



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical

Mestrado e Doutorado

UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil

ANAI PAOLA PRISSILLA GONZALES FLORES

**AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon*
*citratu*s (POACEAE) EM PARASITOS MONOGENEAS DAS
BRÂNQUIAS DE *Colossoma macropomum* (SERASSALMIDAE)**

MACAPÁ, AP

2020

ANAI PAOLA PRISSILLA GONZALES FLORES

AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (POACEAE) EM PARASITOS MONOGENEAS DAS BRÂNQUIAS DE *Colossoma macropomum* (SERASSALMIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka

Co-Orientador: Dr. Marcos Tavares Dias

MACAPÁ, AP

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

Elaborada por Cristina Fernandes – CRB2/1569

Flores, Anai Paola Prissilla Gonzales.

Ação anti-helmíntica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (POACEAE) em parasitos monogeneas das brânquias de *Colossoma macropomum* (SERASSALMIDAE) / Anai Paola Prissilla Gonzales Flores, Orientadora, Eliane Tie Oba Yoshioka; Coorientador, Marcos Tavares Dias. – Macapá, 2020.

61 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Óleo essencial. 2. Parasitos. 3. Tambaqui (Peixe). I. Yoshioka, Eliane Tie Oba, orientadora. II. Dias, Marcos Tavares, coorientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

616.96 F634a

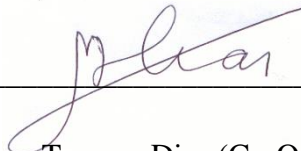
CDD. 22 ed.

ANAI PAOLA PRISSILLA GONZALES FLORES

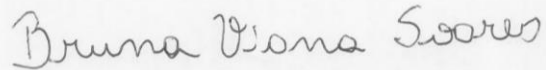
AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*
(POACEAE) EM PARASITOS MONOGENEAS DAS BRÂNQUIAS DE *Colossoma*
macropomum (SERASSALMIDAE)



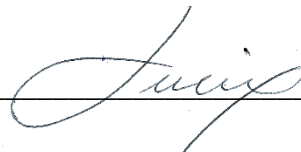
Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka (Orientador)
Embrapa Amapá/ PPGBIO



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



Dra. Bruna Viana Soares
Agência de defesa e inspeção Agropecuária do estado do Amapá-Diagro



Dr. Lucio André Viana Dias
UNIFAP/PPGBIO

Aprovada em 17 de fevereiro de 2020, Macapá, AP, Brasil

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus por me fortalecer através da fé em momentos difíceis. A minha mãe, meu pai e meus irmãos, por me propiciarem suporte emocional durante a minha estadia no Brasil. Também a minha maior gratidão ao Chris, pelo carinho e apoio durante estes dois anos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Marcos Tavares Dias, pela orientação, paciência e conhecimento concedido. Além disso, porque não me orientou apenas na vida acadêmica e sim por me dar lições de vida que estou muito segura que vou pôr em prática durante a minha vida em diante;

A professora Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka, por aceitar-me como orientadora e pela amizade durante esses dois anos da minha estadia no Brasil para a realização do mestrado.

A Embrapa Amapá, por propiciar a oportunidade para o desenvolvimento desta pesquisa de Mestrado.

Ao André do Centro de Microscopia Eletrônica EPM-UNIFESP, pela colaboração para o processamento de microscopia eletrônica de varredura das amostras de monogeneas.

Ao Roger Ferreira do Laboratório de Morfofisiologia e Sanidade de Organismos Aquáticos da Universidade Estadual do Amapá (UEAP), pelo suporte durante a elaboração das lâminas histológicas.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Nutrição (Yuri Furtado, Maria Ferreira, Crisziellem Cardoso, Alexandre Brasiliense, Tais Cantuária e Sheyla Souza Pereira) e Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (Marcos Sidney B. Oliveira, Ligia Rigôr, Dayna Malheiros e William F. Borges) da Embrapa Amapá, pela ajuda durante a realização da parte experimental do meu projeto de Mestrado e também pelas risadas.

Aos meus amigos que são presentes da vida: Jennyfer Zuñiga, Carlos Flores, Tony Noriega, Bayron Calle, Angelica Martinez, Natalia Montaña, Mayerli Saavedra e Iracy Maiany, muito obrigada por tudo.

A minhas tias, tios e primas por todo o apoio emocional e moral.

Muito obrigada!

PREFÁCIO

Esta dissertação está dividida em dois capítulos, seguindo o formato alternativo proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), que segue as normas do periódico Ecology, até as referências da introdução geral. O segundo capítulo, é o artigo intitulado “**Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) for monogenean parasites of the *Colossoma macropomum* gills (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects**”, que foi submetido ao periódico Aquaculture (Qualis A1).

RESUMO

Gonzales, Anai Paola Prissilla Flores. Ação anti-helmíntica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Poaceae) em monogeneas das brânquias de *Colossoma macropomum* (Serassalmidae). Macapá, 2020. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia anti-helmíntica do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon citratus* contra monogeneas das brânquias de *Colossoma macropomum* e determinar possíveis alterações histológicas e hematológicas nesse hospedeiro, após os banhos terapêuticos. Os componentes majoritários presentes no OE de *C. citratus* foram geranial (45.7%) e neral (33.9%). Para os ensaios *in vitro* foram testadas cinco concentrações de OE de *C. citratus* (100, 200, 300, 400 e 500 mg/L) e dois grupos controles (água do tanque do cultivo e água do tanque do cultivo + álcool 70%) colocados diretamente nos arcos das brânquias. As brânquias dos peixes estavam naturalmente parasitadas por monogeneas *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* e *Notozothecium janauachensis*. Nos ensaios *in vitro*, a eficácia foi dose-dependente e 500 mg/L de OE mostrou 100% de eficácia em 5 minutos de exposição, causando danos estruturais no tegumento dos parasitos. Ambos os grupos controles causaram 100% de mortalidade dos parasitos em 7 horas de exposição. Banhos terapêuticos de três dias seguidos usando 60 mg/L, a concentração tolerada pelos peixes, teve 47.1% de eficácia contra *A. spathulatus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis* e aumentou o nível de glicose e hemoglobina, bem como o número de trombócitos, monócitos e eosinófilos, e reduziu o número de leucócitos e linfócitos, quando comparados aos controles. A pesquisa mostrou que banhos terapêuticos com 60 mg/L de OE de *C. citratus* são seguros para controle e tratamento contra monogeneas de *C. macropomum*, *entretanto* deve ser usada exposição continuada por de 6 a 7 dias seguidos para aumentar a eficácia antiparasitária desse óleo.

Palavras chave: Fitoterapia; óleo essencial; parasitos; sangue; tratamento antiparasitário.

ABSTRACT

Gonzales, Anai Paola Prissilla Flores. Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) for monogenean parasites of the *Collossoma macropomum* gills (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. Macapá, 2020. Dissertation (Master in Tropical Biodiversity). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

The aim of this study was to evaluate the anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (EO) against *Collossoma macropomum* gill monogeneans and to determine the histological and hematological changes in this host after therapeutic baths. The major components present in the *C. citratus* EO were the geranial (45.7%) and neral (33.9%). For *in vitro* assays were tested five *C. citratus* EO concentrations (100, 200, 300, 400 and 500 mg/L) and two control groups (cultivation tank water and cultivation tank water + 70% alcohol) that were directly added in the arches of the fish gills. The gills were naturally parasitized by monogeneans *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* and *Notozothecium janauachensis*. In the *in vitro* trials, efficacy was dose dependent and 500 mg/L of EO showed 100% efficacy within 5 minutes of exposure, causing structural damage to tegument of parasites. Both control groups caused 100% parasite mortality within 7 h of exposure. Therapeutic baths with 60 mg/L of three days, the concentration tolerated by the fish, had 47.1% efficacy against *A. spathulatus*, *M. boegeri* and *N. janauachensis*, and increased glucose and hemoglobin levels, thrombocytes, monocytes and eosinophils number, and reduced leukocytes and lymphocytes number when compared to controls. We have shown that therapeutic baths with 60 mg/L of *C. citratus* EO are safe for control and treatment against *C. macropomum* monogeneans, however this exposure should be used for 6-7 consecutive days to increase antiparasitic efficacy of this EO.

Keywords: Phytotherapy; essential oil; parasites; blood; antiparasitic treatment.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1. Bioecología e cultivo de <i>Colossoma macropomum</i>	14
1.2. Parasitos monogeneas de <i>Colossoma macropomum</i>	15
1.3. Uso de óleos essenciais no controle de monogeneas de peixes	17
1.5. <i>Cymbopogon citratus</i> e seu uso contra parasitos.....	21
1.5. Efeitos tóxicos de óleos essenciais em parâmetros hematológicos e estrutura tecidual das brânquias de peixes	22
2. HIPÓTESES	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. GERAL.....	26
3.2. ESPECÍFICOS	26
4. REFERÊNCIAS.....	27
Artigo científico submetidos ao periódico “Aquaculture”	36
Anthelmintic efficacy of <i>Cymbopogon citratus</i> essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of <i>Colossoma macropomum</i> (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects.....	37
1. Introduction.....	38
2. Materials and Methods	39
2.1. Obtaining and chemical composition of <i>C. citratus</i> essential oil.....	39
2.2. Fish and acclimation.....	40
2.3. In vitro assays with <i>C. citratus</i> essential oil against monogeneans of <i>C. macropomum</i> ...40	
2.4. Therapeutic baths of <i>C. macropomum</i> with <i>C. citratus</i> essential oil.....	41
2.5. Blood analysis after therapeutic baths of <i>C. macropomum</i>	42
2.6. Procedures for histopathological analysis of <i>C. macropomum</i> gills after therapeutic baths	42
2.7. Statistical analyses	43
3. Results.....	43
3.1. Chemical composition of <i>C. citratus</i> essential oil.....	43
3.2. In vitro antiparasitic efficacy of <i>C. citratus</i> essential oil against monogeneans	43
3.3. Antiparasitic efficacy of therapeutic baths with <i>C. citratus</i> essential oil	44
3.4. Effects on blood parameters of <i>C. macropomum</i> after therapeutic baths with <i>C. citratus</i> essential oil	44
3.5. Histopathological alterations in <i>C. macropomum</i> gills after therapeutic baths with <i>C. citratus</i> essential oil.....	45
4. Discussion	45

5. Conclusions	47
Acknowledgements	48
References.....	48
5. CONCLUSÕES.....	59
7. ANEXO.....	60

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção global da piscicultura está crescendo devido a demanda por proteína animal e ao aumento do consumo de carnes brancas ricas em proteínas, nutrientes, aminoácidos, ácidos graxos essenciais, minerais e vitaminas (FAO 2016, 2018). O Brasil encontra-se entre os 25 maiores produtores mundiais da piscicultura continental com uma produção de 722.560 toneladas em 2018, um crescimento de 4,5% em relação ao 2017 (FAO 2016, 2018, IBGE 2018, PeixesBR 2019). Entre as espécies nativas mais cultivadas na piscicultura brasileira está o *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (tambaqui), cuja produção de 287.910 toneladas foi superada somente pela produção de *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo), que foi de 400.280 toneladas em 2018 (PeixesBR 2019). Porém, outros peixes não-nativos também têm sido produzidos, bem como espécies nativas, que representam cerca 40% da produção nacional em 2018. Entre as causas principais dessa superação da produção de peixes nativos estão problemas climáticos, sanitários e mercadológicos nos principais polos produtores do país (PeixesBR 2019).

Com o crescimento e intensificação da produção da piscicultura brasileira, o uso de elevadas densidades de estocagem e a baixa qualidade da água nos cultivos podem ocasionar problemas, como as parasitoses nos peixes. Essas condições desfavoráveis que podem levar a uma redução na resistência imunológica, tornando esses animais mais suscetíveis a agentes patogênicos presentes no ambiente de cultivo (Thatcher 1981, Martins e Romero 1996). Entre essas doenças estão aquelas causadas por monogeneas, que são ectoparasitos com ciclo de vida simples e direto, o que favorece a transmissão entre os peixes no cultivo (Thatcher 1981), podendo ocasionar a morte e perdas econômicas na piscicultura quando o parasitismo é elevado (Santos et al. 2013, Tavares-Dias e Martins 2017). Conseqüentemente, diversos quimioterápicos sintéticos convencionais são usados nas pisciculturas para controlar e tratar infecções causadas por monogeneas, como por exemplo, formalina, permanganato de potássio, sulfato de cobre, mebendazol, albendazol, levamisol, ivermectin, praziquantel, entre outros produtos (Tavares-Dias et al. 2002, Carneiro et al. 2005, Benavides-González et al. 2014, Andrade-Porto et al. 2017). Tais quimioterápicos sintéticos podem causar efeitos adversos nos peixes como toxicidade, resistência e imunossupressão, além de impactos negativos no meio ambiente e riscos à saúde da população humana (Benavides-González et al. 2014, Hashimoto et al. 2016, Andrade-Porto et al. 2017, Soares et al.

2017b, Morales-Serna et al. 2019). Além disso, não são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para uso na piscicultura (Benavides-González et al. 2014, Hashimoto et al. 2016, Andrade-Porto et al. 2017, Soares et al. 2017a).

Em razão dos efeitos negativos quanto ao uso de quimioterápicos na piscicultura, produtos derivados de plantas medicinais vêm se tornando cada vez mais populares, pois possuem diversos compostos bioativos com potencial antiparasitário em monogeneas de peixes, além de serem acessíveis e biodegradáveis (Steverding et al. 2005, Soares e Tavares-Dias 2013, Sutili et al. 2014, Hashimoto et al. 2016, Soares et al. 2016, 2017a, 2017b, Tavares-Dias 2018, Morales-Serna et al. 2019). Assim, diversos estudos (Monteiro 2012, Giarratana et al. 2015, Andrade et al. 2016, Hashimoto et al. 2016, Pérez et al. 2016, Soares et al. 2017a, 2017b, Costa et al. 2017, Valentim et al. 2018a, 2018b, Morales-Serna et al. 2019) investigaram como alternativa ao uso de quimioterápicos sintéticos a aplicação de extratos, óleos essenciais, oleoresina e nanoemulsões de diversas plantas medicinais contra monogeneas de peixes, por exemplo, *Chenopodium ambrosioides*, *Copaifera affinalis*, *Copaifeira duckei*, *Mentha piperita*, *Bixa orellana*, *Pterodon emarginatus*, *Lippia sidoides*, *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Lavandula stoechas*, *Lavandula lamiaceae*, *Lavandula apiaceae*, *Lavandula spica*, *Cuminum cyminum*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, entre outras. Porém, há grande interesse em estudar o uso de óleo essencial de outras espécies de plantas medicinais para controlar monogeneas em peixes, incluindo *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

Cymbopogon citratus é uma Poaceae cultivada em praticamente todos os países tropicais, incluindo o Brasil (Gomes e Negrelle 2015), cujos compostos metabólitos secundários têm potenciais efeitos anti-helmíntico, antibacteriano e antimicótico conhecidos em diferentes espécies de vertebrados (Pedroso et al. 2006, Justino e Barros 2008, Zago et al. 2009, Ntonga et al. 2014), exceto em peixes. Assim, não há estudos sobre a eficácia anti-helmíntica do óleo essencial de *C. citratus* em parasitos de *C. macropomum*. Portanto, como há necessidade de testar produtos alternativos para controlar e tratar infecções causadas por monogeneas no cultivo de *C. macropomum*, óleo essencial de *C. citratus* tem potencial para uso na piscicultura desse principal peixe nativo cultivado no Brasil e na Amazônia, beneficiando assim seus produtores, os quais poderão fazer uso desse fitoterápico alternativo. Além disso, dependendo de sua eficácia anti-helmíntica, esse óleo poderá ser testado para outras espécies de peixes.

1.1. Bioecología e cultivo de *Colossoma macropomum*

Colossoma macropomum é peixe amplamente distribuído nos sistemas das bacias dos rios Orinoco e Amazonas, localizados na Amazônia (Figura 1). Na natureza, as larvas desse peixe eclodem principalmente no início do período das inundações dos rios causadas pelas chuvas amazônicas. O tambaqui ao atingir a maturidade sexual migra rio acima para fazer a reprodução (Goulding e Carvalho 1982, Isaac e Barthem 1995, Vieira et al. 1999, Villacorta-Correa e Saint-Paul 1999).

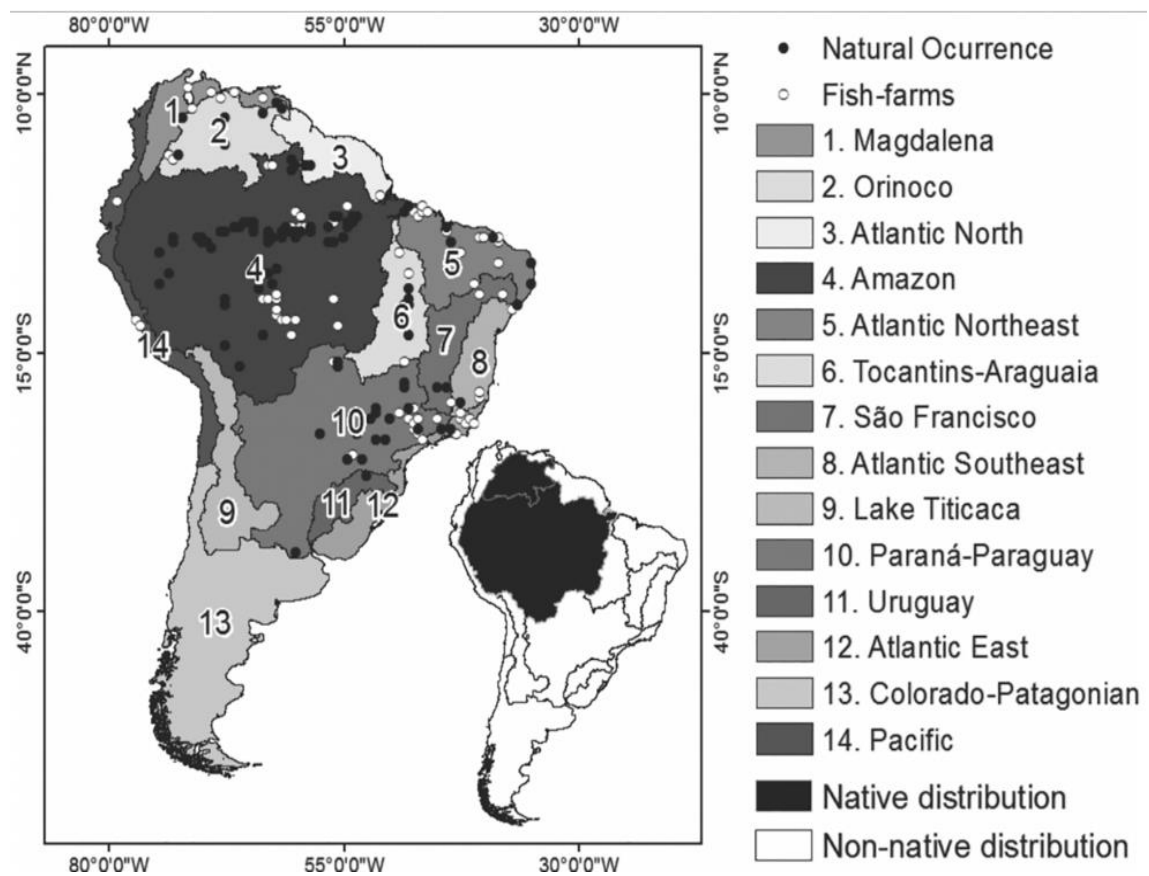


Figura 1 - Distribuição natural e cultivo de *Colossoma macropomum* na América do Sul. Fonte: Lopes et al. (2017).

No ambiente natural, esse peixe onívoro se alimenta principalmente de frutos, sementes, insetos, moluscos, crustáceos, macrófitas e, ocasionalmente, de outros peixes (Goulding e Carvalho 1982, Santos et al. 2006). Pode chegar a mais de 30 kg e 1 m de comprimento, apesar disso, vem sofrendo uma forte pressão da pesca, uma vez que essa é uma atividade econômica familiar de subsistência e comercial na Amazônia (Isaac e Barthem 1995).

O tambaqui é um peixe de alto valor comercial nos principais mercados, devido ao seu valor nutricional, textura e sabor de sua carne (Santos et al. 2006). Além disso, no cultivo apresenta boas características zootécnicas como bom crescimento, aceita ração artificial, boa tolerância a baixas concentrações de oxigênio na água, entre outras. Assim, vêm sendo geradas tecnologias para a sua reprodução e cultivo intensivo (Andrade e Yasui 2003), como alternativa para complementar a produção da pesca e reduzir a sobre-exploração das populações naturais (Santos e Santos 2005). Por exemplo, Pereira-Junior et al. (2013) avaliaram o desempenho produtivo em juvenis de tambaqui alimentados com farinha de mandioca como substituto do milho, mostrando que esse peixe pode ser capaz de aproveitar muito bem rações a base de farinha de mandioca para promover a taxas de ganho de peso, e também a substituição pode reduzir no custo de produção das rações. A taxa de alimentação é também importante para o crescimento dos peixes, pois estudos mostraram que a taxa de 5% do peso vivo por dia permitiu um bom desempenho de tambaquis cultivados em sistema de tanque-rede (Chagas et al. 2005). Chellappa et al. (1995) mencionaram que pode se obter uma boa produção de tambaqui em pequenos tanques-rede durante mais de seis meses de cultivo, quando usando manejo adequado. Esta espécie de peixe também pode tolerar cultivo em altas densidades de estocagem e baixos níveis de oxigênio. Estudos mostraram que o aumento da biomassa de tambaqui não comprometeu a sua sobrevivência quando cultivado em canais de igarapé (Silva et al. 2013). Conseqüentemente, esse é o peixe nativo é o mais cultivado no Brasil (Andrade e Yasui 2003, Sidonio et al. 2012, Barçante e Sousa 2015), pois pode ser atualmente encontrado em pisciculturas com vários sistemas de cultivo, os quais visam obter uma maior produção e produtividade, em menor tempo (Chellappa et al. 1995, Gomes et al. 2006).

1.2. Parasitos monogeneas de *Colossoma macropomum*

No Brasil, *C. macropomum* tem sido parasitado por pelo menos quatro espécies de monogeneas (Tabela 1), ectoparasitos platelmintos hermafroditas com ciclo de vida simples e direto (Figura 2). Em geral, espécies de monogeneas podem parasitar principalmente a pele, fossas nasais, brânquias e, em alguns casos, os ureteres e estômago, mas no tambaqui ocorrem principalmente nas brânquias e pele. Os monogeneas são parasitos com maior especificidade entre os helmintos, pois podem parasitar peixes de uma mesma espécie ou de um mesmo gênero, mesma família, mesma classe ou até de uma mesma ordem (Thatcher 1981, Fischer et al. 2003,

Thatcher 2006, Fernández-Méndez et al. 2015). Uma característica útil na identificação desses parasitos é o órgão de fixação (haptor) e órgão copulador masculino (Thatcher 2006).

As infecções causadas por monogeneas em *C. macropomum* podem ocorrer em níveis moderados a elevados, dependendo das espécies infectando esses hospedeiros. *Linguadactyloides brinkmanni* é mais patogênico entre esses parasitos de *C. macropomum*, podendo ocasionar lesões graves nas brânquias dos peixes, pois se aderem com seu haptor ao epitélio branquial causando reação inflamatória nos filamentos branquiais e acúmulo de eritrócitos e leucócitos arredor das lesões (Thatcher e Kritsky 1983, Thatcher 2006). Em geral, *Anacanthorus spathulatus* são os parasitos com maior frequência e maior intensidade nas brânquias de tambaqui, e infecções elevadas podem provocar asfixia, causando mortalidade massiva de peixes (Thatcher 1981, Fischer et al. 2003, Santos et al. 2013).

Tabela 1 - Monogeneas registrados em *Colossoma macropomum* de pisciculturas de diferentes localidades do Brasil.

Espécies de parasito	Localidade	Referências
Monogenea gen. sp.	Jaboticabal (SP)	Martins e Romero (1996), Martins et al. (2000)
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	Manaus (AM)	Thatcher e Kritsky (1983)
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	Pirassununga (SP)	Ceccarelli et al. (1990)
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	Irاندuba (AM)	Varella et al. (2003)
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	Rondônia (RO)	Godoi e Oliveira (2011)
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	Amapá (AP)	Dias et al. (2015)
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Manaus (AM)	Kritsky et al. (1979)
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Irاندuba (AM)	Varella et al. (2003)
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Manaus (AM)	Tavares-Dias et al. (2006)
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Rondônia (RO)	Godoi e Oliveira (2011)
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Amapá (AP)	Santos et al. (2013), Dias et al. (2015)
<i>Anacanthorus penilabiatus</i>	Pentecoste (CE)	Pamplona-Basilio et al. (2001)
<i>Notozothecium janauachensis</i>	Jaboticabal (SP)	Belmont-jégu et al. (2004)
<i>Notozothecium janauachensis</i>	Amapá (AP)	Dias et al. (2015)
<i>Notozothecium</i> sp.	Rondônia (RO)	Godoi e Oliveira (2011)
<i>Notozothecium euzeti</i>	Pentecoste (CE)	Cohen e Kohn (2009)
<i>Mymarothecium</i> sp.	Rondônia (RO)	Godoi e Oliveira (2011)
<i>Mymarothecium</i> sp. 1.	Rondônia (RO)	Godoi e Oliveira (2011)
<i>Mymarothecium</i> sp. 2.	Rondônia (RO)	Godoi e Oliveira (2011)
<i>Mymarothecium boegeri</i>	Pentecoste (CE)	Cohen e Kohn (2005)
<i>Mymarothecium boegeri</i>	Amapá (AP)	Santos et al. (2013), Dias et al. (2015)

Durante o cultivo muitos fatores podem comprometer a saúde dos peixes e entre eles estão as densidades de estocagem acima da capacidade suporte nos tanques de cultivo, dietas não balanceadas, má qualidade da água, manejo inadequado e entre outros. Todos esses fatores em conjunto podem alterar a homeostasia dos peixes, tornando-os mais suscetíveis às infecções causadas por monogeneas. Conseqüentemente, quando essa estreita interação hospedeiro-parasito-ambiente é rompida, pode levar a epizootias difíceis de controlar, as quais podem causar grandes perdas econômicas na piscicultura (Thatcher 1981, Martins e Romero 1996, Tavares-Dias e Martins 2017). No Brasil, estima-se que os parasitos causam prejuízos entorno de 84 milhões de dólares/ano para a piscicultura (Tavares-Dias e Martins 2017), entre esses parasitos estão também as monogeneas.

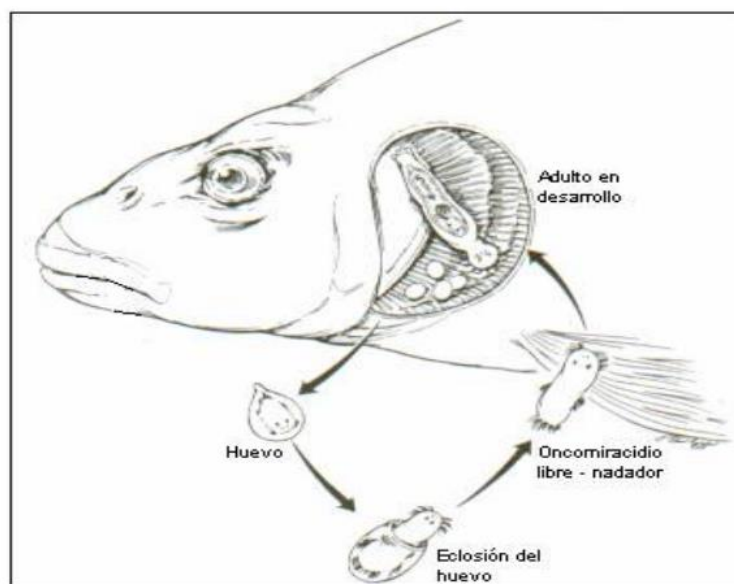


Figura 2 - Ciclo de vida simples e direto da família Dactylogyridae (Tomado e modificado Stoskopf 1993).

1.3. Uso de óleos essenciais no controle de monogeneas de peixes

À medida que a produção da piscicultura cresce e aumentam os problemas com doenças causadas por monogeneas, há necessidade de mais medidas de controle e tratamento são necessárias, principalmente usando novas alternativas. Para controlar esses parasitos em peixes, óleos essenciais de diversas plantas medicinais têm sido testados, os quais mostraram ser uma alternativa promissora para controlar monogeneas

de peixes, devido seus compostos bioativos com eficácia anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* (Tabela 2).

As plantas medicinais possuem compostos metabólicos primários e secundários. Os metabolitos primários (proteínas, ácidos graxos, carboidratos, ligninas) desempenham um papel importante na atividade celular, como a divisão e crescimento celular, respiração, armazenamento e reprodução. Os metabolitos secundários (fenólicos, terpenos, esteroides e alcaloides) são sintetizados a partir dos metabolitos primários e estão encarregados da interação da planta com seu meio externo (Bourgaud et al. 2001, Poser e Mentz 2010, Tavares-Dias 2018). Diversos compostos majoritários podem ser obtidos de várias partes das plantas (folhas, talos, raízes, flores e sementes), e as concentrações dessas substâncias podem variar de acordo a espécie, etapa de desenvolvimento, sazonalidade, condições climáticas, regiões geográficas e meio de extração (Sangwan et al. 2001, Soares e Tavares-Dias 2013). Entre os compostos majoritários de diferentes plantas medicinais estão o mentol, mentona, timol, p-cimeno, carvona, limoneno, carvacrol, terpinol, terpineno, eucaliptol, β -bisaboleno, trans- α -bergamoteno, entre muitos outros (Hashimoto et al. 2016, Malheiros et al. 2016, Soares et al. 2016, 2017a, 2017b, Costa et al. 2017), mas a presença e quantidade desses dependem de vários fatores. Em geral, nos estudos sobre óleos essenciais, avalia-se primeiramente a atividade anti-helmíntica *in vitro* e, em seguida, a eficácia terapêutica dos banhos (*in vivo*) contra os parasitos monogeneas. Usualmente, em tratamentos antiparasitários uma eficácia $\geq 50\%$ é considerada aceitável (Sommerville et al. 2016); porém, estudos recentes sugerem considerar uma eficácia $\geq 70\%$, para aplicação dos resultados em campo (Soares et al. 2017b).

Tabela 2 - Eficácia anti-helmíntica, *in vitro* e *in vivo*, de óleos essenciais de diferentes plantas medicinais no controle de monogêneas em diferentes espécies de peixes.

Parasitas	Hospedeiros	Espécie de planta	Ensaio <i>in vitro</i>			Ensaio <i>in vivo</i>			Referências
			Dose	Tempo de exposição	Eficácia	Dose	Tempo de exposição	Eficácia	
<i>Gyrodactylus</i> spp.	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	-	-	-	30 mg/L	48 horas	50%	Steverding et al. (2005)
<i>Gyrodactylus</i> sp.	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>	-	-	-	5 e 10 mg/L	1 hora	80-90%	Sutuli et al. (2014)
Monogênea gen. sp.	<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>	-	-	-	10 mg/L	1 hora	81%	Boijink et al. (2015)
Monogênea gen.sp.	<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>	-	-	-	15 mg/L	15 minutos	100%	Boijink et al. (2016)
<i>Dawestrema cycloancistrum</i> , <i>Dawestrema cycloancistroides</i>	<i>Arapaima gigas</i>	<i>Mentha piperita</i>	160 e 320 mg/L	30 minutos	100%	40 mg/L	30 minutos	15.6%	Malheiros et al. (2016)
<i>Anacanthorus spathulatus</i> , <i>Notozothecium janahuachensis</i> , <i>Mymarothecium boeueri</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Lippia alba</i>	1.280 e 2.560 mg/L	20 minutos	100%	100 e 150 mg/L	30 minutos	40.7- 50.3%	Soares et al. (2016)
<i>Gyrodactylus</i> sp	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Ocimum americanum</i>	10 e 50 mg/L	1 hora	75-98%	10 e 50 mg/L	1 hora	13.0-60%	Sutuli et al. (2016)
<i>Anacanthorus penilabiatus</i> , <i>Mymarothecium viatorum</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Copaifeira duckei</i>		1 hora	100%	50 mg/L	10 minutos	45%	Costa et al. (2017)
		<i>Melaleuca alternifolia</i>	100 e 400 mg/L	15 minutos	100%	-	-	-	
<i>Mentha piperita</i>				2 horas	100%	-	-	-	
<i>Cichlidogyrus tilapiae</i> <i>Cichlidogyrus thurstonae</i> <i>Cichlidogyrus halli</i> <i>Scutogyrus ongicornis</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i>	160 e 320 mg/L	3 e 8 minutos	33.3-41.6%	20 e 40 mg/L	3 banhos de 10 minutos e intervalos de 24 h.	72.5-75%	Hashimoto et al. (2016)

Tabela 2 - Continuação...

Parasitas	Hospedeiros	Espécie de planta	Ensaio <i>in vitro</i>			Ensaio <i>in vivo</i>			Referências
			Dose	Tempo de exposição	Eficácia	Dose	Tempo de exposição	Eficácia	
<i>Anacanthorus spathulatus</i> , <i>Notozothecium janahuachensis</i> , <i>Mymarothecium boegeri</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Lippia organoides</i>	320 e 160 mg/L	20 e 60 minutos	100% eficácia	40 mg/L	6 horas	100%	Soares et al. (2017a)
<i>Anacanthorus spathulatus</i> , <i>Notozothecium janahuachensis</i> , <i>Mymarothecium boegeri</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Lippia sidoides</i>	320 mg/L	10 minutos	100% eficaz	10 e 20 mg/L	60 e 15 minutos	86.7-100%	Soares et al. (2017b)
<i>Cichlidogyrus tilapiae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>	320 mg/L	2 horas	100% de eficácia	160 mg/L	5 minutos	86.7%	Meneses et al. (2018)

1.5. *Cymbopogon citratus* e seu uso contra parasitos

Cymbopogon citratus conhecida popularmente como capim-cidreira, capim-limão, capim-cidrão ou capim-cheiroso, é uma planta medicinal originária da Índia. Porém, está amplamente distribuída em países das regiões tropicais e de savana (Gupta e Jain 1970, Machado et al. 2012, Gomes e Negrelle 2015, Avoseh et al. 2015). Erva perene, cresce formando densos grupos de até 3 m de altura, com rizomas curtos. Suas folhas são eretas, com mais de 1 m de largura, em alguns casos. É cultivada em praticamente todos os países tropicais. No Brasil, a produção dessa espécie de planta medicinal se destaca nas regiões Sul e Sudeste. No estado do Paraná, maior produtor de plantas medicinais aromáticas do país, a produção ocupa posição de destaque, e valor médio de R\$ 717.647 a 992.207, pois é usada principalmente por populações humanas para o uso de diferentes enfermidades (Avoseh et al. 2015, Gomes e Negrelle 2015). Muitas comunidades brasileiras usam as folhas e as raízes em preparações tradicionais para obter infusões, sucos e chá para tratar diarreia, resfriados, dores de cabeça e musculares, reumatismo, febre, hipertensão, espasmos, bem como analgésico, sedativo e antidiurético (Stasi et al. 2002, Machado et al. 2012, Avoseh et al. 2015).

A escolha da planta medicinal para utilização do óleo essencial é feita tendo como critério o seu uso terapêutico e etnobotânico, bem como a presença de determinadas substâncias bioativas ou de acordo com sua disponibilidade (Zago et al. 2009). Óleo essencial ou extrato de *C. citratus* tem sido utilizado na medicina veterinária contra protozoários, fungos, bactérias e nematoides (Pedroso et al. 2006, Justino e Barros 2008, Matasyoh et al. 2011, Ntonga et al. 2014, Macedo et al. 2015), mas não em peixes. Os efeitos positivos desse óleo contra agentes parasitários e infecciosos são atribuídos aos seus principais compostos bioativos como isoneral, geraniol linalol, mirceno, limoneno, citronelal, ocimeno, mas principalmente o citral, geranial e neral (Barbosa et al. 2008, Matasyoh et al. 2011, Carmo et al. 2012, Machado et al. 2012, Ntonga et al. 2014, Lingan 2018). Porém, o percentual desses compostos no óleo de *C. citratus* pode variar influenciado por muitos fatores tais como método de coleta, extração, origem da planta, condições ambientais, entre outros fatores.

A eficácia anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais dependem, principalmente da concentração e tempo de exposição (Tabela 2). Matasyoh et al. (2011) mostraram atividade do óleo essencial de *C. citratus* (10 mL do OE/placa) contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*. Além disso, esse óleo teve eficácia contra *Aspergillus fumigatus* e *Escherichia coli* (Ebani et al. 2018). Também teve efeitos inibitórios em *Malassezia* spp. (Carmo et al. 2012),

e eficácia de 60% após 1 hora e 100% de eficácia após 2 horas contra larvas de nematoides *Contracaecum* sp. de peixes. Os nematóides expostos apresentaram ruptura da cutícula e desintegração da parede intestinal, devido aos compostos químicos majoritários que atuaram diretamente na estrutura dos parasitos (Justino e Barros 2008).

Eficácia dose-dependente do óleo essencial de *C. citratus* foi mostrada em protozoários *Crithidia deanei*, os quais tiveram alterações na membrana flagelar (Pedroso et al. 2006). Houve também eficácia dose-dependente em *Plasmodium falciparum* e larvas de *Anopheles funestus* (Ntonga et al. 2014). Foi relatada atividade citotóxica de óleo de *C. citratus* contra *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major* (Machado et al. 2012) e promastigotas de *Leishmania*, na qual resultou o aumento do volume das células, orgânulos e vacuolização do citoplasma (Pedro et al. 2016). O óleo essencial de *C. citratus* e citral teve atividade inibitória em *Mycobacterium tuberculosis* (Mota et al. 2018). Macedo et al. (2015) avaliando a eficácia do óleo essencial de *C. citratus* contra *Haemonchus contortus*, concluíram que esse fitoterápico tem atividade anti-helmíntica. Portanto, considerado que tais resultados positivos do óleo essencial de *C. citratus* e os problemas dos monogeneas na produção da piscicultura, esse fitoterápico deve ser testado contra monogeneas de *C. macropomum*.

1.5. Efeitos tóxicos de óleos essenciais em parâmetros hematológicos e estrutura tecidual das brânquias de peixes

Os parâmetros hematológicos são ferramentas úteis no diagnóstico e prognóstico de doenças, estresse, sinais de anemia, bem como no desequilíbrio homeostático em peixes (Tavares-Dias e Moraes 2004, Ranzani-Paiva et al. 2013, Neves et al. 2018). Já os estudos histológicos das brânquias podem refletir o nível de toxicidade, danos, difusão dos tecidos brânquiais e lamelares, entre outros danos ocasionados por substâncias que os peixes podem ser submetidos (Soares et al. 2017a, 2017b). Apesar da eficácia anti-helmíntica dos óleos essenciais, alguns deles podem desencadear reações adversas e toxicidade para os peixes, os quais podem ser reflexos na fisiológica e histologia branquial dos animais expostos; conseqüentemente, é importante considerar tais efeitos das concentrações e o tempo de exposição nos peixes (Boijink et al. 2016).

Em *O. niloticus*, após banhos com óleo essencial de *L. sidoides* (20 mg/L) e *M. piperita* (40 mg/L), o *L. sidoides* mostrou ser mais tóxico para os peixes que *M. piperita*, pois causou diminuição do número de eritrócitos e trombócitos e aumento do hematócrito e níveis de glicose plasmática. A redução do número de eritrócitos e aumento dos níveis de glicose

foram causados pelo estresse e disfunção respiratória, enquanto a redução do número de trombócitos parece ser devido à migração dessas células pela ação irritativa do óleo essencial nas brânquias dos peixes (Hashimoto et al. 2016). No entanto, *C. macropomum* expostos a concentrações (10 e 15 mg/L) de óleo essencial de *O. gratissimum*, após banhos de 24 horas, não mostraram alterações nos parâmetros sanguíneos, exceto nos níveis séricos de amônia, que foi atribuído ao estresse de manipulação dos peixes (Boijink et al. 2016). Em *O. niloticus* submetidos a banhos longos com 9 mg/L de *O. gratissimum*, as brânquias mostraram hiperplasia grave, enquanto após banhos com 40 mg/L as brânquias mostraram hiperplasia grave, elevação epitelial e edema sub-epitelial (Meneses et al. 2018).

Em *C. macropomum*, os banhos terapêuticos com 100 e 150 mg/L de *L. alba* causaram diminuição do hematócrito, hemoglobina, número de eosinófilos, e aumento dos níveis de glicose proteínas totais plasmáticas. Além disso, nas brânquias ocorreram lesões, dilatação capilar, desprendimento epitelial, proliferação das células mucosas e hipertrofia lamelar (Soares et al. 2016). *Arapaima gigas* submetidos a 80, 100 e 130 mg/L de óleo essencial de *M. piperita* mostraram elevações epitelial, fusão, hipertrofia lamelar e aneurisma, enquanto os peixes submetidos a 160 mg/L de óleo, as brânquias mostraram necroses lamelares (Malheiros et al. 2016). Em *Rhamdia quelen* expostos a 0, 20, 50, 80, 110 e 140 mg/L de óleo essencial de *M. piperita*, após 4 h ocorreram lesões nas brânquias tais como congestão do seio venoso da lamela primária e na base da lamela secundária, hiperplasia inter-lamelar e com fusão das lamelas, descolamento do epitélio, dilatação do seio venoso, edema lamelar e aneurisma (Spanghero et al. 2019).

Em *C. macropomum*, após banhos com 20 e 40 mg/L de *L. organoides* houve diminuição do hematócrito e aumento dos níveis de proteínas totais, número de monócitos e neutrófilos. Além disso, ocorreram danos estruturais nas brânquias dos peixes após os banhos (Soares et al. 2017a). Banhos com 20 mg/L de óleo essencial de *L. sidoides* causaram diminuição do hematócrito e hemoglobina em *C. macropomum*, possivelmente devido às lesões hemorrágicas observadas nas brânquias, mas os níveis de glicose e proteína totais no plasma se mantiveram constantes, apesar que estes parâmetros refletem situações de estresse. Além disso, estudos histológicos das brânquias mostraram alterações como hiperplasia e fusão de epitélio branquial lamelar, vasodilatação, descolamento lamelar, aneurisma lamelar, e ruptura epitelial com hemorragia, congestão, edema e necrose (Soares et al. 2017b). Em *Piaractus mesopotamicus* expostos a 20 e 70 mg/L de óleo essencial de *L. sidoides* houve aumento nos níveis de glicose e lactato plasmático, e aumento no hematócrito em peixes

expostos a 70 mg/L, mas nenhuma dessas concentrações de óleo influenciou o número de eritrócitos, hemoglobina, VCM e CHCM (Ventura et al. 2019). Em *P. mesopotamicus*, banhos com 10 e 50 mg/L de oleorresina de *C. duckei* durante 7 dias, levaram a redução no VCM, HCM, proteína, albumina, glucose e número de monócitos e neutrófilos. Porém, tais alterações foram devido ao manejo dos peixes e não aos tratamentos com a oleorresina. Além disso, análises histológicas das brânquias revelaram alterações devido aos efeitos patológicos dos parasitos e não das concentrações da oleorresina (Costa et al. 2017).

2. HIPÓTESES

- Óleo essencial de *C. citratus* tem atividade anti-helmíntica, *in vitro* e *in vivo*, contra monogeneas das brânquias de *C. macropomum*, devido à ação de seus compostos químicos majoritários.
- A concentração terapêutica de óleo essencial de *C. citratus* usada em banhos curtos não causa alterações hematológicas e histopatológicas, pois não é suficiente para causar efeitos indesejáveis em *C. macropomum*.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Investigar a eficácia anti-helmíntica, *in vitro* e *in vivo*, do óleo essencial de *C. citratus* em monogêneas das brânquias de *C. macropomum*, bem como os efeitos dos banhos terapêuticos na hematologia e histopatologia dos peixes.

3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia *in vitro* das concentrações e tempo de exposição do óleo essencial de *C. citratus* em parasitos monogêneas de *C. macropomum*;
- Avaliar a tolerância de *C. macropomum* às concentrações obtidas nos ensaios *in vitro* com o óleo essencial;
- Determinar a estratégia e eficácia dos banhos terapêuticos em monogêneas das brânquias de *C. macropomum* expostos a maior concentração de óleo essencial de *C. citratus* tolerada;
- Analisar os possíveis efeitos da concentração de óleo essencial de *C. citratus* em parâmetros hematológicos e histopatologia das brânquias de *C. macropomum* após os banhos terapêuticos.

4. REFERÊNCIAS

- Andrade-Porto, S. M., E. G. Affonso, D. Kochhann, J. C. Oliveira Malta, R. Roque, E. A. Ono, C. S. O. Araújo, and M. Tavares-Dias. 2017. Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Aquaculture* 479:38-44.
- Andrade, J. I. A., G. T. Jerônimo, E. M. Brasil, C. V. Nunez, E. L. T. Gonçalves, M. L. Ruiz, and M. L. Martins. 2016. Efficacy of seed extract of *Bixa orellana* against monogenean gill parasites and physiological aspects of *Colossoma macropomum* after bath treatment. *Aquaculture* 462:40-46.
- Andrade, R. D., and G. S. Yasui. 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 27:166-172.
- Avoseh, O., O. Oyedeji, P. Rungqu, B. Nkeh-Chungag, and A. Oyedeji. 2015. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules* 20:7438-7453.
- Barbosa, L. C. A., U. A. Pereira, A. P. Martinazzo, C. R. Á. Maltha, R. R. Teixeira, and E. D. C. Melo. 2008. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) stapf samples. *Molecules* 13:1864-1874.
- Barçante, B., and A. Sousa. 2015. Características zootécnicas e potenciais do tambaqui (*Colossoma macropomum*) para a piscicultura brasileira. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia* 9:287-290.
- Belmont-jégu, E., M. V. Domingues, and L. Martins. 2004. *Notozothecium janauachensis* n. sp. (Monogeneoidea: Dactylogyoridae) from wild and cultured tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae) in Brazil. *Zootaxa* 8:1-8.
- Benavides-González, F., R. A. Gómez-Flores, J. G. Sánchez-Martínez, J. L. Rábago-Castro, and I. O. Montelongo-Alfaro. 2014. In vitro and in vivo antiparasitic efficacy of praziquantel against monogenean *Ligictaluridus floridanus* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Thai Journal of Veterinary Medicine* 44:533-539.
- Boijink, C. L., W. S. da C. Miranda, E. C. Chagas, J. K. Dairiki, and L. A. K. A. Inoue. 2015. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture* 438:138-140.
- Boijink, C. L., C. A. Queiroz, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves, and L. A. K. A. Inoue. 2016. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil

- for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture* 457:24-28.
- Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi, and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161:839-851.
- Carmo, E. S., F. de O. Pereira, A. C. P. Moreira, L. L. Brito, J. G. M. Gayoso, Carla Wanderley da Costa, and E. de O. Lima. 2012. Essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: a promising natural product against *Malassezia* spp. *Rev Inst Adolfo Lutz* 71:386-391.
- Carneiro, P. C. F., M. Schorer, and D. Mikos. 2005. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesq. agropec. bras.*, Brasília 40:99-102.
- Ceccarelli, P. S., L. B. Figueira, C. L. B. Ferraz de Lima, and E. C. A. Oliveira. 1990. Observações sobre a ocorrência de parasitos no CEPTA entre 1983 e 1990. *Boletim Técnico do CEPTA* 3:43-55.
- Chagas, E. C., L. D. C. Gomes, H. Martins, R. Roubach, and J. N. De Paula Lourenço. 2005. Desempenho de tambaqui cultivado em tanques-rede, em lago de várzea, sob diferentes taxas de alimentação. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 40:833-835.
- Chellappa, S., N. T. Chellappa, W. B. Barbosa, F. A. Huntingford, and M. C. M. Beveridge. 1995. Growth and production of the Amazonian tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. *Aquaculture International* 3:11-21.
- Cohen, S. C., and A. Kohn. 2005. A new species of *Mymarothecium* and new host and geographical records for *M. viatorum* (Monogenea: Dactylogyridae), parasites of freshwater fishes in Brazil. *Folia Parasitologica* 52:307-310.
- Cohen, S. C., and A. Kohn. 2009. On Dactylogyridae (Monogenea) of four species of characid fishes from Brazil. *Check List* 5:351.
- Costa, J. C., G. M. R. Valladão, G. Pala, S. U. Gallani, S. Kotzent, A. E. M. Crotti, L. Fracarolli, J. J. M. da Silva, and F. Pilarski. 2017. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture* 471:72-79.
- Dias, M. K. R., L. R. Neves, R. G. B. Marinho, and M. Tavares-Dias. 2015. Parasitic infections in tambaqui from eight fish farms in Northern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 67:1070-1076.
- Ebani, V., B. Najar, F. Bertelloni, L. Pistelli, F. Mancianti, and S. Nardoni. 2018. Chemical composition and in vitro antimicrobial efficacy of sixteen essential oils against

Escherichia coli and *Aspergillus fumigatus* Isolated from Poultry. *Veterinary Sciences* 5:62.

FAO. 2016. Contribución a La Seguridad Alimentaria y La Nutrición Para Todos. Rome.

FAO. 2018. World Fisheries and Aquaculture (Fao 2012). Rome.

Fernández-Méndez, C., A. Gonzales, and G. Pizango. 2015. Valores hematológicos y parasitológicos de banda negra *Myleus schomburgkii* (Pisces, Serrasalminidae) cultivados en estanques de tierra. *Folia Amazónica* 24:179-184.

Fischer, C., J. C. de O. Malta, and A. M. B. Varella. 2003. A fauna de parasitas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) do médio rio solimões, estado do Amazonas (AM) e do baixo rio Amazonas, estado do Pará (PA), e seu potencial como indicadores biológicos. *Acta Amazonica* 33:651-662.

Giarratana, F., D. Muscolino, F. Panebianco, A. Patania, C. Benianti, G. Ziino, and A. Giuffrida. 2015. Activity of R(+) limonene against *Anisakis* larvae. *Italian Journal of Food Safety* 4:209-211.

Godoi, M. M. I. D. M., and V. E. G. D. Oliveira. 2011. Taxonomia e ecologia da fauna parasitária de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae) criados em tanques no município de Rolim de Moura, RO (Doctoral dissertation).

Gomes, E. C., and R. R. B. Negrelle. 2015. Análise da cadeia produtiva do capim limão: estudo de caso. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 17:201-209.

Gomes, L. C., C. A. R. M. Araujo-Lima, A. R. Chippari-Gomes, and R. Roubach. 2006. Transportation of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a closed system. *Brazilian Journal of Biology* 66:493-502.

Goulding, M., and M. L. Carvalho. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia* 1:107-133.

Gupta, B.K., and N. Jain. 1978. Cultivation and utilization of genus *Cymbopogon* in Indian. *Indian Perfumer* 22:55-68.

Hashimoto, G. S., F. M. Neto, M. L. Ruiz, M. Acchile, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves, and M. L. Martins. 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.

IBGE. 2018. Produção da pecuária municipal. GEPEC/COAGRO, Rio de Janeiro.

Isaac, V. J., and R. B. Barthem. 1995. Os recursos pesqueiros da Amazônia brasileira. PR-

MCT/CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém, Brasil.

- Kritsky, D. C., V. E. Thatcher, and R. J. Kayton. 1979. Neotropical Monogenoidea. The Anacanthorinae Price, 1967, with the proposal of four new species of *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965 from Amazonian fishes. *Acta Amazonica* 9:355-361.
- Lingan, K. 2018. A Review on Major Constituents of Various Essential Oils and its Application. *Translational Medicine* 8:1-5.
- Justino, C. H. da S., and L. A. Barros. 2008. In vitro evaluation of the resistance of the *Contracaecum* sp. larvae (Railliet & Henry, 1912) (Nematoda: Anisakidae), to the essential oil of citronella (*Cymbopogon* sp.) (Poaceae). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 15:122-125.
- Lopes, T. M., D. Bailly, B. A. Almeida, N. C. L. Santos, B. C. G. Gimenez, G. O. Landgraf, P. C. L. Sales, M. S. Lima-Ribeiro, T. F. Cassemiro, Fernanda A S Rangel, J. A. F. Diniz-Filho, A. A. Agostinho, and L. C. Gomes. 2017. Two sides of a coin : Effects of climate change on the native and non-native distribution of *Colossoma macropomum* in South America. *Journal.pone* 12:1-18.
- Macedo, I. T. F., L. M. B. de Oliveira, W. L. C. Ribeiro, J. M. L. dos Santos, K. das C. Silva, J. V. de Araújo Filho, A. L. F. Camurça-Vasconcelos, and C. M. L. Bevilaqua. 2015. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 24:268-275.
- Machado, M., P. Pires, A. M. Dinis, M. Santos-Rosa, V. Alves, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, and M. C. Sousa. 2012. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. *Experimental Parasitology* 130:223-231.
- Malheiros, D. F., P. O. Maciel, M. N. Videira, and M. Tavares-Dias. 2016. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture* 455:81-86.
- Martins, M. L., F. R. Moraes, R. Y. Fujimoto, E. M. Onaka, D. T. Nomura, C. A. H. Silva, and S. S. H. Schalch. 2000. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes a survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 9: 23-28.
- Martins, M. L., and N. G. Romero. 1996. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: Estudio parasitologico e histopatologico. *Revista Brasileira de Zoologia* 13:489-1996.

- Matasyoh, J., I. Wagara, J. Nakavuma, and A. Kiburai. 2011. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *African Journal of Food Science* 5:138-142.
- Meneses, J. O., M. V. S. do Couto, N. C. Sousa, F. dos S. Cunha, H. A. Abe, F. M. Ramos, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves, M. L. Martins, A. N. Maria, P. C. F. Carneiro, and R. Y. Fujimoto. 2018. Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus tilapiae* gill parasite of Nile tilapia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 70:497-504.
- Monteiro, P. C. 2012. O uso do extrato aquoso de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) no controle de monogenóideos (Plathyhelminthes) em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). MA (Mestre dissertation).
- Morales-Serna, F.N., V. H. Caña-Bozada, D. G. López-Moreno, R. M. Medina-Guerrero, J. A. Morales-Serna, E. J. Fajer-Ávila. 2019. In vitro efficacy of two terpenes against ancyrocephalid monogeneans from Nile tilapia. *Journal of Parasitic Diseases* 43:739-742.
- Mota, A. P. P., J. C. P. Dantas, and C. C. Frota. 2018. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. *Ciência Rural* 48:1-9.
- Neves, M. S., M. V. S. Couto, N. C. Sousa, R. F. B. Santos, H. M. Dias, H. A. Abe, J. A. R. Dias, F. S. Cunha, M. T. Dias, and R. Y. Fujimoto. 2018. Resposta hematológica do cascudo ornamental amazônico *Peckoltia oligospila* ao estresse de transporte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 70:13-19.
- Ntonga, P. A., N. Baldovini, E. Mouray, L. Mambu, P. Belong, and P. Grellier. 2014. Activity of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum*, and *Cymbopogon citratus* essential oils against *Plasmodium falciparum* and mature-stage larvae of *Anopheles funestus* s.s. *Parasite* 21:33.
- Pamplona-Basilio, M. C., A. Kohn, and V. A. Feitosa. 2001. New host records and description of the egg of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96:667-668.
- Pedro, C. P., M. Sekhoacha, M. Gilbert, S. M. Oliveira, and M. Machado. 2016. Cytotoxicity Effects and Mechanisms of Action of *Cymbopogon Citratus* Essential Oils Against Pathogens. *EC Pharmacology and Toxicology* 2.6:251-262.
- Pedroso, R. B., T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias-Filho, D. A. G. Cortez, L. E. R. Cortez, J. A.

- Morgado-Díaz, and C. V. Nakamura. 2006. Biological activities of essential oil obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei*. *Acta Protozoologica* 45:231-240.
- Peixe, BR. 2019. Anuário da Piscicultura 2019. Peixe BR—Associação Brasileira da Piscicultura, São Paulo. Brasil.
- Pereira-Junior, G. P., E. M. de O. Pereira, M. Pereira-Filho, P. de S. Barbosa, E. Shimoda, and L. V. Brandão. 2013. Desempenho produtivo de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) alimentados com rações contendo farinha de cruzeira de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) em substituição ao milho (*Zea mays*). *Acta Amazonica* 43:217-226.
- Poser, G.L., and L.A. Mentz. 2010. Diversidade biológica e sistema de classificação. Pages 7-89 in C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello and P.R. Petrovick (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora UFRGS: Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis, Brasil.
- Pérez, M. G. M., C. N. Moll, G. M. Espinosa, and A. V. López. 2016. Evaluation of different mediterranean essential oils as prophylactic agents in anisakidosis. *Pharmaceutical Biology* 55:456-461.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., S.B. de Pádua, M. Tavares-Dias, M.I. Egami. 2013. *Métodos para análise hematológica em peixes*. 1ª ed. Eduem, Maringá, Brasil.
- Sangwan, N. S., A. H. Farooqi, F. Shabih, and R. S. Sangwan. 2001. Regulation of essential oil production in plant. *J. Plant Growth Regul. Plant Growth Regulation* 34:3–21.
- Santos, E. F., M. Tavares-Dias, D. A. Pinheiro, L. R. Neves, R. das G. B. Marinho, and M. K. R. Dias. 2013. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. *Acta Amazonica* 43:105-112.
- Santos, G., E. Ferreira, and J. Zuanon. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Page (Ibama, Ed.). Instituto. Manaus AM, Brasil.
- Santos, G. M., and A. C. M. Dos Santos. 2005. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. *Acta Amazônica* 19:165-182.
- Sidonio, L., I. Cavalcanti, L. Capanema, R. Morch, G. Magalhães, J. Lima, V. Burns, A. J. A. Júnior, and R. Munglioli. 2012. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *BNDES Setorial* 35:421-463.
- Silva, A. D. R. da, R. B. dos Santos, A. M. da S. S. Bruno, and E. C. Soares. 2013. Cultivo de

- tambaqui em canais de abastecimento sob diferentes densidades de peixes. *Acta Amazonica* 43:517-523.
- Soares, B. V., A. C. F. Cardoso, R. R. Campos, B. B. Gonçalves, G. G. Santos, F. C. M. Chaves, E. C. Chagas, and M. Tavares-Dias. 2017a. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469:72-78.
- Soares, B. V., L. R. Neves, D. O. Ferreira, M. S. B. Oliveira, F. C. M. Chaves, E. C. Chagas, R. A. Gonçalves, and M. Tavares-Dias. 2017b. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Veterinary Parasitology* 234:49-56.
- Soares, B. V., L. R. Neves, M. S. B. Oliveira, F. C. M. Chaves, M. K. R. Dias, E. C. Chagas, and M. Tavares-Dias. 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.
- Soares, B. V., and M. Tavares-Dias. 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu Potencial Bioativo e Importância na Medicina Veterinária e Aquicultura. *Biota Amazônia* 3:109-123.
- Sommerville, C., R. Endris, T. A. Bell, K. Ogawa, K. Buchmann, and D. Sweeney. 2016. World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP) guideline for testing the efficacy of ectoparasiticides for fish. *Veterinary Parasitology* 219:84-99.
- Spanghero, D. B. N., E. C. A. de Medeiros Spanghero, J. dos Santos Pedron, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves, and E. Zaniboni-Filho. 2019. Óleo essencial de hortelã-pimenta como anestésico e sua toxicidade para juvenis de jundiá. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 54:1-8.
- Stasi, L. C., G. P. Oliveira, M. A. Carvalhaes, M. Queiroz-Junior, O. S. Tien, S. H. Kakinami, and M. S. Reis. 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73:69-91.
- Steverding, D., E. Morgan, P. Tkaczynski, F. Walder, and R. Tinsley. 2005. Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Diseases of aquatic organisms* 66:29-32.
- Stoskopf, M. K. 1993. Clinical pathology. *Fish Medicine*. Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Sutili, F. J., L. T. Gressler, and B. Baldisserotto. 2014. Anthelmintic activity of the phytochemical eugenol against the fish parasite *Gyrodactylus* sp. and acute toxicity in

- Daphnia pulex*. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 9:223-227.
- Suttili, F. J., A. L. Murari, L. L. Silva, L. T. Gressler, B. M. Heinzmann, A. C. de Vargas, D. Schmidt, and B. Baldisserotto. 2016. The use of *Ocimum americanum* essential oil against the pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus* sp. in silver catfish (*Rhamdia quelen*). Letters in Applied Microbiology 63:82-88.
- Tavares-Dias, M. 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. Aquatic Living Resources 31:13.
- Tavares-Dias, M., and M. L. Martins. 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. Journal of Parasitic Diseases 41:913-918.
- Tavares-Dias, M., J. R. G. Lemos, S. M. S. Andrade, and S. L. Aquino-Pereira. 2006. Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) cultivados em estação de piscicultura na Amazônia Central. IV Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 4:726-731.
- Tavares-Dias, M., and F. R. De Moraes. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Brazil.
- Tavares-Dias, M., M. L. Martins, S. H. C. Schalch, E. M. Onaka, C. I. F. Quintana, J. R. E. De Moraes, and F. R. De Moraes. 2002. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). Acta Scientiarum: Biological Science 24:547-554.
- Thatcher, V. E. 2006. Amazon fish parasites. Pensoft Publishers 1:1-42.
- Thatcher, V. E. 1981. Patologia de peixes da Amazônia Brasileira, 1. Aspectos gerais. Acta Amazonica 11:125-140.
- Thatcher, V. E., and D. C. Kritsky. 1983. Neotropical Monogenoidea. 4. *Linguadactyloides Brinkmani* gen. et sp. n. (Dactylogyridae: Linguadactyloidea subfam. n.) with Observations on its Pathology in a Brazilian Freshwater Fish, *Colossoma macropomum* (Cuvier). Proceedings of the Helminthological Society of Washington 50:305-311.
- Valentim, D. S. S., J. L. Duarte, A. E. M. F. M. Oliveira, R. A. S. Cruz, J. C. T. Carvalho, E. C. Conceição, C. P. Fernandes, and M. Tavares-Dias. 2018a. Nanoemulsion from essential oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows in vitro efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae). Journal of Fish Diseases 41:443-449.
- Valentim, D. S. S., J. L. Duarte, A. E. M. F. M. Oliveira, R. A. S. Cruz, J. C. T. Carvalho, C. Solans, C. P. Fernandes, and M. Tavares-Dias. 2018b. Effects of a nanoemulsion with

- Copaifera officinalis* oleoresin against monogenean parasites of *Colossoma macropomum*: A Neotropical Serrasalmidae. *Journal of Fish Diseases* 41:1041-1048.
- Varella, A. M., B. S. N. Peiro, and J. C. O. Malta. 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae) cultivado em tanques-rede em um lago de várzea na Amazônia, Brasil. Simpósio brasileiro de Aquicultura: Goiânia/GO Brasil. Associação Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática (AQUABIO) 12:95-106.
- Ventura, A. S., T. S. de Castro Silva, R. B. Zanon, L. A. K. A. Inoue, and C. A. L. Cardoso. 2019. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. *International Aquatic Research* 11:1-12.
- Vieira, E., V. J. Isaac, and N. N. Fabr e. 1999. Biologia Reprodutiva do Tambaqui. *Acta Amazonica* 29:625-638.
- Villacorta-Correa, M. A., and U. Saint-Paul. 1999. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in Central Amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 59:637-652.
- Zago, J. A. A., P. I. Ushimaru, L. N. Barbosa, and A. Fernandes. 2009. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19:828-833.
- Zhang, Q., D.-H. Xu, and P. H. Klesius. 2013. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology* 198:45-53.

Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) in monogenean parasites of the *Colossoma macropomum* gills (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects

Artigo científico submetidos ao periódico "Aquaculture"

Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae), and blood and histopathological effects

Anai Paola Prissilla Flores Gonzales¹, Eliane Tie Oba Yoshioka^{1,2}, Patrick Delgado Mathews³, Omar Mertins⁴, Marcela Nunes Videira⁵, Marcos Tavares-Dias^{1,2*}

¹Postgraduate Program on Tropical Biodiversity (PPGBio), Federal University of Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brazil.

²Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, 2600, Macapá, AP, Brazil

³Department of Zoology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

⁴Department of Biophysics, Paulista Scholl of Medicine from Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵ University of Amapá State (UEAP), Macapá, AP, Brazil

* Corresponding author: Embrapa Amapá, AP, Brasil

E-mail address: marcos.tavares@embrapa.br (M. Tavares-Dias)

ABSTRACT

This study investigated the *in vitro* and *in vivo* anthelmintic efficacy, histopathological and hematological effects of *Cymbopogon citratus* essential oil (EO) in *Colossoma macropomum*. The major compounds of the essential oil were geranial (45.7%) and neral (33.9%). Essential oils were assayed at concentrations of 100, 200, 300, 400 and 500 mg L⁻¹ for *in vitro* efficacy against monogeneans *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* and *Notozothecium janauachensis* in the gills of *C. macropomum*. Two controls were considered, one with the use of cultivation tank water and the other with cultivation tank water + 70% alcohol. *In vivo* results show that the concentration of 500 mg L⁻¹ of the EO showed 100% efficacy against the parasites within 5 min of exposure, causing structural damages to their tegument. The 400 and 300 mg L⁻¹ concentrations were 100% effective with 10 min and 30 min of exposure, respectively. The 200 mg L⁻¹ concentration was also 100% effective within 30 min and the 100 mg L⁻¹ treatment was 100% effective within 100 min of exposure. Total parasite mortality in both control groups occurred within 7 h. Efficacy was 47.1% after therapeutic baths of 20 min for three consecutive days with 60 mg L⁻¹ of this EO. In addition, 60 mg L⁻¹ of EO was the highest concentration tolerated by the fish and it had an anesthetic effect, and it caused increase in plasma glucose levels and decrease in leukocytes and lymphocytes number, as well as hyperplasia, lamellar fusion, detachment and aneurysm in *C. macropomum* gills. A low efficacy against the monogeneans was shown perhaps due to the low concentration of this EO tolerated by *C. macropomum* and the strategy used for the therapeutic baths, which may be corrected with a lower concentration of EO and more consecutive days for therapeutic baths.

Keywords: Aquaculture; Blood; Therapeutic baths; Phytotherapy

1. Introduction

Aquaculture is an important economic activity worldwide for its generation of jobs and income and it currently accounts for 50% of global fish consumption (Shah and Mraz, 2019). However, global aquaculture production has suffered economic losses estimated at 1.05 to US\$ 9.58 billion/year from problems related to diseases (Shinn et al., 2015), including monogenean parasites in farmed fish.

Monogeneans are parasitic plathelminths that mainly affect the gills and tegument of fish and they are problematic in commercial aquaculture because of their simple life cycle, transmission between host fish, and many species are pathogenic and cause mortality when

present in a high abundance (Zhang et al., 2014; Tavares-Dias and Martins, 2017; Morales-Serna et al., 2019). Outbreaks of these ectoparasites have led to losses in the farming of native fish species in the Amazonian countries of Brazil, Peru, Bolivia, Colombia and Venezuela, which produce the tambaqui *Colossoma macropomum* (Centeno et al., 2004; Soler-Jiménez et al., 2016; Tavares-Dias and Martins, 2017; Soares et al., 2017 a,b), the second largest scaled fish in the Amazon. Therefore, the maintaining of desirable productions requires an integrated approach of understanding and implementing new strategies to control infections with these parasites. The commercial aquaculture industry is seeking technological advances to obtain fish products of better quality while diminishing the use of synthetic chemotherapeutics, many of which are banned in several countries due to risks of toxicity to fish and handlers as well as environmental contamination. Thus, current research is focused on ecofriendly, non-toxic and natural therapeutics as a strategy to increase the overall sustainability of the activity (Soares et al., 2016; Tavares-Dias, 2018; Shah and Mraz, 2019; Morales-Serna et al., 2019).

Essential oils (EO) and their bioactive compounds are a new alternative to the use of synthetic chemotherapeutics in the control and treatment of fish infected by monogeneans (Soares et al., 2016, 2017a,b; Tavares-Dias, 2018; Meneses et al., 2018; Morales-Serna et al., 2019). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) is a medicinal plant of the Poaceae family that is widely used in human medicine to treat various diseases (Machado et al., 2012; Avoseh et al., 2015). In addition, its EO has been tested as an anthelmintic in large animals (Matasyoh et al., 2011; Ebani et al., 2018) and has shown potential to control and treat infections of monogeneans in fish farming. Thus, the present study investigated the anthelmintic efficacy (*in vitro* and *in vivo*) of *C. citratus* EO to control and treat *C. macropomum* infected in the gills by monogeneans and evaluate if this EO has adverse effects on this fish species.

2. Materials and Methods

2.1. Obtaining and chemical composition of C. citratus essential oil

Cymbopogon citratus was cultivated in the Embrapa Amazon West Medicinal Plants and Vegetables Sector, Manaus (AM), Brazil (1°56'45.7'' S- 37° 02'58.5'' W). The essential oil was extracted from fresh leaves through hydrodistillation with a Clevenger apparatus. Chemical composition of the essential oil was determined using gas chromatography mass spectrometry (Adams, 2007).

2.2. Fish and acclimation

A total of 200 *C. macropomum* fingerlings were acquired from a commercial fish farm in the municipality of Macapá (AP), Brazil, and transported to the Embrapa Amapá Aquaculture and Fishery Laboratory, Macapá, Amapá State (Brazil). The fishes were acclimatized for seven days in 500 L tanks with a constant water flux and were fed twice daily with a commercial fish diet containing 36% crude protein (Guabi, Brazil). Water quality parameters of the tanks were monitored daily using a multiparameter probe (Horiba Mod. U52, Japan). Means of the water parameters were: temperature 30.3 ± 0.1 °C, dissolved oxygen 5.4 ± 0.2 mg L⁻¹, pH, 5.3 ± 0.2 , total ammonia 0.5 ± 0.2 mg L⁻¹, alkalinity 10.0 ± 0.001 mg L⁻¹ and hardness 10.0 ± 0.001 mg L⁻¹. The fish were used for all *in vitro* and *in vivo* assays and the monogeneans were obtained from the fish, which were naturally infected.

All experimental procedures in the present study were approved by the Embrapa Amapá Ethics Committee for the Use of Animals (Protocol N° 016/2019 - CEUA/CPAFAP).

2.3. *In vitro* assays with *C. citratus* essential oil against monogeneans of *C. macropomum*

Seven *C. macropomum* fingerlings (12.5 ± 1.0 cm and 33.7 ± 9.1 g) naturally infected with the monogeneans *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* and *Notozothecium janauachensis* were used for this assay. Fish were euthanized and the gills were removed for the evaluation of exposure time and *C. citratus* EO concentrations that cause *in vitro* mortality of the monogeneans. The assay was carried out with five concentrations of *C. citratus* EO (100, 200, 300, 400 and 500 mg L⁻¹) with three replicates per concentration. Concentrations of the EO were diluted to a ration of 1:10 g in 70% alcohol. Two control groups were used, of which one control group was with tank water and the other was with cultivation tank water + 70% ethyl alcohol. These assays were performed with an ambient temperature of 20°C. Gill arches of individual *C. macropomum* specimens infected by monogeneans were collected in Petri dishes (5.5 cm) and submerged in the different concentrations of *C. citratus* EO. Live and dead parasites were quantified every 5 minutes using stereomicroscopes. Each replicate was visualized with a field of view containing at least 20 monogeneans. Dead parasites were considered as those that were detached from the gill tissue and those that were adhered to the gill tissue but with no mobility (Soares et al., 2016). The effectiveness of each treatment was calculated using methods described in Zhang et al. (2014).

At the end of these assays, gills of the fish in both control treatments and of those exposed to the different concentrations of *C. citratus* EO were prepared for observation for possible structural damage in the monogeneans using scanning electron microscopy (SEM). Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution buffered in 0.1M sodium cacodylate buffer with a pH of 7.2. The gills were then subjected to three washes at 30 min intervals in buffer solution and were incubated in 4% osmium tetroxide and 0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.2 three times. The gills were then incubated in 1% aqueous tannic acid solution for 45 min and gradually dehydrated in 50, 70, 90 and 100% ethanol for 20 minutes per solution. After dehydration, the samples were subjected to a drying process in a critical point chamber using carbon dioxide and coated with a thin layer of platinum (“Sputtering”, Leica EM SCD 500, German). Samples were visualized with a scanning electron microscope (DSM 940, ZEISS, Germany) operated at an acceleration of 15 kV.

2.4. Therapeutic baths of *C. macropomum* with *C. citratus* essential oil

Fish tolerance was tested based on the *in vitro* results to determine the concentration of *C. citratus* EO for therapeutic baths. Sixty *C. macropomum* fingerlings (10.5 ± 0.8 cm and 21.2 ± 3.4 g) were distributed in 100 L water tanks with 10 fish per tank. Therapeutic baths were carried out with a different concentration of *C. citratus* EO in each tank (500, 400, 300, 200, 100 and 60 mg L⁻¹). Ethyl alcohol (70%) was used as solvent (1:10 g) for *C. citratus* EO. The tanks were maintained with no water renewal during the assays. The *C. citratus* EO concentration of 60 mg L⁻¹ was tolerated by the fish for use in a therapeutic bath.

For the therapeutic baths, 117 *C. macropomum* fingerlings (10.7 ± 0.9 cm and 22.4 ± 4.4 g) naturally infected with monogeneans were randomly distributed in 9 100 L tanks. Three treatments with three replicates (tanks) were used with 13 fish for each replicate (39 fish per treatment). Two treatments were control groups, of which one control was with tank water and the other was with tank water + 70% ethyl alcohol. The third treatment was with 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO. The baths with the *C. citratus* EO were performed for 20 min and for three consecutive days. The tanks were maintained with constant aeration and no water renewal. Alterations in fish behavior were observed during the therapeutic baths.

After treatment with the therapeutic baths, the gills of 10 fish from each replicate (30 fish per treatment) were collected and fixed in 5% formalin for quantification and identification of the monogeneans (Eiras et al., 2006), and to calculate their prevalence and

mean abundance (Bush et al., 1997). The efficacy of the therapeutic baths was determined using calculations described in Zhang et al. (2014).

2.5. Blood analysis after therapeutic baths of *C. macropomum*

Blood samples were collected from the fish after the therapeutic baths with 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO and before removal of the gills. Ten fish from each replicate (30 fish per treatment) were used to obtain blood samples from the caudal vessel with syringes and EDTA (10%). The blood was immediately divided into two aliquots. One aliquot was used to quantify erythrocytes in a hemocytometer, determine hematocrit using the microhematocrit method, and determine the hemoglobin concentration using the cyanometahemoglobin method. These data were used to calculate hematimetric indices of mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) as described in Wintrobe (1934). Blood smears were made and stained panchromically with a May Grünwald-Giemsa-Wright combination (Ranzani-Paiva et al., 2013) for the differential count of leukocytes in up to 200 cells of interest in each extension. The identification and nomenclature of leukocyte counts were performed as described in Tavares-Dias et al. (1999). Blood smears were also used to determine the total number of leukocytes and thrombocytes (Ranzani-Paiva et al., 2013).

The second blood aliquot was centrifuged at 75 G (Centrifuga MCD-2000, Brazil) to obtain plasma and to determine levels of glucose and total protein in the plasma. The glucose concentration was determined by the enzymatic-colorimetric glucose oxidase method using a commercial kit (Biotécnica, MG, Brazil) and spectrophotometer reading at 510 nm. The total plasma protein concentration was determined by the biuret method using a commercial kit (Biotécnica, MG, Brazil) and spectrophotometer reading at 540 nm. The readings were performed on a digital spectrophotometer (Biospectro SP-220, Brazil).

2.6. Procedures for histopathological analysis of *C. macropomum* gills after therapeutic baths

After the therapeutic baths with 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO, gills were collected from three fish from each replicate (9 fish per treatment) for histopathological analysis. The first gill arch on both sides of each fish was collected and fixed in formalin buffer (10%). Gill arches were dehydrated in a gradual series of ethanol (70, 80, 90, 100%) and xylol baths, and embedded in paraffin to obtain consecutive 5- μ m sections using an electron microtome (Thermo ScientificTM HM 340E, USA). Histological sections were prepared and stained with

hematoxylin-eosin (HE). Histological sections were prepared and stained with hematoxylin-eosin (HE). Images were taken using a common optical microscope (Leica DM 1000, USA) and the software Leica Application Suite 1.6.0 software. Histopathological analyses were performed in a semiquantitative manner using mean assessment values (MAV) (Schwaiger et al., 1997) and the histopathological alteration index (HAI) (Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994).

2.7. Statistical analyses

All data were evaluated for normality and homoscedasticity using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. No normal distributions were shown for the data, so treatments data were compared using the Kruskal-Wallis test and significant differences were determined using the Dunn test (Zar, 2010).

3. Results

3.1. Chemical composition of *C. citratus* essential oil

The chemical components of *C. citratus* EO are shown in Table 1. Almost all chemical components were quantified (97.8%), of which geranial (45.7%), neral (33.9%) and mircene (6.6%) represented the majority of the compounds in the *C. citratus* EO.

3.2. In vitro antiparasitic efficacy of *C. citratus* essential oil against monogeneans

The monogeneans *A. spathulatus*, *M. boegeri* and *N. janauachensis* in the *C. macropomum* of the two control groups (culture tank water and tank water + alcohol) showed total immobilization after 7 h. In the control group exposed to tank water + alcohol, in vitro immobilization of monogeneans was observed after 3 h of exposure, whereas immobilization was observed after 6 h in the other control group (Table 2). An efficacy of 100% occurred after 5 min for the monogeneans exposed to 500 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO. Mortality of the monogeneans was observed after 5 min of exposure with the 400 and 300 mg L⁻¹ treatments, but 100% efficacy occurred after 10 min with 400 mg L⁻¹ and 30 min with 300 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO. Parasite mortality occurred with 10 min exposure in the 200 and 100 mg L⁻¹ treatments, and 100% efficacy after exposure was observed at 30 and 100 min for the 200 and 100 mg L⁻¹ concentrations, respectively (Fig. 1 and Table 2).

Monogeneans exposed to tank water (control) presented a defined body shape and shallow wrinkles on the tegument surface (Fig. 2A). In contrast, the tegument of

monogeneans exposed to 500 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO showed extensive damage due to perforation caused by this EO (Fig. 2B).

3.3. Antiparasitic efficacy of therapeutic baths with *C. citratus* essential oil

The gills of *C. macropomum* were naturally parasitized by three monogenean species (*A. spathulatus*, *M. boegeri* and *N. janauachensis*), which showed variations in prevalence and abundance between different treatments. The mean abundance of *A. spathulatus* was reduced ($p < 0.05$) after three therapeutic baths with 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO when compared to the control treatments, whereas the mean abundance of *M. boegeri* and *N. janauachensis* were similar ($p > 0.05$) between treatments. The abundance of *M. boegeri* and *N. janauachensis* in the control treatment with the tank water + alcohol was lower ($p < 0.05$) when compared to those of the control with only the tank water (Table 3). The therapeutic baths with 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* showed an efficacy of 47.1%.

Changes in fish behavior were observed during the therapeutic baths with the *C. citratus* EO. The fish showed agitated behavior, acceleration of the opercular movement and erratic swimming after 5 min of exposure. After 10-12 min, the fish completely lost balance and opercular movements and were going to the bottom of the tank.

3.4. Effects on blood parameters of *C. macropomum* after therapeutic baths with *C. citratus* essential oil

Colossoma macropomum showed an increase ($p < 0.05$) in plasma glucose levels and a reduction in the number of leukocytes and total lymphocytes after therapeutic baths with 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO when compared to fish in the control treatments. In addition, the fish exposed to 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO showed a decrease in hemoglobin and increase in number of thrombocytes ($p < 0.05$) when compared to the fish in the control treatment with the water + alcohol. Fish exposed to the water + alcohol showed an increase ($p < 0.05$) in monocytes when compared to the other control and an increase in eosinophils when compared to the fish exposed to the *C. citratus* EO. The other parameters evaluated showed no changes between treatments (Table 4).

3.5. Histopathological alterations in *C. macropomum* gills after therapeutic baths with *C. citratus* essential oil

After therapeutic baths with 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO, histopathological analyses of gills showed significant differences ($p < 0.05$) between treatments regarding MAV and HAI (Table 5). The HAI of gills of fish exposed to 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO showed moderate to severe alterations when compared to controls, which were characterized by hyperplasia, lamellar fusion, detachment and aneurysm. The histopathological alterations observed in the gills of control fish exposed to tank water + alcohol were lamellar hyperplasia, fusion and secondary lamella congestion (Fig. 3).

4. Discussion

Essential oils possess different bioactive properties according to their production of secondary metabolites of mainly monoterpenes, sesquiterpenes and oxygenated derivatives, all of which vary in quantity, quality and composition according to the climate, soil composition, part of the plant, age and stage of the plant cycle (Vale et al., 2002; Barbosa et al., 2008; Teixeira et al., 2015; Soares et al., 2016; Tavares-Dias, 2018). Many essential oils have anesthetic effects and anthelmintic activity, in addition to several other bioactive properties that are beneficial in aquaculture (Soares et al., 2016; Soares et al., 2017a,b; Meneses et al., 2018; Tavares-Dias, 2018; Morales-Serna et al., 2019). In the present study, the major compounds of *C. citratus* EO were the monoterpenes geranial and neral, both of which composed nearly 80% of the compounds in this oil. The high occurrence of geraniol and neral as the main compounds in *C. citratus* EO has been shown in previous studies (Barbosa et al., 2008; Teixeira et al., 2015). The combination of the aldehyde isomers of geranial and neral form the monoterpene citral, which is responsible for the anthelmintic property of this EO (Barbosa et al., 2008; Teixeira et al., 2015). Bioactive properties of the essential oil may result from a synergistic effect of the major molecules or high concentrations of certain molecules (Teixeira et al., 2015; Tavares-Dias, 2018) as shown with the presence of citral in several EOs. Citral is the main bioactive compound in several OEs and has sedative and relaxing effects (Vale et al., 2002), which were observed in *C. macropomum* exposed to the *C. citratus* EO in the present study.

In vitro studies are an important preliminary step prior to the evaluation of therapeutic baths when antiparasitic effects of EO are unknown in fish (Tavares-Dias, 2018), thus facilitating the establishment of more appropriate strategies to control infections caused by

monogeneans. The different concentrations of *C. citratus* EO (100, 200, 300, 400 and 500 mg L⁻¹) showed 100% efficacy *in vitro* against the monogeneans *A. spathulatus*, *M. boegeri* and *N. janauachensis*, but the immobilization time of these parasites was dose dependent. Similar studies with the essential oils of *Lippia alba* (Soares et al., 2016), *Lippia sidoides* (Soares et al., 2017a) and *Lippia organoides* (Soares et al., 2017b) also reported dose dependent efficacy against monogeneans. However, the modes of action of EO in the treatment of monogeneans are little understood. Scanning electron microscopy (SEM) in the present study showed that the monogeneans exposed to *C. citratus* EO had perforated tegument after treatment. *Dactylogyrus intermedius* exposed to cinnamaldehyde of *Cinnamomum cassia* EO have been visualized with SEM and were shown with deep wrinkles and other extensive damage to the tegument (Ling et al., 2015). Justino and Barros (2008) observed that nematodes *Contracaecum* sp. exposed to *Cymbopogon* sp. presented an increased body volume, rupture of the tegument cuticle and disintegration of the intestinal wall.

The expansion of fish farming has led to an increase in infections caused by monogeneans. Hence, the aquaculture industry requires continuous advancements in technology and innovations to control outbreaks of such parasites, which have threatened productions of several fish species around the world (Centeno et al., 2004; Zhang et al., 2014; Soler-Jiménez et al., 2016; Tavares-Dias and Martins, 2017; Morales-Serna et al., 2019). Phytotherapies have been used for centuries in human medicine and as such, may be used in the control and treatment of fish diseases. Various EOs currently have broad applications in fish farming (Shah and Mraz, 2019) and their efficacy in controlling monogeneans vary according to the species of parasite and the concentration of an EO, which depends on fish tolerance (Soares et al., 2016; Soares et al., 2017a,b; Tavares-Dias, 2018) and the strategy used when treating with therapeutic baths. For the *C. macropomum*, the efficacy of therapeutic baths with *C. citratus* EO at 60 mg L⁻¹ was low (47.1%) when considering that it reduced less than 50% of the monogeneans (*A. spathulatus*, *M. boegeri* and *N. janauachensis*) in the fish gills. Therefore, since the maximum tolerance of *C. macropomum* exposed to *C. citratus* EO was low in the short baths of three days, a longer exposure time of about 6-7 days should be used to improve the efficacy. In contrast, Meneses et al. (2018) showed that short-term baths of 5 min for 3 consecutive days with 320 mg L⁻¹ of *Ocimum gratissimum* EO had an efficacy of 87.7% against the monogenean *Cichlidogyrus tilapiae*, whereas long-term therapeutic baths for 2 h and with 40 mg L⁻¹ of the same EO had an efficacy of 65.8%.

Despite the advantages of using EOs in fish farming, some EOs may have adverse effects and toxicity to the target fish species (Soares et al., 2016; Meneses et al., 2018; Tavares-Dias, 2018; Soares et al., 2017b). Therefore, the present study investigated alterations of hematological and biochemical parameters in *C. macropomum* exposed to 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO, as well as histology of the gills to evaluate their tolerance to this therapeutic concentration. *Colossoma macropomum* exposed to 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO had increase in plasma glucose levels and a reduction in the number of leukocytes and lymphocytes, hyperplasia, lamellar fusion, detachment and aneurysm in gills after therapeutic baths. In addition, there was a reduction in hemoglobin levels and an increase in the number of thrombocytes when compared to the fish exposed to water + alcohol. This increasing plasma glucose level and decrease in number of leukocytes and lymphocytes is a secondary response to stress in *C. macropomum* caused by the therapeutic baths. An increased glucose level is due to the glycogenolytic and gluconeogenic effects of catecholamines and cortisol, respectively, and has been used to measure acute and chronic stress responses in fish (Barton and Iwama, 1991; Davis, 2006; Soares et al., 2016), including exposure to EO. *C. macropomum* submitted to a 30 min bath with 100 or 150 mg L⁻¹ of *L. alba* EO have also been shown with an increase in glucose levels accompanied by a decrease in leukocytes and lymphocytes, and severity of gill lesions was directly proportional to the concentration of this EO (Soares et al., 2016). In the same study, the lesions in the gills were more severe in the fish exposed to 150 mg L⁻¹ of *L. alba* EO at 24 h after the bath (Soares et al., 2016). In contrast, one short bath using low concentrations of *L. origanoides* (20 or 40 mg L⁻¹) showed no alterations in glucose levels and in the number of leukocytes and lymphocytes in *C. macropomum*, but lesions in the gills varied in severity with the use of this EO (Soares et al., 2017a). Meneses et al. (2018) reported that *O. niloticus* treated with three short-term therapeutic baths with 320 mg L⁻¹ of *O. gratissimum* EO showed no damage in the gills, whereas long-term baths with 40 mg L⁻¹ provoked hyperplasia in the gills (Meneses et al., 2018). Therefore, these results indicate that damages in gills of fish exposed to essential oils are dependent on the fish species as well as the phytotherapies species and applied concentrations.

5. Conclusions

Cymbopogon citratus EO possesses *in vitro* anthelmintic efficacy that was dose dependent, and low concentrations of this EO showed anesthetic effects on *C. macropomum*. Furthermore, this EO had low anthelmintic efficacy against monogeneans of *C.*

macropomum gills due to the low tolerance of the fish to the EO and the use of a low concentration for the therapeutic baths, which caused stress that may compromise the fish immune system, as well as moderate to severe changes in gills. The present study indicates that therapeutic baths with 60 mg L⁻¹ of *C. citratus* EO is a safe concentration for treating *C. macropomum* and suggests that more exposures at a minimum of 6-7 consecutive days may increase the efficacy against the ectoparasites.

Acknowledgements

The authors would like to thank Embrapa for the financial support for this project (Project CYLIALPI). M. Tavares Dias thanks to National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the research fellowship granted (Grant N° 303013/2015-0).

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL. 808pp. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978\(96\)83708-2](http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978(96)83708-2)
- Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B., Oyedeji, A., 2015. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules* 20,7438-7453. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20057438>
- Barbosa, L., Pereira, U., Martinazzo, A., Maltha, C., Teixeira, R., Melo, E., 2008. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf samples. *Molecules* 13,1864-1874. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules13081864>
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann Rev. Fish Dis.* 1,3-26. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575-583.
- Centeno, L., Silva-Acuña, A., Silva-Acuña, R., Pérez, J.L., 2004. Fauna ectoparasitaria asociada a *Colossoma macropomum* y al híbrido de *C. macropomum* x *Piaractus brachypomus*, cultivados en el estado delta Amacuro, Venezuela. *Bioagro* 16,121-126.
- Davis, K.B., 2006. Management of physiological stress in finfish aquaculture. *North Amer. J. Aquacul.* 68, 116-121. <http://dx.doi.org/10.1577/a05-007.1>

- Ebani, V., Najar, B., Bertelloni, F., Pistelli, L., Mancianti, F., Nardoni, S., 2018. Chemical composition and in vitro antimicrobial efficacy of sixteen essential oils against *Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* isolated from poultry. *Vet Scien.* 5, 62. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci5030062>
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., 2006. Métodos de estudos e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Editora UEM, Maringá 173 pp.
- Justino, C.H., Barros, L.A., 2008. In vitro evaluation of the resistance of the *Contraecaecum* sp. larvae (Railliet & Henry, 1912) (Nematoda: Anisakidae), to the essential oil of citronella (*Cymbopogon* sp.) (Poaceae). *Rev. Bras. Cien. Vet.* 15,122-125 <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.212>
- Ling, F., Jiang, C., Liu, G., Li, M., Wang, G., 2015. Anthelmintic efficacy of cinnamaldehyde and cinnamic acid from cortex cinnamon essential oil against *Dactylogyrus intermedius*. *Parasitology* 142,1744-1750. <http://dx.doi.org/10.1017/S00311882015001031>
- Machado, M., Pires, P., Dinis, A.M., Santos-Rosa, M., Alves, V., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Sousa, M.C., 2012. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. *Exp. Parasitol.* 130, 223-231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.12.012>
- Matasyoh, J.C., Wagara, I.N., Nakavuma, J.L., 2011. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *African J. Food Sci* 5,138-142.
- Meneses, J.O., do Couto, M.V.S., Sousa, N.C., Cunha, F.D.S., Abe, H.A., Ramos, F.M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., Carneiro, P.C., 2018. Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus tilapiae* gill parasite of Nile tilapia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 70, 497-504. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9667>
- Morales-Serna, F.N., Caña-Bozada, V.H., López-Moreno, D.G., Medina-Guerrero, R.M., Morales-Serna, J.A., Fajer-Ávila, E.J., 2019. In vitro efficacy of two terpenes against ancyrocephalid monogeneans from Nile tilapia. *J. Paras. Dis.* 43,739-742. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-019-01150-2>
- Poleksić, V., Mitrović-Tutundžić, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish.* Oxford: Fishing News Books 339-52.

- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. 1^a ed. Eduem, Maringá.
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aqua. Ecosystems. Stress Recov.* 6, 75-86. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008212000208>
- Shah, B. R., Mraz, J., 2019. Advances in nanotechnology for sustainable aquaculture and fisheries. *Rev. Aquacul.* 1-18. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12356>
- Shinn, A.J., Pratoomyot, J., Bron, J., Paladini, G., Brooker, E., Brooker, A., 2015a. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. *Global Aquacul. Advocate* 82-84.
- Soares, B.V., Neves, L.R., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Dias, M.K.R., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M., 2016. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture* 452,107-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>
- Soares, B.V., Cardoso, A.C.F., Campos, R.R., Gonçalves, B.B., Santos, G.G., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M. 2017a. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469, 72-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>
- Soares, B.V., Neves, L.R., Ferreira, D.O., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Gonçalves, R.A., Tavares-Dias, M., 2017b. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Vet. Parasitol.* 234, 49-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.012>
- Soler-Jiménez, L.C., Paredes-Trujillo, A.I., Vidal-Martínez, V.M., 2017. Helminth parasites of finfish commercial aquaculture in Latin America. *J. Helminthol.* 91, 110-136. <http://dx.doi.org/10.1017/s0022149x16000833>
- Tavares-Dias, M., Sandrim, E.F.S., Campos-Filho, E.D., 1999. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo: II. Leucócitos. *Rev. Brasil. Zool.* 16, 175-184. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751999000100012>

- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J. Paras. Dis.* 41, 913-918. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Tavares-Dias, M., 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aqua. Liv. Res.* 31, 13. <http://dx.doi.org/10.1051/alr/2018001>
- Teixeira, Z., Fernández, F., Ramos, A., Fernandes, A., Pinto, J., Escalona-Arranz, J., de Carvalho, M., 2015. Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 24, 36-44. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015006>
- Vale, T.G., Furtado, E.C., Santos, J.G., Viana, G.S.B., 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Phytomedicine* 9, 709-714. <http://dx.doi.org/10.1078/094471102321621304>
- Wintrobe, M., 1934. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. *Folia Haematologica* 51:32-49.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 4th edition 944 pp.
- Zhang, X.P., Li, W.X., Ai, T.S., Zou, H., Wu, S.G., Wang, G.T., 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture* 420, 302-307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.022>

Table 1. Chemical compounds of the *Cymbopogon citratus* essential oil.

Peak	% Content	Retention index	Identification
1	0.6	0	Alpha-pinene
2	0.5	IK calc.	Beta-pinene
3	0.5	939	6-methyl-5-hepten-2-one
4	6.6	981	Myrcene
5	0.6	989	6,7-epoxymyrcene
6	1.4	993	Linalool
7	0.5	1095	Ni
8	0.7	1101	Ni
9	0.3	1168	Citronelol
10	33.9	1185	Neral
11	3.0	1231	Geraniol
12	45.7	1244	Geranial
13	1.3	1258	Ni
14	1.1	1341	Ni
15	1.1	1356	Geranyl acetate
16	0.1	1386	Ni
Total identified (%)	97.8		

Ni: Undetermined

Table 2. *In vitro* antiparasitic action of *Cymbopogon citratus* essential oil in monogeneans of *Colossoma macropomum*, in relation to the concentrations and time of exposure.

Time of exposure	Treatments	Live parasites	Mortality (%)
0 h	Water	35 ± 5.3	0
5 min	Water	35 ± 5.3	0
10 min	Water	35 ± 5.3	0
30 min	Water	35 ± 5.3	0
1.40 min	Water	35 ± 5.3	0
3 h	Water	35 ± 5.3	0
6 h	Water	19 ± 4.3	49.0
7 h	Water	0.0 ± 0.0	100

Table 2. Continued...

Time of exposure	Treatments	Live parasites	Mortality (%)
0 h	Water + alcohol	33 ± 1.3	0
5 min	Water + alcohol	33 ± 1.3	0
10 min	Water + alcohol	33 ± 1.3	0
30 min	Water + alcohol	33 ± 1.3	0
1.40 min	Water + alcohol	33 ± 1.3	0
3 h	Water + alcohol	31 ± 1.7	5.0
6 h	Water + alcohol	10 ± 5.1	86.0
7 h	Water + alcohol	0.0 ± 0.0	100
0 h	100 mg L ⁻¹	31 ± 2.0	0
5 min	100 mg L ⁻¹	31 ± 2.0	0
10 min	100 mg L ⁻¹	30 ± 1.0	2.0
30 min	100 mg L ⁻¹	15 ± 4.0	48.0
1h40 min	100 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
0 h	200 mg L ⁻¹	26 ± 2.0	0
5 min	200 mg L ⁻¹	26 ± 2.0	0
10 min	200 mg L ⁻¹	22 ± 0.0	11.0
30 min	200 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
0 h	300 mg L ⁻¹	31 ± 6.0	0
5 min	300 mg L ⁻¹	22 ± 0.0	27.0
10 min	300 mg L ⁻¹	19 ± 1.0	35.0
30min	300 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
0 h	400 mg L ⁻¹	25 ± 5.0	0
5 min	400 mg L ⁻¹	10 ± 10.0	45.0
10 min	400 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
0 h	500 mg L ⁻¹	23 ± 1.0	0
5 min	500 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100

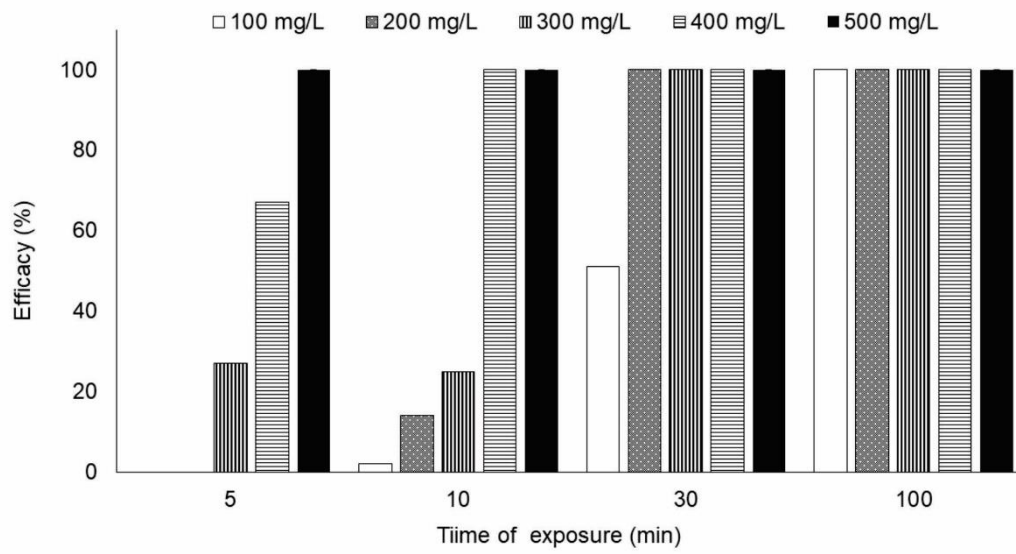


Fig 1. *In vitro* efficacy of different concentrations of *Cymbopogon citratus* the essential oil against monogenean parasites.

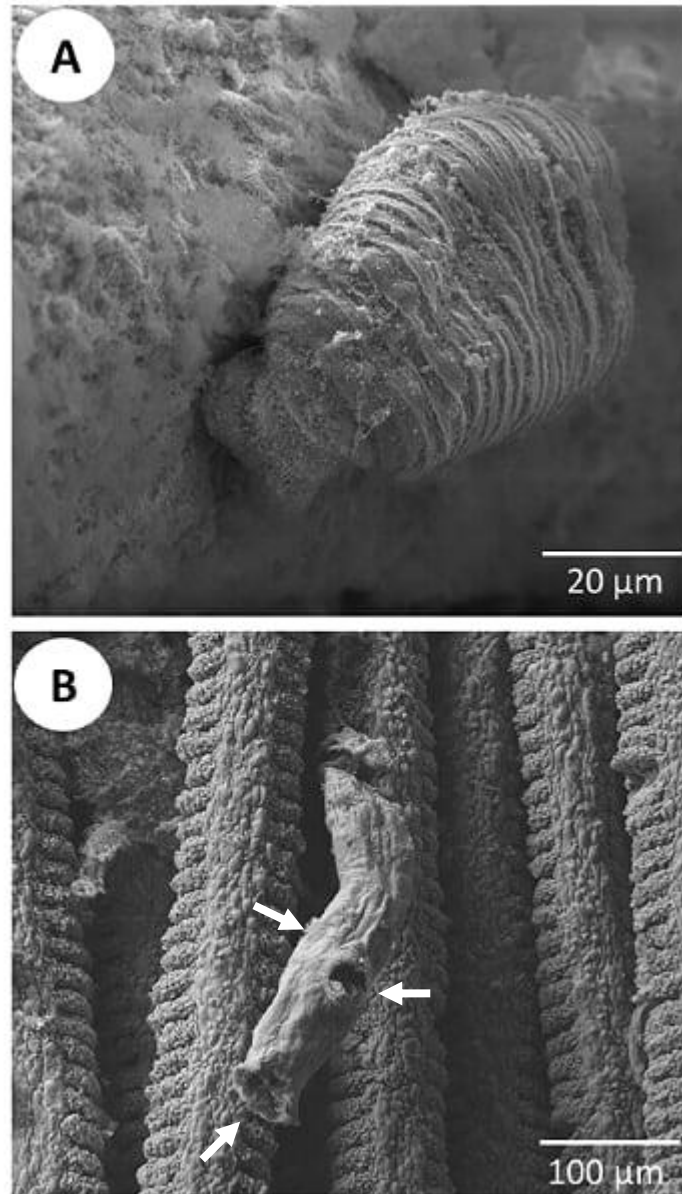


Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) of monogeneans on *Colossoma macropomum* exposed to *Cymbopogon citratus* essential oil. Untreated parasite (**A**). Parasites exposed to 500 mg L⁻¹ *Cymbopogon citratus* essential oil (**B**).

Table 3. Prevalence (P%) and mean abundance (MA) of the parasite monogeneans on gills of

Treatments	Tank water		Tank water + alcohol		60 mg L ⁻¹	
	P (%)	MA	P (%)	MA	P (%)	MA
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	100	9.3 ± 4.6 ^a	100	18.4 ± 16 ^b	100	6.3 ± 4.5 ^c
<i>Mymarothecium boegeri</i>	50	2.3 ± 2.7 ^a	10	0.3 ± 0.8 ^b	46.7	0.8 ± 1.0 ^{ab}
<i>Notozothecium janaouachensis</i>	46.7	2.4 ± 3.3 ^a	3.3	0.1 ± 0.7 ^b	23.3	0.2 ± 0.4 ^{ab}

Values express mean ± deviation standard. Different letter, in same line, indicate differences by the Dunn test (p<0.05).

Table 4. Body and blood parameters of *Colossoma macropomum* exposed to *Cymbopogon citratus* essential oil.

Parameters	Water	Water + alcohol	60 mg L ⁻¹
Body weight (g)	21.6 ± 4.9 ^a	23.1 ± 4.2 ^a	22.9 ± 3.5 ^a
Length (cm)	10.5 ± 0.9 ^a	10.8 ± 0.9 ^a	10.8 ± 0.7 ^a
Glucose (g dL ⁻¹)	101.0 ± 18.5 ^a	78.0 ± 23.0 ^b	122.1 ± 22.6 ^c
Total protein (mg dL ⁻¹)	4.3 ± 0.6 ^a	6.3 ± 9.0 ^a	3.8 ± 0.7 ^a
Red blood cells (x10 ⁶ µL ⁻¹)	1.33 ± 0.21 ^a	1.39 ± 0.39 ^a	1.24 ± 0.21 ^a
Hemoglobin (g dL ⁻¹)	6.5 ± 0.8 ^{ab}	6.8 ± 1.4 ^b	5.9 ± 1.1 ^a
Hematocrit (%)	22.8 ± 3.0 ^a	23.1 ± 2.6 ^a	24.1 ± 2.4 ^a
MCV (fL ⁻¹)	177.2 ± 41.1 ^a	193.0 ± 117.4 ^a	197.9 ± 26.4 ^a
MCHC (g dL ⁻¹)	29.4 ± 6.8 ^a	29.6 ± 5.9 ^a	24.4 ± 4.1 ^a
Thrombocytes (µL ⁻¹)	15087 ± 12364 ^{ab}	6050 ± 2048 ^a	19179 ± 3346 ^b
Leukocytes (µL ⁻¹)	9945 ± 1661 ^a	14595 ± 4300 ^a	6187 ± 1079 ^b
Lymphocytes (µL ⁻¹)	4303 ± 2039 ^a	6187 ± 472 ^a	1206 ± 866 ^b
Monocytes (µL ⁻¹)	385 ± 335 ^a	2090 ± 1916 ^b	600 ± 377 ^{ab}
Neutrophils (µL ⁻¹)	4777 ± 0.30 ^a	4733 ± 3460 ^a	3970 ± 1074 ^a
PAS-GL (µL ⁻¹)	102 ± 165 ^a	376 ± 593 ^a	149 ± 218 ^a
Eosinophils (µL ⁻¹)	382 ± 224 ^{ab}	1219 ± 908 ^a	262 ± 269 ^b

Values express mean ± deviation standard. Different letter, in same line, indicate differences by the Dunn test (p<0.05).

Table 5. Values of histopathological alteration index (HAI) and mean assessment values (MAV) for gills of *Colossoma macropomum* exposed to the essential oil of *Cymbopogon citratus*.

Treatments	N	MAV	HAI	Severity of lesions according to the HAI
Water	9	0.3 ± 0.4 ^a	0.3 ± 0.4 ^a	No alteration in gills
Water + alcohol	9	0.6 ± 0.8 ^{ab}	5.7 ± 8.4 ^a	No alteration in gills
60 mg L ⁻¹	9	1.4 ± 0.4 ^b	37.8 ± 38.2 ^b	Moderate to severe alterations of gills

Values express mean ± deviation standard. Different letter, in same column, indicate differences by the Dunn test (p<0.05).

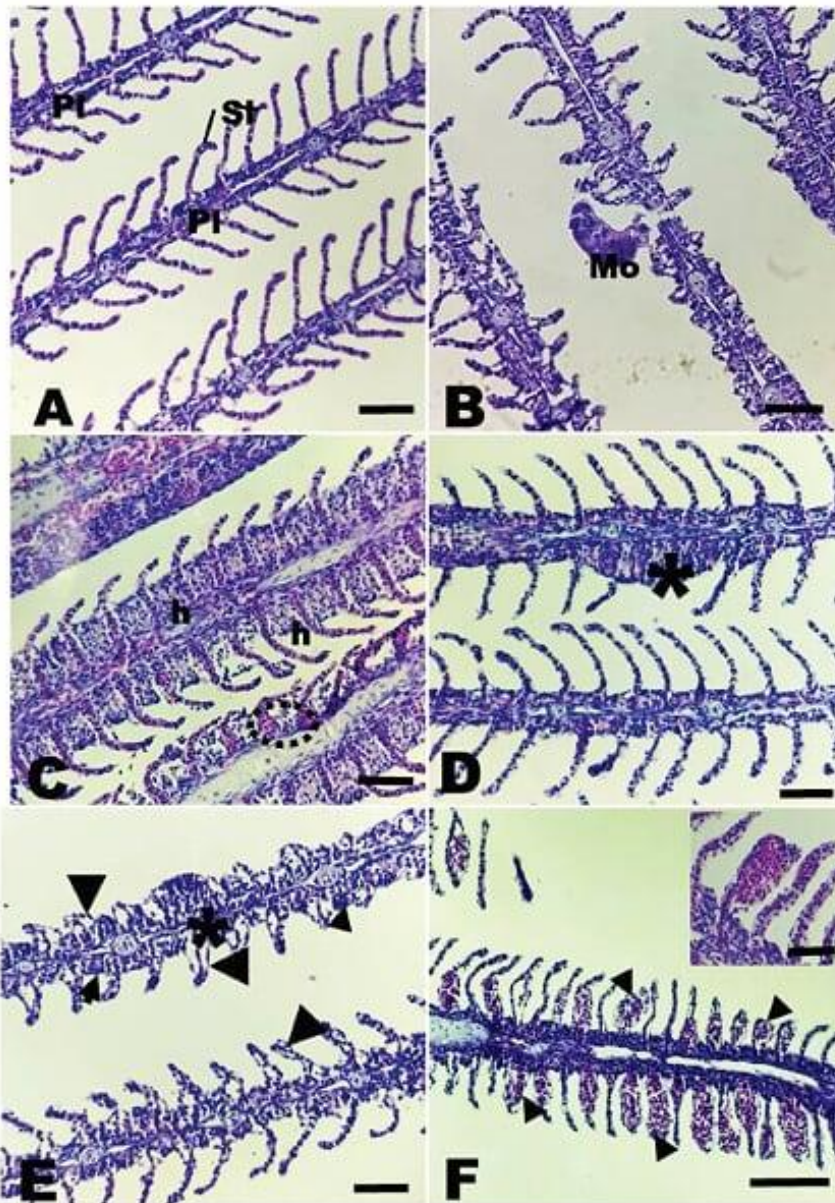


Fig. 3. (A) *Collossoma macropomum* gills exposed to water of cultivation tank (control) showing primary (Pl) and secondary lamellas (Sl). (B) Monogenean in gills of fish exposed to water of cultivation tank (control). (C) Hyperplasia lamellar (h) and congestion of secondary lamellas (circle) in fish exposed to water of cultivation tank + alcohol (control). (D) Hyperplasia with fusion of secondary lamellas (*) in fish exposed to water of cultivation tank + alcohol. (E) Hyperplasia with fusion of secondary lamellas (*), detachment of lamellar epithelium (triangle) and hyperplasia in gills of fish exposed to 60 mg L⁻¹ *Cymbopogon citratus* essential oil. (F) Aneurism (arrow) in gills of fish exposed to 60 mg L⁻¹ *Cymbopogon citratus* essential oil. Scale bar: 30 μm.

5. CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *C. citratus* apresentou geranial (45.7%) e neral (33.9%) como principais componentes químicos.
- Todas as cinco concentrações de óleo essencial de *C. citratus* testadas *in vitro* contra monogêneas (*A. spathulatus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis*) tiveram 100% eficácia e foram dose-dependente, pois 500 mg/L foi eficaz após cinco minutos de exposição, o tempo mais curto observado.
- 500 mg/L de óleo essencial de *C. citratus* causou danos estruturais no tegumento dos parasitos.
- A concentração tolerada por *C. macropomum* para os banhos terapêuticos foi de 60 mg/L e por apenas 20 minutos de exposição, e após 5 minutos causou comportamento agitado nos peixes, aceleração do movimento opercular e natação irregular, mas após 10-12 minutos, levou a perda completa do equilíbrio e dos movimentos operculares.
- 60 mg/L de óleo essencial usado nos banhos terapêuticos teve 47.1% de eficácia antiparasitária e causou alterações severas a moderadas nas brânquias dos peixes expostos como hiperplasia, fusão e desprendimento das lamelas branquiais, além de aneurisma.
- O tratamento com banhos terapêuticos com 60 mg/L teve 47.1% eficácia contra *A. spathulatus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis* e aumentou o nível de glicose e hemoglobina, número de trombócitos, monócitos e eosinófilos, e reduziu o número de leucócitos e linfócitos.
- O tratamento com banhos terapêuticos com 60 mg/L de OE de *C. citratus* é seguro para controle e tratamento contra monogêneas de *C. macropomum*, mas recomenda-se a exposições de 6 a 7 dias consecutivos para aumentar a eficácia contra os parasitos na piscicultura, uma vez que exposição durante 3 dias mostrou baixa eficácia.

7. ANEXO

Comprovante de submissão do artigo ao periódico Aquaculture

Zimbra

marcos.tavares@embrapa.br

[PROVAVEL SPAM] Successfully received: submission Anthelmintic efficacy of Cymbopogon citratus essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of Colossoma macropomum (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects for Aquaculture

De : Aquaculture

<EvisSupport@elsevier.com>

Seg, 30 de Dez de 2019 20:05

Assunto : [PROVAVEL SPAM] Successfully received: submission Anthelmintic efficacy of Cymbopogon citratus essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of Colossoma macropomum (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects for Aquaculture**Para :** marcos tavares

<marcos.tavares@embrapa.br>

Responder para : AQUA@elsevier.com

This message was sent automatically.

Ref: AQUA_2019_3320

Title: Anthelmintic efficacy of Cymbopogon citratus essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of Colossoma macropomum (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects

Journal: Aquaculture

Dear Professor. Tavares-Dias,

Comprovante de submissão do artigo ao periódico Aquaculture com os Autores
Your co-authored submission

Dear Dr. Gonzalees,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Aquaculture

Title: Anthelmintic efficacy of Cymbopogon citratus essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of Colossoma macropomum (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects

Corresponding Author: Marcos Tavares-Dias

Co-Authors: Anai Gonzalees, Eliane Tie Yoshioka, Patrick Mathews, Francisco Célio Chaves, Omar Mertins, Marcela Videira

Marcos Tavares-Dias submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating

to http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=AQUA

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at marcos.tavares@embrapa.br.

Thank you,
Aquaculture