sem efeitos adversos (BENOVIT et al., 2015) e uma patente foi solicitada no Brasil

(BR1020120213141 A2) de um produto à base de espatulenol para utilização como sedativo e/ou anestésico obtido de extratos de *A. gratissima*.

Já o OE das folhas de *A. gratissima* na concentração de 100 mg L⁻¹ apresentou potencial larvicida contra larvas de Coenagrionidae, ao causar 66,67% de mortalidade em quatro horas de exposição (SILVA et al., 2014). Essas larvas são predadoras naturais de alevinos de peixes e a sua presença é combatida em pisciculturas (FONSECA et al., 2004).

Outras atividades biológicas e farmacológicas já foram descritas para extratos de *A. gratissima*: antiviral (GARCÍA et al., 2003; MONTANHA et al., 2004), antifúngica (DELLACASA et al., 2003), nematicida (DUSCHATZKY et al., 2004), antiulcerogênica (BUCCIARELLI; SKLIAR, 2007), efeitos antiproliferativos em células vegetais (HISTER et al., 2009) e ausência de genotoxicidade (RICCO et al., 2010).

1.5.2 Lauraceae

A família apresenta-se amplamente distribuída através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo formada por 49 gêneros e 2.500 - 3.000 espécies (WERFF, 1996). Nesta família, o óleo essencial é armazenado em células secretoras parenquimáticas diferenciadas, que podem ser encontradas na folha, na casca e no lenho (BARROS et al., 1997; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Nectandra Rol. ex Rottb. é um dos mais importantes gêneros da Lauraceae em número de espécies, sendo conhecidas 114 e, destas, 43 são brasileiras. O gênero é composto por árvores monóicas de folhas peninérveas alternas, raramente opostas e subopostas (BAITELLO et al., 2003). O gênero é caracterizado pela presença de alcaloides dos grupos benzilquinolínico (BOHLKE et al., 1996), aporfínico e indólico (SANTOS FILHO; GILBERT, 1975), lignanas tetraidrofurânicas (SILVA FILHO et al., 2004a) e neolignanas (BRAZ FILHO; GOTTLIEB, 1980; COY et al., 2009), monoterpenoides e sesquiterpenoides (GOTTLIEB et al., 1981).

Espécies de *Nectandra* são empregadas na medicina popular por suas propriedades digestivas, diuréticas, antirreumáticas e analgésicas (PIO-CORRÊA, 1984). Algumas espécies já foram estudadas e demonstraram propriedades antitumoral (MORENO et al., 1993), relaxante muscular (SLISH et al., 1999), antimalárica (BOHLKE et al., 1996), antioxidante (RIBEIRO et al., 2005), anti-

inflamatória (SILVA FILHO et al., 2004b) e antifúngica (SLISH et al., 1999; GARCEZ et al., 2009).

1.5.2.1 *Nectandra megapotamica*

Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez (Figura 19) é uma arbórea que apresenta ampla distribuição nas florestas nativas do Rio Grande do Sul, sendo conhecida popularmente como canela-louro, canela-preta, canela-ferrugem e canela-fedorenta (TONINI; FINGER; SCHNEIDER, 2003). Apresenta como sinônimas botânicas *N. briquetii* Hassl., *N. membranacea* (Spreng.) Hassl., *N. membranacea* fo. *floribunda* Hassl., *N. membranacea* var. *saligna* (Nees) Hassl., *N. racemifera* Meisn., *N. saligna* Nees, *N. saligna* var. *obscura* Meisn., *N. tweediei* (Meisn.) Mez, *Oreodaphne tweediei* Meisn., *O. tweediei* var. *cymulosa* Meisn., *Strychnodaphne suaveolens* Griseb. e *Tetranthera megapotamica* Spreng. (TROPICOS.ORG, 2012).

Figura 19 – *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, em Santa Maria, RS, Brasil



Fonte: Lúcio de Paula Amaral.

O uso etnofarmacológico desta espécie dá-se, principalmente, como analgésico, antirreumático (SILVA FILHO et al., 2008), sendo o chá de folhas *N. megapotamica* usado como calmante e no tratamento de gripes e tosses. Já a casca desfiada e aquecida é utilizada para o tratamento de abscessos (ALVES et al., 2008). Estudos fitoquímicos de extratos etanólicos desta espécie mostraram a

presença de sesquiterpenoides, fenilpropanoides e flavonoides nas cascas e folhas (GARCEZ et al., 2009) e outras classes de compostos fitoquímicos como as lignanas tetraidrofurânicas nas folhas (SILVA FILHO et al., 2004a) e alcaloides indólicos nas cascas (SMITH, 1977).

Alguns estudos, avaliando atividades biológicas e farmacológicas desta espécie, já foram realizados. Para o extrato hidroalcoólico de cascas de *N. megapotamica*, é relatada fraca atividade leishmanicida e antimalárica. Já as lignanas isoladas (machilina G e veranguesina) apresentaram melhor atividade contra *Leishmania donovani*. Outro componente presente no extrato, a calopeptina, também presente no extrato etanólico de folhas, demonstrou boa atividade contra *Plasmodium falciparum*. Tanto os extratos como as substâncias isoladas não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (SILVA FILHO et al., 2004a; SILVA FILHO et al., 2008). Do extrato hidroalcoólico de cascas foi isolada α -asarona, que demonstrou atividade no teste de constrição abdominal em ratos. Também isolados das cascas, a galgravina e a veraguensina apresentaram melhores resultados no ensaio de edema de pata em ratos (SILVA FILHO et al., 2004b).

Testes de atividade antioxidante (nos ensaios com 2,2-difenil-picrilidrazila [DPPH] e β -caroteno) e antifúngica (por microdiluição) foram realizados, utilizando substâncias de estrutura aromática isoladas do extrato etanólico de cascas do caule de *N. megapotamica*. A epicatequina apresentou significativa atividade antioxidante em ambos os ensaios e outras substâncias isoladas foram ativas frente às cepas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Os fenilpropanoides isolados do extrato etanólico de cascas do caule (isoelemicina) e de folhas também apresentaram atividade antioxidante (GARCEZ et al., 2009).

O extrato etanólico das cascas de *N. megapotamica*, administrado por via intraperitoneal em ratas fêmeas em três concentrações diferentes (75, 112,5 e 300 mg kg⁻¹), produziu um efeito analgésico significativo quando comparado à dipirona (60 mg kg⁻¹ i.p.). Entretanto, não foi significativo quando comparado à morfina (4 mg kg⁻¹), sugerindo que o extrato aumenta o limiar da dor (NOVAES et al., 1998).

Do extrato metanólico de cascas *N. megapotamica* também foram isoladas lignanas tetraidrofurânicas, das quais as nectandrina A, veraguensina e galgravina apresentaram atividade contra as células da leucemia humana (HL60) nas CI₅₀ de

14,2, 16,9 e 16,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estes compostos são capazes de produzir danos na membrana plasmática e mitocôndrias, podendo assim relacionar-se com a via apoptótica intrínseca (PONCI et al., 2015).

Em estudo sobre variação circadiana e sazonal do OE extraído de folhas de *N. megapotamica*, não foi detectada diferença entre as amostras, sendo o constituinte majoritário o α -bisabolol (ROMOFF et al., 2010). Este constituinte apresentou atividade anti-inflamatória (KAMATOU; VILJOEN, 2010), antitumoral (SILVA et al., 2010) e antimicrobiana (POPOVIĆ et al., 2010). Em outro estudo, realizado com três indivíduos e avaliando variabilidade sazonal, observou-se uma variação qualitativa no OE de folhas, sendo α -santaleno (17,42%) e β -santaleno (9,23%) os majoritários em dois indivíduos e muurolo-4,10-(14),dien-1- β -ol (23,09%) e δ -elemeno (11,16%) de um terceiro indivíduo analisado. Para o OE obtido de galhos foram observadas variações quali e quantitativas ao se analisar diferentes indivíduos, sendo que no indivíduo 1 os constituintes majoritários foram 5-iso-cedranol (12,07%) e α -muurolol (11,28%); no indivíduo 2 α -bisabolol (13,19%) e 5-iso-cedranol (10,3%); enquanto que no indivíduo 3 predominou o α -muurolol (43,04%) (BRITO, 2009).

Em um trabalho comparando a composição química do OE obtido de folhas jovens e velhas de *N. megapotamica* não foi verificada variação qualitativa. Os constituintes majoritários foram biciclogermacreno, α - e β -pineno e germacreno D em ambos os óleos, mas a concentração das substâncias apresentou variação de acordo com o estágio de desenvolvimento de folhas e sazonalidade (AMARAL et al., 2015). Ambos os óleos deste mesmo estudo apresentaram atividade sedativa leve na concentração de 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ e anestésica em concentrações acima de 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ em robalos-peva (*Centropomus parallelus*). Entretanto, o OE obtido de folhas velhas não foi eficaz para prevenir o estresse gerado pelo manuseio e transporte desta espécie (TONDOLO, 2011; TONDOLO et al., 2013).

No trabalho de Apel et al. (2006) o OE de folhas de *N. megapotamica*, na concentração de 3.125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) em 71%, de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) em 51% e *Escherichia coli* (ATCC 25922) em 20%, sendo inativo contra a *Candida albicans* (ATCC 10231). Outros ensaios realizados no mesmo trabalho demonstraram atividade anti-inflamatória e antitumoral na concentração de 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com

citotoxicidade seletiva para células de câncer de próstata e mieloma múltiplo para o mesmo OE.

Os OEs das folhas e das cascas de *N. megapotamica* nas concentrações de 100 mg L⁻¹ apresentaram atividade contra larvas de Coenagrionidae, sendo as mortalidades de 20% e 60%, respectivamente, após o período de 19 horas de exposição. Entretanto, estes resultados não tornam o uso destes OEs viáveis como larvicidas em sistemas de aquicultura (SILVA et al., 2014).

A composição química do OE *N. megapotamica* foi caracterizado durante diferentes estados vegetativos e em todos foi encontrado predomínio de monoterpenoides (21,0-31,7%) e sesquiterpenoides (58.5-68.9%). Os extratos obtidos da coleta do outono demonstraram melhor atividade contra o veneno de *Bothrops diporus*. O OE e extrato aquoso apresentaram atividade inibitória da ação hemolítica e o extrato hexânico inibição da ação pró-coagulante desse veneno (TORRES et al. 2014).

1.5.2.2 *Nectandra grandiflora*

Nectandra grandiflora Nees (Figura 20) pertence à Lauraceae, sendo uma espécie nativa endêmica do Brasil, de distribuição nas regiões Sudeste e Sul (QUINET et al., 2010). Apresenta como sinônimas *Gymnobalanus regnelli* Meisn., *Nectandra glauca* Warm ex. Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *cuneata* Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *latifolia* Ness, *Nectandra grandiflora* var. *longifolia* Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *oblongifolia* Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *obovata* Meisn. (TROPICOS.ORG).

Popularmente é conhecida por canela-amarela ou caneleira (LORENZI, 1982; JURINITZ; JARENKOW, 2003) e canela ou canela-fedida (QUINET et al., 2010). A infusão de suas folhas é usada na medicina popular para o tratamento de problemas digestivos, além de serem descritas propriedades diuréticas e antirreumáticas (PIO-CORRÊA, 1984).

Figura 20 – *Nectandra grandiflora* Nees



Fonte: Solon Jonas Longhi.

O extrato etanólico das folhas de *N. grandiflora* apresenta flavonoides glicosilados (canferol 3-O- β -ramnosídeo e quercetina 3-O- β -ramnosídeo) que exibiram atividade antioxidante, inibindo a oxidação do β -caroteno (RIBEIRO; SILVA; BOLZANI, 2002). Ribeiro e colaboradores (2005) isolaram o ácido protocatéquico e os flavonóides glicosilados afzelina e quercetrina, os quais exibiram atividade sequestradora de radicais livres frente ao DPPH; além disso, foram obtidas três neolignananas. No extrato etanólico da casca é descrita a presença de alcaloides aporfinoídes (MORENO et al., 1993).

O OE das folhas de *N. grandiflora*, no estudo de Bidá (1991), apresentou um rendimento médio de 0,80% e a presença de eugenol. Este constituinte já teve o seu uso descrito como anestésico em jundiá (CUNHA et al., 2010), entre outras espécies de peixes (WAGNER et al., 2002; HOSEINI et al., 2015).

A análise da variabilidade sazonal de *N. grandiflora* e das diferentes partes do vegetal sobre o rendimento e a composição química do OE evidenciou que este apresenta maior rendimento na primavera (época de floração da espécie). No entanto, a composição química não sofreu influência significativa das estações do

ano e foram verificadas apenas pequenas diferenças quantitativas na proporção de constituintes majoritários. Seus OEs são constituídos preponderantemente por sesquiterpenoides, sendo a deidrofuquinona o composto majoritário, que se apresenta em maiores concentrações no inverno. Na primavera ocorre um decréscimo na sua concentração e incremento nos teores do composto biciclogermacreno. Outro dado fator importante é que o processo de secagem do material vegetal à temperatura ambiente não compromete o teor do OE (SILVA, 2013; SILVA et al., 2015).

A deidrofuquinona, principal constituinte do OE de *N. grandiflora*, exerce um efeito depressor central em *R. quelen*, podendo ser utilizado como anestésico ou sedativo na piscicultura, uma vez que, em uma exposição de 24 horas de duração, as concentrações de 2,5 a 20 mg L⁻¹ não apresentaram efeitos colaterais nos peixes. Esta apresenta atividade sobre os receptores GABA_A e previne o aumento do cortisol em protocolo de estresse (GARLET et al., 2015).

No estudo de Silva et al. (2014) o OE das folhas apresentou um rendimento de 0,38% e, quando testado frente a larvas de Coenagrionidae na concentração de 100 mg L⁻¹, resultou em taxas de mortalidade de 8,33% para 6 e 9 horas, e 25% para 19 de exposição. Assim, a baixa efetividade do OE não justificaria o seu uso como larvicida em pisciculturas.

1.6 JUSTIFICATIVA

A expansão da aquicultura (GRICORAKIS; RIGOS, 2011) exige o desenvolvimento de esforços para que se reduzam os problemas das parasitoses, eliminando o uso abusivo de antibióticos e produtos químicos. Também é necessário prevenir a introdução de organismos exóticos em águas locais e a criação de sistemas que permitam tornar os produtos para a aquicultura mais sustentáveis no mercado consumidor (DIANA et al., 2013). Aliada a essa conjuntura, a legislação que regulamenta o cultivo orgânico (BRASIL, 2011) estimula um ambiente propício para o desenvolvimento de novos fitoterápicos a partir de espécies nativas para tratar doenças parasitárias, em especial a girodactilose e ictiofitriase, responsáveis por significativos prejuízos na produção mundial de peixes (HANSON et al., 2008).

Rhamdia quelen é a principal espécie nativa dos sistemas de piscicultura continental no estado do Rio Grande do Sul e apresenta alto potencial de

comercialização, entretanto é bastante suscetível à ictiofitiríase (MIRON et al., 2003; GARCIA et al., 2007; BALDISSEROTTO, 2009). Além disso, é importante considerar considerando ainda que não há relatos de opção de tratamento para *G. lilliana* e que é difícil o tratamento das parasitoses causadas por espécies de *Gyrodactylus* (DAVIDSEN et al., 2013). Assim, o desenvolvimento de alternativas para o tratamento de doenças nesta espécie pode estimular o seu cultivo, contribuindo para a valorização deste peixe nativo.

Os óleos essenciais de *Aloysia gratissima*, *Nectandra megapotamica* e *N. grandiflora* não possuem relatos na literatura quanto à avaliação da atividade antiparasitária. Além disso, estes óleos essenciais já tiveram alguns de seus efeitos avaliados em peixes, sendo promissores para a utilização durante o cultivo e manejo desses animais, principalmente como sedativos e anestésicos (BENOVIT, 2012; TONDOLO et al., 2013, SILVA, 2014).

As espécies vegetais alvo deste estudo são nativas do Brasil e utilizadas na medicina popular no combate a infecções diversas (PIO-CORRÊA, 1984, ALICE et al., 1995; PINTO et al., 2007; SOUZA; WIEST, 2007). Também não são encontrados relatos na literatura de intoxicações em humanos por essas plantas. Assim, o estudo da atividade antiparasitária de seus óleos essenciais pode resultar em produtos eficazes, seguros e economicamente viáveis para o tratamento da girodactilose e ictiofitiríase, principalmente para sistemas de cultivo orgânico, sendo de grande valia para uma nova perspectiva de tratamento ecológico e seguro no âmbito comercial.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

Obter novos produtos antiparasitários para girodactilose e ictiofitiríase a partir dos óleos essenciais de espécies vegetais nativas do Brasil para uso em aquicultura.

1.7.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antiparasitária dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso, *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez e *Nectandra grandiflora* Nees *in vitro* contra os parasitos *Gyrodactylus lilianae* e *Ichthyophthirius multifiliis*.
- Estabelecer protocolos de tratamento *in vivo* para os óleos essenciais das espécies vegetais em questão para juvenis de jundiá parasitados por com *Gyrodactylus lilianae* e *Ichthyophthirius multifiliis*.
- Determinar a eficácia antiparasitária *in vivo* dos óleos essenciais.
- Descrever a composição química do óleo essenciais das espécies em estudo.

1 **2 ARTIGO 1**

2 **Antiparasitic activity of the essential oil of *Aloysia gratissima* against**
3 **monogenean infections and ichthyophthiriasis in silver catfish**

4 Anelise L. Murari^a, Fernando J. Sutilli^a, Simone C. Benovit^a, Daniele Beutinger^b,
5 Mario Luiz de la Rue^{a, b}, Bernardo Baldisserotto^a, Berta M. Heinzmann^{a, b}

6 ^aPharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Camobi,
7 Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

8 ^bFaculty of Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS,
9 97105-900, Brazil

10 **Correspondence**

11 Prof.^a Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
12 Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus
13 Universitário, Avenida Roraima nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria – RS, Brazil,
14 BR-97105-900. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com Phone: +55 55 3220 9674 Fax:
15 +55 55 3220 8336.

16 E-mail addresses:

17 aneliselm@gmail.com (A.L. Murari)

18 sutilifj@gmail.com (F.J. Sutili)

19 sbenovit@yahoo.com.br (S.C. Benovit)

20 dani_beutinger@yahoo.com.br (D. Beutinger)

21 mldelarue@hotmail.com (M.L. Rue)

22 bbaldisserotto@hotmail.com (B. Baldisserotto)

23

24 **Antiparasitic activity of the essential oil of *Aloysia gratissima* against**
25 **monogenean infections and ichthyophthiriasis in silver catfish**

26

27 ABSTRACT

28

29 The essential oil of *Aloysia gratissima* (AEO) had their chemical composition and
30 antiparasitic activity against *Gyrodactylus lillianae* and *Ichthyophthirius multifiliis*
31 assessed. The AEO chemical components were identified by gas chromatography
32 (GC) coupled to mass spectrometry and their quantification was performed by GC
33 with flame ionization detector. In the first experiment the mortality of *G. lillianae in*
34 *vitro* (at concentrations from 9 to 90 mg L⁻¹ AEO) were analyzed, and following
35 naturally infected silver catfish juveniles (*Rhamdia quelen*) were treated with two bath
36 administrations of 2 h at 90 mg L⁻¹ AEO, with an interval of 24 h between them. In the
37 second experiment AEO was tested *in vitro* against *I. multifiliis* at concentrations from
38 9 to 750 mg L⁻¹, and afterwards infected fish were treated with 9 and 15 mg L⁻¹ AEO.
39 In both *in vivo* experiments fish mortality were evaluated. The major constituents of
40 AEO were identified as germacrene D (19.98%), β -caryophyllene (12.97%) and *p*-
41 cymene (11.88%). Against *G. lillianae* AEO showed *in vitro* activity at all tested
42 concentrations, and the *in vivo* treatment protocol at 90 mg L⁻¹ showed anthelmintic
43 efficacy of 98.4% after the first bath, and 100% after the second one. AEO also
44 inhibited the development of *I. multifiliis* tomites to theronts *in vitro* at concentrations
45 up to 9 mg L⁻¹. However, in the *in vivo* experiment against *I. multifiliis*, AEO was not
46 effective.

47 **Keywords:** *Ichthyophthirius multifiliis*, *Gyrodactylus lillianae*, Monogenea, *Rhamdia*
48 *quelen*.

49 1. Introduction

50

51 Parasitic diseases in fish play an important role in aquaculture, since the
52 caused infections have led to important economic losses, due to mortality and/or
53 decrease in growth rate during fish rearing in intensifive systems (Abd El-Galil and
54 Aboelhadid, 2012). *Gyrodactylus* spp. and *Ichthyophthirius multifiliis* are parasites
55 that cause high losses in silver catfish (*Rhamdia quelen*) production, one of the main
56 cultivated native species in southern Brazil, due to its high-quality meat (Carneiro and
57 Mikos, 2005; Baldisserotto, 2009).

58 *Gyrodactylus* spp. are monogenean ectoparasites of 19 orders of teleost fish
59 (Bakke et al., 2002 and 2007). Damage caused by gyrodactylids includes epithelial
60 proliferation and increased mucus production in the gills provoked by their feeding
61 activities and by mechanical action of their attachment apparatus (Cone and Odense
62 1984). This may eventually lead to host death by asphyxiation due to functional
63 failure of the respiratory epithelium (Roberts and Smith, 2011).

64 The protozoan *I. multifiliis* is a ciliate parasite, commonly called Ich, which
65 infects a range of freshwater fish species. The life cycle of Ich consists of four stages:
66 an infestative theront, a parasitic trophont and two reproductive ones, tomont and
67 tomite (Matthews, 2005; Coyne et al., 2011).

68 Gyrodactylids and ichthyophthiriasis are difficult to control and the available
69 treatments are associated to low efficacy, toxicity for the host, human health and
70 environmental concerns and difficulties in application. In general, treatments are
71 applied either orally (with the food) or topically (added to water, through immersion or
72 bath) (Schelkle et al., 2009; Reverter et al., 2014). Additionally, the emergence of
73 resistant strains of parasites to the currently available synthetic drugs has been

74 increasingly reported (Umeda et al., 2006; Morley, 2009). There has been a current
75 trend to move away from chemical treatments in aquaculture, therefore alternative
76 strategies should be developed.

77 In this sense an increase in research about efficacy of traditional plant-based
78 medicines for the treatment of fish infections/infestations could be observed (Ekanem
79 et al., 2004; Steverding et al., 2005; Ji et al., 2012; Militz et al., 2013; Fridmann et al.,
80 2014; Reverter et al., 2014). In addition, the antiparasitic activity of essential oils
81 (EOs) from various plant species has been reported (Katiki et al., 2011; Chakraborty
82 and Hancz, 2011). Therefore, EOs are considered potentially promising mixtures of
83 compounds for the treatment of numerous parasitic diseases (Olounladé et al.,
84 2012).

85 *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso, a shrub native to Southern
86 Brazil, has anthelmintic, analgesic, antiviral and antimicrobial properties associated
87 to its use in popular medicine (Souza and Wiest, 2007; Medeiros et al., 2013). In
88 addition, Kinupp and Lorenzi (2014) reported its use as food for humans. Antiviral
89 (García et al., 2003), nematocide (Duschatzky et al., 2004), antifungal (Dellacasa et
90 al., 2003), antibacterial (Franco et al., 2007), larvicide (Silva et al., 2014), antifungal,
91 antioxidant (Santos et al., 2015) and sedative and anesthetic activities for Brazilian
92 flounder and silver catfish (Benovit et al., 2012; 2015) were described.

93 Therefore, this study aimed to evaluate the antiparasitic activity of AEO
94 against *G. lillianae* and *I. multifiliis* in experiments *in vitro* and *in vivo* using infected
95 silver catfish. Additionally, the composition of AEO was analyzed and the chemical
96 data used for the interpretation of the results.

97

98

99 2. Materials and methods

100

101 2.1. Plant material, isolation of essential oil and determination of its chemical 102 composition

103

104 Aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. were collected from
105 its natural habitat, in December 2010 in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.
106 Voucher specimen identified by Prof. Dr. Solon Jonas Longhi was deposited in the
107 Biology Department of the Federal University of Santa Maria (UFSM) (SMDB
108 13.077).

109 The essential oil of the aerial parts was obtained by hydrodistillation on a
110 Clevenger type apparatus for 3 h (European Pharmacopoeia, 2010) and samples of
111 AEO were stored at - 4 °C in amber glass bottles prior to the tests.

112 The chemical components of AEO were identified by GC-MS, performed on an
113 Agilent-7890A gas chromatograph coupled with an Agilent 5975C mass selective
114 detector, using an HP5-MS column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m × 0.25
115 mm i.d. × 0.25 µm) and EI-MS of 70 eV. The operating conditions were as follows:
116 split inlet 1:100; temperature program: Oven temperature kept at 40° C for 4 °C
117 min⁻¹; 40–320 °C at 4 °C min⁻¹; carrier gas He; flow rate 1 mL min⁻¹; and injector and
118 detector temperature: 250 °C. The identification of the EO components was
119 performed by comparison of their Kovats retention index and fragmentation pattern of
120 the mass spectra with literature data (Adams, 2009; NIST, 2008). The EO
121 components were quantitatively determined using an Agilent 7890A gas
122 chromatography system with flame ionization detector (GC-FID). The analysis

123 parameters were equivalent to those cited previously for GC-MS, except for the
124 following: inlet in splitless mode, injector and detector temperature: 300 °C.

125 **2.2 Animals and water quality**

126

127 Juvenile silver catfish (3.55 ± 0.63 g; 7.37 ± 0.33 cm) were purchased from a
128 fish culture at Federal University of Pelotas (UFPEl) in the experiment 1 and the
129 animals were acclimated for 20 days. In experiment 2 juvenile silver catfish ($9.86 \pm$
130 0.40 g; 10.61 ± 0.18 cm) were purchased from a local fish culture in São João do
131 Polêsine city, and the animals were acclimated for five days. Acclimation was carried
132 out in continuously aerated 250 L tanks. The freshwater parameters were: pH $7.40 \pm$
133 0.17 (DMPH-2 pH meter, Digimed); dissolved oxygen 7.36 ± 0.28 mg L⁻¹;
134 temperature 22.0 ± 0.6 °C (YSI oxygen meter, Model Y5512); total ammonia $2.03 \pm$
135 0.56 mg L⁻¹ (Verdouw et al., 1978); un-ionized ammonia 0.01 ± 0.045 (Colt, 2002);
136 hardness 37.26 ± 1.90 mg L⁻¹ CaCO₃; alkalinity 42.60 ± 2.54 mg L⁻¹ CaCO₃. The fish
137 were fed daily to satiation with commercial feed pellets (42% crude protein, Alisul/
138 Supra® - Brazil). Through fish acclimation before the first experiment, monogenean
139 infection was evidenced by a stereomicroscope (10x total magnification) in all fish.
140 The samples were identified by Dr. Walter A. Boeger of Federal University of Paraná
141 (UFPR) as *Gyrodactylus lilianae* (Boeger et al., 2016).

142 Through fish acclimation for the second experiment, clinical signs of infection
143 with *Ichthyophthirius multifiliis* were observed and confirmed by observing the
144 parasites on a stereomicroscope (10x total magnification).

145

146 **2.3 Experiment 1- Evaluation of antiparasitic activity against *Gyrodactylus***
147 ***liliana***

148

149 **2.3.1 *In vitro* assay**

150

151 Portions of the barbels were carefully cut off (2-3 mm/ 30-40 parasites) and
152 placed in tissue culture plates, into which concentrations of 9, 15, 50 or 90 mg L⁻¹
153 AEO (previously diluted in ethanol 1:30) were added. The total number of dead
154 parasites in each sample was counted under a stereomicroscope after 0.5, 1, 2 and 3
155 h and the parasite was considered dead if it did not present any movement for 5 min
156 (Ekanem et al., 2004). The experiments were conducted with three replicates and
157 compared with a control group subjected to the same test conditions, but exposed
158 only to ethanol at the highest concentration used to dilute AEO. A water control was
159 also performed, in which parasites survived on average 34 h.

160

161 **2.3.2 *In vivo* assay**

162

163 The protocols for the *in vivo* assay included two baths of 2 h each, with an
164 interval of 24 h between them and the concentrations used were determined from the
165 *in vitro* assay. The baths were performed in 2-L plastic aquaria with 1 L of constantly
166 aerated freshwater. The protocol consisted of three groups: 90 mg L⁻¹ AEO (diluted in
167 ethanol 1:10) (n= 15) and, in order to reduce the number of animals, negative control
168 (with the same concentration of ethanol in the AEO group) (n= 10) and water control
169 (no substance added) (n= 5). Only infected fish were used, and the intensity of
170 infestation (=number of monogenean parasites on each fish) was determined by

171 observation on stereomicroscope (10x total magnification) before and after
172 treatments, daily through seven days, without anesthesia. The variation of the initial
173 intensity of infestation (number of parasites per fish) was 22-33 before the first bath
174 and 0-1 before the second bath. After bathing, animals were transferred to 10 L
175 aquaria without the addition of any substance to the water.

176 The anthelmintic efficacy (AE) of each treatment was calculated according to
177 the formula:

$$178 \quad \quad \quad AE = (B-T) / B \times 100 \quad (I)$$

179 Where B is the average number of surviving *G. lilliana* in water or ethanol
180 controls, and T is the average number of surviving parasites in the AEO group (Ji et
181 al., 2012).

182

183 **2.4 Experiment 2- Evaluation of antiparasitic activity against *Ichthyophthirius*** 184 ***multifiliis***

185

186 **2.4.1 *In vitro* assay**

187

188 The methodology was adapted from Zheng et al. (2015). Briefly, the tomonts
189 were collected from an aquarium containing infected fish with a pipette and observed
190 under a stereomicroscope. The tomonts were transferred into microplates (4-6
191 tomonts/ well) with AEO at concentrations of 9, 15, 50, 90, 250, 500 or 750 mg L⁻¹,
192 which were obtained by diluting AEO previously in ethanol (1:10) and afterwards in
193 distilled water (1:100). The volume in the wells to 1 mL. The negative control was
194 performed with the highest concentration of ethanol used for dilution of the AEO in
195 water. Tomonts were observed on stereomicroscope (10x total magnification) after 1,

196 2, 4, 20, 22, 24, 26, 48, 72, 96, 120, 144, 168 and 192 h. The dead tomonts were
197 counted (parasites with no internal motility or abnormal cell division and those who
198 did not produce theronts) in each triplicate. The experiment was conducted at room
199 temperature (22 ± 1 °C).

200

201 **2.4.2 *In vivo* assay**

202

203 A semi-static system was used, and 120 fish (in triplicate, n= 10 each)
204 naturally infestation with *I. multifiliis* (prevalence of 100%, intensity of initial
205 infestation; number of parasites per fish of 12.7 ± 6.3), were transferred to 10 L
206 aquaria. Juveniles were exposed to different AEO concentrations (0.0 negative
207 control, 9.0, and 15.0 mg L⁻¹, firstly diluted in ethanol 1:10) or 4 g L⁻¹ NaCl (positive
208 control). After 24 h of the first AEO application, 50% of the water was replaced by the
209 same volume of freshwater, and afterwards 50% of the initial concentration of AEO
210 oil was added. This procedure was repeated for five days, and after which only 50%
211 of the water was replaced every day, without replacing AEO. Fish were fed to
212 satiation once a day with commercial feed (42% crude protein, Alisul / Supra - Brazil).
213 The remains of feces and food were removed 30 min after feeding. The dead fish
214 were also removed daily. The course of infection was assessed by counting the
215 number of trophonts on the animals with a stereomicroscope. The fish were analyzed
216 before treatment and daily after this procedure, for 15 days.

217

218 **2.5 Ethical**

219

220 The present methodology was approved by the Ethical and Animal Welfare
221 Committee of the Federal University of Santa Maria (Process n° 046/2010). The

222 number of fish used in each experiment was the lowest possible in order to satisfy
223 the policy of reduction of experimental animals of the institution.

224

225 **2.6 Statistical analysis**

226

227 The results of *in vitro* evaluation against *G. lillanae* and *I. multifiliis* were
228 submitted to Probit analysis for the calculation of the EC₅₀ (median effective
229 concentration) and EC₉₀ (90% effective concentration), corresponding to efficacy of
230 AEO at the 95% confidence level (Finney, 1971).

231 The data resulting from the count of *G. lillanae* in the *in vivo* test were
232 analyzed, and considering that sample size and the homogeneity of variance
233 between the samples could not be guaranteed according to the Levene ($P < 0.05$) the
234 statistical analysis was performed by non-parametric tests. To verify the existence of
235 significant differences between independent samples, the Kruskal Wallis test was
236 carried out, and to verify the existence of significant differences between the same
237 samples, but at different times, Mann-Whitney U test was used. The significance
238 level considered was $P < 0,05$.

239 After analysis of the variance and homogeneity of the data from the *in vivo*
240 experiment against *I. multifiliis*, the non-parametric Scheirer-Ray-Hare test, extension
241 of Kruskal-Wallis test, followed by the Nemenyi test ($P < 0.05$) were used for analyzing
242 the number of trophonts as a function of time. The analysis of fish survival was
243 performed by Kaplan-Meier with log rank test ($P < 0.001$) and multiple comparison
244 procedures (Holm-Sidak method) ($P < 0.05$)

245

246 **3. Results**

247

248 **3.1. Yield, density and chemical composition of essential oil**

249

250 The average yield of AEO extraction was $0.68 \pm 0.2\%$, and its density was
251 0.8943 g mL^{-1} . Mono- and sesquiterpenoids were the major groups of constituents
252 found (Table 1). The major components were identified as germacrene D (19.98%),
253 β -caryophyllene (12.97%), *p*-cymene (11.88%), 5-isopropyl-2-
254 methylbicyclo(3.1.0)hexan-2-ol (9.79%), germacrene B (9.36%) and
255 isopinocampone (5.04%).

256

257 **3.2. *In vitro* assay of AEO against *G. lilianae***

258

259 Mortality of the parasites subjected to AEO increased as a function of
260 exposure to same time (Fig. 1A), and in the same way EC_{50} and EC_{90} decreased
261 (Table 2). Significant difference in mortality ($P < 0.05$) between groups submitted to 9
262 and 15 mg L^{-1} of AEO was observed only after 1 h. The 90% effective concentration
263 (EC_{90}) after 2 h was 84.2 mg L^{-1} (Table 2), and from this information the *in vivo* test
264 was performed.

265

266 **3.3 *In vivo* assay of AEO against *G. lilianae***

267

268 The number of parasites found in the host before the first bath was
269 significantly not different between groups. After the first bath, the group treated with
270 90 mg L^{-1} AEO presented significantly lower number of parasites compared to

271 ethanol and water controls ($P < 0.05$). The bath with ethanol did not affect significantly
272 the number of parasites compared to control group. The anthelmintic efficacy for the
273 treatment with 90 mg L^{-1} AEO in the first bath was 98.4% and after the second bath
274 the efficacy reached 100% (Figure 1B). No fish mortality was observed.

275

276 **3.4 *In vitro* assay of AEO against *I. multifiliis***

277

278 During the observation period, tomonts submitted to the different
279 concentrations of AEO did not develop to the theront stage at all concentrations
280 tested. However, in the control group, the development of theronts was observed
281 after 20-22 h.

282

283 **3.5 *In vivo* assay of AEO against *I. multifiliis***

284

285 There was no significant difference between survival of the treated and control
286 groups up to the sixth day ($P > 0.05$). All treated groups presented higher survival than
287 water control group from the seventh to the ninth day. After 10 days up to the end of
288 the experiment, the best survival rate was from the group treated with 4 g L^{-1} NaCl.
289 The group treated with 9 mg L^{-1} AEO presented the second best survival rate after 10
290 days (97%), followed by the group treated with 15 mg L^{-1} AEO (94%). Survival from
291 the control and groups treated with AEO decreased progressively from the eleventh
292 day up to the end of the experiment, but with no significant difference between them
293 (Fig. 2A).

294 No significant difference was observed in the mean number of trophonts per
295 fish between groups at the beginning of the assay ($P > 0.05$). Silver catfish treated

296 with 15 mg L⁻¹ AEO showed significant (P<0.05) lower number of parasite compared
297 to control group (0.0 mg L⁻¹ AEO) (Fig. 2B), but higher than NaCl group.

298

299 **4. Discussion**

300

301 The presence of germacrene D, β -caryophyllene and *p*-cymene as major
302 components of AEO, and the results highlights the importance of determining the
303 chemical composition of plant extracts used in pharmacological studies despite
304 previous reports (Soler et al., 1986; Silva et al., 2007; Arze et al., 2013; Santos et al.,
305 2013; Bersan et al., 2014). Benovit et al. (2015) described the toxicity of AEO in
306 *Rhamdia quelen* after 24 h of exposure, in an equivalent concentration to the
307 assessed in this work. However, the chemical compositions found in this study differ
308 significantly. Variations in chemical composition of EO of the same species may be
309 due to biotic and abiotic factors, as differential genetic characteristics, time of
310 collection, besides distinct soil and climatic conditions, among others (Gobbo-Neto;
311 Lopes, 2007; Figueiredo et al., 2008; Barra, 2009).

312 Treatment protocols used *in vivo* against *G. lilliana* demonstrated anthelmintic
313 efficacy of 100%, since the second bath resulted in total elimination of parasites.
314 These results are consistent with the work of Tu et al. (2013), where frequent bath
315 administration allows an increase of anthelmintic efficacy.

316 The exact mode of action of AEO against parasites is unknown. Anthelmintic
317 drugs with different mechanisms of action have been proven to be effective to treat
318 gyrodactylid infections (Schelkle et al., 2009). Terpenoids are a chemical class of
319 components found in EO which are known to be active against a range of organisms.
320 Since EO are complex mixtures of compounds, synergy and/or additive effects often

321 occurs and can result in effective strategies for the parasite control. They can interact
322 with multiple molecular targets on various developmental stages and might be active
323 against parasites by different mechanisms (Magdeleine et al., 2009). However, their
324 structures and modes of action are distinct from those of synthetic anthelmintics in
325 current use, suggesting that cross-resistance with drugs already in use may be
326 minimal, giving advantage to anthelmintics obtained from EOs (Stermitz et al., 2000;
327 Doughari et al., 2009; Reverter et al., 2014). Lipophilic extracts such as EOs can
328 pass through the membrane of the parasite acting therein and causing its rupture (Liu
329 et al., 2010; Levy et al., 2015). Terpenoids isolated from these extracts have also the
330 ability to interact with tegument of helminths and protozoa causing damage and
331 leading to the death of the parasites (Camargos et al., 2014; Mafud et al., 2016).

332 Gyrodactylids have octopaminergic receptors and compounds that act on
333 them have the potential to cause neuromuscular disorders that can result in death of
334 the parasite (Brooker et al., 2011). Eucalyptol found in AEO acts as
335 acetylcholinesterase (AChE) inhibitor, and can also block the octopamine receptor
336 pathway (Khanikor et al., 2013). In addition, it has the ability to interact with lipid
337 components of the protozoan membrane making it more fluid (Camargos et al.,
338 2014). This terpenoid has hydrophobic character and low molecular weight, and
339 therefore can be distributed in the lipid layer of membranes, acting as a spacer
340 destabilizes and weakens their molecular bonds (Turina et al, 2006; Anjos et al,
341 2007; Anjos and Alonso, 2008), facilitating the penetration of other AEO constituents.
342 So, even in minor concentrations eucalyptol may be contributing to the anthelmintic
343 efficacy of AEO and, since it can act by different mechanisms, could prevent the
344 development of antiparasitic resistance (Shalaby, 2013; Reverter et al., 2014).

345 The hexane extract of *Stachys lavandulifolia* consisting of germacrene D
346 (10.6%), β -pinene (8.7%), β -mircene (8.8%) and *E*-cariofilene (5.3%) showed intense
347 AChE inhibitory activity (IC_{50} = 13.7 μ g mL⁻¹) (Tundis et al., 2015). Among the
348 constituents of this extract, only β -pinene is not found in AEO, and in both
349 germacrene D is the major constituent (Table 1). Benovit et al. (2015) reported the
350 absence of inhibitory activity of *Aloysia gratissima* EO at concentrations of 90, 300
351 and 450 mg L⁻¹ on AChE in brain and muscle of *R. quelen*. However, besides the
352 chemical composition of the EO be considerably different from that described in the
353 present study. However, it is likely that the isoform of the enzyme existing in the host
354 and parasite is not the same, since it often differ even in species of the same class
355 (Kim and Lee, 2013). The inhibition of AChE is the anthelmintic mechanism of
356 organophosphates, which use has been banned due to their high toxicity to the host
357 and environment (Morley, 2009). As an alternative to organophosphates, EOs that
358 demonstrated inhibitory activity of AChE may be used (Aaza et al., 2011; Waghmare
359 and Dhumal, 2014), since they have generally lower toxicity and their use is
360 permitted in organic aquaculture (Brasil, 2011; Prein et al., 2012). In addition to the
361 AChE inhibitory effect of eucalyptol, *in vitro* studies have demonstrated AChE
362 inhibitory action for myrtenal (Kaufmann et al., 2011), one of the minor constituents of
363 AEO, which can also contribute to its anthelmintic activity.

364 The results of the *in vitro* assay of AEO against *I. multifilis* are significant,
365 since tomonts generally exhibit more resistance to treatments (Buchmann et al.,
366 2003; Yi et al., 2012; Ling et al., 2012; Zhang et al., 2013). Therefore, the AEO may
367 contain active compounds which have influenced the inhibition of *I. multifilis* tomont
368 division. However, in spite of 15 mg L⁻¹ AEO reducing the number of trophonts in
369 silver catfish, this EO failed to control ichthyophthiriasis, suggesting that the AEO

370 does not exhibit enough activity against other phases of *I. multifilis*. The *in vitro* assay
371 may be excellent in measuring the intrinsic activity of a product but possibly cannot
372 simulate complex *in vivo* situations, where the effects of the treatments are shared
373 between host (fish) and the parasites (Kirby, 1996). In an *in vitro* study doxycycline
374 and toltrazuril demonstrated feasibility for inhibiting the development of theronts, but
375 this capacity has also not been observed in *in vivo* experiment (Abdel-Hafez et al.,
376 2014).

377 Pentagalloylglucose, a polar compound with polyphenolic structure obtained
378 from the ethanolic extract of the plant *Galla chinensis*, showed *in vitro* activity
379 against tomites (at 40 mg L⁻¹) and theronts (from 2.5 mg L⁻¹). This substance caused
380 morphological deformations and changes in the permeability of the plasma
381 membrane, thus allowing the entry of water and causing the death of these parasite
382 forms. However, the same study reported the lack of *in vivo* activity of
383 pentagalloylglucose against trophonts on catfish (Zhang et al., 2013). On the other
384 hand, polar (methanolic) and nonpolar extracts (petroleum ether) of the plants
385 *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) showed potential for
386 the treatment of ichthyophthiriasis, due to the increased survival of fish and decrease
387 in the number of trophonts / fish (Ekanem et al., 2004). Similar results were found for
388 the alkaloids isolated from the methanolic extract of *Toddalia asiatica* (helerythrine at
389 1.8 mg L⁻¹ and chloroxylonine at 8.0 mg L⁻¹) (Xiao-Feng et al., 2014) and also for two
390 steroidal saponins (gracillin at 1 mg L⁻¹ and zingibernsis at 5 mg L⁻¹), isolated from
391 *Costus speciosus* (Zheng et al., 2015). These results suggest that mainly the polar
392 characteristics of extracts and isolated constituents may influence their activity
393 against trophonts. Since trophonts are located on the skin of the fish,
394 pharmacokinetic factors as absorption, distribution, metabolism and excretion
395 interfere with the effectiveness of the drugs tested.

396 The presence of these receptors was not reported in *Gyrodactylus* sp. yet, but
397 their occurrence have been described in other helminth species (Mendonça-Silva et
398 al. 2004) and the authors suggest this as a possible site of action for anthelmintics.
399 Another indication of a possible involvement of GABA receptors in the anthelmintic
400 action of EOA is the fact that this EO has presented larvicidal activity against
401 damselfly (Silva et al., 2014), for which the presence of GABA_A receptors has been
402 described (Vieira et al., 2005).

403 GABA_A receptors in *I. multifiliis* have not been described, but their presence
404 has been reported in ciliated protozoa (Ramoino et al., 2004; Ramoino et al., 2010).
405 In the protozoa *Dictyostelium discoideum*, changes in extracellular GABA
406 concentrations are related to the development of its different stages of life (Wu and
407 Janetopoulos, 2013). This mediator has importance mainly in encysting of parasites,
408 stage that is characterized by being a form of resistance of protozoa to environmental
409 changes and drugs (Jeelani et al., 2012). Therefore, GABA may be related to the
410 persistence of viable tomites in the aquatic environment, influencing the
411 transmission of ichthyophthiriasis. The AEO demonstrated the ability to inhibit the
412 development of tomites to give theronts in *in vitro* experiment, a possible indication
413 of AEO effect on GABAergic system. Therefore, further studies are needed to
414 confirm the presence of GABA_A receptors in *Gyrodactylus* sp. and *I. multifiliis*, as well
415 as to evaluate the AEO isolated compounds on it, including pinocamphone and its
416 analogues.

417

418 **5. Conclusion**

419

420 This study showed that AEO have potential use as a natural alternative to
421 current chemotherapy for treating *G. lilliana*e infection in fish. *In vitro* screening

422 showed to be a proper evaluation methodology of anthelmintic phytochemicals, since
423 this evaluation reproduces the results found *in vivo*. Although AEO showed activity
424 against *I. multifiliis in vitro* and the *in vivo* effect could be demonstrated in the
425 intermediate evaluation period, the protocol used in this work need to be improved,
426 before AEO can be recommended to treat infections caused by this protozoan.
427 Further studies are necessary to determine the best protocol to treat or prevent
428 infections caused by *I. multifiliis* using AEO.

429

430 **Conflict of interest statement**

431

432 None of the authors has any financial or personal relationships that could
433 inappropriately influence or bias the content of the paper.

434

435 **Acknowledgments**

436

437 The authors acknowledge support from CNPq (Conselho Nacional de
438 Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de
439 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors thank prof. Solon
440 Jonas Longhi (UFSM) for identifying the plant species used in this study and prof.
441 Walter Boeger for identifying the species *Gyrodactylus lillianae*.

442

443 **References**

444

445 Aaza, S., Lyoussi, B., Miguel, M.G., 2011. Antioxidant and antiacetylcholinesterase
446 activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*
447 16, 7672–7690.

- 448 Abdel-Hafez, G., Lahnsteiner, F., Mansour, N., 2014. Possibilities to control
449 *Ichthyophthirius multifiliis* infestation with medicated feed in rainbow trout
450 (*Oncorhynchus mykiss*) and chub (*Leuciscus cephalus*). Parasitol. Res. 113, 1119-
451 1126.
- 452 Abd El-Galil, M.A.A., Aboelhadid S.M., 2012. Trials for the control of trichodinosis
453 and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. Vet.
454 Parasitol. 185, 57– 63.
- 455 Adams, R.P., 2009. Identification of Essential oils Components by Gas
456 Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol
457 Stream, Illinois, 804 pp.
- 458 Anjos, J.L.V., Alonso, A., 2008. Terpenes increase the partitioning and molecular
459 dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes. Int. J.
460 Pharm. 350, 103–112.
- 461 Anjos, J.L.V., Neto, D.S., Alonso, A., 2007. Effects of 1,8-cineole on the dynamics of
462 lipids and proteins of stratum corneum. Int. J. Pharm. 345, 81–87.
- 463 Arze, J.B.L., Collin, G., Garneau, F.X., Jean, F.I., Gagnon, H., 2013. Essential oils
464 from Bolivia. XI. Verbenaceae: *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. and
465 Boraginaceae: *Cordia chacoensis* Chodat. J. Essent. Oil Bear. Pl. 16, 545-550.
- 466 Bakke, T.A., Harris, P.D., Cable, J., 2002. Host specificity dynamics: observations on
467 gyrodactylid monogeneans. Int. J. Parasitol. 32, 281–308.
- 468 Bakke, T.A., Cable, J., Harris, P.D., 2007. The biology of gyrodactylid monogeneans:
469 the “Russian-Doll Killers”. Adv. Parasitol. 64, 161–376.
- 470 Baldisserotto, B., 2009. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual,
471 problemas e perspectivas para o futuro. Cienc. Rural 39, 291-299.

- 472 Barra, A., 2009. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of
473 recent developments. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1147-1154.
- 474 Benovit, S.C., Gressler, L.T., Silva, L.L., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2012.
475 Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with
476 essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *J. World Aquac. Soc.*
477 43, 896-900.
- 478 Benovit, S.C., Silva, L.L., Salbego, J., Loro, V.L., Mallmann, C.A., Baldisserotto, B.,
479 Flores, E.M.M., Heinzmann, B.M., 2015. Anesthetic activity and bio-guided
480 fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. *In silver*
481 *catfish Rhamdia quelen*. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 87, 1675-1689.
- 482 Bersan, S.F.S., Galvão, L.C.C., Goes, V.F.F., Sartoratto, A., Figueira, G.M., Rehder,
483 V.L.G., Alencar, S.M., Duarte, R.M.T., Rosalen, P.L., Duarte, M.C.T., 2014. Action of
484 essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms.
485 *BMC Complement Altern. Med.* 14, 1-12.
- 486 Boeger, W.A., Razzolini, E., Murari, A.L., Baldisserotto, B., 2016. Neotropical
487 Monogenoidea xx: *Gyrodactylus liliane* n. sp. (Polyonchoinea, Gyrodactylidae) from
488 *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from Southern Brazil: a potential
489 nuisance for aquaculture. *Zoologia (anexo)*
- 490 Brasil. Instrução Normativa Interministerial nº. 28, de 8 de junho de 2011. Estabelece
491 normas técnicas para os sistemas orgânicos de produção aquícola a serem
492 seguidos por toda pessoa física ou jurídica responsável por unidades de produção
493 em conversão ou por sistemas orgânicos de produção. *Diário Oficial [da] República*
494 *Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 jun. 2011. Seção 1, p. 04-09.*

- 495 Brooker, A.J., Maldonado, M.I.G., Irving, S., Bron, G.E., Longshaw, M., Shinn, A.P.,
496 2011. The effect of octopaminergic compounds on the behaviour and transmission of
497 *Gyrodactylus*. *Parasit. Vectors* 4, 207-217.
- 498 Buchmann, K., Jensen, P.B., Kruse, K.D., 2003. Effects of sodium percarbonate and
499 garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: in vitro
500 experiments. *N. Am. J. Aqua.* 65, 21-24.
- 501 Camargos, H.S., Rodrigo Alves Moreira, R.A., Mendanha, S.A., Fernandes, K.
502 S., Dorta, M.L., Alonso, A., 2014. Terpenes increase the lipid dynamics in the
503 *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. *PLoS*
504 *ONE* 9, e104429.
- 505 Carneiro, P.C.F., Mikos, J.D., 2005. Frequência alimentar de alevinos de jundiá
506 *Rhamdia quelen*. *Cienc. Rural* 35, 187–191.
- 507 Chakraborty, S.B., Hancz, C., 2011. Application of phytochemicals as
508 immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in fin fish culture. *Rev.*
509 *Aquaculture* 3, 103-109.
- 510 Colt, J., 2002. List of spreadsheets prepared as a complement. In: Wedemeyer, G.A.
511 (Ed.), *Fish Hatchery Management*, Second ed. American Fisheries Society,
512 <http://www.fisheries.org/afs/hatchery.html> (accessed 02 08 12).
- 513 Cone, D.K., Odense, P.H., 1984. Pathology of 5 species of *Gyrodactylus* Nordmann,
514 1832 (Monogenea). *Can. J. Zool.* 62, 1084–1088.
- 515 Coyne, R.S., Hannick, L., Shanmugam, D., Hostetler, J.B., Bрами, D., Joardar, V.S.,
516 Johnson, J., Radune, D., Singh, I., Badger, J.H., Kumar, U., Saier, M., Wang, Y., Cai,
517 H., Gu, J., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Wilkes, D.E., Rajagopalan, V., Asai, D.J.,
518 Pearson, C.G., Findly, R.C., Dickerson, H.W., Wu, M., Martens, C., Peer, Y.V., Roos,
519 D.S., Cassidy-Hanley, D.M., Clark, T.G., 2011. Comparative genomics of the

- 520 pathogenic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*, its free-living relatives and a host
521 species provide insights into adoption of a parasitic lifestyle and prospects for
522 disease control. *Genome Biol.* 12, 1-26.
- 523 Dellacasa, A.D., Baillac, P.N., Ponzi, M.I., 2003. *In vitro* activity of essential oils from
524 San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis*. *J. Essent. Oil Res.* 15, 282–285.
- 525 Doughari, J.H., Human, I.S., Bennade, S., Ndakidemi, P.A., 2009. Phytochemicals as
526 chemotherapeutic agents and antioxidants: possible solution to the control of
527 antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Res. J. Med. Plant.* 3, 839–848.
- 528 Duschatzky, C.B., Martinez, A.N., Almeida, N.V., Bonivardo, S.L., 2004. Nematicidal
529 activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot
530 nematode. *J. Essent. Oil Res.* 16, 626–628.
- 531 Ekanem, A.P., Wang, M., Simon, J.E., Obiekezie, A.I., Morah, F., 2004. *In vivo* and *in*
532 *vitro* activities of the seed extract of *Piper guineense* Schum. and Thonn. against skin
533 and gill monogenean parasites of goldfish (*Carassius auratus auratus*). *Phyther.*
534 *Res.* 18, 793–797.
- 535 European Pharmacopeia. European directorate for the quality of medicines. 7 th edn.
536 Strassbourg: 2010.
- 537 Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C., 2008. Factors affecting
538 secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils.
539 *Flavour Fragr. J.* 23, 213-226.
- 540 Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge,
541 333pp.
- 542 Franco, A.L.P., Oliveira, T.B., Ferri, P.H., Bara, M.T.F., Paula, J.R., 2007. Avaliação
543 da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia*

- 544 *gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo)
545 e *Curcuma longa* (açafão). Revista Eletrônica de Farmácia 2, 208-220.
- 546 Fridmann, S., Sinai, T., Zilberg, D., 2014. Efficacy of garlic based treatments against
547 monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). Vet.
548 Parasitol. 203, 51-58.
- 549 García, C.C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., Damonte,
550 E.B., 2003. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis,
551 Argentina. Phytother. Res. 17, 1073–1075.
- 552 Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no
553 conteúdo de metabólitos secundários. Quim. Nova 30, 374-381.
- 554 Jeelani, G., Sato, D., Husain, A., Escueta-de Cadiz, A., Sugimoto, M., Soga, T.,
555 Suematsu, M., Nozaki, T., 2012. Metabolic profiling of the protozoan parasite
556 *Entamoeba invadens* revealed activation of unpredicted pathway during encystation.
557 PLoS ONE 7, e37740.
- 558 Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G.X., Chen, P., 2012. Screening of 42 medicinal plants
559 for *in vivo* anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in
560 goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol. Res. 111, 97–104.
- 561 Katiki, L.M., Chagas, A.C.S., Bizzo, H.R., Ferreira, J.F.S., Amarante, A.F.T., 2011.
562 Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and
563 *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. Vet. Parasitol.
564 183, 103-108.
- 565 Kaufmann, D., Dogra, A.K., Wink, M., 2011. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a
566 known Alzheimer target. J. Pharm. Pharmacol. 63, 1368–1371.
- 567 Khanikor, B., Parida, P., Yadav, R.N.S., Bora, D., 2013. Comparative mode of action
568 of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase

- 569 of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking
570 studies. J. Appl. Pharm. Sci. 3, 006-012.
- 571 Kim, Y.H., Lee, S.H., 2013. Which acetylcholinesterase functions as the main
572 catalytic enzyme in the Class Insecta? Insect Biochem. Mol. Biol. 43, 47-53
- 573 Kinupp, V.F., Lorenzi, H., 2014. Plantas Alimentícias não convencionais (PANC) no
574 Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. Instituto
575 Plantarum, São Paulo, 768 pp.
- 576 Kirby, G.C., 1996. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with
577 particular reference to malaria. T. Roy. Soc. Trop. Med. 90, 605-609.
- 578 Levy, G., Zilberg, D., Paladini, G., Fridman, S., 2015. Efficacy of ginger-based
579 treatments against infection with *Gyrodactylus turnbulli* in the guppy (*Poecilia*
580 *reticulata*(Peters)). Vet. Parasitol. 209, 235-241.
- 581 Ling, F., Wang, J.G., Lu, C., Wang, G.X., Lui, X.N.G., 2012. Effects of aqueous
582 extract of *Capsicum frutescens* (Solanaceae) against the fish ectoparasite
583 *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol. Res. 111, 814–848.
- 584 Liu, Y.T., Wang, F., Wang, G.X., Han, J., Wang, Y., Wang, Y.H., 2010. *In vivo*
585 anthelmintic activity of crude extracts of *Radix angelicae pubescentis*, *Fructus*
586 *bruceae*, *Caulis spatholobi*, *Semen aesculi*, and *Semen pharbitidis* against
587 *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol.
588 Res. 106, 1233–1239.
- 589 Mafud, A.C., Silva, M.P.N., Monteiro, D.C., Oliveira, M.F., Resende, J.G., Coelho,
590 M.L., Sousa, D.P., Mendonça, R.Z., Pinto, P.L.S., Freitas, R.M., Mascarenhas, Y.P.,
591 Moraes, J., 2016. Structural parameters, molecular properties, and biological
592 evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. Chem. Biol.
593 Interact. 244, 129-139.

- 594 Magdeleine, M., Hoste C., Mahieu, H., Varo M., Archimede, H., 2009. *In vitro* effects
595 of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 161,
596 99–105.
- 597 Matthews, R.A., 2005. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in
598 freshwater teleosts. Adv. Parasitol. 59, 159–241.
- 599 Medeiros, P.M., Ladio, A.H., Albuquerque, U.P., 2013. Patterns of medicinal plant
600 use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macro scale investigation
601 based on available literature. J. Ethnopharmacol. 150, 729-746.
- 602 Mendonça-Silva, D.A., Gardino, P.F., Kubrusly, R.C.C., De Mello, F.G., 2004.
603 Characterization of a GABAergic neurotransmission in adult *Schistosoma mansoni*.
604 Parasitology 129,137–146.
- 605 Militz, T.A., Southgate, P.C., Carton, A.G., Hutson, K.S., 2013. Dietary
606 supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in
607 aquaculture. Aquaculture 408, 95-99.
- 608 Morley, N. J., 2009. Environmental risk and toxicology of human and veterinary
609 waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host–parasite relationships. Environ.
610 Toxicol. Phar. 27, 161-175.
- 611 National Institute of Standards and Technology, NIST/ EPA/ NIH. 2008. Mass
612 spectral library Gaithersburg, USA, 2008.
- 613 Olounladé, P.A., Azando, E.V.B., Hounzangbé-Adoté, M.S., Tam, H.T.B., Leroy, E.,
614 Moulis, C., Fabre, N., Magnaval, J.F., Hoste, H., Valentin, A., 2012. *In vitro*
615 anthelmintic activity of the essential oil of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and
616 *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*. Parasitol. Res.110, 1427–1433.
- 617 Prein, M., Bergleiter, S., Ballauf, M., Brister, D., Halwart, M., Hongrat, K., Kahle, J.,
618 Lasner, T., Lem, A., Lev, O. Morrison, C., Shehadeh, Z., Stamer, A., Wainberg, A.A.,

- 619 2012. Organic aquaculture: the future of expanding niche markets. FAO, Rome and
620 NACA, Bangkok. (<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e04c.pdf>)
621 (accessed 01 January 2015).
- 622 Ramoino, P., Milanese, M., Candiani, S., Diaspro, A., Fato, M., Usai, C., Bonanno,
623 G., 2010. Gamma-amino butyric acid (GABA) release in the ciliated protozoon
624 *Paramecium* occurs by neuronal-like exocytosis. J. Exp. Biol. 213, 1251–1258.
- 625 Ramoino, P., Scaglione, S., Diaspro, A., Beltrame, F., Fato, M., Usai, C., 2004.
626 GABA_A receptor subunits identified in *Paramecium* by immunofluorescence confocal
627 microscopy. FEMS Microbiol. Lett. 238, 449–453.
- 628 Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P., 2014. Use of plant
629 extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and
630 future perspectives. Aquaculture 433, 50-61.
- 631 Roberts, H.E., Smith, S.A., 2011. Disorders of the respiratory system in pet and
632 ornamental fish. Vet. Clin. Exot. Anim. 14, 179–206.
- 633 Shalaby, H.A., 2013. Anthelmintics resistance; how to overcome it? Iranian J.
634 Parasitol. 8, 18-32.
- 635 Santos, F.M., Pinto, J.E.B.P., Berto lucci, S.K.V, Alvarenga, A.A., Alves, M.N.,
636 Duarte, M.C.T, Sartoratto, A., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity
637 of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. Rev. Bras. Pl.
638 Med. 15, 583-588.
- 639 Santos, T.G., Jerusa Laemmle, J., Rebelo, R.A., Dalmarco, E.M., Cruz, A.B., Schmit,
640 A.P., Cruz, R.C.B., Zeni, A.L.B., 2015. Chemical composition and antimicrobial
641 activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) leaf essential oil, J Essent. Oil Res. 27,
642 1-6.

- 643 Schelkle, B., Shinn, A.P., Peeler, E., Cable, J., 2009. Treatment of gyrodactylid
644 infections in fish. *Dis. Aquat. Organ.* 86, 65–75.
- 645 Silva, D.C.M.N., Meireles, M.A.A., Brat, P., Magalhães, P.M., Menut, C. 2007.
646 Chemical composition and biological activity of natural extracts obtained from a
647 Brazilian aromatic plant (*Aloysia gratissima*) by supercritical CO₂ and
648 hydrodistillation. *Int. J. Essent. Oil Therap.* 1, 172-178.
- 649 Silva, D.T., Silva, L.L., Amaral, L.P., Pinheiro, C.G., Pires, M.M., Schindler, B.,
650 Garlet, Q.I., Benovit, S.C., Baldisserotto, B., Longhi, S.J., Kotzian, C.B., Heinzmann,
651 B.M., 2014. Larvicidal activity of brazilian plant essential oils against Coenagrionidae
652 larvae. *J. Econ. Entomol.*, 107, 1713-1720.
- 653 Soler, E., Dellacasa, E., Moyna, P., 1986. Composition of *Aloysia grassima* leaf
654 essential oil. *Phytochemistry* 25, 1343-1345.
- 655 Souza, A.A., Wiest, J.M., 2007. Antibacterial activity of *Aloysia gratissima* (Gill et
656 Hook) Tronc. (garupá, herb-saint), used in the traditional medicine in Rio Grande do
657 Sul State – Brazil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 9, 23-29.
- 658 Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L.A., Lewis, K., 2000. Synergy in
659 a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-
660 methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97,
661 1433–1437.
- 662 Steverding, D., Morgan, E., Tkaczynski, P., Walder, F., Tinsley, R., 2005. Effect of
663 Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback
664 *Gasterosteus aculeatus*. *Dis. Aquat. Org.* 66, 29–32.
- 665 Tu, X., Ling, F., Huang, A., Zhang, O., Wang, G., 2013. Anthelmintic efficacy of
666 *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. *Parasitol*
667 *Res.* 112, 2839–2845.

- 668 Tundis, R., Bonesi, M., Pugliese, A., Nadjafi, F., Menichini, F., Loizzo, M.R., 2015.
669 Tyrosinase, acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Stachys*
670 *lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) and its major constituents. *Rec. Nat. Prod.* 9, 81-93.
- 671 Turina, A.V., Nolan, M.V., Zygadlo, J.A., Perillo, M.A., 2006. Natural terpenes: Self-
672 assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 122, 101–113.
- 673 Umeda, N., Nibe, H., Hara, T., Hirazawa, N., 2006. Effects of various treatments on
674 hatching of eggs and viability of oncomiracidia of the monogenean
675 *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini*. *Aquaculture* 253, 148-
676 153.
- 677 Vieira, R., Míguez, J.M., Aldegunde, M., 2005. GABA modulates day–night variation
678 in melatonin levels in the cerebral ganglia of the damselfly *Ischnura graellsii* and the
679 grasshopper *Oedipoda caerulescens*. *Neurosci Lett*, 376, 111-115.
- 680 Verdouw, H., Vanechteld, C.J.A., Deckkers, E.M.J., 1978. Ammonia determi-nations
681 based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399–402.
- 682 Waghmare, J.S., Dhumal, T.D., 2014. Mechanism of action of essential oil on
683 *Pediculus humanus capitis*. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 5, 894-901.
- 684 Wu, Y., Janetopoulos, C., 2013. Systematic analysis of γ -aminobutyric acid (GABA)
685 metabolism and function in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol.*
686 *Chem.* 288, 15280–15290.
- 687 Xiao-Feng, S., Ging-feng, M., Yuan-huan, K., Yu, B., Yun-Hang, G., Wei-li, W., Ai-
688 dong, Q., 2014. Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia*
689 *asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Vet.*
690 *Parasitol.* 199, 250–254.

- 691 Yi, Y.L., Lu, C., Hu, X.G., Ling, F., Wang, G.X., 2012. Antiprotozoal activity of
692 medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*).
693 Parasitol. Res. 111, 1771–1778.
- 694 Zhang, Q., Xu, D., Klesius, P.H., 2013. Evaluation of an antiparasitic compound
695 extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Vet
696 Parasit. 98, 45– 53.
- 697 Zheng, W., Yan, C., Zhang Y., Li, Z. LI, LI, X. Wang, Z., Wang, X., Chen, W., Yu, X.
698 2015. Antiparasitic efficacy of Gracillin and Zingiberensis newsaponin from *Costus*
699 *speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitology 142,
700 473–479.
- 701

702 Table 1 - Chemical composition of the essential oil of *Aloysia gratissima* (AEO)

| Constituent | AEO (%) | RT | RI cal | RI lit |
|---|---------|-------|--------|---------------------|
| β -myrcene | 2.86 | 12.78 | 991 | 991 ¹ |
| <i>p</i> -cymene | 11.88 | 14.04 | 1023 | 1023 ¹ |
| Sylvestrene | 0.72 | 14.20 | 1027 | 1027 ¹ |
| Eucalyptol | 1.85 | 14.29 | 1030 | 1029 ¹ |
| 5-isopropyl-2-methylbicyclo (3.1.0)hexan-2-ol | 9.79 | 15.79 | 1068 | 1067 ¹ |
| Terpinolene | 3.07 | 17.02 | 1099 | 1097 ¹ |
| Isopinocarveol | 2.82 | 18.46 | 1138 | 1136 ¹ |
| Pinocamphone | 1.79 | 19.38 | 1163 | 1163 ¹ |
| Isopinocamphone | 5.04 | 19.80 | 1174 | 1174 ^{1,2} |
| 4-terpineol | 1.27 | 19.93 | 1177 | 1177 ¹ |
| Myrtenal | 1.15 | 20.63 | 1196 | 1196 ¹ |
| Z-pinocarvyl acetate | 0.61 | 24.25 | 1300 | 1298 ^{1,2} |
| β -caryophyllene | 12.97 | 28.15 | 1420 | 1420 ¹ |
| α -caryophyllene | 2.92 | 29.20 | 1454 | 1454 ¹ |
| germacrene D | 19.98 | 30.07 | 1482 | 1482 ¹ |
| Bicyclogermacrene | 2.82 | 30.56 | 1498 | 1498 ¹ |
| germacrene B | 9.36 | 32.34 | 1559 | 1557 ¹ |
| Spathulenol | 1.29 | 32.93 | 1579 | 1580 ¹ |
| caryophyllene oxide | 1.55 | 33.11 | 1585 | 1585 ¹ |
| Guaiol | 0.62 | 33.52 | 1599 | 1599 ¹ |
| Bulnesol | 1.71 | 35.43 | 1669 | 1667 ² |
| Identified components | | 96.07 | | |

703 RT: Retention time

704 RI calc: Calculated retention index.

705 RI lit: Literature retention index¹ NIST (2008) and ²Adams (2009).

706

707 Table 2. Antiparasitic activity of essential oil of *Aloysia gratissima* against *G. lillianae*
 708 *in vitro* (P<0.05). Probit Analysis (Finney, 1971).

| Time (h) | EC ₅₀ ±SE (mg L ⁻¹) | EC ₉₀ ±SE (mg L ⁻¹) | X ² | Intercept | Slope |
|-------------|---|---|----------------|-----------|-------|
| 0.5 | 108.9± 34.8 | 2540.4±2758.9 | 2.32 | 3.09 | 0.94 |
| 1.0 | 28.9±5.4 | 911.4±790.2 | 0.63 | 3.75 | 0.86 |
| 2.0 | 6.9±4.9 | 84.8±74.2 | 1.90 | 4.01 | 1.17 |
| 3.0 | 5.7±2.2 | 31.1±4.7 | 0.14 | 3.68 | 1.74 |

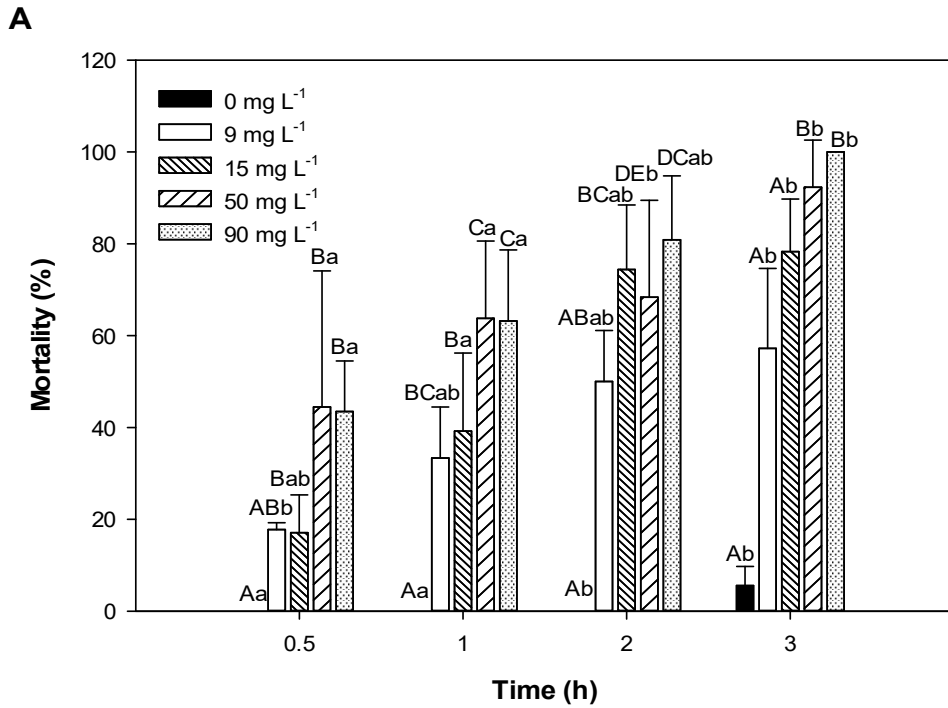
709 EC₅₀: effective concentration 50%

710 EC₉₀: effective concentration 90%

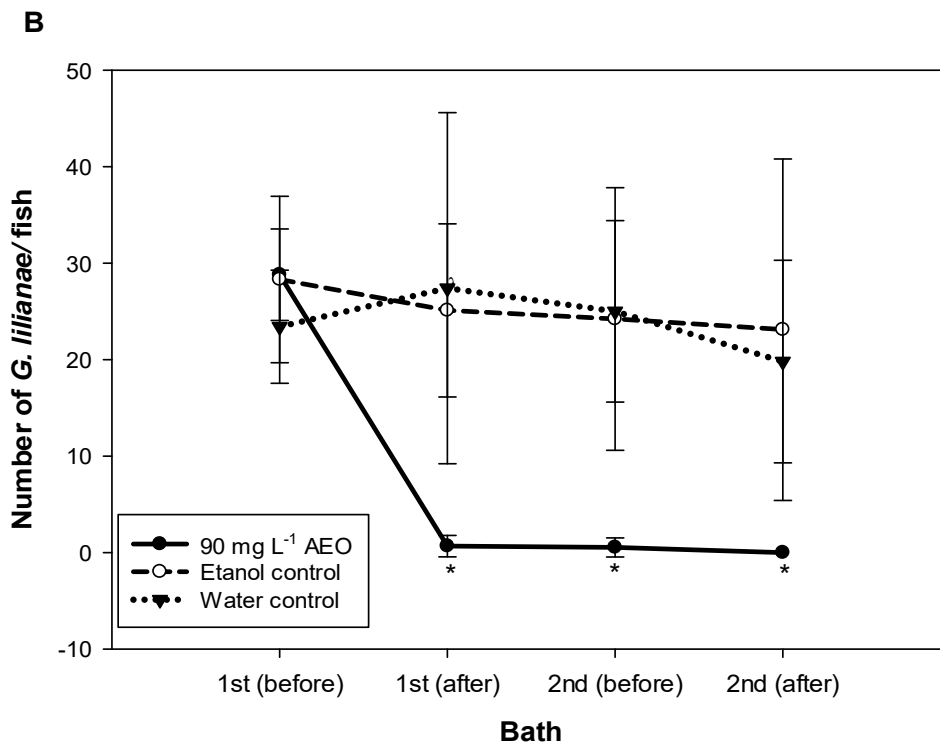
711 SE: Standard error

712

713 **Fig. 1** Effect of *A. gratissima* essential oil on *Gyrodactylus lillianae* (Means \pm SD). (A)
 714 *In vitro* assay. Bars with the same capital letters at the same time and lower case
 715 letters at the same concentration do not differ (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U
 716 test, $P < 0.05$). (B) *in vivo* assay. (*) indicates significant from control and ethanol
 717 groups at the same time (multiple comparisons, Kruskal-Wallis, $P < 0.05$).

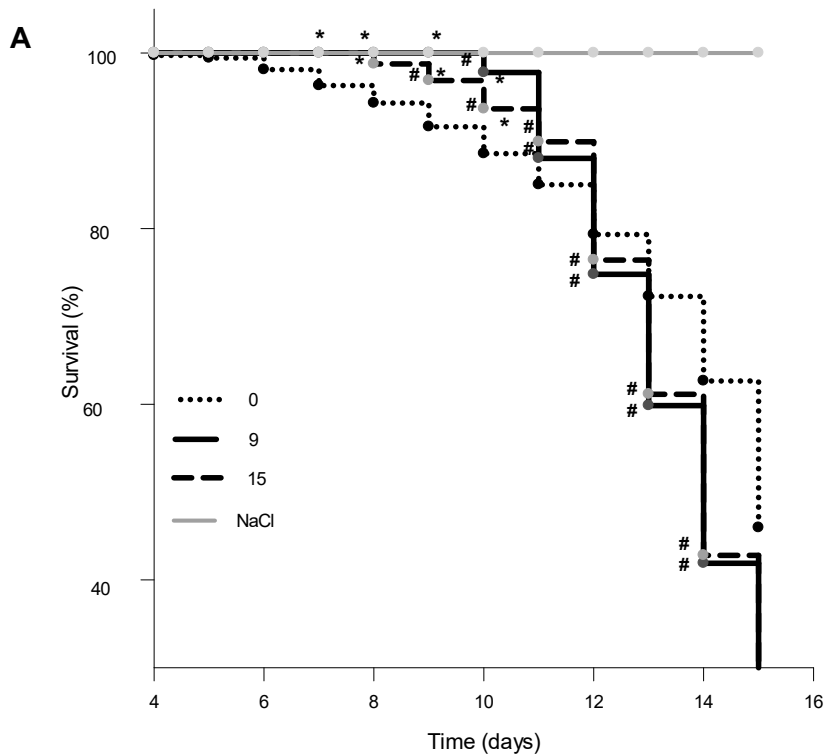


718

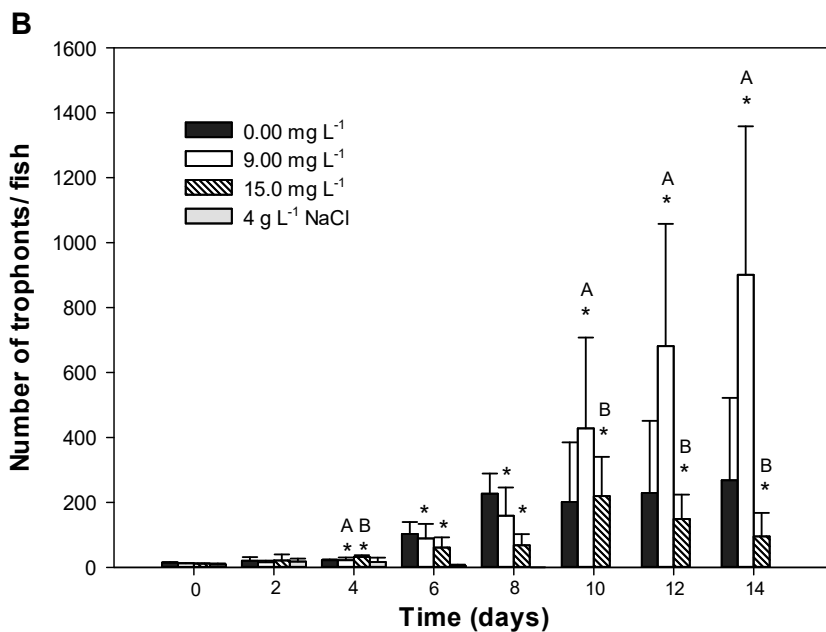


719

720 **Fig. 2** (A) Survival of silver catfish infected with *I. multifiliis* and treated with different
 721 concentrations of *Aloysia gratissima* essential oil (AEO). (*) indicates significant
 722 difference from the control group (0.0 mg L⁻¹ AEO) and (#) indicates significant
 723 difference from the positive control group (4 g L⁻¹ NaCl) at the same period (Kaplan–
 724 Meier survival analysis with Log-rank test, P<0.001 and Holm-Sidak method,
 725 P<0.05). (B) AEO effect on trophonts of infected silver catfish fish as a function of
 726 time. Different letters indicate significant difference at the same time of analysis
 727 (Scheirer-Ray-Hare extension of Kruskal-Walis followed by Nemenyi test, P<0.05).

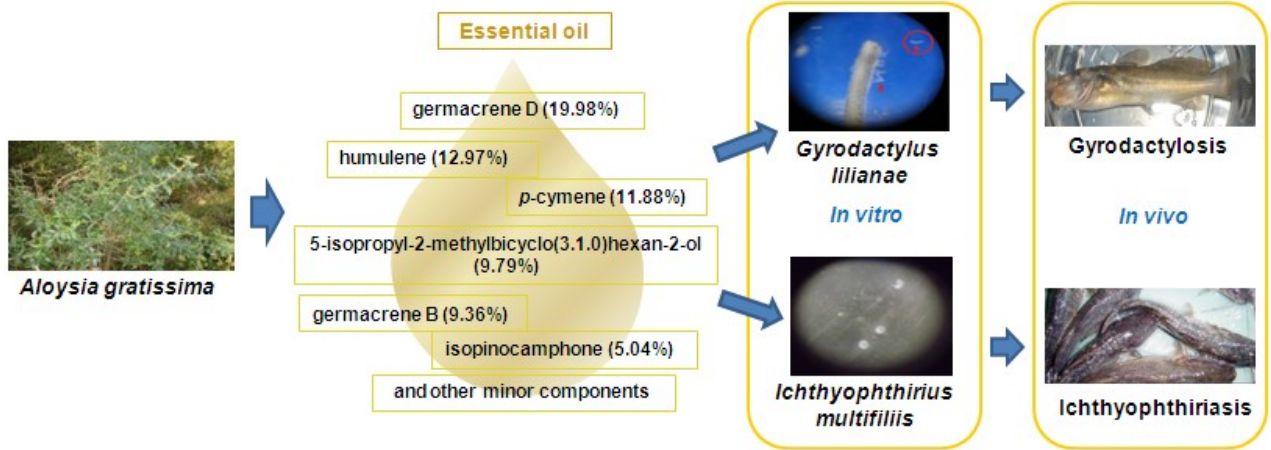


728



729

730 **Graphical abstract**



731
732

3 ARTIGO 2

ANTIPARASITIC ACTIVITY OF LAURACEAE ESSENTIAL OILS .

Anelise L. Murari¹, Samantha Spall², Luciano de Oliveira Garcia³, Lúcio de Paula Amaral⁴, Daniela Thomas da Silva⁵, Solon Jonas Longhi⁶, Bernardo Baldisserotto⁷, Berta M. Heinzmann⁸

¹Pharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil, aneliselm@gmail.com

²Faculty of Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil, samanthaspall@hotmail.com

³Instituto de Oceanografia (IO), Laboratório de Aquacultura Continental (LAC), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), 96210-030, Rio Grande, RS, garcia_log@hotmail.com

⁴Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil, lpamaralengflorestal@gmail.com

⁵Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil, dthomasdasilva@gmail.com

⁶Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil, longhi.solon@gmail.com

⁷Pharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil, bbaldisserotto@hotmail.com

⁸Pharmacology Postgraduate Program, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Federal University of Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil,

Correspondence

Prof.^a Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria – RS, Brazil, BR-97105-900. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com Phone: +55 55 3220 9674 Fax: +55 55 3220 8336.

Acknowledgments

The authors acknowledge support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors thank Prof. Walter Boeger for identifying the species *Gyrodactylus lilianae*.

Abstract

Parasitic diseases are responsible for great economic losses both in conventional and organic fish farming and pharmacological treatments with good effectiveness for organic farming are still scarce. The objective of this study was to analyze the antiparasitic activity of essential oils (EOs) of *Nectandra grandiflora* (GEO) and *Nectandra megapotamica* (MEO) against *Gyrodactylus lilianae* and *Ichthyophthirius multifiliis* found in juvenile *Rhamdia quelen*. The effective concentrations were determined by *in vitro* tests. The *in vivo* tests against *G. lilianae* consisted of two baths lasting 1h with an interval of 24 h between them (50 and 200 mg L⁻¹ for GEO and MEO, respectively). Only GEO was tested *in vivo* against *I. multifiliis* through bath for five days, at 15 mg L⁻¹. The chemical composition of extractives were analyzed by gas chromatography. MEO, composed mainly of α -pinene, β -pinene, limonene and globulol, showed 50% effective concentration (EC₅₀) of 65.2 and 79.2 mg L⁻¹ *in vitro* against *G. lilianae* and *I. multifiliis*, respectively. For GEO, dehydrofukinone, bicyclogermacrene, α -pinene and β -E-ocimene were the major components. GEO EC₅₀ *in vitro* against *G. lilianae* and *I. multifiliis* were 39.6 and 9.6 mg L⁻¹, respectively. The *in vivo* tests against *G. lilianae* detected an anthelmintic efficacy (AE) of 90.7% and 95.6% after the first bath for MEO and GEO, respectively, and 100% AE was achieved after the second bath for both EOs. *In vivo* GEO application against *I. multifiliis* resulted in increased survival of treated fish. Both EOs showed potential for commercial development of new antiparasitic drugs.

Palavras chaves: Antiprotozoan, anthelmintics, fish, silver catfish, *Rhamdia quelen*, terpenoids.

Introduction

The intensification of the global aquaculture has been vulnerable to disease outbreaks that result in partial or total production losses (Bondad-Reantaso et al. 2005). This vulnerability is related to the difficulties of adequate control of the main factors that cause diseases such as high population density, periodic handling of animals, poor water quality, temperature changes, nutritional deficiencies and lack of sanitary conditions. These result in physiological changes such as stress and immunosuppression, favoring the appearance of diseases, particularly parasitic diseases (Naylor et al. 2000; Cabello 2006; Quesada et al. 2013; Oidtmann et al. 2013).

One of the main causes of fish mortality in the wild are parasitic diseases (Dargent et al. 2013) and therefore, they also are among the leading causes of losses in fish culture systems. There are parasites of worldwide distribution, such as *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Matthews 2005; Elsayed et al. 2006; Forwood et al. 2015), and *Gyrodactylus* spp. (Boeger et al. 2003; Harris et al. 2004; Bakke et al. 2007). Both are able to cause high mortality in a wide variety of fish species, both in the wild and culture systems (Bakke et al. 2002; García-Vásquez et al. 2007).

Ichthyophthirius multifiliis known popularly as "ich", is a ciliated protozoan that affects freshwater fish causing ichthyophthiriasis, responsible for extensive economic losses in fish farming. This presents an obligatory parasitic phase, trophont, which settles on the skin of freshwater fish and feeds on mucus and tissues. The presence of a trophont is characterized by a white spot on the skin of the host, which is the origin of the popular name of "white spots disease". After undergoing maturation, the trophont releases the tomont in water and this process causes a lesion in the host skin, favoring the attack of other microorganisms such as bacteria, fungi and virus, which further weaken the fish. The tomont is a resistance form capable of surviving days in the aquatic environment. Its maturation originates the tomita, which releases many theronts, the infestative forms of the parasite. These usually survive only a few hours in the water if they do not find a host (Matthews 2005; Cassidy-Hanley et al. 2011; Coyne et al. 2011; Shinn et al. 2012; Forwood et al. 2015).

Gyrodactylus species can attack fresh- and saltwater fish. They are obligatory parasites, viviparous and have the ability to change between sexual and asexual reproduction, allowing exponential population growth in a short period (Cable and Harris 2002; Bakke et al. 2007). They predominantly parasitize the gills and body surface of their hosts (Poulin, 2002). The lesions provoked by the parasite adherence causes osmoregulatory changes in the host, making it more susceptible to infections caused by bacteria, fungi and other parasites (Collins et al. 2002; Martins et al. 2011; Pettersen et al. 2013). The most important representative of this genus is *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957, which devastated the Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) industry, causing losses around € 500 million (Bakke et al. 2007). However, other species of this genus can also cause significant economic losses in fish farming (Abd El-Galil and Aboelhadid 2012; Friedman et al. 2014.).

The treatment of parasitosis caused by *I. multifiliis* and *Gyrodactylus* spp. is difficult. In general, the treatments available are of low efficacy, expensive and not always safe to the host and/or handler. Thus, many studies have been conducted with the goal of finding more promising alternatives, both with the use of synthetic substances, as well as those of natural origin (Schelkle et al. 2009; Picón-Camacho et al. 2012). Natural products, when used in the form of plant extracts can be employed in organic farming systems. Besides having potential antiparasitic activity, they also contribute to making aquaculture more sustainable to the consumer market (Brazil 2011; Prein et al. 2012; Diana et al. 2013). Medicinal plants extracts, as essential oils (EOs), are

considered less toxic, more ecofriendly and biodegradable than antiparasitic of synthetic origin (Rahuman et al. 2008; Zhang et al. 2013; Zheng et al. 2015). Some EOs present immunostimulant (Chakraborty and Hancz 2011) and antiparasitic activities (Schelkle et al. 2015; Trailović et al. 2015; Hashimoto et al. 2016; Soares et al. 2016; Valladão et al. 2016).

The Lauraceae is an important family of trees that produce EOs, and among its representatives *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, 1902 and *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. ex Nees, 1883 (Amaral et al. 2015; Garlet et al. 2015) can be found. Both are used in folk medicine for the treatment of various pathologies (Pio-Correa 1984; Ahmed et al. 2008; Silva Filho et al. 2008). The EOs of *N. megapotamica* and *N. grandiflora* had their sedative, anesthetic (Tondolo et al. 2013) and larvicidal actions (Silva et al. 2014) evaluated for employment in aquaculture, but to date there is no report of the evaluation of the antiparasitic activity of the EOs obtained from these species. Thus, the objective of this study was to evaluate the activity of EOs of *N. megapotamica* and *N. grandiflora* against the parasites *I. multifiliis* and *Gyrodactylus lillianae* Boeger, Razzolini, Murari & Baldisserotto, 2016 which affect juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824). This fish species is native to southern Brazil and very susceptible to these parasites, which cause economic losses (Miron et al. 2003; Garcia et al. 2007; Baldisserotto 2009; Boeger et al. 2016).

Materials and methods

Plant material, extraction of *Nectandra megapotamica* and *N. grandiflora* essential oils, and determination of their chemical composition

The fresh leaves of *Nectandra megapotamica* and *Nectandra grandiflora* were collected in their natural habitat in Santa Maria and Jaguari (RS), Brazil, respectively. The species were identified by Prof. Dr. Solon Jonas Longhi and a voucher specimen of each one was deposited in the herbarium of the Department of Biology of the Federal University of Santa Maria (UFSM) (SMDB SMDB 13,107 and 13,162, respectively).

The essential oils (EOs) were obtained by hydrodistillation, using the Clevenger type apparatus for 3 h (British Pharmacopoeia 2007) in triplicate. After determining yield and density, EOs were stored at -4°C in amber glass until test procedures.

The identification of the components of the EOs of *N. megapotamica* (MEO) and *N. grandiflora* (GEO) was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in a hyphenated Agilent 7890A system, equipped with a mass selective detector 5975C series. Analyses parameters: Split inlet (1:100, v/v), carrier gas: He (flow at 1 mL/min); an HP5-MS capillary column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm); oven temperature program: 40 $^{\circ}\text{C}$ (Ti) for 4 min, 40-320 $^{\circ}\text{C}$, 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; injector temperature: 250 $^{\circ}\text{C}$; interface temperature: 250 $^{\circ}\text{C}$; ionization energy: 70 eV; Data bank: NIST, 2008. The components of EOs were identified by comparing their retention index (RI) determined by using a calibration curve obtained from a homologous series of n-alkanes (C8-C32) injected under the same chromatographic conditions of the samples and on basis of their mass spectra with literature data (NIST 2008; Adams 2009). The EOs components were quantitatively determined using an Agilent 7890A gas chromatograph system with a flame ionization detector (GC-FID). The analysis parameters were equivalent to those mentioned above, except for the following: splitless mode; Injector and detector temperature: 300 $^{\circ}\text{C}$.

Animals

Juvenile silver catfish were purchased from the fish farming at the Federal University of Pelotas (UFPEL) (3.55 ± 0.63 g, 7.37 ± 0.33 cm) for the experiments with the *N. megapotamica* EO (MEO), while those for the experiments with *N. grandiflora* EO (GEO) (9.55 ± 2.1 g; 10.12 ± 1.03 cm) were acquired from a fish farming in Cruz Alta (RS, Brazil). Animals were transported to the Fish Physiology Laboratory at the Federal University of Santa Maria and were acclimated in 250 L tanks with constant aeration and controlled water parameters.

Prior the tests with MEO, through acclimation (20 days) fish showed clinical signs of monogeneans infection. The parasite was identified as *Gyrodactylus lilianae* by Dr. Walter A. Boeger, at the Federal University of Paraná (UFPR). On the fifth day of acclimation for tests with GEO fish presented infection by *I. multifilis*, and then the *in vivo* and *in vitro* experiments were conducted. Fish not used in the experiment were treated with 4 g L^{-1} sodium chloride for five days, and 15 days after the end of the infection, animals were exposed to water contaminated with *G. lilianae* (from the fish acquired from UFPEL) over a period of 15 days. Once gyrodactylosis was detected, the *in vitro* and *in vivo* experiments with GEO were carried out.

The water parameters were controlled as follows: dissolved oxygen and temperature were measured by an Y5512 oxygen meter (MEO experiment: $6.97 \pm 0.32 \text{ mg L}^{-1}$ and $21.7 \pm 0.8^\circ\text{C}$; GEO experiment: $7.36 \pm 0.28 \text{ mg L}^{-1}$ and $20.4 \pm 0.6^\circ\text{C}$). The pH was determined by a DMPH-2 pH meter (MEO experiment: 7.25 ± 0.14 ; GEO experiment: $\text{pH } 7.40 \pm 0.17$). The total ammonia levels were determined by the salicylate method (Verdouw et al. 1978) (MEO experiment: $2.3 \pm 0.06 \text{ mg L}^{-1}$; GEO experiment: $2.03 \pm 0.56 \text{ mg L}^{-1}$). Levels of un-ionized ammonia (NH_3) were calculated in accordance with Colt (2002) (MEO experiment: $0.03 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$; GEO experiment: 0.01 ± 0.045). The water hardness was measured by EDTA titration method (Eaton et al. 2005) (MEO experiment: $37.26 \pm 1.90 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$; GEO experiment: $36.81 \pm 0.44 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$). The fish were fed once a day with commercial feed (42% crude protein, Alisul / Supra® - Brazil). Room temperature was set at $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Assays against *Gyrodactylus lilianae*

In vitro

Fish maxillary barbels heavily infested by *G. lilianae* were removed after euthanasia by section of the spinal cord, and divided into smaller fractions (2-3 mm), with each fragment containing an average of 35 ± 5 parasites. For the test, 24 well polystyrene plates were used and in each well 1 mL of water, the concentration of EO to be tested and a fragment of parasitized barbel were added. The EOs were previously diluted in ethanol (1:30) for their complete dissolution in water. The solutions tested were (in triplicate): MEO (50, 125, 250, 500 mg L^{-1}), GEO (10, 25, 50, 100 mg L^{-1}), an ethanol control with the highest concentration of ethanol used for dilution and a water control (without the addition of any substance). The mortality of the parasites was assessed after 1, 2 and 3 hours of exposure and the parasites were considered dead when they showed no movement after five continuous minutes of observation (Ekanem et al. 2004a).

In vivo

The EOs concentrations to be tested were obtained after the *in vitro* assays and preliminary pilot assays. Immersion baths of fish parasitized with *G. lillianae* were carried out using 2 L plastic aquaria containing 1 L of continuously aerated freshwater. The treatment protocol consisted of two 1 h baths, with 24 h interval between them. The animals were divided in three groups, in triplicate, for each EO. MEO: 200 mg L⁻¹, ethanol control group (containing the equivalent ethanol concentration of the treatment group, 1800 mg L⁻¹), water control (without the addition of any substance) (n= 8 each group). GEO: 50 mg L⁻¹, ethanol (450 mg L⁻¹) and water control groups (n= 6 each group), in triplicate.

The parasite count was performed with a stereomicroscope (10x total magnification) before and after baths, and afterwards each 24 h through seven days. Between the baths and after the treatment protocol, fish were maintained in 10 L aquaria. The anthelmintic efficacy (AE) was calculated by the following equation (JI et al. 2012):

$$AE = [C - T] \times 100\% / C$$

Where:

C: average number of surviving parasites in ethanol and water

T: average number of surviving parasites in the treated group

Assays against *Ichthyophthirius multifiliis****In vitro***

The methodology was adapted from Zheng et al. (2015): the assay was carried out using 24 well polystyrene plates. In each well 1 mL of water, the concentration of EO to be tested and 4-6 tomites collected with a pipette from the aquarium water with a highly parasitized fish. The EOs were diluted in ethanol (1:10) and afterwards in distilled water (1:100). The concentrations tested were (in triplicate): 50, 80, 100, 200, 300 and 500 mg L⁻¹ for MEO and 10, 25, 50 and 100 mg L⁻¹ for GEO. An ethanol control containing the highest ethanol concentration used in assay and a water control (without the addition of any substance) were also performed.

The tomites were observed with a stereomicroscope (10x total magnification) aiming to detect alterations in their morphological characteristics. The parasites were considered dead when no internal motility, abnormal cell division or no production of theronts were observed within 26 h. After this period, the tomites were observed daily for seven days. The assay was performed at 22 ± 1° C.

In vivo

Silver catfish parasitized with *I. multifiliis* were exposed to 15 mg L⁻¹ GEO, a negative control (0.0 mg L⁻¹ GEO) and a positive control (sodium chloride 4 g L⁻¹) in triplicate (n = 8 each replicate) in 40 L aquaria (22 ± 2 °C). Water of the aquaria was 50% replaced every 24 h for 5 days and GEO and NaCl concentrations were proportionally adjusted. After this period, 50 % of the water was daily changed, but without replacing GEO until the end of the experiments, when all the fish of the negative control died. Fish were fed once a day after the water change. The count of white spots (trophonts) was performed daily using a stereomicroscope (10 X). The

results were expressed according to Bush et al. (1997) by the infestation intensity (number of white spots in each juvenile body divided by the number of infected fish in each aquarium) and prevalence (numbers of infected fish / total number of fish \times 100). The initial intensity of infestation was 14.3 ± 7.7 , while the prevalence detected was 100%.

Statistical analysis

The results of *in vitro* evaluation against *G. lilianae* and *I. multifiliis* were submitted to Probit analysis for the calculation of the EC₅₀ (median effective concentration), EC₉₀ (90% effective concentration) and EC₉₉ (99% effective concentration) of the EOs at 95% confidence level (Finney 1971).

Data from the count of *G. lilianae* in the *in vivo* test were not homocedastic according to Levene's tests, so analysis was performed by Kruskal-Wallis followed by the multiple comparisons of mean ranks for all groups ($P < 0.05$). Data from the intensity and infestation prevalence from the *in vivo* experiment against *I. multifiliis* were also not homocedastic and therefore the Scheirer-Ray-Hare extension of Kruskal-Wallis test, followed by Nemenyi post hoc test were applied ($P < 0.05$). The fish survival analysis was done by Kaplan Meier with Log Rank test ($P < 0.001$) and multiple comparison tests (Holm-Sidak method) ($P < 0.05$).

Results and Discussion

The EOs of the present study are composed of terpenoid derivatives. In MEO occurred the predominance of monoterpenoids (53.91%) while in GEO sesquiterpenoids predominated (57.19%) (Table 1). MEO showed yield of 0.26% and density of 0.912 g mL^{-1} and its major constituents were identified as α -pinene (25.50%), β -pinene (15.45%), globulol (10.50%), limonene (8.21%), β -bisabolene (6.10%) and allo-aromandendrene (4.70%). These results are in agreement with those found by Amaral et al. (2015), which described the prevalence of monoterpenoids, including the α -pinene, β -pinene and limonene in MEO, diverging from the study of Torres et al. (2014), which reported sesquiterpenoids as major components for this EO. These results reinforce the need to determine the chemical composition of EOs used in pharmacological activity assays. The chemical composition of an EO is subject to the influence of several factors, among them: environmental (geography, seasonality and growing conditions), intrinsic (genetic, circadian cycle and part of the plant) and the selected extraction method (solvent, temperature and time) (Gobbo-Neto and Lopes 2007; Figueiredo et al. 2008; Barra 2009).

In GEO extraction, the obtained yield was 0.71% and the density 0.9321 g mL^{-1} . This EO presented as major components dehydrofukinone (17.08%), bicyclogermacrene (11.47%), α -pinene (4.98%), β -E-ocimene (4.56%), valencene (4.44%) and kaurene (4.25%) (Table 1). Similar data were described by Silva (2013), and dehydrofukinone was already isolated from GEO by Garlet et al. (2015), which described the activities of GEO major compound on cortisol and its depressant action on central nervous system in silver catfish.

The EOs demonstrated antiparasitic activity against *G. lilianae* dependent on exposure time and concentration in the *in vitro* experiments (Table 2). MEO showed EC₉₀ of 111.8 (89.9 - 210.0) mg L^{-1} and GEO 69.6 (18.5 - 261.9) mg L^{-1} for the period of 1 h. These data show that GEO is more effective *in vitro* than MEO. The treatment protocol using baths showed anthelmintic efficacy of 90.7% for MEO and 95.6% for GEO after

the first bath. However, after the second bath, an anthelmintic efficacy of 100% was achieved for both protocols with EOs (Figure 1 a and b). In both protocols, significant lower number of parasites in each fish after the first and second baths were observed when compared to controls ($P < 0.05$). The diluent of the EOs (ethanol) did not have activity against *G. lilianae* in the proposed protocol ($P > 0.05$). As the initial number of *G. lilianae* in each juvenile was different at the beginning of the experimental protocols with MEO and GEO, it is not possible to compare the results obtained for both EOs. Juvenile mortality was not observed for the group treated with MEO, but in the group treated with GEO there was 8.33% mortality after the second bath. The main constituent of GEO, dehydrofukinone, did not induce side effects in silver catfish exposed to 2.5 to 20 mg L⁻¹ for 24 h (Garlet et al. 2015). It is unlikely that this substance is responsible for the observed mortality, since the juveniles were exposed for a shorter period of time and at a dehydrofukinone concentration of 8.54 mg L⁻¹ (estimated from GEO chemical composition, see Table 1) in each bath.

Due to the complex chemical composition of the EOs often toxic or pharmacologic properties result of synergism and/or additive effects of the various constituents. Moreover, the diversity of EOs constituents allows that multiple mechanisms of action may be involved in antiparasitic activity, and so hindering the resistance of parasites to these extractives. This is an important advantage of the use of complex mixtures of components in relation to the isolated constituents for different biological activities (Sereno et al. 2007; Bakkali et al. 2008; Biavatti 2009; Gómez-Rincón et al. 2014; Langeveld et al. 2014; Reverter et al. 2014).

The EO of *Melaleuca alternifolia* Cheel, 1924 solubilized in Tween 80 reduced the number of *Gyrodactylus* spp. in naturally infected fish (*Gasterosteus aculeatus*) when used at 3 and 30 mg L⁻¹ for 19 h (Steverding et al. 2005). A commercial product based on EO of *Melaleuca cajuputi* Powell, 1809 containing eucalyptol and limonene as major constituents, showed 65.2% efficacy against *Gyrodactylus turnbulli* Harris, 1986, in *Poecilia reticulata*, after a seven days bath at 132 µL L⁻¹. Another commercial product obtained from the EO of *Pimenta racemosa* (Mill.) Moore, 1933, which presented eugenol and β-myrcene as major components, demonstrated efficacy of 32% in the same treatment protocol (Schelkle et al. 2015).

Among the constituents reported by Schelkle et al. (2015), only eugenol was not found in the EOs of the present study, but the other constituents (eucalyptol, limonene and β-myrcene) are in low concentrations in GEO and may contribute to its anthelmintic efficacy. On the other hand, one of MEO major constituents is limonene (8.21%), and plant extracts in which this compound was described as the major compound showed anthelmintic activity (Abdelqader et al. 2012, Gainza et al. 2015). The antiprotozoal activity of limonene against *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 by acting on the fluidity of the plasma membrane of the parasite was also described (Camargos et al. 2014). Limonene may interact with eucalyptol in the antimicrobial activity resulting in antagonistic, additive or synergistic interactions effects depending on the concentration and type of enantiomer found in the EO (Vuuren and Viljoen 2007). In addition, eucalyptol can interact with octapamine receptors (Khanikor et al. 2013), which were described for gyrodactylids, compounds that act on them have the potential to cause neuromuscular disorders that can result in death of the parasite (Brooker et al. 2011).

The inhibition of maturation of *I. multifiliis* tomonts to produce theronts was evaluated, and the EC₉₀ was calculated only within 26 h (Table 3). After this period, the results did not change and the theronts development in the negative control occurred within 22 h. EC₉₀ for MEO was 172.4 (127.0-365.2) mg L⁻¹ and for GEO 24.1 (20.6-30.0) mg L⁻¹, results that may be considered relevant, since tomonts are characterized by showing increased resistance to pharmacological available treatments (Buchmann et al. 2003; Yi et al. 2012;

Ling et al. 2013; Zhang et al. 2013). There was no release of theronts (infestative forms), which are generally more susceptible to the antiparasitics of both plant origin (Ling et al. 2012; Yi et al. 2012) and synthetic ones (Buchmann et al. 2003; Rowland et al. 2009).

α -pinene is MEO major constituent and is among the main compounds of GEO. Essential oils having α -pinene as main constituent had *in vitro* antiprotozoan activity already reported (Boyom et al. 2011; Essid et al. 2015; Mahmoudvand et al. 2015). The α -pinene in the isolated form had anti-Leishmania activity with EC_{50} of 19.7 mg L^{-1} after 72 h exposure, as well as low cytotoxicity (cytotoxic concentration 50% 614.1 mg L^{-1}) to human macrophages and erythrocytes (Rodrigues et al. 2015). In the present study, the EC_{50} of MEO against *I. multifiliis* was 79.2 mg L^{-1} . The α -pinene is also present in the GEO in lower concentration (4.98%) which showed EC_{50} of 69.6 mg L^{-1} , so α -pinene probably contributes to the antiprotozoal activity of both EOs evaluated in this study. The antiparasitic activity described for α -pinene could be related to its inhibitory action on acetylcholinesterase (AChE) (IC_{50} 0.062 mg mL^{-1}). Similarly, β -pinene, present in MEO (15.45%) and GEO (3.84%), also acts on this enzyme, with IC_{50} of 0.190 mg mL^{-1} (Seo et al. 2015). Other minor monoterpenoids of the EOs evaluated in the present study (eucalyptol and myrtenal) also act by inhibiting AChE (Kaufmann et al. 2011). Considering that AChE activity in the nervous system of *Gyrodactylus derjavini* Mikailov, 1975 was previously described (Buchman 1998), the eventual action of these terpenoids on the nervous system of *G. lilianae* could explain the anthelmintic efficacy detected in this study.

GEO showed lower effective concentrations (EC_{99} 51.3 mg L^{-1}) in the *in vitro* experiment against *I. multifiliis* compared to MEO (EC_{99} of 325.3 mg L^{-1}). Thus, a treatment protocol to treat ichthyophthiriasis in silver catfish was proposed only for this OE, which was more effective. GEO *in vivo* experiment showed the ability to increase the survival of the treated group with 15 mg L^{-1} from the 13th day, when compared to the negative control group ($P < 0.05$). However, when the treated group was compared with the positive control, significant difference was observed only from the 17th day, remaining until the end of the experiment ($P < 0.05$). The experiment ended when all fish of the negative control group died (Figure 2a). The increasing survival of fish with ichthyophthiriasis has been reported in treatments with *Melaleuca alternifolia* EO, given as daily baths lasting 2 h (for five days) at $50 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$. However, in the chemical composition of this EO monoterpenoids predominated, being terpinen-4-ol (44%) and γ -terpinene (22%) the major ones (Valladão et al. 2016). Of these components, only the terpinen-4-ol is present in GEO as one of the minor constituents (0.1%), and therefore other components may be influencing the observed results. Other plant extracts already demonstrate the ability to increase the survival of fish infected with Ich (Ekanem et al. 2004b; Ling et al. 2012).

GEO presented *in vivo* activity against *I. multifiliis* detected by observing the decrease of infestation intensity between days 6 and 9 and after the 21th day, remaining until the end of the experiment compared with the negative control group (Figure 2b). This decrease may be due to the direct activity of GEO on tomonts, inhibiting the release of theronts (infestative form). Consequently, a reduction of the number of trophonts *in vivo* would occur (Ling et al. 2013), provoking the significant reduction of the infestation prevalence on the ninth day of experiment ($P < 0.05$) (Figure 2c). GEO concentration was kept constant in the first five days of the *in vivo* experiment, and afterwards it decreased 50% per day. Precisely at the beginning of the period of concentration decrease, the effect of GEO on the prevalence and infestation intensity could be observed.

The analysis of the survival, intensity and infestation prevalence data indicate that complete elimination of *I. multifiliis* did not occur, but GEO had the ability to increase the survival of silver catfish juveniles with

ichthyophthiriasis. Therefore, there is the need of further studies in order to evaluate whether these data correspond to an antiprotozoal activity *in vivo* or if other mechanisms could be related to the observed results, such as a GEO action on the immune system of silver catfish. Many plant extracts that exhibit antimicrobial activity *in vivo* act mainly on fish immune system and not directly on the pathogen (Vasecharan and Thaya 2014; Newaj-Fyzul and Austin, 2015). In addition, other management strategies could be coupled to pharmacological treatment with GEO, aiming to control ichthyophthiriasis (for example, temperature rise of the water in culture tanks).

Dehydrofukinone, GEO major constituent, presents activity on GABA_A (gamma-aminobutyric acid type A) receptors (Garlet et al. 2015). These receptors, although not described in *G. lilianae* and *I. multifiliis*, were described in other helminths (Mendonça-Silva et al. 2004) and protozoa (Ramoino et al. 2004; 2010; Wu and Janetopoulos 2013). The action on GABA is one of the action mechanisms of ivermectin, a macrocyclic lactone (Brown et al. 2012; Hernando and Bouzat 2014) which displays antiparasitic activity against monogeneans at concentrations above 10 mg L⁻¹ (Reimschuessel et al. 2011). Piperazine, when added to the fish diet (40 mg kg⁻¹), is a example of antiprotozoal which has the capacity to reduce the number of trophonts by acting on the GABA receptors (Tojo and Santamarina 2001; Hondebrink et al. 2015).

Bicyclogermacrene, GEO second major constituent (11.47%), was also detected in the EO of *Annona vepretorum* Mart., in this case as the major component (39%). This EO showed antiprotozoal activity with an EC₅₀ of 20 mg L⁻¹ against *Trypanosoma cruzi* (Meira et al. 2015). Nevertheless, GEO showed EC₅₀ of 9.6 mg L⁻¹ for *I. multifiliis*, and so suggesting a possible antiprotozoal activity resulting also from the presence of bicyclogermacrene.

Results of biological tests performed with EOs of other *Nectandra* species may also provide information about the possible active substances of the oils under study. The EO of *Nectandra leucantha* Ness & Mart., 1833 showed *in vitro* cytotoxic activity (IC₅₀ above 33 ± 1 g L⁻¹) against human tumor cell lines. This EO presented as major constituents bicyclogermacrene (28.44%), germacrene A (7.34%), spathulenol (5.82%), globulol (5.25%), α-pinene (6.59%) and β-pinene (4.57%). In the same study, bicyclogermacrene in the isolated form showed IC₅₀ of 3.1 ± 0.2 μg L⁻¹ for the various tested cell lines (Grecco et al. 2015) and has also presented antiprotozoal activity (Capello et al. 2015). All of these are constituents of GEO, and only bicyclogermacrene and germacrene A and are not present in MEO. Other components of the EOs evaluated in this work, as β-elemene, germacrene D, β-caryophyllene and eucalyptol, when isolated from other plants, also showed antiprotozoal activity (Soares et al. 2013; Capello et al. 2015; Essid et al. 2015).

The GEO presented antiparasitic activity in lower concentrations than MEO, and an analysis of their chemical composition evidenced that there is a higher concentration of sesquiterpenoids in GEO. Several studies report that EOs with this class of major constituents have better antiparasitic activity when compared to EOs with a higher proportion of monoterpenoids. Overall, evaluations of antiparasitic activity result of parasitism evaluations (reduction of parasites number, intensity and infestation prevalence) or even the death of the parasite (Moura-do-Carmo et al. 2012; Dias et al. 2013; Soares et al. 2013; Capello et al. 2015; Grecco et al. 2015). However, although higher concentrations of MEO are necessary for antiparasitic activity, this oil was safer for fish.

The results obtained in the *in vitro* and *in vivo* tests with MEO and GEO against *G. lilianae* showed a good correlation, once the effective concentrations found by *in vitro* tests are effective also *in vivo*. *Gyrodactylus*

liliana is an ectoparasite (Boeger et al. 2016) and consequently the antiparasitic activity of the EOs is not subjected to pharmacokinetic factors related to the host (absorption, distribution, metabolism and excretion). However, these factors play a role in the *in vivo* test with GEO against *I. multifiliis*, since the trophonts are housed in the host epidermis and the constituents of the EOs absorbed may have a direct effect on the parasite (Matthews 2005; Cassidy-Hanley et al. 2011; Coyne et al. 2011).

The EOs studied in this work could also be acting directly on the tegument of the parasites. Plant extracts and their isolated constituents have shown this mechanism of action for the antiparasitic activity against monogeneans and *I. multifiliis* (Ling et al. 2012; Ji et al. 2012; Zhang et al. 2013; Fu et al. 2014). Essential oils have the ability to destroy the tegument of parasites through depolarization and vacuolization of the plasma membrane, and may also cause cytoplasmic and nuclear changes (Bakkali et al. 2008; Oliveira et al. 2012; Camargos et al. 2014; Raut and Karuppayil, 2014).

The EOs of the Lauraceae species evaluated in this study presented 100% anthelmintic efficacy against *G. liliana* *in vivo*. Both EOs showed *in vitro* activity against *I. multifiliis*, and the GEO demonstrated ability to increase survival of fish with ichthyophthiriasis. The observed effects are probably due to the interaction of various components through additive and/or synergistic action. These results are of great importance for the development of new commercial products for organic and conventional fish farming. Furthermore, they can contribute to the development of other antiparasitic of importance to veterinary medicine, which are more effective and safer for the environment, animals and man.

Ethical approval

This work is part of the Project entitled "The use of medicinal plants as basis for anesthetics and antioxidants for fish and shrimp and antibacterial and antiparasitic for fish", which was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Santa Maria (nr. 46/2010). All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abdelqader A, Qarallah B, Al-Ramamneh D, Das G (2012) Anthelmintic effects of citrus peels ethanolic extracts against *Ascaridia galli*. *Vet Parasitol* 188:78-84. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.003
- Abd El-Galil MAA, Aboelhadid SM (2012) Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Vet Parasitol* 185:57-63. DOI:10.1016/j.vetpar.2011.10.035
- Adams RP (2009) Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois

- Amaral LP, Tondolo JSM, Schindler B, Silva DT, Pinheiro CG, Longhi SJ, Mallmann CA, Heinzmann, BM000000000 (2015) Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Braz Arch Biol Technol 58:12-21. DOI:10.1590/S1516-8913201502462
- Baldisserotto B (2009) Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. Cienc Rural 39:291-299. DOI: 10.1590/S0103-84782008005000046
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils - a review. Food Chem Toxicol 46:446-75. DOI:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Bakke TA, Cable J, Harris PD (2007) The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian-doll killers”. Adv Parasitol 64:161-376. DOI: 10.1016/S0065-308X(06)64003-7
- Bakke TA, Harris PD, Cable J (2002) Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. Int J Parasitol 32:281–308. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00331-9
- Barra A (2009) Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. Nat Prod Commun 4:1147-1154.
- Biavatti MB (2009) Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. Braz J Pharm Sci 45: 371:378. DOI: 10.1590/S1984-82502009000300002
- Boeger WA, Kritsky DC, Pie MR (2003) Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogenoidea). Zool Scr 32:437-448. DOI: 10.1046/j.1463-6409.2003.00130.x
- Boeger WA, Razzolini E, Murari AL, Baldisserotto B (2016) Neotropical Monogenoidea xx: *Gyrodactylus liliane* n. sp. (Polyonchoinea, Gyrodactylidae) from *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from Southern Brazil: a potential nuisance for aquaculture. Zoologia
- Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP, Arthur JRb, Ogawa K, Chinabut S, Adlard R, Tan Z (2005) Disease and health management in Asian aquaculture. Vet Parasitol 132:249-272. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.07.005
- Boyom FF, Ngouana V, Kemgne EAM, Zollo PHA, Menut C, Bessiere JM, Gut J, Rosenthal PJ (2011) Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engler & Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. Parasitol Res 108:1211-1217. DOI 10.1007/s00436-010-2165-7
- Brooker AJ, Maldonado, MIG, Irving S, Bron GE, Longshaw M, Shinn AP (2011) The effect of octopaminergic compounds on the behaviour and transmission of *Gyrodactylus*. Parasit Vectors 4:207-217. DOI: 10.1186/1756-3305-4-207
- Brown DDR, Siddiqui SZ, Kaji MD, Forrester SG (2012) Pharmacological characterization of the *Haemonchus contortus* GABA-gated chloride channel, Hco-UNC-49: Modulation by macrocyclic lactone anthelmintics and a receptor for piperazine. Vet Parasitol 185:201-209. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.10.006
- Brasil. Instrução Normativa Interministerial nº. 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. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 jun. 2011. Seção 1, p. 04-09.
- British Pharmacopoeia (Ed.) (2016) British Pharmacopoeia. The Stationery Office, London.
- Buchmann K (1998) Histochemical characteristics of *Gyrodactylus derjavini* parasitizing the fins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Folia Parasitol (Praha) 45:312-318

- Buchmann K, Jensen PB, Kruse KD (2003) Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *in vitro* experiments. North Am J Aquacult 65:21–24. DOI: 10.1577/1548-8454(2003)065<0021:EOSPAG>2.0.CO;2
- Buchmann K, Bresciani J, Jappe C (2004) Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. J Fish Dis 27:99-104. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2003.00519.x
- Cabello FC (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol 8:1137-1144. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- Cable J, Harris PD (2002) Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. Int J Parasitol 32:255–280. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00330-7
- Camargos HS, Moreira RA, Mendanha SA, Fernandes KS, Dorta ML, Alonso A (2014) Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC₅₀ values. PLoS ONE 9(8):e104429. DOI:10.1371/journal.pone.0104429
- Capello TM, Martins EGA, de Farias CF, Figueiredo CR, Matsuo AL, Passero LFD, Oliveira-Silva D, Sartorelli P, Lago JHG (2015) Chemical composition and *in vitro* cytotoxic and antileishmanial activities of extract and essential oil from leaves of *Piper cernuum*. Nat Prod Commun 10:285-288.
- Cassidy-Hanley DM, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH, Devine C, Hossain MM, Dickerson HW, Clark TG (2011) Transcriptional profiling of stage specific gene expression in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. Mol Biochem Parasit 178:29-39. DOI:10.1016/j.molbiopara.2011.04.004
- Chakraborty SB, Hancz C (2011) Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. Rev Aquaculture 3:103-119. DOI: 10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x
- Collins CM, Mo TA, Buchmann K, Cunningham CO (2002) Diagnosis of *Gyrodactylus* (MONOGENEA; PLATYHELMINTHES) infecting salmonid fish in northern Europe. [https://www.researchgate.net/profile/Tor_Mo/publication/267250277_DIAGNOSIS_OF_GYRODACTYLUS_\(MONOGENEA_PLATYHELMINTHES\)_INFECTING_SALMONID_FISH_IN_NORTHERN_EUROPE/links/5\(48566730cf2437065c9cfcdf.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Tor_Mo/publication/267250277_DIAGNOSIS_OF_GYRODACTYLUS_(MONOGENEA_PLATYHELMINTHES)_INFECTING_SALMONID_FISH_IN_NORTHERN_EUROPE/links/5(48566730cf2437065c9cfcdf.pdf). Accessed 2 december 2015.
- Colt J (2002) List of spreadsheets prepared as a complement to the book fish hatchery management. In: Wedemeyer GA (Ed.). American Fisheries Society Publications: Bethesda
- Coyne RS, Hannick L, Shanmugam D et al. (2011) Comparative genomics of the pathogenic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*, its free-living relatives and a host species provide insights into adoption of a parasitic lifestyle and prospects for disease control. Genome Biol 12:1-26. DOI: 10.1186/gb-2011-12-10-r100
- Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Springfield
- Ekanem AP, Wang M, Simon JE, Obiekezie AI, Morah F (2004a) *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*). Phytother Res 18:793–797. DOI: 10.1002/ptr.1550
- Ekanem AP, Obiekezie A, Kloas W, Knopf K (2004b) Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol Res 92:361-366. DOI: 10.1007/s00436-003-1038-8

Elsayed EE, Dien NEE, Mahmoud A (2006) Ichthyophthiriasis: various fish susceptibility or presence of more than one strain of the parasite? *Nature and Science* 4:5-13.

Essid R, Rahali FZ, Msaada K, Sghair I, Hammami M, Bouratbine A, Aoun K, Limam F (2015) Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in northern Tunisia. *Ind Crop Prod* 77:795–802. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.09.049

Dargent F, Torres-Dowdall J, Scott ME, Ramnarine I, Fussmann GF (2013) Can mixed-species groups reduce individual parasite load? A field test with two closely related poeciliid fishes (*Poecilia reticulata* and *Poecilia picta*). *PLoS ONE* 8:e56789. DOI: 10.1371/journal.pone.0056789.

Diana JS, Egna HS, Chopin T, Peterson MS, Cao L, Pomeroy R, Verdegem M, Slack WT, Bondad-Reantaso MG, Cabello F (2013) Responsible aquaculture in 2050: Valuing local conditions and human innovations will be key to success. *BioScience* 63:255-262. DOI: 10.1525/bio.2013.63.4.5

Dias CN, Rodrigues KA, Carvalho FA, Carneiro SM, Maia JG, Andrade EH, Moraes DF (2013) Molluscicidal and leishmanicidal activity of the leaf essential oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. *Chem Biodivers* 10:1133-1141. doi: 10.1002/cbdv.201200292.

Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr J* 23:213-226. DOI: 10.1002/ffj.1875

Finney DJ (1971) *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Forwood JM, Harris JO, Landos M, Deveney MR (2015) Life cycle and settlement of an Australian isolate of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 from rainbow trout. *Folia Parasitol (Praha)* 62:1-5. DOI: 10.14411/fp.2015.013.

Fu W-U, Zhang Q-Z, Xu D-H, Liang, J-H, Wang B (2014) Antiparasitic effect of cynaratoside-C from *Cynanchum atratum* against *Ichthyophthirius multifiliis* on grass carp. *J Agric Food Chem* 62:7183-7189. DOI: 10.1021/jf5018675

Gáinza YA, Domingues LF, Pereza OP, Rabelo MD, López ER, Chagas ACS (2015) Anthelmintic activity *in vitro* of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Ind Crop Prod* 76:647–652. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.07.056

Garcia LO, Becker AG, Copatti CE, Baldisserotto B, Radünz Neto J (2007) Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *J World Aquacult Soc* 38:1-11. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2006.00068.x

García-Vásquez A, Hansen H, Shinn AP (2007) A revised description of *Gyrodactylus cichlidarum* Paperna, 1968 (Gyrodactylidae) from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus niloticus* (Cichlidae), and its synonymy with *G. niloticus* Cone, Arthur et Bondad-Reantaso, 1995. *Folia Parasitol (Praha)* 54:129–140. DOI: 10.14411/fp.2007.018

Garlet QI, Pires LC, Silva DT, Spall S, Gressler LT, Bürger ME, Baldisserotto B, Heinzmann BM (2015) Effect of (+)-dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. *Braz J Med Biol Res* 49:1-9. DOI: 10.1590/1414-431X20154872.

Grecco SS, Martins EGA, Girola N, de Figueiredo CR, Matsuo AL, Soares MG, Bertoldo BC, Sartorellie P, Lago JHC (2015) Chemical composition and *in vitro* cytotoxic effects of the essential oil from *Nectandra leucantha* leaves. *Pharm Biol* 53:133-137. DOI: 10.3109/13880209.2014.912238

- Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30:374-381. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200026
- Gómez-Rincón C, Langa E, Murillo P, Valero MS, Berzosa C, López V (2014) Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil against L3 larvae of *Anisakis simplex*. *Biomed Res Int* 2014:1-6. DOI: 10.1155/2014/549510
- Harris PD, Shinn AP, Cable J, Bakke TA (2004) Nominal species of the genus *Gyrodactylus* von Nordmann 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae), with a list of principal host species. *Syst Parasitol* 59:1-27. DOI: 10.1023/B:SYPA.0000038447.52015.e4
- Hashimoto GSO, Neto FM, Ruiz ML, Acchile M, Chagas EC, Chaves FCM, Martins ML (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.
- Hernando G, Bouzat C (2014) *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction: GABA receptors and ivermectin action. *PLoS ONE* 9(4): e95072. DOI:10.1371/journal.pone.0095072
- Hondebrink L, Hermans EJP, Schmeink S, van Kleef RGDM, Meulenbelt J, Westerink RHS (2015) Structure-dependent inhibition of the human $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A receptor by piperazine derivatives: A novel mode of action. *NeuroToxicology* 51:1-9. DOI: 10.1016/j.neuro.2015.09.002
- 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. DOI:10.1007/s00436-011-2805-6
- Kaufmann D, Dogra AK, Wink M (2011) Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. *J Pharm Pharmacol* 63:1368-1371. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2011.01344.x.
- Khalil WKB, Abdel-Gawad FK, Belattar N, Senator M, Abdel-Wahhab MA (2011) Protective effects of *Nigella sativa* extract against chromiumvi-induced genotoxicity in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Global Veterinaria* 7:283-93.
- Khanikor B, Parida P, Yadav RNS, Bora D (2013) Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking studies. *J Appl Pharm Sc* 3:006-012. DOI: 10.7324/JAPS.2013.30202
- Langeveld WT, Veldhuizen EJ, Burt SA (2014) Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol* 40:76-94. DOI: 10.3109/1040841X.2013.763219
- Ling F, Wang JG, Lu C, Wang GX, Lui YH, Gong XN (2012) Effects of aqueous extract of *Capsicum frutescens* (Solanaceae) against the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitol Res* 111:841-848. DOI: 10.1007/s00436-012-2907-9.
- Ling F, Lu C, Tu X, Yi Y, Huang A, Zhang Q, Wan G (2013) Antiprotozoal screening of traditional medicinal plants: evaluation of crude extract of *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. *Parasitol Res* 112:2331-2340. DOI: 10.1007/s00436-013-3397-0
- Mahmoudvand H, Ezzatkhah F, Sharififar F, Sharifi I, Dezaki ES (2015) Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. *Korean J Parasitol* 53:21-27. DOI: 10.3347/kjp.2015.53.1.21.
- Martins ML, Shoemaker CA, Xu D, Klesiu PH (2011) Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. *Aquaculture* 314:18-23. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.01.022

- Matthews RA (2005) *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. *Adv Parasitol* 59:159-241. DOI: 10.1016/S0065-308X(05)59003-1
- Mendonça-Silva DA, Gardino PF, Kubrusly RCC, De Mello, FG (2004). Characterization of a GABAergic neurotransmission in adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 129:137-146. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182004005554>
- Meira CS, Guimarães ET, Macedo TS, da Silva TB, Menezes LRA, Costa EV, Soares MBP (2015) Chemical composition of essential oils from *Annona vepretorum* Mart. and *Annona squamosa* L. (Annonaceae) leaves and their antimalarial and trypanocidal activities. *J Essent Oil Res* 27:160-168 DOI: 10.1080/10412905.2014.982876
- Miron DS, Silva LVF, Golombieski JI, Baldisserotto B (2003) Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* contamination of silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *J Appl Aquacult* 14:155-161. DOI:10.1300/J028v14n01_12
- Moura do Carmo DF, Amaral AC, Machado GM, Leon LL, Silva JR (2012) Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of *Piper* species. *Molecules* 17:1819-1829. DOI: 10.3390/molecules17021819
- National Institute of Standards and Technology, NIST/ EPA/ NIH (2008) Mass spectral library Gaithersburg, USA
- Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405:1017-1024. DOI: 10.1038/35016500
- Newaj-Fyzul A, Austin B (2015) Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *J Fish Dis* 38:937-955. DOI: 10.1111/jfd.12313.
- Oidtmann B, Peeler E, Lyngstad T, Brun E, Bang Jensen B, Stärk KD (2013) Risk-based methods for fish and terrestrial animal disease surveillance. *Prev Vet Med* 112:13-26. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.07.008
- Oliveira RN, Rehder VL, Santos Oliveira AS, Júnior IOM, de Carvalho JE, de Ruiz AL, Jeraldo VL, Linhares AX, Allegretti SM (2012) *Schistosoma mansoni*: *in vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Exp Parasitol* 132:135-43. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.06.005
- Pettersen RA, Hytterød S, Vøllestad LA, Mo TA (2013) Osmoregulatory disturbances in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., caused by the monogenean *Gyrodactylus salaris*. *J Fish Dis* 36:67-70. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01441.x
- Picón-Camacho SM, Marcos-Lopez M, Bron JE, Shinn AP (2012) 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* 139:149-190. DOI: 10.1017/S0031182011001867
- Pio-Corrêa M (1984) Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro
- Poulin R (2002) The evolution of monogenean diversity. *Int J Parasitol* 32:245-254. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00329-0
- Prein M, Bergleiter S, Ballauf M, Brister D, Halwart M, Hongrat K, Kahle J, Lasner T, Lem A, Lev O Morrison C, Shehadeh Z, Stamer A, Wainberg AA (2012) Organic aquaculture: the future of expanding niche markets. FAO, Rome and NACA, Bangkok. (<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e04c.pdf>) Accessed 03 December 2015

- Quesada SP, Paschoal JA, Reyes FG (2013) Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones - a review. *J Food Sci* 78:1321-1333. DOI: 10.1111/1750-3841.12222
- Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K (2008) Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 102:867–873. DOI: 10.1007/s00436-007-0839-6
- Ramoino P, Milanese M, Candiani S, Diaspro A, Fato M, Usai C, Bonanno G (2010). Gamma-amino butyric acid (GABA) release in the ciliated protozoon *Paramecium* occurs by neuronal-like exocytosis. *J Exp Biol* 213:1251–1258. DOI: 10.1242/jeb.039594.
- Ramoino P, Scaglione S, Diaspro A, Beltrame F, Fato M, Usai C (2004). GABA_A receptor subunits identified in *Paramecium* by immunofluorescence confocal microscopy. *FEMS Microbiol Lett* 238:449-453. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09788.x
- Raut JS, Karuppayil SM (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod* 62:250-264. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.05.055.
- Reimschuessel R, Giesecker C, Poynton S (2011) *In vitro* effect of seven antiparasitics on *Acolpenteron ureteroecetes* (Dactylogyridae) from largemouth bass *Micropterus salmoides* (Centrarchidae). *Dis Aquat Organ* 94:59-72. DOI: 10.3354/dao02303
- Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433:50-61. DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.05.048
- Rodrigues KA, Amorim LV, Dias CN, Moraes DF, Carneiro SM, Carvalho FA (2015) *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. *J Ethnopharmacol* 160:32-40. DOI: 10.1016/j.jep.2014.11.024.
- Rowland SJ, Mifsud C, Nixon M, Read P, Landos M (2009) Use of formalin and copper to control ichthyophthiriosis in the Australian fresh water fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). *Aquacult Res* 40:44–54. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2008.02061.x
- Schelkle B, Shinn AP, Peeler E, Cable J (2009) Treatment of gyrodactylid infections in fish. *Dis Aquat Organ* 86:65–75. DOI: 10.3354/dao02087
- Schelkle B, Snellgrove D, Jones LL, Cable J (2015) Efficacy of commercially available products against *Gyrodactylus turnbulli* infections on guppies *Poecilia reticulata*. *Dis Aquat Organ* 115:129-137. DOI: 10.3354/dao02886
- Seo SM, Jung S, Kang J, Lee HR, Kim SW, Hyun J, Park IK (2015) Larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Apiaceae plant essential oils and their constituents against *Aedes albopictus* and formulation development. *J Agr Food Chem* 63:9977-9986. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03586
- Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaisi A (2007). Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 56:3-7. DOI: 10.1016/j.parint.2006.09.001
- Shinn AP, Picón-Camacho SM, Bron JE, Conway D, Yoon GH, Guo FC, Taylor NG (2012) The anti-protozoal activity of bronopol on the key life-stages of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora). *Vet Parasitol* 186:229-236. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.11.025

- Silva Filho AA, Costa ES, Cunha WR, Silva MLA, Nanayakkara NPD, Bastos JK (2008) *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother Res* 22:1307–1310. DOI: 10.1002/ptr.2486
- Silva DT (2013) Óleos essenciais de *N. grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: rendimento, composição química e atividades biológicas. Dissertation, Federal University of Santa Maria
- Silva DT, Silva LL, Amaral LP, Pinheiro CG, Pires MM, Schindler B, Garlet QI, Benovit SC, Baldisserotto B, Longhi SJ, Kotzian CB, Heinzmann BM (2014) Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. *J Econ Entomol* 10:1713-1720. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EC13361>
- Soares BV, Neves LR, Oliveira MSB, Chaves FCM, Dias MKR, Chagas EC, 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. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.10.029
- Soares DC, Portella NA, Ramos MF, Siani AC, Saraiva EM (2013) Trans- β -caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera* spp.). *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:1-13. DOI: 10.1155/2013/761323.
- Steverding D, Morgan E, Tkaczynski P, 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. DOI:10.3354/dao066029
- Tojo JLR, Santamarina MTF (2001) Attempts at oral pharmacological treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 24:249-252. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2001.00278.x
- Tondolo JSM, Amaral LP, Simões LN, Garlet QI, Schindler B, Oliveira TM, Silva BF, Gomes LC, Baldisserotto B, Mallmann CA, Heinzmann BM (2013) Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotrop Ichthyol* 11:667-674. DOI: 10.1590/S1679-62252013000300020
- Torres AM, Camargo FJ, Ricciardi GA, Ricciardi AIA, Dellacassa E (2014) *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* venom. *J Essent Oil Res* 26:325-326. DOI:10.1080/10412905.2014.882277
- Trailović SM, Marjanović DS, Nedeljković Trailović J, Robertson AP, Martin RJ (2015) Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitol Res* 114:3059–3068. DOI: 10.1007/s00436-015-4508-x
- Vuuren SF, Viljoen AM (2007) Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr J* 22:540–544. DOI: 10.1002/ffj.1843
- Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2015) Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *J Vet Pharmacol Ther* 38:417-428. DOI: 10.1111/jvp.12202
- Valladão GMR, Gallani SU, Ikefuti CV, da Cruz C, Levy-Pereira N, Rodrigues MVN, Pilarski F (2016) Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *J Fish Dis* 18. DOI: 10.1111/jfd.12447

- Vaseeharan B, Thaya R (2014) Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquacult Int* 22:1079-1091. DOI: 10.1007/s10499-013-9729-3.
- Verdouw H, Van Echteld CJA, Dekkers EMJ (1978) Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res* 12:399-402. DOI: 10.1016/0043-1354(78)90107-0
- Yi, YL, Lu C, Hu XG, Ling F, Wang GX (2012). Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res* 111:1771–1778. DOI: 10.1007/s00436-012-3022-7
- Wu Y, Janetopoulos C (2013) Systematic analysis of γ -aminobutyric acid (GABA) metabolism and function in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 288:15280-15290. DOI: 10.1074/jbc.M112.427047
- Zhang Q, Xu DH, Klesius PH (2013) Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Parasitol* 198:45-53. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.08.019
- Zheng W, Yan CM, Zhang YB, Li ZH, Li Z, Li XY, Wang ZW, Wang X, Chen WQ, Yu XH (2015) Antiparasitic efficacy of gracillin and zingiberensis newsaponin from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology* 142:473-479. DOI: 10.1017/S0031182014001358

Table 1 Chemical composition of the essential oils of *Nectandra megapotamica* (MEO) e *Nectandra grandiflora* (GEO) leaves

| Compound | RI calc | RI ref | MEO % | GEO % |
|--|---------|--------|-------|-------|
| α -pinene | 932 | 932 | 25.50 | 4.98 |
| camphene | 944 | 945 | - | 0.29 |
| β -pinene | 974 | 974 | 15.45 | 3.84 |
| β -myrcene | 990 | 990 | - | 0.30 |
| α -terpinene | 1013 | 1012 | - | 0.03 |
| limonene | 1025 | 1026 | 8.21 | 0.50 |
| eucalyptol | 1028 | 1028 | 1.01 | 0.33 |
| β -Z-ocimene | 1038 | 1037 | - | 0.84 |
| β -E-ocimene | 1039 | 1048 | - | 4.56 |
| α -terpinolene | 1086 | 1085 | - | 0.06 |
| β -linalool | 1100 | 1100 | - | 1.12 |
| Z-pinocarveol | 1138 | 1138 | 1.07 | 1.07 |
| E-p-mentha-2,8-dien-1-ol | 1136 | 1138 | 0.50 | - |
| pinocarvone | 1163 | 1163 | 0.57 | - |
| terpinen-4-ol | 1175 | 1175 | - | 0.10 |
| Z-3-hexenyl-1-butyrate | 1187 | 1186 | - | 0.50 |
| myrtenal | 1197 | 1194 | 1.60 | - |
| borneol acetate | 1285 | 1285 | - | 0.30 |
| δ -elemene | 1337 | 1338 | - | 0.27 |
| β -bourbonene | 1385 | 1388 | - | 0.20 |
| β -elemene | 1392 | 1392 | 1.10 | 1.27 |
| E- α -bergamotene | 1407 | 1415 | 0.53 | - |
| β -caryophyllene | 1419 | 1418 | 1.48 | 0.68 |
| Z- α -bergamotene | 1417 | 1427 | 0.45 | - |
| α -guaiene | 1442 | 1440 | - | 1.21 |
| aromadendrene | 1440 | 1441 | 0.80 | - |
| epi- β -santalene | 1449 | 1450 | 0.33 | - |
| α -caryophyllene | 1454 | 1454 | 1.91 | 0.36 |
| cedrene | 1458 | 1449 | 3.14 | - |
| allo-aromandendrene | 1462 | 1463 | 4.70 | - |
| dehydroaromadendrene | 1458 | 11468 | - | 0.19 |
| drima-7,9(11)-diene | 1471 | 1471 | - | 3.85 |
| α -amorphene | 1478 | 1475 | 1.10 | - |
| τ -muurolene | 1482 | 1480 | - | 1.03 |
| germacrene D | 1483 | 1483 | 0.58 | - |
| valencene | 1488 | 1488 | - | 4.44 |
| viridiflorene | 11496 | 1493 | 0.79 | - |
| β -guaiene | 1501 | 1499 | 0.35 | - |
| bicyclogermacrene | 1500 | 1500 | - | 11.47 |
| β -bisabolene | 1510 | 1508 | 6.10 | - |
| germacrene A | 1506 | 1509 | - | 0.93 |
| γ -cadinene | 1516 | 1514 | 0.46 | 0.11 |
| δ -cadinene | 1524 | 1523 | - | 0.10 |
| kessane | 1541 | 1539 | - | 1.65 |
| 2(1H)-Naphthalenone, 7-ethynyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro | 1546 | 1543 | - | 0.11 |
| elemol | 1550 | 1550 | - | 0.10 |
| nerolidol | 1565 | 1566 | 2.40 | - |

| | | | | |
|---------------------------------|------|------|--------------|--------------|
| Spathulenol | 1580 | 1578 | 0.22 | 2.15 |
| Globulol | 1586 | 1585 | 10.50 | 0.63 |
| Viridiflorol | 1593 | 1595 | 2.31 | 0.09 |
| τ -cadinol | 1640 | 1642 | 1.12 | 0.51 |
| δ -cadinol | 1644 | 1646 | 0.65 | - |
| α -cadinol | 1657 | 1657 | 1.33 | - |
| humulane-1,6- dien-3-ol | 1624 | 1619 | - | 0.30 |
| Eromoligenol | 1633 | 1631 | - | 0.85 |
| selin-11-en-4- α -ol | 1661 | 1660 | - | 2.85 |
| dehydrofukinone | 1816 | ** | - | 17.08 |
| Kaurene | 2044 | 2043 | - | 4.25 |
| Compounds identified | | | 96.72 | 74.44 |

RT: Retention time; RI calc: Calculated retention index; RI lit: Literature retention index; ** RI not reported

Table 2 *In vitro* antiparasitic activity of essential oils of *Nectandra megapotamica* (MEO) and *Nectandra grandiflora* (GEO) against *G. lilianae*. Probit Analysis ($P < 0.05$) (Finney, 1971).

| | MEO | | | GEO | | |
|----------------------|------------|------------|-----------|------------|------------|----------|
| | 1h | 2h | 3h | 1h | 2h | 3h |
| EC ₅₀ ±SE | 65.2±5.9 | 38.9±4.0 | 37.2±3.4 | 39.6±7.9 | 24.9±4.0 | 7.1±1.1 |
| EC ₉₀ ±SE | 111.8±17.2 | 70.8±3.9 | 64.0±2.6 | 69.6±21.8 | 54.7±12.1 | 19.3±2.0 |
| EC ₉₉ ±SE | 173.6±49.2 | 115.4±14.7 | 99.7±7.71 | 110.3±54.8 | 104.0±37.1 | 43.9±9.6 |
| Intercept | 4.73 | -2.84 | -3.54 | -3.36 | -0.22 | 2.50 |
| Slope | 0.01 | 4.93 | 5.44 | 5.23 | 3.74 | 2.93 |
| X ² | 4.11 | 0.23 | 0.14 | 43.4 | 10.1 | 0.04 |

EC₅₀: Effective concentration 50 % (mg L⁻¹), EC₉₀: Effective concentration 90 % (mg L⁻¹), EC₉₉: Effective concentration 99 % (mg L⁻¹), SE: Standard error

Table 3 *In vitro* antiparasitic activity of essential oils of *Nectandra megapotamica* (MEO) and *Nectandra grandiflora* (GEO) against *I. multifilis* in 26 hours. Probit Analysis (P <0.05) (Finney, 1971).

| | EC ₅₀ (mg L ⁻¹) ^a ±SE | EC ₉₀ (mg L ⁻¹) ^b ±SE | EC ₉₉ (mg L ⁻¹) ^c ±SE | Intercept | Slope | X ² |
|-----|---|---|---|-----------|-------|----------------|
| MEO | 79.2±8.9 | 172.4±33.0 | 325.3±110.0 | -2.20 | 3.79 | 10.48 |
| GEO | 9.6±0.9 | 24.1±2.3 | 51.3±9.2 | 1.87 | 3.19 | 0.14 |

^aEC₅₀: Effective concentration 50 % ^bEC₉₀: Effective concentration 90 % ^cEC₉₉: Effective concentration 99 %
SE: Standard error

Fig1 Average number of parasites of the species *Gyrodactylus lilianae* per fish in relation to each bath. A: Treatment protocol with 200 mg L⁻¹ essential oil of *N. megapotamica* (MEO); B: Treatment protocol with 50 mg L⁻¹ essential oil of *N. grandiflora* (GEO); (*) Indicates significant difference between controls and treatment with the essential oil after bathing protocol (Kruskal-Wallis test, P <0.05)

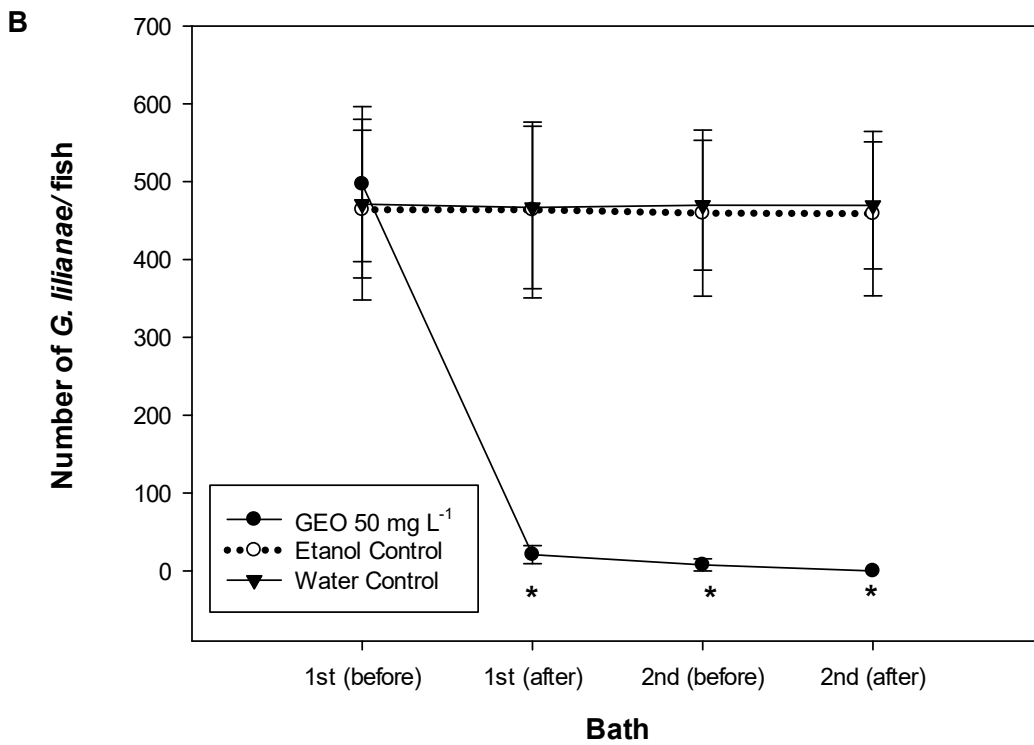
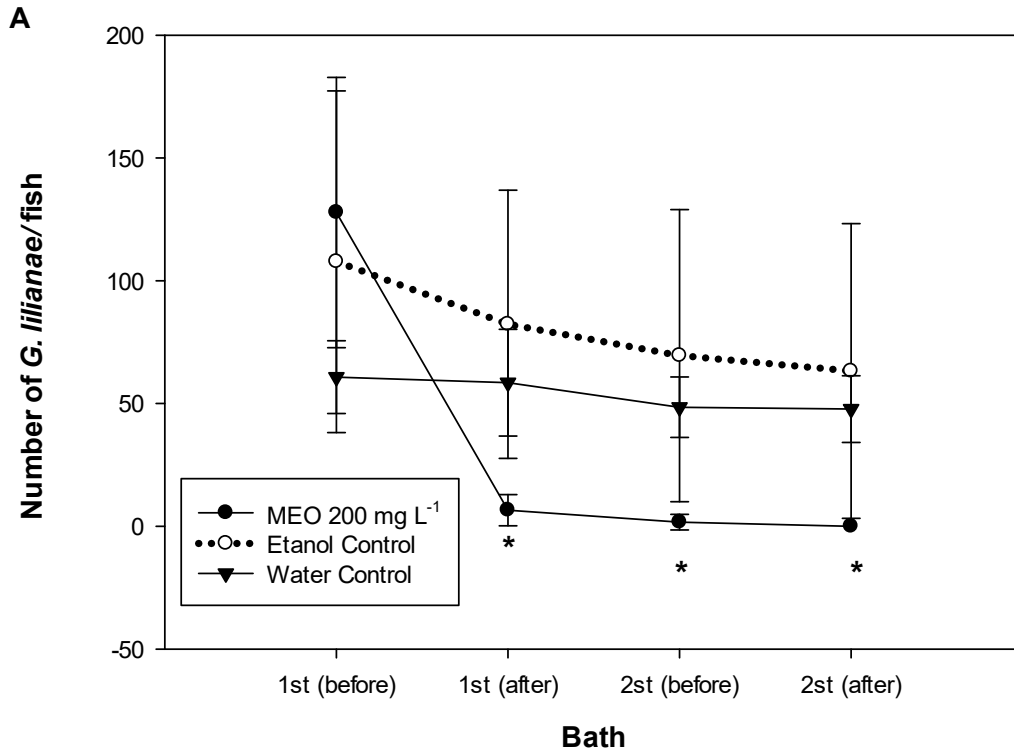
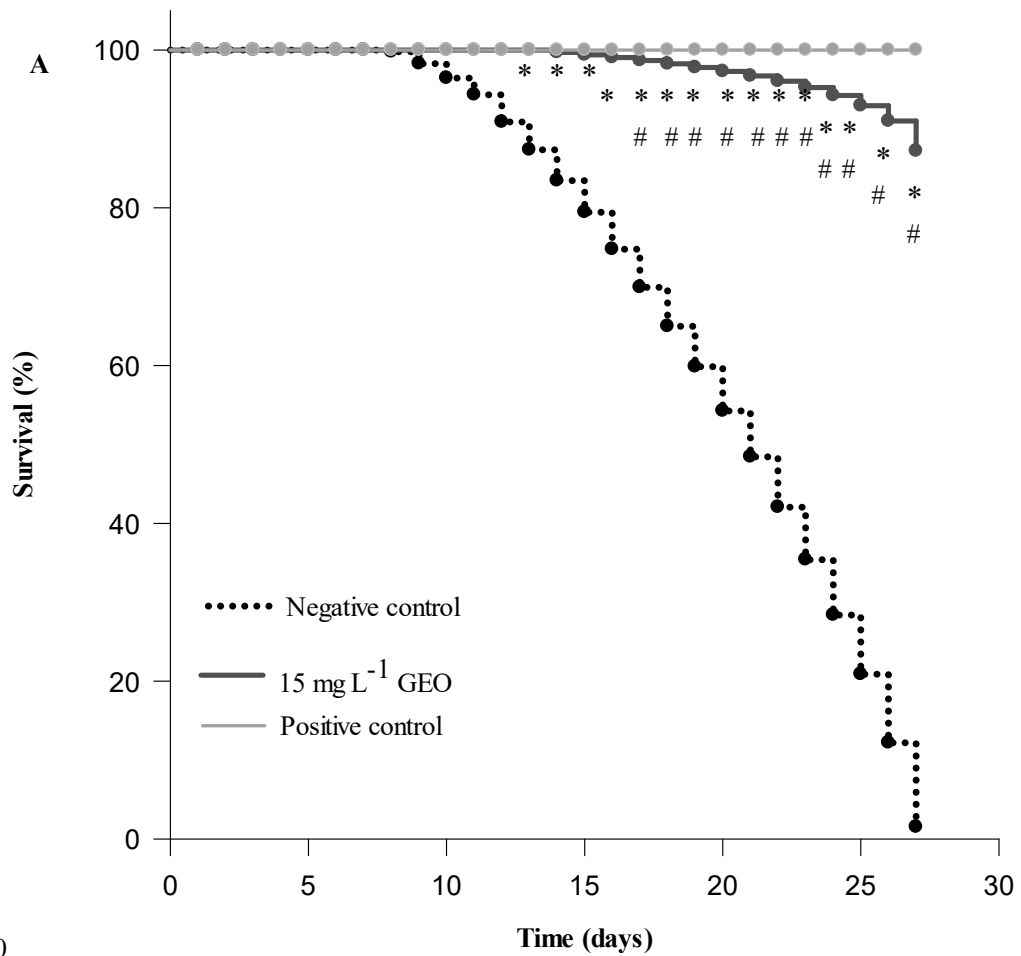
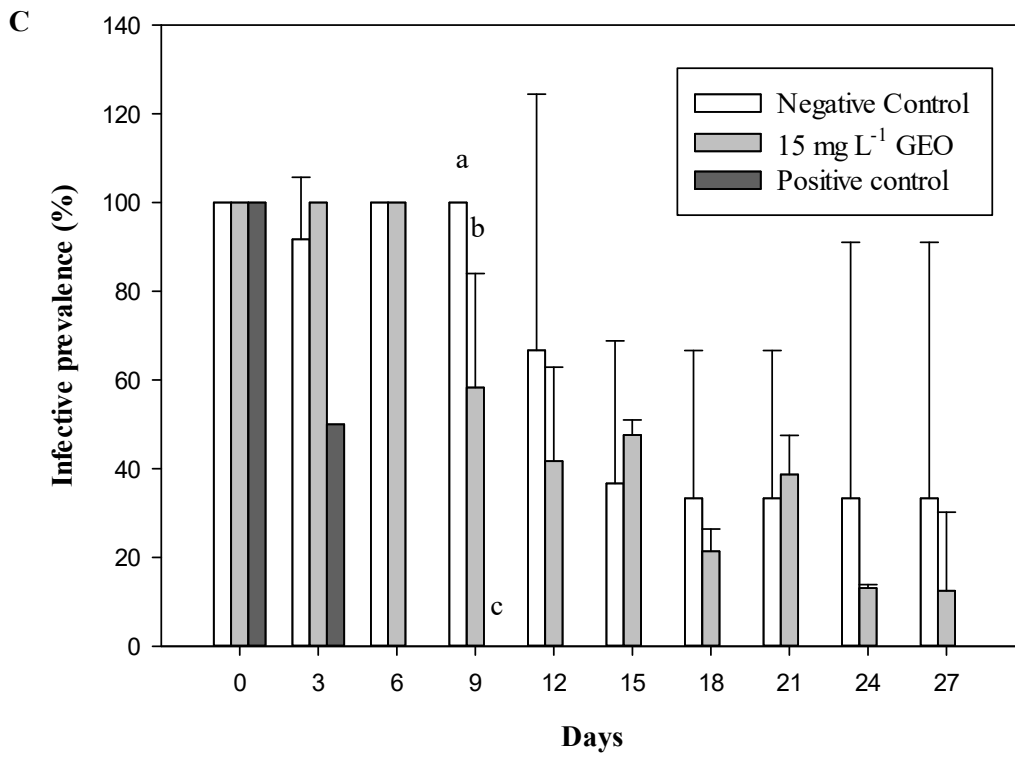
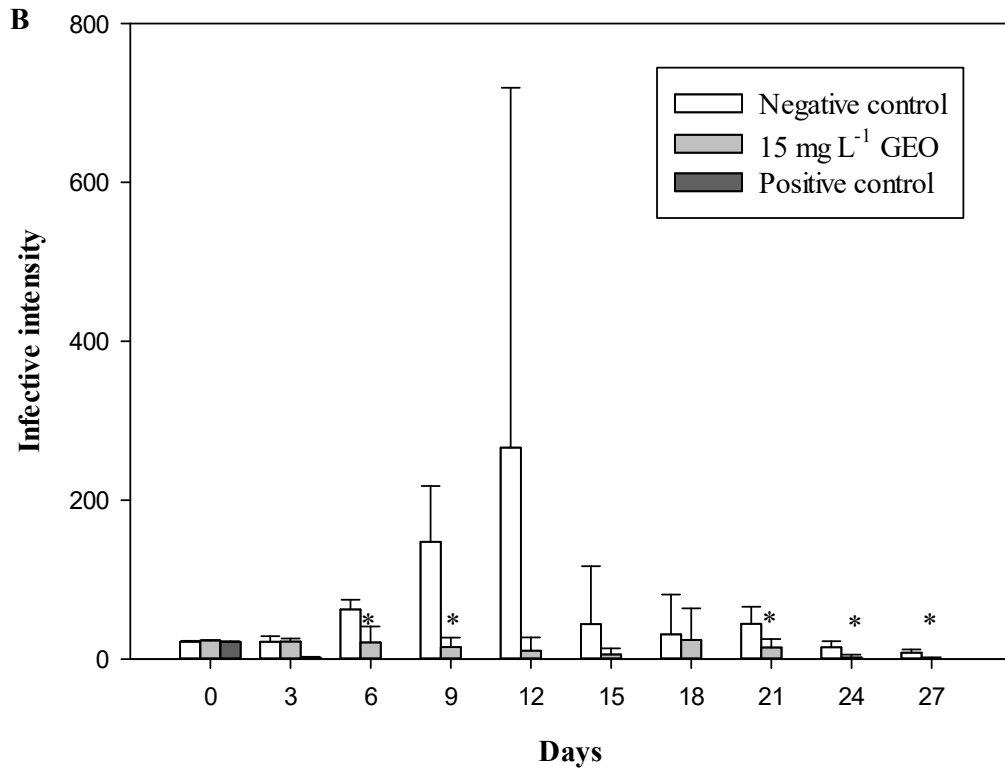


Fig2 (A) Survival of silver catfish infected with *I. multifiliis* and treated with *Nectandra grandiflora* essential oil (GEO). (#) indicates significant difference among the GEO groups and positive control at the same time. (*) indicates significant difference among the GEO groups and the negative control at the same time. Kaplan–Meier analysis of survival with Log-rank test ($P < 0.001$) and Holm-Sidak method ($P < 0.05$) (B) Effect of treatment on the infestation intensity (trophonts number in the body of the fish / number of infected fish) as function of time. (C) Infestation prevalence (%) as function of time. Different letters indicate differences between groups (Scheirer-Ray-Hare extension of Kruskal-Wallis test, with Nemenyi *post hoc* test, $P < 0.05$).





4 DISCUSSÃO GERAL

A expansão da aquicultura tem estimulado o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos que possam ser empregados em cultivos orgânicos e convencionais para o tratamento de diversas doenças parasitárias. Estudos visando à busca de novos fitoterápicos para tratamento da gírodactilose e da ictiofitiríase tornaram-se uma necessidade pelo crescente desenvolvimento e valorização do cultivo orgânico, além de ser alternativa aos tratamentos convencionais que muitas vezes apresentam pouca eficácia e/ou produzem danos ao meio ambiente, à saúde animal e humana (SCHELKLE et al., 2009; PICÓN-CAMACHO et al., 2012a; VALLADÃO et al., 2016).

O desenvolvimento de um novo fitoterápico antiparasitário exige o cumprimento de diversas etapas de estudos. De modo geral, engloba a seleção da espécie vegetal, do tipo de extrato, da caracterização química dos constituintes dos extratos, testes farmacológicos, testes toxicológicos, estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos e validação de processos de produção (KLEIN et al., 2009; HUANG et al., 2013). Neste trabalho são apresentados os estudos das etapas iniciais para o desenvolvimento de fitoterápicos para uso como antiparasitários em aquicultura. Os estudos realizados abrangeram a seleção da planta, do extrato e os testes farmacológicos pré-clínicos (*in vitro*) e clínicos (*in vivo*). Os dados gerados resultaram em dois artigos que compõem esta tese, além de duas solicitações de produtos de inovação tecnológica (BR1020150165994, BR1020150165978) e a descrição de uma nova espécie de parasito (*G. lilliana*) de importância para o cultivo do jundiá.

Neste trabalho foram selecionadas plantas medicinais nativas do estado do Rio Grande do Sul, que já apresentaram algum potencial farmacológico para o emprego na piscicultura. No artigo 1, a espécie vegetal selecionada foi *A. gratissima* que já teve descrita a atividade sedativa e anestésica para peixes (BENOVIT et al., 2012 e 2015) e atividade larvicida contra larvas de Coenagrionidae (SILVA et al., 2014).

O manuscrito 2 aborda os testes realizados com OE de duas espécies de Lauráceas: *N. megapotamica* e *N. grandiflora*. Estas já foram alvo de estudos pelo grupo de pesquisa Labeve/UFSM quanto à variabilidade sazonal da constituição química dos OEs (SILVA, 2013; AMARAL et al., 2015) e já tiveram avaliadas as

atividades larvicida (SILVA et al., 2014) sedativa e anestésica (GARLET et al., 2015; SILVA, 2013; TONDOLO et al., 2013) para emprego dos OEs no cultivo de peixes.

A literatura descreve atividades antiparasitárias para óleos essenciais e seus constituintes (BAKKALI et al., 2008, ABDEL-RAHMAN et al., 2013) e, portanto, este foi o tipo de extrato selecionado. O método de extração adotado foi a hidrodestilação, que permite a obtenção de um extrato livre da presença de solventes orgânicos, que poderiam interferir nas atividades farmacológicas (OIDTMANN et al., 2013). A composição química dos OEs foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e ao detector de ionização em chama, método padrão para a análise de extratos com características voláteis (BAKKALI et al., 2008; BRASIL, 2010). Os OEs se apresentaram constituídos de terpenóides e os seus componentes majoritários divergiram de alguns trabalhos anteriores para *A. gratissima* (SOLER et al., 1986; SILVA et al., 2007; ARZE et al., 2013; SANTOS et al., 2013; BERSAN et al., 2014) e *N. megapotamica* (TORRES et al., 2014). Estas análises revelam a importância da determinação da constituição química de EOs utilizados em ensaios de atividades farmacológicas, visto a composição estar sujeita a fatores abióticos e bióticos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008; BARRA, 2009).

Os testes *in vitro* e *in vivo* dos OEs frente a *G. lillanae* demonstraram que a atividade é dependente da concentração e do tempo de exposição. O OE de *A. gratissima* apresentou EC_{90} de $84,8 \text{ mg L}^{-1}$ para o tempo de 2 horas. No experimento *in vivo*, foi administrada por banho a concentração de 90 mg L^{-1} durante 2 horas, e a eficácia anti-helmíntica obtida foi de 98,4 %. A mesma correlação entre testes *in vitro* e *in vivo* foi encontrada para os OEs das espécies de Lauráceas avaliadas nesse trabalho. A metodologia adotada *in vitro* é adequada para a triagem da atividade antiparasitária de OEs frente a *G. lillanae* que parasitam *R. quelen*. Correlações desse tipo, no geral, somente são válidas quando se relaciona o mesmo parasito e hospedeiro e para os extratos de polaridade semelhante (OIDTMANN et al., 2013; FU et al., 2014).

Todos os OEs apresentaram eficácia anti-helmíntica superior a 90% no primeiro protocolo de tratamento e 100% no segundo frente a *G. lillanae*. Esses resultados são similares aos encontrados por Tu et al. (2013), onde administrações repetidas de um protocolo de tratamento por banho com o extrato clorofórmico de *Santalum album* para o tratamento de parasitose ocasionada por *Gyrodactylus*

elegans é capaz de elevar a eficácia anti-helmíntica. No entanto o extrato clorofórmico tem a desvantagem de conter os pigmentos vegetais e, em consequência, sua coloração poderia turvar/colorir a água dos tanques. Por outro lado, o OE dessa espécie, bem como seu componente majoritário, α -santalol, apresentaram toxicidade dérmica em animais de laboratório (BURDOCK; CARABIN, 2008).

A concentração de 90 mg L⁻¹ do OE de *A. gratissima* administrada em banhos com duração de duas horas demonstrou atividade sedativa e não apresentou mortalidade dos jundiás no teste *in vivo* frente ao *G. lillanae*. Já a mesma concentração deste OE resultou em mortalidade de 8,3% em experimento de transporte por 7 horas do linguado brasileiro (*Paralichthys orbignyanus*) no trabalho de Benovit et al. (2012), revelando que a exposição de diferentes espécies de peixes ao OE de *A. gratissima* pode apresentar resultados distintos também quanto aos efeitos adversos.

A concentração de 200 mg L⁻¹ do OE de *N. megapotamica* utilizada no protocolo de tratamento frente a *G. lillanae* não provocou mortalidade nos juvenis tratados. Apenas concentrações superiores a 300 mg L⁻¹ deste óleo induziram a sedação em juvenis de *R. quelen* (RODRIGUES et al., 2015). No estudo de Tondolo et al., (2013) a concentração de 30 μ L L⁻¹ deste OE apresentou atividade sedativa leve e concentrações acima de 150 μ L L⁻¹ foram anestésicas para robalos-peva (*Centropomus parallelus*).

Estes dados revelam que os OE de *A. gratissima* e *N. megapotamica* possuem potencial para o desenvolvimento de antiparasitários comerciais para o tratamento da girodactilose em *R. quelen*. Considerando o estudo de Silva et al. (2014), que avaliou o efeito desses OE frente à larvas de Coenagrionidae, estes novos fitoterápicos também teriam o potencial de apresentar atividade frente a larvas da ordem Odonata, que são predadoras de larvas de peixes e outros invertebrados, sendo combatidas em cultivos de peixes (FONSECA et al., 2004). Entretanto, são necessários estudos de toxicidade em diferentes espécies de peixes.

No entanto, para o OE de *N. grandiflora* foi relatada fraca atividade larvicida frente às larvas da ordem Odonata já que a concentração de 100 mg L⁻¹ resultou em uma mortalidade de 25 % após 19 horas (SILVA et al., 2014). Entretanto, no teste *in vivo* frente a *G. lillanae* o grupo de juvenis de *R. quelen* tratado com 50 mg L⁻¹ desse OE apresentou mortalidade de 8,33% durante o segundo banho do protocolo (artigo

2). Para o extrato metanólico de *Piper guineense* foi relatada atividade frente a *G. elegans in vitro* nas concentrações de 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ e *in vivo* em *Carassius auratus* estas concentrações também foram efetivas para a eliminação do parasito, mas resultaram em mortalidade para o hospedeiro de 15 e 37%, respectivamente (EKANEM, et al., 2004b). O OE de *Lippia sidoides* na concentração de 20 mg L⁻¹ administrado por 10 minutos na forma de três banhos com intervalo de 24 horas resultou sinais de toxicidade (aumento no número de neutrófilos e na glicose plasmática) na tilápia do Nilo (HASHIMOTO et al., 2016). Schelkle et al. (2009) também relatam que esta é uma dificuldade encontrada para fármacos de sistemas de cultivo convencional, uma vez que concentrações efetivas para a eliminação dos girodactilídeos acabam se revelando tóxicas para os hospedeiros. Assim, são necessários estudos complementares com o OE de *N. grandiflora* a fim de determinar seu índice terapêutico para o tratamento girodactilose em *R. quelen*. A partir destes estudos será possível determinar com maior exatidão se esse OE apresenta potencial para o desenvolvimento de um novo antiparasitário. Alternativamente, também é possível realizar estudos para determinar os constituintes responsáveis pela toxicidade e realizar a purificação do extrato (HUANG et al., 2013).

Os parasitos estudados nesse trabalho possuem classificação taxonômica diferente e características bem distintas no seu ciclo de vida: *G. lillanae* é uma espécie vivípara (BORGER et al., 2016), já *I. multifiliis* apresenta diferentes fases no seu ciclo de vida (MATTHEWS, 2005; CASSIDY-HANLEY et al., 2011; COYNE et al., 2011). Assim, um antiparasitário para o *I. multifiliis* pode atuar sobre uma ou demais fases de seu ciclo de vida. Na revisão de Picón-Camacho et al. (2012a) foi relatado que no geral, os antiparasitários disponíveis não conseguem atuar sobre todas as fases. Uma exceção seria o verde de malaquita (BUCHMANN et al., 2003) que é utilizado no tratamento de jundiás (CARNEIRO et al., 2005), embora seja altamente contraindicado. Essa substância e seus derivados são altamente persistentes no meio ambiente, bio-acumulando nos ecossistemas e tecidos de peixes (HENDERSON et al., 1997) que resultam em prejuízos à saúde humana, motivo pelo qual o seu uso em sistemas de cultivos de peixes foi banido em muitos países (SRIVASTAVA et al., 2004; ROWLAND et al., 2009; YI et al., 2012).

A atividade antiparasitária *in vitro* dos OEs nesse estudo frente ao *I. multifiliis* foi avaliada sobre a fase tomonte, que é considerada a fase mais resistente ao

tratamento farmacológico (BUCHMANN et al., 2003; PICÓN-CAMACHO et al., 2012a; YI et al., 2012; FU et al., 2014) e todos os OEs foram eficazes. Extratos que atuam sobre a fase reprodutiva (tomonte) possuem maior habilidade em interromper a parasitose (ZHANG et al., 2013). Song et al. (2015) sugerem a avaliação dos extratos vegetais que tenham a proposta de serem administrados na forma de banhos também preferencialmente contra a fase tomonete *in vitro*, para evitar resultados falso positivos (não reproduzíveis *in vivo*). Esta foi a fase avaliada neste trabalho e o OE de *A. gratissima* demonstrou que concentrações acima de 9 mg L⁻¹ inibem *in vitro* o desenvolvimento dos tomontes em terontes (fase infectante). Entretanto, no protocolo adotado *in vivo*, as concentrações de 9 e 15 mg L⁻¹ deste óleo não se apresentaram eficazes a longo prazo pelos critérios avaliados (sobrevivência e número de trofontes por peixe). Os resultados sugerem que, à medida que a concentração do OE de *A. gratissima* decresce na água (50% do volume de água foi trocado diariamente) a atividade antiparasitária deixa de ser observada, já que ocorreu um aumento no número de trofontes por peixes e decréscimo da sobrevivência dos juvenis. Estudos complementares são necessários para avaliar se a administração desse OE por um período de tempo maior poderia resultar em maior eficácia, uma vez que *in vitro* o OE demonstrou ser bastante eficaz frente aos tomontes.

Dentre as Lauráceas, o OE de *N. grandiflora* foi o que apresentou menores valores de concentrações efetivas *in vitro* frente a *I. multifiliis*, portanto foi o selecionado para o teste *in vivo*. Ao longo do experimento, o OE demonstrou capacidade de aumentar a sobrevivência dos peixes e diminuir a intensidade infestativa, mas não apresentou resultado sobre a prevalência infestativa. O aumento da sobrevivência e da diminuição do número de trofontes poderia ser um indicativo que esse óleo estaria atuando no sistema imune do jundiá. A literatura relata que vários dos extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana *in vivo* atuam principalmente sobre o sistema imune dos peixes e não diretamente sobre o patógeno (VASEEHARAN; THAYA, 2014; NEWAJ-FYZUL; AUSTIN, 2015). Picón-Camacho et al. (2012a) descreveram que tratamentos farmacológicos não totalmente efetivos para a ictiofitiríase podem ter a sua eficácia complementada pelo emprego de outras formas de manejo, como por exemplo a alteração da temperatura da água dos tanques de cultivo, que alteram o tempo de vida das fases do parasito (FORWOOD et al., 2015).

As concentrações encontradas nos testes *in vitro* contra *I. multifiliis* para os OEs neste estudo não demonstram ser muito eficazes nos testes *in vivo*, e estes resultados podem estar relacionados às demais fases do parasito que não foram testadas *in vitro*, mas principalmente, aos fatores farmacocinéticos do hospedeiro (OIDTMANN et al., 2013). Para os OEs de *A. gratissima* e *N. grandiflora* apresentarem ação direta sobre os tomontes, estes necessitam que seus constituintes sejam absorvidos e distribuídos na epiderme do peixe, onde está alojada esta fase do parasito. Assim, mesmo que os OEs tivessem sido avaliados e apresentassem atividade *in vitro* frente aos trofontes, não seria possível estimar eficácia similar *in vivo*, como pode ser observado no estudo de Xiao-Feng et al. (2014), onde constituintes isolados do extrato metanólico de *Toddalia asiatica* que apresentaram eficácia de 100% *in vitro* frente a trofontes e não apresentaram eficácia correspondente para o tratamento da ictiofitiríase *in vivo*.

Trabalhos de revisão sobre tratamentos farmacológicos para girodactilose e ictiofitiríase descrevem uma diversidade muito grande de metodologias empregadas para avaliar a efetividade dos tratamentos, o que dificulta a comparação entre os produtos/fármacos (SCHELKLE et al., 2009; PICÓN-CAMACHO et al., 2012a; VALLADÃO et al., 2015). Além disso, na girodactilose as espécies do parasito e do hospedeiro influenciam na efetividade dos tratamentos farmacológicos (SCHELKLE et al., 2009). Na ictiofitiríase diferentes estirpes/ genótipos de *I. multifiliis* podem se comportar muito diferente em termos de infecciosidade (ELSAYED et al., 2006; LING et al., 2009), na especificidade e sensibilidade ao tratamento (STRAUS et al., 2009).

Neste estudo, os parasitos apresentaram sensibilidade diferenciada aos OEs, *in vitro* *G. lillanae* se apresentou mais sensível aos OEs de *N. grandiflora* > *N. megapotamica* > *A. gratissima*, resultados que foram confirmados nos testes *in vivo*. No entanto, para o *I. multifiliis in vitro* a efetividade deu-se na seguinte ordem decrescente: *A. gratissima* > *N. grandiflora* > *N. megapotamica*. Ainda *in vivo* o OE de *N. grandiflora* apresentou melhores resultados. Claudiano et al. (2009), na avaliação de diferentes concentrações (40, 80, 120 mL L⁻¹) do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tambaqui, observaram maior sensibilidade dos monogénéticos que de *I. multifiliis* ao tratamento por banho de longa duração (7 dias).

A complexidade química encontrada nos OEs deste estudo dificulta o estabelecimento exato dos mecanismos de ação farmacológica. As atividades

antiparasitárias podem ter origem na interação dos constituintes e resultarem de efeitos sinérgicos, antagônicos e/ou aditivos (GÓMEZ-RINCÓN et al., 2014).

Entretanto, a possibilidade de muitos mecanismos de ação estarem envolvidos na atividade antiparasitária dificulta o desenvolvimento de resistência dos parasitos ao tratamento (SERENO et al., 2007; BAKKALI et al., 2008; BIAVATTI, 2009; LANGEVELD et al., 2014; REVERTER et al., 2014).

Nos manuscritos 1 e 2 são relatados diferentes mecanismos de ação que poderiam estar envolvidos na atividade antiparasitária dos OEs avaliados neste estudo. Assim, os OEs podem estar atuando simultaneamente na estrutura do tecido tegumentar dos parasitos, na atividade da acetilcolinesterase e nos receptores gabaérgicos. Além desses possíveis sítios de ação em *G. lillanae*, os receptores octopaminérgicos são um provável sítio ativo dos OEs.

Extratos lipofílicos, como os OEs estudados neste trabalho, conseguem interagir e atravessar a membrana dos parasitos causando a sua ruptura (LIU et al., 2010; LEVY et al., 2015). Terpenóides isolados destes extratos conseguiram interagir com o tegumento de helmintos e protozoários causando danos, que resultam na morte destes parasitos (CAMARGOS et al., 2014; MAFUD et al., 2016.)

O eucaliptol, um constituinte presente em proporções diferentes em todos os OEs avaliados neste trabalho, apresenta capacidade de interagir com os componentes lipídicos da membrana de protozoários, atuando como um espaçador que desestabiliza e enfraquece as suas ligações moleculares, provocando um desequilíbrio no sistema de transporte da membrana (CAMARGOS et al., 2014; TURINA et al., 2006; ANJOS et al., 2007; ANJOS; ALONSO, 2008). Estudos descrevem que o eucaliptol interage com enantiômeros do limoneno (presente nos OEs das Lauraceas) produzindo efeitos antagonistas, sinérgicos ou interações aditivas dose-dependentes (VAN VUUREN; VILJOEN, 2007).

Outro mecanismo de ação descrito para o eucaliptol é a capacidade de atuar como um bloqueador dos receptores octopaminérgicos (KHANIKOR et al., 2013). Estes receptores já foram descritos em girodactílideos e fármacos que atuam neles provocam desordens neuromusculares, que podem resultar na morte dos parasitos (BROOKER et al., 2011). Este monoterpenoide oxigenado é um exemplo de que um mesmo constituinte do OE pode possuir mais de um mecanismo de ação e, além dos já descritos, o eucaliptol é um inibidor da AChE (KHANIKOR et al., 2013).

A atividade da AChE já foi descrita no sistema nervoso de girodactilídeos (BUCHMANN, 1998) e os organofosforados que atuam inibindo a AChE são efetivos para o combate destes parasitos, embora não devam ser empregados por apresentar elevada toxicidade (MORLEY, 2009; SCHELKLE et al., 2009). Assim, os OEs obtidos de plantas medicinais que apresentam atividade frente a AChE são uma alternativa ao uso dos organofosforados, em especial nos sistemas de cultivo orgânico (BRASIL, 2011; PREIN et al., 2012).

Nos manuscritos deste trabalho é discutida a possível ação dos OEs sobre o sistema gabaérgico dos parasitos. A literatura não descreve a presença destes receptores em *G. lillianae* e *I. multifiliis*, mas fármacos que possuem o mecanismo de ação neste sistema apresentam eficácia para o tratamento das parasitoses (TOJO; SANTAMARINA, 2001; REIMSCHUESSEL et al., 2011; BROWN et al., 2012; HERNANDO; BOUZAT, 2014; HONDEBRINK et al., 2015). A presença do sistema gabaérgico já foi descrita em outros helmintos (MENDONÇA-SILVA et al., 2004) e protozoários ciliados (RAMOINO et al., 2004; RAMOINO et al., 2010; JEELANI et al., 2012; WU; JANETOPOULOS, 2013).

Dentre os constituintes do AEO, a pinocanfona foi isolada e teve comprovada a sua atividade bloqueadora e inibitória dos receptores GABA_A (HÖLD et al., 2002; BENOVIĆ et al., 2015). Esse mecanismo também pode ser relacionado à atividade antiparasitária do OE de *N. grandiflora*, uma vez que seu principal constituinte, a deidrofuquinona, demonstrou ação sobre os receptores GABA_A (GARLET et al., 2015). Adicionalmente, todos os OEs apresentaram ação larvicida para larvas de Coenagrionidae (SILVA et al., 2014) que apresentam receptores GABA_A descritos (VIEIRA et al., 2005).

Este trabalho foi o primeiro estudo avaliando o potencial do uso dos OEs de *A. gratissima*, *N. megapotamica* e *N. grandiflora* para o tratamento de parasitoses em juvenis de jundiá. *Rhamdia quelen* é a principal espécie nativa dos sistemas de piscicultura continental no estado do Rio Grande do Sul e apresenta alto potencial de comercialização (MIRON et al., 2003; GARCIA et al., 2007; BALDISSEROTTO, 2009). Assim, antiparasitários que possam ser utilizados no seu cultivo orgânico estariam contribuindo para agregar valor a sua carne (BRASIL, 2011; DIANA et al., 2013). Adicionalmente, este também é o primeiro estudo com extratos vegetais para tratar a girodactilose em jundiá, principalmente as ocasionadas por *G. lillianae*, nova espécie identificada durante os experimentos *in vivo* deste trabalho (artigo anexo).

5 CONCLUSÕES

- O óleo essencial obtido de *A. gratissima* (AEO) apresentou atividade antiparasitária *in vitro* contra *G. lillanae*, sendo a CE₉₀ de 84,8 mg L⁻¹ para duas horas de exposição. O protocolo de tratamento *in vivo*, na concentração de 90 mg L⁻¹ administrada por duas horas, apresentou eficácia anti-helmíntica de 98,4% após o primeiro banho e de 100% após o segundo.

- O AEO apresentou atividade antiparasitária *in vitro* contra *Ichthyophthirius multifiliis*, inibindo a maturação dos tomontes em concentrações acima de 9 mg L⁻¹. No experimento *in vivo*, as concentrações de 9 e 15 mg L⁻¹ resultaram em uma maior sobrevivência dos peixes no 9º e 10º dia do período experimental quando comparado com o grupo controle. Apenas a concentração de 15 mg L⁻¹ resultou em um menor número de trofontes por peixe, quando comparado ao grupo controle negativo.

- No AEO foram detectados germacreno D (19,98%), β-cariofileno (12,97%), *p*-cimeno (11,88%), 5-isopropil-2-metilbicyclo(3.1.0)hexan-2-ol (9,79%) e germacreno B (9,36%) como componentes majoritários. Estes dados diferem de outros estudos encontrados na literatura para o OE desta espécie vegetal.

- O óleo essencial obtido de *N. megapotamica* (MEO) apresentou atividade antiparasitária *in vitro* contra *G. lillanae*, sendo a CE₉₀ de 111,8 mg L⁻¹ para uma hora de exposição. A concentração de 200 mg L⁻¹ de óleo, empregada no protocolo de tratamento *in vivo*, com dois banhos de imersão para juvenis de jundiás, apresentou uma eficácia anti-helmíntica de 90,7% após primeiro banho e 100% após o segundo.

- No experimento *in vitro* frente a *I. multifiliis*, o MEO exibiu atividade contra tomontes, sendo determinada a CE₉₀ de 172,4 mg L⁻¹, para 26 horas de exposição.

- O MEO apresentou como constituintes majoritários α-pineno (25,5%), β-pineno (15,4%), globulol (10,5%), limoneno (8,2%) e β-bisaboleno (6,1%). Estes constituintes já foram encontrados em outros trabalhos relatados na literatura para o OE desta espécie vegetal.

- O óleo essencial de *N. grandiflora* (GEO) exibiu atividade *in vitro* frente ao *G. lillanae* sendo determinada a CE₉₀ de 69,6 mg L⁻¹ para uma hora. A concentração de 50 mg L⁻¹ administrada na forma de banho com duração de uma hora apresentou 95,6% de eficácia anti-helmíntica após o primeiro banho, sendo atingida 100% após um segundo banho. Os peixes tratados apresentaram mortalidade (8,33%) durante o segundo banho.

- Nos testes *in vitro* frente *I. multifiliis* o GEO apresentou uma CE₉₀ de 24,1 mg L⁻¹ para tomontes num período de 26 horas. No protocolo de tratamento, administrando 15 mg L⁻¹ através de banho estático por um período de 5 dias, foi observado um aumento da sobrevivência dos juvenis, acompanhada de uma redução da intensidade infestativa entre os 6º e 9º dias e após o 21º dia ao final do experimento.

- Os principais constituintes de GEO foram: dehidrofuquinona (17,08%), biciclogermacreno (11,47%), α -pineno (4,98%), β -*E*-ocimeno (4,56%) e valenceno (4,44%), composição semelhante já foi relatada na literatura para esta espécie vegetal.

- Os óleos essenciais AEO e MEO demonstram ser promissores para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da girodactilose, já o GEO apresenta potencial para ser utilizado como adjuvante em tratamentos da ictioftiríase por aumentar a sobrevivência dos peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAFEZ, G.; LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. Possibilities to control *Ichthyophthirius multifiliis* infestation with medicated feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and chub (*Leuciscus cephalus*). **Parasitology Research**, v. 113, p. 1119-1126, 2014.

ABDEL-RAHMAN, F. H. et al. Nematicidal activity of terpenoids. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.48, p. 16-22, 2013

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009.

AIHUA, L.; BUCHMANN, K. Temperature and salinity dependent development of a Nordic strain of *Ichthyophthirius multifiliis* from rainbow trout. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, p. 173-276, 2001.

AKINBOWALE, O. L. et al. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1103-1113, 2006.

ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: ULBRA, 1995. 205p.

ALVES, E. O. et al. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência Agrotécnica**, v. 32, p. 651-658, 2008.

AMARAL, L. P. **Caracterização química e avaliação biológica de óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.** 2014. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

AMARAL, L. P. et al. Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 12-21, 2015.

ANJOS, J. L. V.; ALONSO, A. Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 103–112, 2008.

ANJOS, J. L. V.; NETO, D. S.; ALONSO, A. Effects of 1,8-cineole on the dynamics of lipids and proteins of stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, p. 81–87, 2007.

APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo - Brazil). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 376-383, 2006.

ARAÚJO, D. A. M. et al. Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology. **Life Sciences**, v. 89, p. 540-544, 2011.

ARZE, J. B. L. et al. Essential oils from Bolivia. XI. Verbenaceae: *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. and Boraginaceae: *Cordia chacoensis* Chodat. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, p. 545-550, 2013.

ATHANASSOPOULOU, F. et al. Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, p. 217-226, 2004.

AZAMBUJA, C. R. J. et al. 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.

BAITELLO, J. B. et al. Lauraceae. In: WANDERLEI, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Editora Rima. v. 3. p. 149-223. 2003.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BAKKE T. A. et al. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 281-308, 2002.

BAKKE T. A. et al. Host specificity and dispersal strategy in gyrodactylid monogeneans, with particular reference to *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 13, p. 63-74, 1992.

BAKKE, T. A. et al. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian-doll killers”. **Advances in Parasitology**, v. 64, p. 161-376, 2007.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, p. 291-299, 2009.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, JOÃO (Org.). **Criação do jundiá**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2004. 232p.

BALTA, F.; KAYIS, S.; ALTINOK, I. External protozoan parasites in three trout species in the Eastern Black Sea region of the Turkey: intensity, seasonality and their treatments. **Bulletin of European Association of Fish Pathologists**, v. 28, p. 157-162, 2008,

BANSEMIR, A. et al. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, v. 252, p. 79-84, 2006.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 121-123, 2001.

BARRA, A. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1147-1154, 2009.

BARROS, C. F. et al. **Madeiras da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1997. 86 p.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: Editora UFV. 2002, 309 p.

BECKER, A. G. et al. 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.

BENOVIT, S. C. et al. Anesthesia and transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, p. 896-900, 2012.

BENOVIT, S. C. et al. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 1675-1689, 2015.

BERSAN, S. M. F. et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-12, 2014.

BIAVATTI, M. B. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 371:378, 2009.

BIDÁ, A. Óleo essencial de folhas de *Nectandra grandiflora* Nees et Mart. ex. Nees. **Acta Botanica Brasilica**, v. 5, p. 105, 1991.

BODENSTEINER, L. R. et al. Flowing water: an effective treatment for ichthyophthiriasis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 12, p. 209-219, 2000.

BOEGER, W. A. et al. Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogenoidea). **Zoologica Scripta**, v. 32, p. 437-448, 2003.

BOEGER, W. A. et al. Neotropical Monogenoidea xx: *Gyrodactylus liliane* n. sp. (Polyonchoinea, Gyrodactylidae) from *Rhamdia quelen*

(Siluriformes, Heptapteridae) from Southern Brazil: a potential nuisance for aquaculture. **Zoologia**, 20

BOHLKE, M. et al. Costaricine, a new antiplasmodium bisbenzylisoquinoline alkalid from *Nectandra salicifolia* truk bark. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 576-579, 1996.

BONDAD-REANTASO, M. G. et al. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p. 249-272, 2005.

BONZANI, N. E. et al. Particularidades epidérmicas em algumas espécies de Verbenaceae. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica**, v. 68, p. 47-56, 1997.

BOWKER, J. D. et al. Efficacy of 35% PEROX-AID (hydrogen peroxide) in reducing an infestation of *Gyrodactylus salmonis* in freshwater-reared rainbow trout. **North American Journal of Aquaculture**, v. 74, p. 154-159, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - RDC N° 26, de 13 de maio de 2014: dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 maio 2014. Seção 1, p. 52.

_____. 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 jun. 2011. Seção 1, p. 04-09.

_____. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e da Aquicultura 2010**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012. 128 p.

_____. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e da Aquicultura 2011**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2013. 60 p.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. P. Neolignans from *Nectandra* Species. **Phytochemistry**, v. 19, p. 659-662, 1980.

BRITO, A. F. R. **Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química Fundamental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

- BROWN, D. D. R. et al. Pharmacological characterization of the *Haemonchus contortus* GABA-gated chloride channel, Hco-UNC-49: Modulation by macrocyclic lactone anthelmintics and a receptor for piperazine. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 201-209, 2012.
- BROOKER, A. J. et al. The effect of octopaminergic compounds on the behaviour and transmission of *Gyrodactylus*. **Parasitology Vectors**, v. 4, p. 207-217, 2011.
- BUCCIARELLI, A.; SKLIAR, M. I. Medicinal plants from Argentina with gastro protective activity. **Ars Pharmaceutica**, v. 48, p. 361-369, 2007.
- BUCHMANN K. et al. Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *in vitro* experiments. **North American Journal of Aquaculture**, v. 65, p. 21-24, 2003.
- BUCHMANN, K. Histochemical characteristics of *Gyrodactylus derjavini* parasitizing the fins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Folia Parasitologica**, v. 45, p. 312-318, 1998.
- BUCHMANN, K.; BRESCIANI, J.; JAPPE, C. Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, p. 99-104, 2004.
- BUCHMANN, K.; KRISTENSSON, R. T. Efficacy of sodium percarbonate and formaldehyde bath treatments against *Gyrodactylus derjavini* infestations of rainbow trout. **North American Journal of Aquaculture**, v. 65, p. 25-27, 2003.
- BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G. Safety assessment of sandalwood oil (*Santalum album* L.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 421-432, 2008.
- BURKART, M. A.; CLARK, T. G.; DICKERSON, H. W. Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet): killed versus live vaccines. **Journal of Fish Diseases**, v. 13, p. 401-410, 1990.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- 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.
- CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1137-1144, 2006.

CABLE, J.; HARRIS, P. D. Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 255-280, 2002.

CAMARGOS, H. S. et al. Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC₅₀ values. **PLoS ONE**, v. 9, p.e104429, 2014.

CAITO, S.; ASCHNER, M. Neurotoxicity of metals. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 131, p. 169-189, 2015.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Conventional therapeutic treatments on the control of the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* in *Rhamdia quelen*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 99-102, 2005.

CARNEIRO, P. C. F.; CIRIO, S. M.; SCHORER, M. Pathological study of jundia fingerlings experimentally infected by ich and submitted to conventional treatments. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 33-38, 2006.

CARRASCHI, S. P. et al. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 63, p. 579-583, 2011.

CARVALHO, A. M. et al. A new species *Aphanoblastella* (Mongenea: Dactylogyridae) parasitic on *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) from Southeastern Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, p. 323-325, 2009.

CASSIDY-HANLEY, D. M. Transcriptional profiling of stage specific gene expression in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 178, p. 29-39, 2011.

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.

CIGANA, C. O Rio Grande está para peixe. **Zero Hora**, Porto Alegre, 28 out. 2014, Caderno Campo e Lavoura, p. 1-3.

CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**, v. 19, p. 403-414, 2010. CHAVERRI, C.; CICCIO, J. F. Volatile compounds of cell lines. **Química Nova**, v. 32, p. 605-609, 2009.

CLAUDIANO, G. S. et al. Eficácia do extrato aquoso de "*Terminalia catappa*" em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 625-636, 2009.

COE-TEIXEIRA, B. Lauráceas do gênero *Ocotea* do estado de São Paulo. **Rodriguésia**, v. 32, p. 55-190, 1980.

COLLINS, C. M.; MO, T. A.; BUCHMANN, K.; CUNNINGHAM C. O. Diagnosis of *Gyrodactylus* (MONOGENEA; PLATYHELMINTHES) infecting salmonid fish in northern Europe. **Fisheries Research Services**, v. 7, p. 1-69, 2002.

CONSOLINI et al. Antispasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 889-890, 2011.

CORDO, H. A.; DELOACH, C. J. Natural enemies of the rangeland weed whitebrush (*Aloysia gratissima*: Verbenaceae) in South-America: Potential for biological control in the United States. **Biological Control**, v. 5, p. 218-230, 1995.

COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Decision 2004/453/EC of 29 April 2004 implementing Council Directive 91/67/EEC as regards measures against certain fish diseases in aquaculture animals (notified under document number C (2004). Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32006D0272>> Acesso em: 15 set. 2015.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

COY, E. D. et al. COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 6922-6925, 2009.

COYNE, R. S. Comparative genomics of the pathogenic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*, its free-living relatives and a host species provide insights into adoption of a parasitic lifestyle and prospects for disease control. **Genome Biology**, v. 12, p. 1-26, 2011.

CUESTA, A. et al. Cell-mediated cytotoxicity is the main innate immune mechanism involved in the cellular defence of gilthead seabream (Teleostei: Sparidae) against *Enteromyxum leei* (Myxozoa). **Parasite Immunology**, v. 28, p. 657-665, 2006.

DA SILVA, A. C. et al. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum* infected soybean seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 305-313, 2012.

DA SILVA, A. C. et al. Local and systemic control of powdery mildew in eucalyptus using essential oils and decoctions from traditional Brazilian medicinal plants. **Forest Pathology**, v. 44, p. 145-153, 2014.

DARGENT, F. et al. Can mixed-species groups reduce individual parasite load? A field test with two closely related Poeciliid fishes (*Poecilia reticulata* and *Poecilia picta*). **PLoS ONE**, v. 8, art. n. e56789, 2013.

DAVIDSEN, J. G.; THORSTAD E. B.; BAKTOFT, H.; AUNE, S.; ØKLAND, F.; RIKARDBSEN A. H. Can sea trout *Salmo trutta* compromise successful eradication of *Gyrodactylus salaris* by hiding from CFT Legumin (rotenone) treatments? **Journal of Fish Biology**, v. 82, p. 1411-1418, 2013.

DELLACASA, A. D. et al. *In vitro* activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascospheara apis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 282-285, 2003.

DIANA, J. S. et al. Responsible aquaculture in 2050: Valuing local conditions and human innovations will be key to success. **BioScience**, v. 63, p. 255-262, 2013.

DICKERSON, H. W.; FINDLY, R. C. Immunity to *Ichthyophthirius multifiliis* infections in fish: a synopsis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 43, p. 290-299, 2014.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DUSCHATZKY, C. B. et al. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 626–628, 2004.

EIRAS, J. C. **Elementos de ictioparasitologia**. Fundação Antonio de Almeida, Porto, 1994. 339 p.

EKANEM, A. P. et al. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology Research**, v. 92, p. 361-366, 2004a.

EKANEM, A. P. et al. *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, 2004b

ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, p. 233-243, 2014.

ELSAYED, E. E. et al. Ichthyophthiriasis: various fish susceptibility or presence of more than one strain of the parasite? **Nature and Science**, v. 4, p. 5-13, 2006.

ESTEBAN, M. A. An over view of the immunological defenses in fish skin. **ISRN Immunology**, v. 2012, p. 1-29, 2012.

FAJT, J. R.; GRIZZLE, J. M. Blood respiratory changes in common carp exposed to a lethal concentration of rotenone. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 127, p. 512-516, 1998.

FARAHANI, M. S. et al. Plant-derived natural medicines for the management of depression: an overview of mechanisms of action. **Reviews Neuroscience**, v. 26, p. 305-321, 2015.

FARLEY, D. G.; HECKMANN, R. Attempts to control *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet (Ciliophora: Orphryoglinidae) by chemotherapy and electrotherapy. **Journal of Fish Diseases**, v. 3, p. 203-212, 1980.

FARMER, B. D. et al. Efficacy of bath treatments of formalin and copper sulfate on cultured white bass, *Morone chrysops*, concurrently infected by *Onchocleidus mimus* and *Ichthyophthirius multifiliis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, p. 305-310, 2013.

FERRARI-HOEINGHAUS, A. P. et al. Host-parasite relationships og monogeneans in the gills of *Astyanax altiparanae* and *Rhamdia quelen* of the São Francisco Verdadeiro River, Brazil. **Parasite**, v. 13, p. 315-320, 2006.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FIGUEIREDO, H. C. P. **Análise de risco de Importação de carcaças e evisceradas e filés de salmonídeos da Noruega**. Brasília, Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010.

FIGUEREDO, A. B. et al. Haematological and parasitological assessment of silver catfish *Rhamdia quelen* farmed in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 157-163, 2014.

FONSECA, A. R. et al. Levantamento de espécies de Odonata associadas à tanques de piscicultura e efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre ninfas de *Pantala flavescens* (Fabricius, 1798) (Odonata: Libellulidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 1, p. 25-29, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture: Opportunities and challenges**. Rome: FAO, 2014. 243p.

FORWOOD, J. M. et al. Life cycle and settlement of an Australian isolate of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 from rainbow trout. **Folia Parasitologica**, v. 62, p. 1-5, 2015.

FRANCO, A. L. P. et al. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* (açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 208-220, 2007.

FREIRES, I. A. et al. The effect of essential oils and bioactive fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms: a confocal analysis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

FU, W.-U. et al. Antiparasitic effect of cynatratoside-C from *Cynanchum atratum* against *Ichthyophthirius multifiliis* on grass carp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 7183-7189, 2014.

GALVÃO, L. C. C. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, p. 407-411, 2009.

GARCÍA, C. C. et al. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1073-1075, 2003.

GARCIA, L. O. G. et al. Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 1-11, 2007.

GARCIA-VÁSQUEZ, A. et al. A revised description of *Gyrodactylus cichlidarum* Paperna, 1968 (Gyrodactylidae) from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus niloticus* (Cichlidae), and its synonymy with *G. niloticus* Cone, Arthur et Bondad-Reantaso, 1995. **Folia Parasitologica**, v. 54, p. 129-140, 2007.

GARLET, Q. I. et al. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, p. 1-9, 2015.

GHEIY, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2010. 472p.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES, L. C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae) - Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v. 30, p. 179-185, 2000.

GÓMEZ-RINCÓN, C. et al. Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil against L3 larvae of *Anisakis simplex*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

GOTTLIEB, O. et al. Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazonica**, v. 11, p. 143-148, 1981.

GOVEN, B. A.; AMEND, D. F. Mebendazole/trichlorfon combination: a new anthelmintic for removing monogenetic trematodes from fish. **Journal of Fish Biology**, v. 20, p. 373-378, 1982.

GRIGORAKIS, K.; RIGOS, G. Aquaculture effects on environmental and public welfare – The case of Mediterranean mariculture. **Chemosphere**, v. 855, p. 899-919, 2011.

GUO, F. C.; WOO, P. T. K. Selected parasitosis in cultured and wild fish. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 207-216, 2009.

HAMAJIMA, F. et al. Studies on the *in vitro* effects of bithionol and menichlopholan on flukes of *Clonorchis sinensis*, *Metagonimus takahashii* and *Paragonimus miyazakii*. **International Journal for Parasitology**, v. 9, p. 241-249, 1979.

HANSON, T. R. et al. Identifying risk factors affecting weather and disease related losses in the U.S. farm-raised catfish industry. **Agricultural and Resource Economics Review**, v. 37, p. 27-40, 2008.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to trematodes (except schistosomes) and cestodes: current level of knowledge and outlook. **Parasitology Research**, v. 88, p. 587-590, 2002.

HARRIS, P. D. et al. Nominal species of the genus *Gyrodactylus* von Nordmann 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae), with a list of principal host species. **Systematic Parasitology**, v. 59, p. 1-27, 2004.

HASHIMOTO, G. S. O. et al. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 450, p. 182-186, 2016.

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.

HENDERSON, A. L. et al. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4099-4101, 1997.

HENRIQUES, A. T. et al. Óleos essenciais: Importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (org.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007. p. 210-235.

HERNANDEZ, T. et al. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 181-188, 2003.

HERNANDO, G.; BOUZAT, C. *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction: GABA receptors and ivermectin action. **PLoS ONE**, v. 9, p. e95072, 2014.

HISTER, C. A. L. et al. Evaluation of the antiproliferative effect of infusions and essential oil of *Aloysia gratissima*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, p. 1581-1584, 2009.

HOHREITER, D. W.; RIGG, D. K. Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. **Chemosphere**, v. 45, p. 471-486, 2001.

HÖLD, K. M. et al. Metabolism and mode of action of *cis*- and *trans*-3-pinanones (the active ingredients of hyssop oil). **Xenobiotica**, v. 32, p. 251-265, 2002.

HONDEBRINK, L. et al. Structure-dependent inhibition of the human $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A receptor by piperazine derivatives: A novel mode of action. **NeuroToxicology**, v. 51, p.1-9, 2015.

HOSEINI, S. M. et al. Anaesthetic efficacy of eugenol on iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in different size classes. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 405-412, 2015.

HUANG, C. et al. Systems pharmacology in drug discovery and therapeutic insight for herbal medicines. **Briefings in Bioinformatics Advance**, v. 15: 710-733, 2013.

HUI, Z. et al. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, v. 39, p. 833-839, 2006.

HUMANSON, G. L. **Animal Tissue Techniques**. 4th ed. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 1979.

IGLESIAS, R. et al. Antiprotozoals effective *in vitro* against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. **Diseases of Aquatic Organism**, v. 49, p. 191-197, 2002.

JANSEN, P. A.; BAKKE, T. A. Temperature-dependent reproduction and survival of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Platyhelminthes: Monogenea) on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Parasitology**, v. 102, p. 105-112, 1991.

JEELANI, G. et al. Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba invadens* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. **PLoS ONE**, v. 7, p. e37740, 2012.

JI, J. et al. Screening of 42 medicinal plants for in vivo anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology Research**, v. 111, p. 97-104, 2012.

JULIANI, H. R. et al. Essential oils from Argentinean aromatic plants. **Acta Horticulturae**, v. 629, p. 491-498, 2004.

JURINITZ, C. F.; JARENKOW, J. A. Estrutura de uma floresta estacional no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 475-487, 2003.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A Review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 87, p. 1-7, 2010.

KHANIKOR, B. et al. Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking studies. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 006-012, 2013.

KHALIL, W. K. B. et al. Protective effects of *Nigella sativa* extract against chromiumvi-induced genotoxicity in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and zebrafish (*Danio rerio*) **Global Veterinaria**, v. 7, p. 283-93, 2011.

KHAN, M. T. H. et al. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107-119, 2005.

KIRKAN, S. et al. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchers farms. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 50, p. 339-342, 2003.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 241-248, 2009.

KOHN, A.; COHEN, S. C. South American Monogenea - list of species\ hosts and geographical distribution. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1517-1554, 1998.

KRISTSKY, D. C. et al. Neotropical Monogenoidea. 57. Revision and phylogenetic position of *Scleroductus* Jara & Cone, 1989 (Gyrodactylidae), with descriptions of new species from the Guatemalan chulin *Rhamdia guatemalensis* (Günther) (Siluriformes: Heptapteridae) in Mexico and the barred sorubim *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus) (Siluriformes: Pimelodidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 84, p. 1-15, 2013.

KRITSKY, D. C. et al. Neotropical Monogenoidea. 22. Variation in *Scleroductus* species (Gyrodactylidae, Gyrodactylidae) from siluriform fishes of southeastern Brazil. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 62, p. 53-56, 1995.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 3. ed. Jundiaí, 1999.96p.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 311-320, 2004.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T. Treatment of Ichthyophthiriasis in rainbow trout and common carp with common and alternative therapeutics. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 19, p. 186-194, 2007.

LANG, G.-J.; ZHU, K. Y.; ZHANG, C.-X. Can acetylcholinesterase serve as a target for developing more selective insecticides? **Current Drug Targets**, v. 13, p. 495-501, 2012.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, p. 76-94, 2014.

LEVY, G. et al. Efficacy of ginger-based treatments against infection with *Gyrodactylus turnbulli* in the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 235-241, 2015

LING, F. et al. Antiprotozoal screening of traditional medicinal plants: evaluation of crude extract of *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2231-2240, 2013.

LING, F. et al. Effects of aqueous extract of *Capsicum frutescens* (Solanaceae) against the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology Research**, v. 111, p. 841-848, 2012.

LING, F. et al. Effects of the 'all-fish' GH (growth hormone) transgene expression on resistance to *Ichthyophthirius multifiliis* infections in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture**, v. 292, p. 1-5, 2009.

LING, F. et al. Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 212-216, 2010.

LING, K. H.; SIMB, Y. M.; LAMB, T. J. Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot disease) in goldfish (*Carassius auratus*). **Aquaculture**, v. 118, p. 23-35, 1993.

LIU, C. H. et al. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1969-1973, 2006.

LIU, Y. T. et al. *In vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Radix angelicae pubescentis*, *Fructus Bruceae*, *Caulis Spatholobi*, *Semen aesculi*, and *Semen pharbitidis* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology Research**, v. 106, p. 1233–1239, 2010.

LOGAMBAL, S. M.; VENKATALAKSHMI, S.; MICHAEL, R. D. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* Peters). **Hydrobiologia**, v. 430, p. 113-120, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Institut Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 1982. 368 p.

MACCHIONI, F. et al. Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 111-114, 2006.

MAFUD, A. C. e al. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 129-139, 2016.

MANSELL, B. et al. Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 253-262, 2005.

MARCHIORI, N. C.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, v. 29, p. 315-318, 1999.

MARCHIORI, N. C. et al. New technique for collecting eggs from monogenean parasites. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 138-140, 2013.

MARTIN, R. J. Review modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v. 154, p. 11-34, 1997.

MARTIN, R. J. et al. The Conqueror Worm: recent advances with cholinergic anthelmintics and techniques excite research for better therapeutic drugs. **Journal of Helminthology**, v. 29, p. 1-11, 2014.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. **Parasitology**, v. 134, p. 1093-1104, 2007.

MARTINS, M. L. et al. Parasitic infection in cultivated fishes a survey of diagnosed cases from 1993-1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 23-28, 2000.

MARTINS, M. L.; SHOEMAKER, C. A.; XU, D.; KLESIOUS, P. H. Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 314, p. 18-23, 2011.

MATTHEWS, R. A. *Ichthyophthirius multifiliis* fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. **Advances in Parasitology**, v. 59, p. 159-240, 2005.

MEINILÄ, M. et al. Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 515-526, 2004.

MENDONÇA, F. A. C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629-636, 2005.

MENDONÇA-SILVA, D. A. et al. Characterization of a GABAergic neurotransmission in adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 129, p. 137-146, 2004.

MIRON, D. S. et al. Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* contamination of silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 14, p. 155-161, 2003.

MONTANHA, J. A. et al. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 183-186, 2004.

MOREIRA, N. I. B. **Helminhos parasitos de peixes de lagos do médio Rio Doce, Minas Gerais, Brasil, Belo Horizonte - MG**. 2000. 195 f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

MORENO, P. R. H. et al. Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, p. 189-192, 1993.

MORLEY, N. J. Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 27, p. 161-175, 2009.

MORONI, P. et al. Species delimitation in the *Aloysia gratissima* complex (Verbenaceae) following the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2015. No prelo.

MOTA, J. H.; de ARAÚJO, C. Rooting of Brazilian-lavender cuttings. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 726-729, 2009.

MOYSES, C. R. S. et al. Ectocommensal and ectoparasites in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) in farmed in the State of São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 283-289, 2015.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, p. 2047-2067, 2011.

NAYLOR, R. L. et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v.405, p. 1017-1024, 2000.

NEWAJ-FYZUL, A.; AUSTIN, B. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. **Journal Fish and Diseases**, v. 38, p. 937-955, 2015.

NOVAES, A. C.; ANDRADE E SILVA, M. L.; BASTOS, J. K. Avaliação da atividade analgesica do extrato hidroalcoólico das cascas de *Nectandra megapota mica*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, p. 17-19, 1998.

OIDTMANN, B. et al. Risk-based methods for fish and terrestrial animal disease surveillance. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, p. 13-26, 2013.

OIE. **Manual of diagnostic tests for aquatic animals**. Chapter 2.3.3. — Gyrodactylosis (*Gyrodactylus salaris*), p. 290-299, 2012.

OLUSOLA, S. E.; EMIKPE, B. O.; OLAIFA, F. E. The potentials of medicinal plants extracts as bio-antimicrobial in aquaculture. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, p. 404-412, 2013.

PÁDUA, S. B. et al. Ictiofitiríase: conhecendo a doença para elaborar estratégias de controle. **Panorama da Aquicultura**, v. 3, p. 22-31, 2012.

PAHOR-FILHO, E.; MIRANDA-FILHO, K. C.; PEREIRA-JÚNIOR, J. Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host. **Aquaculture**, v. 354-355, p. 111-116, 2012.

PALLADINI, G. **Aspects of systematics and host specificity for Gyrodactylus species in aquaculture**. 2012. 235 f. Tese. University of Stirling, Scotland, 2012.

PALLADINI, G. et al. *Gyrodactylus salinae* n. sp. (Platyhelminthes: Monogenea) infecting the south European tooth carp *Aphanius fasciatus* (Valenciennes) (Teleostei, Cyprinodontidae) from a hypersaline environment in Italy. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1-12, 2011.

PAULI, A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 11, p. 126-133, 2001.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes**. 2. ed. Maringá: Eduem. 2002. 305 p.

PEDROSA, R. C. et al. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

PEELER, E. et al. An assessment of the risk of spreading the fish parasite *Gyrodactylus salaris* to uninfected territories in the European Union with the movement of live Atlantic salmon (*Salmo salar*) from coastal waters. **Aquaculture**, v. 258, p. 187-197, 2006.

PETTERSEN, R. A. et al. Osmoregulatory disturbances in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., caused by the monogenean *Gyrodactylus salaris*. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p. 67-70, 2013.

PICÓN-CAMACHO, S. M. et al. 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, 2012a.

PICÓN-CAMACHO, S. M. et al. Effects of long duration, low dose bronopol exposure on the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), parasitising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 237-244, 2012b.

PINTO, J. E. B. P. et al. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 25, p. 210-214, 2007.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

POLÉO, A. B. S. et al. The effect of various metals on *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Parasitology**, v. 128, p. 169-177, 2004.

PONCE, A. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensmittel-Wissenschaft -Technologie**, v. 36, p. 679-684, 2003.

PONCI, V. et al. Neolignans from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) display *in vitro* cytotoxic activity and induce apoptosis in leukemia cells. **Molecules**, v. 20, p. 12757-12768, 2015.

POPAZOGLO, F.; BOEGER, W. A. Neotropical Monogenoidea 37. Redescription of *Gyrodactylus superbus* (Szidat, 1973) comb. n. and description of two new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) from *Corydoras paleatus* and *C. ehrhardti* (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) of Southern Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 47, p. 105-110, 2000.

POPOVIĆ, V. et al. Essential oil from the underground parts of *Laserpitium zernyi*: potential source of alpha-bisabolol and its antimicrobial activity. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 307-310, 2010.

POULIN, R. The evolution of monogenean diversity. **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 245-254, 2002.

PREIN, M. et al. **Organic aquaculture: the future of expanding niche markets**. FAO, Rome and NACA, Bangkok. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e04c.pdf>>. Acesso em: 03 Dez. 2015.

QUESADA, S. P.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones - a review. **Journal of Food Science**, v. 78, p. 1321-1333, 2013.

QUINET, A. et al. **Lauraceae**. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8428>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

RACH, J. J. et al. Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatcheryreared fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 12, p. 267-273, 2000.

RAMOINO, P. et al. Gamma-amino butyric acid (GABA) release in the ciliated protozoon *Paramecium* occurs by neuronal-like exocytosis. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 1251-1258, 2010.

RAMOINO, P. et al. GABA_A receptor subunits identified in *Paramecium* by immunofluorescence confocal microscopy. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 449-453, 2004.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001.

REIMSCHUESSEL, R.; GIESEKER, C.; POYNTON, S. *In vitro* effect of seven antiparasitics on *Acolpenteron ureteroecetes* (Dactylogyridae) from largemouth bass

Micropterus salmoides (Centrarchidae). **Diseases of Aquatic Organism**, v. 94, p. 59-72, 2011.

REVERTER, M. et al. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50-61, 2014.

REW, R. S. Mode of action of common anthelmintics. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 1, p. 183-197, 1978.

RIBEIRO, A. B. et al. A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 526-530, 2005.

RIBEIRO, A. B.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Antioxidant flavonol glycosides from *Nectandra grandiflora* (Lauraceae). **Eclética Química**, v. 27, p. 35-44, 2002.

RICCIARDI, G. A. L. et al. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 698-703, 2006.

RICCO, R. A. et al. Survey on polyphenols, antioxidant activity and genotoxicity on argentinean species of *Lippia* and *Aloysia* (Verbenaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, p. 388-396, 2010.

RINTAMÄKI-KINNUNEN, P. et al. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. 1. Concrete tanks at salmonid farms. **Diseases of Aquatic Organism**, v. 64, p. 69-76, 2005a.

RINTAMÄKI-KINNUNEN, P. et al. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. 2. Earth ponds at salmonid farms. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 66, p. 15-20, 2005b.

RODRIGUES, P. et al. Óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez: composição e avaliação da indução de anestesia em juvenis de jundiá. In: 30ª Jornada Acadêmica Integrada, 2015, Santa Maria. **Anais da 30ª Jornada Acadêmica Integrada**, 2015. Santa Maria: UFSM. Disponível em: <https://portal.ufsm.br/jai/anais/trabalho.html?action=anais>. Acesso em: 05 dez 2015.

ROMOFF, P. et al. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). **Química Nova**, v. 33, p. 1119-1121, 2010.

ROWLAND, S. J. et al. Use of formalin and copper to control ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). **Aquaculture Research**, v. 40, p. 44-54, 2009.

SALA-VILLA, A.; CALDER, P.C. Update on the relationship of fish intake with prostate, breast, and colorectal cancers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 855-871, 2011.

SALIFOGLU, A. Synthetic and structural carboxylate chemistry of neurotoxic aluminum in relevance to human diseases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, p. 297-317, 2002.

SALINEMA, F. R. G. et al. Verbenaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB015126>>. Acesso em: 17 mai. 2012.

SANTAMARINA, M. T. et al. Anthelmintic treatment against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 10, p. 39-44, 1991.

SANTOS FILHO, D.; GILBERT, B. The alkaloids of *Nectandra megapotamica*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 821-822, 1975.

SANTOS, F. M. et al. *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. seedling production through sexual and asexual propagation. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, p. 130-136, 2009.

SANTOS, F. M. et al. Characterization of essential oil and effects on growth of *Verbena gratissima* plants treated with homeopathic phosphorus. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 1499-1504, 2011.

SANTOS, F. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, p. 583-588, 2013.

SANTOS, T. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) leaf essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, p. 1-6, 2015.

SCHELKLE B. et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of garlic compounds against *Gyrodactylus turnbulli* infecting the guppy (*Poecilia reticulata*). **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 96-101, 2013.

SCHELKLE B. et al. Treatment of gyrodactylid infections in fish. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 86, p. 65-75, 2009.

SCHELKLE, B. et al. Efficacy of commercially available products against *Gyrodactylus turnbulli* infections on guppies *Poecilia reticulata*. **Diseases of Aquatic Organism**, v. 115, p. 129-137, 2015.

SCHELKLE, B.; DOETJES, R.; CABLE, J. The salt myth revealed: Treatment of gyrodactylid infections on ornamental guppies, *Poecilia reticulata*. **Aquaculture**, v. 311, p. 74-79, 2011.

SCHMIDT, A. S. et al. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4908-4915, 2000.

SCHOLZ, T. Parasites in feral and cultured fish. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 317-355, 1999.

SERENO, D. et al. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, v.56, p. 3-7, 2007.

SHINN, A. P. et al. Mechanical control of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora) in a rainbow trout hatchery. **Aquaculture Engineering**, v. 41, p. 152-157, 2009.

SHINN, A. P. et al. The anti-protozoal activity of bronopol on the key life-stages of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora). **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 229-236, 2012.

SHINN, A. P.; TAYLOR, N.; WOOTTEN, R. Development of a management system for the control of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Trout News**, v. 40, p. 21-25, 2005.

SILVA FILHO, A. A. et al. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1179-1184, 2004b.

SILVA FILHO, A. A. et al. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 42-45, 2004a.

SILVA FILHO, A. A. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1307-1310, 2008.

SILVA, A. P. da et al. Antitumor activity of (-)- α -bisabolol based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2987-2993, 2010.

SILVA, C. C. et al. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 593-595, 2006.

SILVA, D. C. M. N. et al. Chemical composition and biological activity of natural extracts obtained from a Brazilian aromatic plant (*Aloysia gratissima*) by supercritical CO₂ and hydrodistillation. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 1, p. 172-178, 2007.

SILVA, D. T. et al. Análise do efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* Nees. **Revista Árvore**, v. 39, p. 1065-1072, 2015.

SILVA, D. T. et al. Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 10, p. 1713-1720, 2014.

SILVA, D. T. **Óleos essenciais de *Nectandra grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: rendimento, composição química e atividades biológicas**. 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

SIMIC, A. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 713-717, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. p. 537-556.

SKUCE, P. J.; FAIRWEATHER, I. The effect of the hydrogen ionophore closantel upon the pharmacology and ultrastructure of the adult liver fluke *Fasciola hepatica*. **Parasitology Research**, v. 76, p. 241-250, 1990.

SLISH, D. F. et al. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 159-165, 1999.

SMITH, T. A. Tryptamine and related compounds in plants. **Phytochemistry**, v. 16, p. 171-175, 1977.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, v. 452, p. 107-114, 2016.

SOLENG, A. Aqueous aluminium eliminates *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon. **Parasitology**, v. 119, p. 19-25, 1999.

SOLER, E. et al. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1343-1345, 1986.

SOMMERSET, I. et al. Vaccines for fish in aquaculture. **Expert Reviews of Vaccines**, v. 4, p. 89-101, 2005.

SONG, K. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of antiprotozoal compounds isolated from *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in fish. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, p. 58-64, 2015.

SOUZA, A. A.; WIEST, J. M. Atividade anti-bacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 23-29, 2007.

SRIVASTAVA, S. et al. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 319-329, 2004.

STEVERDING, D. et al. Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 66, p. 29-32, 2005.

STRAUS, D. L.; HOSSAIN, M. M.; CLARK, T. G. Strain differences in *Ichthyophthirius multifiliis* to copper toxicity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 83, p. 31-36, 2009.

STRAUS, D. L.; GRIFFIN, B. R. Efficacy of potassium permanganate in treating ichthyophthiriasis in channel catfish. **The Journal of Aquatic Animal Health**, v. 14, p. 145-148, 2002.

STRAUS, D. T.; MEINELT, T. Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1237-1241, 2009.

SUDOVÁ, E. et al. Evaluation of continuous 4-day exposure to peracetic acid as a treatment for *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology Research**, v. 106, p. 539-542, 2010.

SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 99-102, 2006.

TAVECHIO, W. L. G. et al. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 35, p. 335-341, 2009.

TOJO, J. et al. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 12, p. 185-189, 1992.

TOJO, J. L.; SANTAMARINA, M. T. Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* II: *Gyrodactylus* sp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 33, p. 187-193, 1998.

TOKŞEN, E.; NEMLI, E. Oral treatment trials on telescope fish (*Carassius auratus*) experimentally infected with *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876). **Bulletin of European Association of Fish Pathologists**, v. 30, p. 48-52, 2010.

TONDOLO, J. S. M et al. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 667-674, 2013.

TONDOLO, J. S. M. **Atividade anestésica em robalos-peva (*Centropomus parallelus*) e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae)**. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

TONINI, H.; FINGER, C. A. G.; SCHNEIDER, P. R. O crescimento da *Nectandra megapotamica* Mez., em floresta nativa na depressão central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 33, p. 85-90, 2003.

TORRES, F. C. et al. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* venom. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, p. 325-326, 2014.

TRAILOVIĆ, S. M. et al. Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. **Parasitology Research**, v. 114, p. 3059-3068, 2015.

TROELL, M. et al. Does aquaculture add resilience to the global food system? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. 13257-13263, 2014.

TROPICOS. ORG. **Missouri Botanical Garden: *Nectandra megapotamica***. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/17801556?tab=synonyms>>. Acesso em: 14 mai. 2012.

TROVATI, G. et al. Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 325-326, 2009a.

TROVATI, G. et al. TLC Separation and identification of the essential oil constituents from *Aloysia gratissima*. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, p. 890-895, 2009b.

TU, X. et al. Anthelmintic efficacy of *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2839–2845, 2013.

TURINA, A. V. et al. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101–113, 2006.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99-105, 2006.

VALLADÃO, G. M. R. et al. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Fish Diseases**, 2016. No prelo.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, p. 417-428, 2015.

VAN OOSTERHOUT, C.; HARRIS, P. D.; CABLE, J. Marked variation in parasite resistance between two wild populations of the Trinidadian guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 79, p. 645-651, 2003.

VANDRESEN, F. et al. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 317-321, 2010.

VASEEHARAN, B.; THAYA, R. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 22, p. 1079-1091, 2014.

VIANNA, R. T. **Filogenia e biogeografia histórica dos Gyrodactylidae (Monogenoidea)**: morfologia, moléculas e evidência total. 2007. 271 f. Tese (Doutorado em Ciências área de concentração Zoologia)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

VIEIRA, R.; MÍGUEZ, J. M.; ALDEGUNDE, M. GABA modulates day–night variation in melatonin levels in the cerebral ganglia of the damselfly *Ischnura graellsii* and the grasshopper *Oedipoda caerulea*. **Neuroscience Letters**, v. 376, p. 111-115, 2005.

VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p.540–544, 2007.

VAN VUUREN, S. F. et al. Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 686-691, 2010.

WAGNER, E. et al. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, p. 353-366, 2002.

WEI, J. Z. et al. Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 91-101, 2013.

WERFF, H. et al. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, p. 419-432, 1996.

WHITTINGTON, I. D.; CHISHOLM, L. A. Diseases caused by Monogenea. In: EIRAS, J. C.; SEGNER, H.; WAHLI, T.; KAPOOR, B.G. (Editors). **Fish Diseases**. Jodhpur: Science Publishers, 2008. cap.13, p. 683-816.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International Agency for Research on Cancer. **Formaldehyde, 2- butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan- 2-ol**. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. v. 88, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2006.

WU, Y.; JANETOPOULOS, C. Systematic analysis of γ -aminobutyric acid (GABA) metabolism and function in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 15280–15290, 2013.

XIAO-FENG, S. et al. Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). **Veterinary Parasitology**, v. 199, p. 250-254, 2014.

YAO, J. et al. Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*). **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 8-13, 2011.

YAO, J. et al. Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Parasitology Research**, v. 107, p. 1035-1042, 2010.

YI, Y. et al. Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology Research**, v. 111, p. 1771-1778, 2012.

ZANIBONI FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. editors. **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: EdUFSC. 2004. p. 337-369.

ZENI, A. L. B. et al. Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 864-874, 2011.

ZENI, A. L. B. et al. Evidence of the involvement of the monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Aloysia gratissima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 914-920, 2013a.

ZENI, A. L. B. et al. Phytochemical profile, toxicity and antioxidant activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 36, p. 69-73, 2013b.

ZHANG, Q. et al. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, p. 45-53, 2013.

ZHENG, W. et al. Antiparasitic efficacy of gracillin and zingiberensis new saponin from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology**, v. 142, p. 473-479, 2015.

ZIĘTARA, M. S.; LUMME, J. Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). **Evolution**, v. 56, p. 2445-2458, 2002.

ANEXO**ANEXO A – DESCRIÇÃO DE *Gyrodactylus lilianae* n. sp.**

Neotropical Monogenoidea xx: *Gyrodactylus liliane* n. sp. (Polyonchoinea, Gyrodactylidae) from *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from Southern Brazil: a potential nuisance for aquaculture

Walter A Boeger¹, Emanuel Razzolini¹, Anelise Levay Murari², Bernardo Baldisserotto²

¹Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil;

²Laboratório de Fisiologia de Peixes, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

Running head:

Address for correspondence: W. A. Boeger, Caixa Postal 19073, Curitiba, PR 81531-890, Brazil. Phone/FAX: +55-41-33611765; E-mail: wboeger@gmail.com

Abstracts

Monogeneans are sea- and freshwater fish parasites that cause great economic losses to fish production systems worldwide. Present study describes a new species, *Gyrodactylus lilianae*

n. sp, whose host is the silver catfish, *Rhamdia quelen*, and is a potential nuisance for Neotropical fish culture.

Key words: Fish disease; Parasitism; Platyhelminthes; Species description.

Introduction

Parasitism is a source of mortality in the environment (DARGENT et al. 2013). Gyrodactylid monogeneans are highly pathogenic. Adult worms give birth to single fully-grown off spring that contains a developing embryo in the utero (CABLE & HARRIS 2002). The parasite *Scleroductus* sp., from this family, was reported in some rivers (KRITSKY et al. 1995, 2013, FERRARI-HOEINGHAUS et al. 2006) and fish cultures (FIGUEREDO et al. 2014) in Brazil. *Gyrodactylus* species are found worldwide and may parasitize the gills and body surface of marine and freshwater fish both in the environment and in captivity (POPAZOGLO & BOEGER 2000, POULIN 2002, ZIETARA & LUMME 2002, MEINILÄ et al. 2004). Twelve species of *Gyrodactylus* were described from African Siluriformes (PRIKRYLOVÁ et al. 2012). The lesions caused by the parasite adhesion makes the host more susceptible to infections caused by bacteria, fungi and other parasites, and consequently can reduce yield from fish culture (COLLINS et al. 2002, MARTINS et al. 2011, PETTERSEN et al. 2013).

Silver catfish (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) is distributed from central Argentina to southern Mexico and is the main native species raised in southern Brazil (BALDISSEROTTO 2009). The aim of the present study is to describe a new species, *Gyrodactylus lilianae* n. sp., which infest juvenile silver catfish. This is the first report of the genera *Gyrodactylus* parasitizing *Rhamdia quelen*, and consequently characteristics of its epizooty are not known.

MATERIALS AND METHODS

Juvenile silver catfish both sexes (3.54 ± 0.62 g and 7.37 ± 0.73 cm) were kindly provided by fish culture Barragem do Chasqueiro, $32^{\circ} 09' 788''$ S e $53^{\circ} 09' 960''$ Pelotas, Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil. Fish were transported to the Fish Physiology laboratory at the Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil) where they were maintained in a continuously aerated 250 L tank, at a stocking density of 200 juveniles/tank (two replicates), $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 6.7-7.6, dissolved oxygen levels $6.4\text{-}7.2\text{mg L}^{-1}$. Dissolved oxygen and temperature were measured with an YSI oxygen meter (Model Y5512). The pH was determined with DMPH-2 pH meter (Digimed). Fish were fed once a day with commercially available food (42 % crude protein) and at this moment feeding behavior (feeding or not) and swimming (normal, erratic swimming, lethargy) were observed for 30 min. Mortality was evaluated through the first 30 days according to BUSH et al. (1997) and the prevalence and intensity of parasitism was determined in all fish at the end of the experiment with a stereomicroscope (10 X).

After the onset of mortality five live fish were collected, placed immediately in hot water (about 65°C) and euthanized by section of the spinal cord. The parasites were processed following EIRAS et al. (2000) and MARTINS (2007): specimens were immediately preserved either in ethanol (70–80%) or 5% formalin for subsequent processing. After, parasites were collected from the sediment using a small probe under a dissecting microscope. Gills were removed from the fish, shaken and parasites were collected as described above. Some specimens were stained with Gomori's trichrome and mounted in Canada balsam for study of their soft anatomy; other specimens were cleared and mounted in Hoyer's or Gray and Wess' media for study of their sclerotized structures (all solutions prepared as in HUMASON 1979). Illustrations were prepared with the aid of a camera lucida on an Olympus

BX51 microscope equipped with phase contrast. Measurements were made following KRITSKY et al. (1995): body length includes that of the haptor (longitudinal axis of haptor added to that of body). Haptoral terminology is that provided by MIZELLE & KRITSKY (1967) and KRITSKY & MIZELLE (1968). The number of parasites was determined with the assistance of a stereomicroscope (total magnification 10×). The prevalence and mean intensity were calculated according to BUSH et al. (1997). Dead fish were counted to calculate mortality and removed from the tank throughout the experimental period.

Individual specimens, preserved in ethanol, were placed in glycerine on a microscope slide and the haptoral extremity was cut with a fine blade. The haptoral portion was mounted in Hoyer mounting medium (HUMASON 1979) for species identification and to serve as vouchers. DNA was extracted from the anterior portion of the worm using the DNAEasy tissue kit (Qiagen). The primers ITS1 (5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3') and ITS2 (5'-TCCTCCGCTTAGTGATA-3'), of CUNNINGHAM (1997), were used to amplify and sequence the fragments ITS1, 5.8S and ITS 2. The polymerase chain reaction (PCR) was performed with the following program: initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 40 cycles as follows: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 50 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and final extension 72 °C. PCR was achieved in 25 µL containing 10–30 ng of template DNA, 3 mM MgCl₂, 1× PCR-Buffer (Invitrogen), 0.5 pmoles of each primer, 0.4 mM dNTP, and 1U Platinum Taq polymerase (Invitrogen) in a total volume of 25 µL. Confirmation of the amplification of the fragments by PCR was achieved through electrophoresis in a 1.5% agarose gel, subsequent staining in ethidium bromide and visualization under UV light. Amplicons were purified using the MinElute Purification kit (Qiagen). Sequences were obtained with the BigDye 3.1 chemistry in the 3130 DNA Analyser with the same program and primers used during amplification. Sequences were edited using Geneious 5.0.4 (created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>).

Alignment of the sequences was obtained using the algorithm MUSCLE (EDGAR 2004) within Geneious 5.0.4. Distance analysis (Neighbor Joining) was performed with the software MEGA version 5 (TAMURA et al. 2011) using the model Maximum Composite Likelihood (NEI & KUMAR 2004) removing ambiguous positions for each sequence pair and bootstrap support of 1000 repetitions. Sequences included in the distance analysis were the sequences produced in this study, sequences of Neotropical and non-Neotropical species that systematically clustered together in the distance analysis of NCBI-BLAST (ALTSCHUL et al. 1997). Further, sequences of arbitrarily chosen Neotropical species and sequences of other non-Neotropical species presenting morphological similarity to the new species were selected from GENBANK (Table 1). The resulting phylogram from the neighbor-joining analysis is intended to represent intra- and interspecific distances but not phylogenetic relationships. This decision is based on the fact that, among other things, alignment of fragments of ITS 1 and ITS 2 is often difficult due to abundant indel regions (see ÁLVAREZ & WENDEL 2003). Thus, except for the included 5.8S rDNA region, this fragment has limited reliability in phylogenetic reconstructions without consideration of homologies of its secondary structure among included taxa (COLEMAN 2007), especially if distant taxa are considered.

Type specimens and vouchers were deposited in United States National Parasite Collection (USNPC), Beltsville, USA; the University of Nebraska State Museum, Harold W. Manter Laboratory (HWML), Lincoln, USA; the Helminthological Collection of the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic (IPCAS), and the Parasitological Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (IOC), as indicated in the respective species accounts.

During the experiment, fish presented ulcerative lesions on the skin and a possible concomitant bacterial infection was evaluated. The bacterial isolation was made from lesions

and kidneys of three fish. Morphological and biochemical characteristics were analyzed according to QUINN (1994) for bacterial identification and characterization.

RESULTS

Class Monogenoidea Bychowsky, 1937

Subclass Polyonchoinea Bychowsky, 1937

Order Gyrodactylidea Bychowsky, 1937

Gyrodactylidae van Beneden et Hesse, 1863

Gyrodactylus lilianae n. sp.

(Figs 1-5)

Measurements in micrometres (μm) and angles in degrees ($^\circ$); average \pm standard deviation, followed by range and number of measurements in parentheses.

Description (based on 52 specimens): fusiform body, 389 ± 48.8 ($n = 27$) long and 92 ± 13.2 ($n = 27$) wide. Cephalic glands, head organs, spike sensilla conspicuous. Cephalic glands anterolateral, lateral, posterolateral to pharynx. Excretory vesicles, pores posterolateral to oesophagus. Pharynx composed of two tandem bulbs; distal pharyngeal bulb muscular 33.5 ± 4.2 ($n = 26$) wide; digitiform projections of distal pharyngeal bulb not observed; proximal pharyngeal bulb glandular 36.5 ± 5.6 ($n = 26$) wide. Two caecae, non-confluent. Male copulatory organ 17.3 ($n = 11$) wide, armed with one spine, one row of 5 spinelets, row of 5 intermediary smaller spinelets; spinelets similar in shape and size, each with wide, ovate base. Testis ovate ($n = \text{xx}$ sem dado) wide, posterior to germarium. Germarium ovate, 30 ± 4.6 ($24.3-35.9$; $n = 20$) long, 40.5 ± 7.9 ($28.2-60.7$; $n = 20$) wide. Uterus with up to two generations of embryos. Large reservoir-like, elongate structures lateral to distal end of each

intestinal caecum. Anchor 74.2 ± 4.5 (65.6–82.5; n = 22) long; shaft straight, recurved point xx (xx–xx; n = xx sem dado); deep root poorly developed, knob like; superficial root elongate, slightly tapering distally. Superficial bar 27.4 ± 2.6 (23.8–31.7; n = xx) long, xx (xx–xx; n = x) wide, with two robust, anterolateral projections absent; shield elongate, subrectangular, striated. Deep bar with no constriction or enlargements, attached to deep root of both anchors. Hooks 16 (8 pairs) evenly distributed around haptor, except anteriorly; hooklet with straight shaft, point recurved; heel convex, depressed; toe slightly pointed, erected; shelf convex; shank long, slightly bulbous distally; hook 30.5 ± 3.5 (33.7–24.5; n = 16) long; hooklet 10.5 ± 0.5 (9.3–11; n = 16) long; FH loop about half shaft length.

Type host: *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

Site of infection: Body surface, gills, fins and barbels.

Type locality and date of collections: Pelotas, Rio Grande do Sul state, Brazil

Specimens studied: Holotype (IOC xxxxx), x paratypes (HWML xxx; IOC xxxx; IPCAS M-xxx; USNPC xx); vouchers (n = xx): HWML xxx; USNPC xx.

Etymology: The species is named after Lilian Fatima Reiche Levay, mother of one of the authors (ALM), a science teacher for over 40 years, as homage to all basic education teachers, fundamental to the formation of responsible citizens, some of which become scientists.

Juveniles parasitized with *G. lilianae* did not feed, swam near the aerator and/or water surface and collisions with the tank walls. A large amount of mucous was observed in the tank walls. Fish also showed decreased length or absence of barbells, lesions or total destruction of the fins, necrotic regions on the head, oral cavity and/or tail fin, loss of pigmentation and skin. All fish were parasitized with *G. lilianae* and those with a high intensity (1000 - 2500 parasites/fish) died. Mortality was 36.5 % at the end of 30 days. There was no mortality in the control group.

Table 1. Cumulative mortality of juveniles of *Rhamdia quelen* parasitized with *Gyrodactylus lilianae* (mean \pm standard deviation).

| Days | Mortality (%) |
|------|------------------|
| 9 | 11.75 \pm 1.77 |
| 10 | 15.75 \pm 0.35 |
| 11 | 16.00 \pm 0.71 |
| 16 | 18.25 \pm 1.77 |
| 18 | 19.25 \pm 2.47 |
| 21 | 19.75 \pm 3.18 |
| 23 | 21.25 \pm 1.77 |
| 24 | 27.25 \pm 1.77 |
| 25 | 28.25 \pm 2.47 |
| 26 | 28.75 \pm 2.47 |
| 27 | 29.75 \pm 1.77 |
| 28 | 31.5 \pm 1.41 |
| 29 | 35.25 \pm 0.35 |
| 30 | 36.5 \pm 0.71 |

The occurrence of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) (besides *G. lilianae*) was observed from the day 37. Bacterial analysis did not identified *A. hydrophila* in the lesions at day 56. This bacterium was detected only after 74 days of experiment.

Remarks

We present the descriptions of one new species of gyrodactylids parasitizing silver catfish hosts: *Gyrodactylus lilianae* n. sp.

DISCUSSION

The specimens of *G. lilianae* were found around all body surface, fins and barbels of silver catfish. *Gyrodactylus* spp that infected African clarid fish usually can be found in one specific part of the body, as fins or barbels (PŘIKRYLOVÁ et al. 2012). Another species, *Gyrodactylus patersoni* (KING, BENTZEN, CONE 2014) was found in the gills arches and rakers of Atlantic silverside (*Menidia menidia*, Linnaeus, 1766) (KING et al. 2014). Cage cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) raised in southeastern Brazil presented *Gyrodactylus* sp only in the body surface (ZAGO et al. 2014). High mucous production observed in fish with the gills parasitized with Gyrodactilidae, impairs respiration (BUCHMANN & LINDENSTRØN 2002). This is in accordance with juveniles of *R. quelen* parasitized with *G. lilianae* swimming near aerators or water surface.

The infestation of silver catfish by *G. lilianae* provoked lesions in the fins and skin, increased mucous production and fish did not feed. These results are in accordance with was observed in other fish species parasitized by this genera (VAN OOSTERHOUT et al. 2003, OIE 2012,). Fish with low intensity of monogenean infestation can show inflammatory reaction and epithelial cell hyperplasia, but those highly parasitized may present excessive hyperplasia, edema, necrotic regions, gill hemorrhage and mortality (MARTINS et al. 2000). Large infestation of *Gyrodactylus salaris* (Malmberg, 1956) (almost 3000 per fish) caused extensive damage to the epidermis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, Linnaeus, 1758), leading to an ionoregulatory failure that may provoke death (PETTERSEN et al. 2013). The presence of 100-450 specimens of *Gyrodactylus kobayashii* (Hukuda, 1940) was the primary reason for

around 80% mortality in goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), transferred from a fish pond from central China to laboratory aquaria (TU et al. 2015).

This is the first report of gyrodactilosis in silver catfish and demonstrated that it caused lesions that may provoke mortality and led to secondary infections by *I. multifiliis* and *A. hydrophila*.

LITERATURE CITED

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** **25**(17): 3389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389

ÁLVAREZ I, WENDEL JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **29**(3): 417-434. doi:10.1016/S1055-7903(03)00208-2

BALDISSEROTTO, B (2009) Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural** **39**(1): 291-299. doi:10.1590/S0103-84782008005000046

BUCHMANN K, LINDENSTRØM T (2002) Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology* **32**(3): 309-319. doi. org/10.1016/S0020-7519(01)00332-0. PMID:11835971

BUSH AO, LAFFERTY KD, LOTZ JM, SHOSTAK AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology** **83**(4), 575-583 doi: 10.2307/3284227

CABLE J, HARRIS PD (2002) Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. Invited Review. **International Journal for Parasitology** **32**(3): 255-280. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00330-7

COLEMAN AW (2007) Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. **Nucleic Acids Research** **35**(10): 3322-3329. doi: 10.1093/nar/gkm233

COLLINS CM, MO TA, BUCHMANN K, CUNNINGHAM CO (2002) Diagnosis of *Gyrodactylus* (MONOGENEA; PLATYHELMINTHES) infecting salmonid fish in northern Europe. **Fisheries Research Services** **07**(02): 1-69.

CUNNINGHAM CO (1997) Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. **Journal of Parasitology** **83**(2): 215-219. doi: 10.2307/3284442

DARGENT F J, SCOTT ME, RAMNARINE I, FUSSMANN GF (2013) Can mixed-species groups reduce individual parasite load? A field test with two closely related Poeciliid fishes (*Poecilia reticulata* and *Poecilia picta*). **PLoS ONE** **8** (2): e56789. doi: 10.1371/journal.pone.0056789.

EDGAR RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research** **32**(5):1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340

EIRAS JC, TAKEMOTO RM, PAVANELLI GC (2000) **Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**. Maringá, Ed. EDUEM, 171p.

FERRARI-HOEINGHAUS AP, TAKEMOTO RM, OLIVEIRA LC, MAKRAKIS MC, BAUMGARTNER G (2006) Host-parasite relationships of monogeneans in gills of *Astyanax altiparanae* and *Rhamdia quelen* of the São Francisco Verdadeiro River, Brazil. **Parasite** **13**(4), 315-320. doi: <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2006134315>

FIGUEREDO AB, TANCREDO KR, HASHIMOTO GSO, ROUMBEDAKIS K, MARCHIORI, NC, MARTINS ML (2014) Haematological and parasitological assessment of silver catfish *Rhamdia quelen* farmed in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** **23**(2), 157-163. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014028>

HUMASON, L (1979) *Animal Tissue Techniques*. WH Freeman and Company, 4th ed. San Francisco, 661p.

KING SD, BENTZEN P, CONE DK (2014) *Gyrodactylus patersoni* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) infecting Atlantic silverside (*Menidia menidia*) from Nova Scotia, Canada. **Comparative Parasitology** **81**(1): 27-32. doi: <http://dx.doi.org/10.1654/4647.1>

KRITSKY DC, BOEGER WA, MENDOZA-FRANCO EF, VIANNA RT (2013) Neotropical Monogenoidea. 57. Revision and phylogenetic position of *Scleroductus* Jara & Cone, 1989 (Gyrodactylidae), with descriptions of new species from the Guatemalan chulin *Rhamdia guatemalensis* (Günther) (Siluriformes: Heptapteridae) in Mexico and the barred sorubim *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus) (Siluriformes: Pimelodidae) in Brazil. **Systematic Parasitology** **84**(1) 1-15. doi: 10.1007/s11230-012-9387-2

KRITSKY DC, BOEGER WA, POPAZOGLO F (1995) Neotropical Monogenoidea. 22. Variation in *Scleroductus* species (Gyrodactylidae, Gyrodactylidae) from siluriform fishes of southeastern Brazil. **Journal of the Helminthological Society of Washington** **62**(1): 53-56.

KRITSKY DC, MIZELLE JD (1968) Studies on Monogenetic Trematodes. XXXV. Some New and Previously Described North American Species of *s*. **The American Midland Naturalist** **79**(1):205-215. doi: 10.2307/2423166

MARTINS ML, MORAES FR, FUJIMOTO RY, ONAKA EM, NOMURA DT, SILVA CAH, SCHALCH SHC (2000) Parasitic infections in cultivated freshwater fishes: a survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** **9**(1): 23-28.

MARTINS ML, SHOEMAKER CA, XU D, KLESIUS PH (2011) Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. **Aquaculture** **314**(1-4): 18-23. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.01.022

MEINILÄ M, KUUSELA J, ZIETARA MS, LUMME J (2004) Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). **International Journal for Parasitology** **34**(4): 515-526. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.12.002.

MIZELLE JD, KRITSKY DC (1967) Studies on Monogenetic Trematodes. XXXIII. New Species of *Gyrodactylus* and a Key to the North American Species. **Transactions of the American Microscopical Society** **86**(4):390-401. DOI: 10.2307/3224260

MIZELLE JD, KRITSKY DC (1967) Studies on Monogenetic Trematodes. XXX. Five New Species of *Gyrodactylus* from the Pacific Tomcod, *Microgadus proximus* (Girard). **The Journal of Parasitology** **53**(2): 263-269. DOI: 10.2307/3276572

OIE (2012) **Manual of diagnostic tests for aquatic animals**. Chapter 2.3.3. — Gyrodactylosis (*Gyrodactylus salaris*), p. 290-299.

PETTERSEN RA, HYTTERØD S, VØLLESTAD LA, MO, TA (2013) Osmoregulatory disturbances in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., caused by the monogenean *Gyrodactylus salaris*. **Journal of Fish Diseases** **36**(1): 67-70. doi: 10.1111/j.1365-2761.2012.01441.x

POPAZOGLO F, BOEGER WA (2000) Neotropical Monogenoidea 37. Redescription of *Gyrodactylus superbis* (Szidat, 1973) comb. n. and description of two new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) from *Corydoras paleatus* and *C. ehrhardti* (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) of Southern Brazil. **Folia Parasitologica** **47**(2): 105-110. doi: 10.14411/fp.2000.022

POULIN R (2002) The evolution of monogenean diversity. **International Journal of Parasitology** **32**(3): 245-254. doi:10.1016/S0020-7519(01)00329-0

PŘIKRYLOVÁ I, BLAŽEK L, VANHOVE MPM (2012) An overview of the *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) species parasitizing African catfishes, and their morphological and molecular diversity. **Parasitology Research** **110**(3):1185-1200. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00329-0

QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY BK, CARTER GR (Eds.) (1994) **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe Publishing, London, 648p.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution** **28**(10): 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121

TU X, LING F, HUANG A, WANG G (2015) An infection of *Gyrodactylus kobayashii* Hukuda, 1940 (Monogenea) associated with the mortality of goldfish (*Carassius auratus*) from central China. **Parasitology Research** **114**(2): 737-745. doi:10.1007/s00436-014-4241-x

VAN OOSTERHOUT C, HARRIS PD, CABLE J (2003) Marked variation in parasite resistance between two wild populations of the Trinidadian guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). **Biological Journal of the Linnean Society** **79**(646): 645-651. doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00203.x

ZIETARA MS, LUMME J (2002) Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). **Evolution** **56**(12): 2445-2458. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00170.x

ZAGO AC, FRANCESCHINI L, GARCIA F, SCHALCH SHC, GOZI KS, SILVA RJ (2014) Ectoparasites of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in cage farming in a hydroelectric reservoir in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** **23**(2): 171-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014041>

Legend to figures

Figures 1-5. *Gyrodactylus lilianae* n. sp. from *Rhamdia quelen*. Fig. 1. Holotype (ventral).
 Fig. 2. Male copulatory organ. Fig. 3. Haptor (ventral). Fig. 4. Hook. Fig. 5. Anchor. Scales....
 Figure 6. Phylogram.....

