



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais



JOÃO GABRIEL ROSÁRIO DA LUZ

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet*
(ZINGIBERACEAE) EM MONOGENEA, COM AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E
HISTOPATOLÓGICA EM *Colossoma macropomum* (SERRASALMIDAE)**

Macapá - AP

2021

JOÃO GABRIEL ROSÁRIO DA LUZ

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet*
(ZINGIBERACEAE) EM MONOGENEAS, COM AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E
HISTOPATOLÓGICA EM *Colossoma macropomum* (SERRASALMIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Dr. Marcos Tavares Dias

Macapá - AP

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Luz, João Gabriel Rosário da.

Atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (ZINGIBERACEAE) em monogeneas, com avaliação hematológica e histopatológica em *Colossoma macropomum* (SERRASALMIDAE). / João Gabriel Rosário da Luz; orientador, Marcos Tavares Dias. – Macapá, 2021.
53 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais.

1. Aquicultura. 2. Peixes - Parasitas. 3. Peixes - Amazônia. 4. Toxicidade.
I. Dias, Marcos Tavares, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

639.3 L979a

CDD. 22 ed.

JOÃO GABRIEL ROSÁRIO DA LUZ

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet*
(ZINGIBERACEAE) EM MONOGENEAS, COM AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E
HISTOPATOLÓGICA EM *Colossoma macropomum* (SERRASALMIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Aprovada em 30 de abril de 2021.

BANCA EXAMINADORA

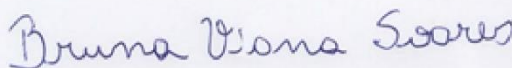


Dr. Marcos Tavares Dias (Orientador) (PPGCA/ Embrapa Amapá_

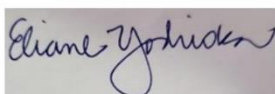


Documento assinado digitalmente
Mauricio Laterça Martins
Data: 30/04/2021 11:19:18-0300
CPF: 082.371.998-71
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dr. Mauricio Laterça Martins (UFSC)



Dra. Bruna Viana Soares (DIAGRO/AP)



Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka (PPGBio/Embrapa Amapá)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Marcos Tavares-Dias por todos os ensinamentos, disponibilidade de tempo, paciência e apoio.

A minha esposa Lilia Suzane Nascimento, pelo apoio incondicional durante toda a jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA), ao Laboratório de Aquicultura e Pesca da Embrapa Amapá e ao Laboratório de Morfosiologia e Sanidade Animal da Universidade Federal do Amapá por terem cedido ambientes de muita aprendizagem teórica e prática.

Aos colegas do Laboratório de Aquicultura e Pesca da Embrapa Amapá, pela fundamental participação e ajuda nas práticas laboratoriais.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho de Mestrado.

PREFÁCIO

Esta dissertação está dividida em dois capítulos, seguindo o formato alternativo proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências ambientais (PPGCA). Assim, inicialmente, é feita uma introdução na dissertação, seguida pelo artigo 1 intitulado “**Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) has anthelmintic efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum*, a Neotropical Serrasalmidae**” que foi submetido ao periódico Aquaculture Qualis A1(Anexo 1).

RESUMO

LUZ, J. G. R. Atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) em monogeneas, com avaliação hematológica e histopatológica em *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências ambientais, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2021.

Este estudo investigou pela primeira vez a eficácia anti-helmíntica de óleo essencial (OE) de *Alpinia zerumbet* contra monogenea de *Colossoma macropomum*, bem como os efeitos sanguíneos e histopatológicos desse óleo essencial para esse peixe. Nos ensaios *in vitro* foram avaliadas diferentes concentrações do OE de *A. zerumbet* (300, 600, 1200 e 2400 mg L⁻¹) e dois grupos controles: com água do tanque de cultivo e água do tanque de cultivo + álcool etílico 70%. Os componentes majoritários do OE foram terpinen-4-ol (27,7%), eucalyptol (19,2%) e γ -terpineno (14,9%). Os testes de tolerância mostraram que *C. macropomum* tolera exposição a 300 mg L⁻¹ de OE, concentração usada nos banhos terapêuticos. Os peixes foram expostos a 300 mg L⁻¹ de *A. zerumbet* EO por 30 minutos, durante seis dias consecutivos. Após os banhos terapêuticos, foram coletadas as brânquias dos peixes para quantificar os parasitos, determinar a prevalência e abundância média de parasitos e realizar as análises histopatológicas. Também foram retiradas amostras de sangue para determinar os parâmetros sanguíneos como eritrócitos, leucócitos e bioquímica. Os monogenéticos *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* e *Notozothecium janauachensis* tiveram 100% de imobilização *in vitro* em todas as concentrações do óleo essencial testadas, com efeito dose dependente. Estudos de microscopia eletrônica de varredura mostraram que os parasitos expostos à OE de *A. zerumbet* apresentaram enrugamento profundo no tegumento. Os peixes mostraram tolerância à concentração de 300 mg L⁻¹ de OE de *A. zerumbet*, que foi usada nos banhos terapêuticos. Observamos nos peixes expostos efeito anestésico de EO de *A. zerumbet* com rápida sedação e recuperação após exposição. Os banhos terapêuticos com 300 mg L⁻¹ de OE de *A. zerumbet* tiveram eficácia anti-helmíntica de 94% e baixa toxicidade para os peixes. Apenas os níveis de glicose plasmática e proteína total, número de leucócitos, neutrófilos e monócitos apresentaram redução nos peixes expostos a 300 mg L⁻¹ de OE. As alterações histopatológicas leves não comprometeram o funcionamento das brânquias de *C. macropomum*. Portanto, 300 mg L⁻¹ de OE de *A. zerumbet* pode ser usada em banhos terapêuticos de 30 min/dia, durante seis dias consecutivos, para controlar e tratar infecções causadas por monogeneas nas brânquias de *C. macropomum*.

Palavras-chave: Aquicultura, Sangue, Parasito, Tratamento, Tolerância, Toxicidade

ABSTRACT

LUZ, J. G. R. Anthelmintic activity of the essential oil of *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) in monogeneans, with hematological and histopathological evaluation in *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae). Master Dissertation – Postgraduate Program in Environmental Sciences, Federal University of Amapá, Macapá, 2021.

This study investigated, for the first time, the anthelmintic efficacy of *Alpinia zerumbet* essential oil (EO) against monogeneans of *Colossoma macropomum*, as well as the blood and histopathological effects of this essential oil for this fish. In *in vitro* tests, different concentrations of the essential oil of *A. zerumbet* (300, 600, 1200 and 2400 mg L⁻¹) and two control groups (one with water from the culture tank and other with water from the culture tank + 70% ethyl alcohol) were evaluated. The majority components of EO were terpinen-4-ol (27.7%), eucalyptol (19.2%) and γ -terpinene (14.9%). Tolerance tests showed that *C. macropomum* tolerates exposure to 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, the concentration used in therapeutic baths. In therapeutic baths, the fish were exposed to 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO for 30 minutes, for six consecutive days. After the therapeutic baths, the gills of the fish were collected to quantify the parasite and to determine the prevalence and mean abundance of parasites and to carry out the histopathological analyzes. Blood samples were also taken to determine blood parameters such as erythrocytes, leukocytes and biochemical. The monogeneans *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* and *Notozothecium janauachensis* had 100% immobilization *in vitro* at all EO concentrations tested, with a dose dependent effect. Scanning electron microscopy studies showed that the parasite exposed to *A. zerumbet* EO showed deep wrinkling in the integument. The fish showed tolerance to the concentration of 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, which was used in therapeutic baths. We observed anesthetic effect of *A. zerumbet* EO in exposed fish with rapid sedation and recovery after exposure. Therapeutic baths with 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO had anthelmintic efficacy of 94% and low toxicity to fish. Just the levels of plasma glucose and total protein, and number of leukocytes, monocytes and neutrophils has a decreases in fish exposed to 300 mg L⁻¹ de OE, and mild histopathological changes that did not compromise the functioning of the gills of *C. macropomum*. Therefore, 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO can be used in therapeutic baths of 30 min/day, for six consecutive days, for controlling and treating infections caused by monogeneans in the gills of *C. macropomum*.

Keywords: Aquaculture, Blood, Parasite, Treatment, Tolerance, Toxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>Colossoma macropomum</i> e infecções por monogeneas	13
1.2. Óleos essenciais no controle e tratamento contra monogenea em peixes	14
1.3. Fitoterapia e uso de óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> na aquicultura.....	17
1.4. Efeitos adversos de óleos essenciais na hematologia e histologia de peixes.....	19
2. PROBLEMAS.....	21
3. HIPÓTESES	21
4. OBJETIVOS	22
4.1. Geral	22
4.2. Específicos.....	22
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	23
ARTIGO 1: Essential oil of <i>Alpinia zerumbet</i> (Zingiberaceae) has anthelmintic efficacy against monogenean of <i>Colossoma macropomum</i>, a neotropical Serrasalminidae	36
1. INTRODUCTION	39
2. MATERIALS AND METHODS.....	40
2.1 Fish and acclimation	40
2.2 Obtaining and chemical composition of <i>A. zerumbet</i> essential oil	40
2.3 <i>In vitro</i> assay with monogeneans of <i>Colossoma macropomum</i>	41
2.4 Scanning electron microscopy of the monogeneans used in the <i>in vitro</i> assays.....	41
2.5 Tolerance test of the <i>C. macropomum</i> to different concentrations of the <i>A. zerumbet</i> EO	42
2.6 Therapeutic baths with <i>A. zerumbet</i> EO in <i>C. macropomum</i>	42
2.7 Blood analyses in <i>C. macropomum</i> after therapeutic baths with <i>A. zerumbet</i> EO	42
2.8 Histopathological analyses of the gills of <i>C. macropomum</i> after therapeutic baths with <i>A. zerumbet</i> EO.....	43
2.9 Statistical analyses	43
3. RESULTS.....	44
3.1. Composition of <i>A. zerumbet</i> EO	44
3.2. <i>In vitro</i> efficacy of the <i>A. zerumbet</i> EO against monogeneans of <i>C. macropomum</i>	44
3.3. Scanning electronic microscopy of monogeneans exposed to <i>A. zerumbet</i> EO	47
3.4. Tolerance of <i>C. macropomum</i> to different concentrations of <i>A. zerumbet</i> EO	47
3.5. Therapeutic baths and anthelmintic action of <i>A. zerumbet</i> EO in <i>C. macropomum</i>	48

3.6. Blood parameters of <i>the C. macropomum</i> exposed to <i>Alpinia zerumbet</i> EO	48
3.7. Histopathological analyses of the gills of <i>C. macropomum</i> after therapeutic baths with <i>A. zerumbet</i> EO.....	50
4. DISCUSSION.....	52
5. CONCLUSIONS.....	54
REFERENCES	54
CONCLUSÕES FINAIS	59
ANEXO 1.....	60

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o crescimento populacional do planeta chegará próximo a 10 bilhões de habitantes em 2050. Esse incremento populacional, consequentemente aumentará a demanda global por alimentos, água potável e energia (ONU, 2019). Diante desse cenário e do declínio de estoques naturais de peixes, a aquicultura tem sido cada vez mais estimulada a aumentar sua produção, maximizando a eficiência dos seus sistemas, espaços e recursos, exigindo o desenvolvimento de novas estratégias de manejo e controle de doenças, tanto para reduzir impactos ambientais quanto para alcançar uma maior segurança alimentar (FAO, 2018; Hoof et al., 2019; Nobile et al., 2019).

Nos últimos anos, a aquicultura mundial tem crescido mais rapidamente que outros grandes setores de produção de alimentos. Em 2016, a produção aquícola mundial foi de 110,2 milhões de toneladas, gerando um valor de US\$ 243,5 bilhões. Desse total, 80 milhões de toneladas foram oriundas exclusivamente da piscicultura, representando 72,6% da produção aquícola global, que movimentou US\$ 231,6 bilhões. Essa produção tem se tornado cada vez mais importante, tanto por contribuir com o fornecimento de proteína animal de alto valor biológico para o consumo do homem, como por gerar empregos e renda, impulsionando assim o desenvolvimento econômico de diversos países (FAO, 2018).

Todavia, juntamente com o crescimento da produção da aquicultura, tem aumentado o número de surtos de doenças que afetam negativamente a produção, lucratividade e a sustentabilidade dessa importante indústria (Ina-Salwany et al., 2019). Na aquicultura, a maior parte das perdas na produção se deve a problemas com doenças (Assefa and Abunna, 2018). Para a piscicultura mundial, estima-se que as perdas provocadas por doenças parasitárias causem prejuízos econômicos de US\$ 1,05-9,58 bilhões/ano (Shinn et al., 2015). No Brasil, doenças na piscicultura de água doce causam perdas econômicas estimadas em US\$ 84 milhões/ano (Tavares-Dias and Martins, 2017). Por isso, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para encontrar soluções mitigatórias que reduzam esses problemas com doenças na piscicultura (Tavares-Dias et al., 2011; Lu et al., 2011; Hu et al., 2014; Chagas et al., 2016; Hashimoto et al., 2016; Malheiros et al., 2016; Soares et al., 2016, 2017a, 2017b; Costa et al., 2017; Castro et al., 2018; Corral et al., 2018; Cunha et al., 2018; Enevova et al., 2018; Lopez et al., 2018; Alves et al., 2019; Bader et al., 2019; Garcia Magana et al., 2019; Tancredo et al., 2019), incluindo doenças causadas por monogeneas.

Globalmente, o controle e tratamento de doenças causadas por monogeneas têm sido realizados usando diversos agentes químicos convencionais (ex. levamisol, albendazol,

mebendazol, ivermectina, cloreto de sódio, sulfato de cobre, verde malaquita, praziquantel, formalina, entre outros). Porém, muitas vezes o uso desses quimioterápicos, além de não alcançar um resultado eficaz, causa efeitos tóxicos aos peixes e riscos à saúde do homem, podendo também poluir o meio ambiente, devido à descarga considerável de resíduos químicos tóxicos nos ecossistemas aquáticos adjacentes aos locais de cultivo. Consequentemente, muitos quimioterápicos foram proibidos para uso na aquicultura em vários países (Costello et al., 2001; Srivastava et al., 2004; Maximiano et al., 2006; Tavechio et al., 2009; Tavares-Dias et al., 2011; Martinez-Porchas and Martinez-Cordova, 2012; Rico and Brink, 2014; Valladão et al., 2015; Chagas et al., 2016; Enevova et al., 2018; Alves et al., 2019; Bader et al., 2019; Garcia Magana et al., 2019; Lieke et al., 2019; Tancredo et al., 2019). Outro grande problema no uso frequente de quimioterápicos está relacionado à resistência dos parasitos. O uso indevido, doses insuficientes ou excessivas dessas substâncias, exercem pressão seletiva e geram o desenvolvimento da resistência aos produtos químicos, limitando assim a eficácia dos tratamentos (Buchmann et al., 1992; Hur et al., 2012; Zhang et al., 2014).

Nos últimos anos, fitoterápicos e seus compostos bioativos têm atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores, pois além de serem considerados ambientalmente “amigáveis”, frequentemente têm apresentado bons resultados no controle de doenças parasitárias em peixes (Lu et al., 2011; Hu et al., 2014; Hashimoto et al., 2016; Costa et al., 2017; Corral et al., 2018; Cunha et al., 2018; Lopez et al., 2018). Os óleos essenciais, por exemplo, além de geralmente serem baratos e disponíveis, apresentam-se como uma fonte promissora de diversos compostos bioativos, constituídos majoritariamente por terpenos e seus derivados, podendo substituir quimioterápicos convencionais usados há muito tempo na piscicultura (Harikrishnan et al., 2011; Murthy and Kiran, 2013; Pandey, 2013; Tu et al., 2013; Valladão et al., 2015; Hashimoto et al., 2016; Soares et al., 2016, 2017a; Morales-Serna et al., 2019). Além de óleos essenciais geralmente apresentarem menos efeitos colaterais aos peixes expostos quando comparados os quimioterápicos disponíveis comercialmente (Souza et al., 2019; Barriga et al., 2020), são fontes alternativas viáveis de compostos naturais que podem ser usadas no controle e tratamento de doenças causadas por monogeneas em peixes (Tavares-Dias, 2018). Portanto, é necessário avaliar os efeitos anti-helmínticos do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* Burt e Smith contra monogeneas das brânquias de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (tambaqui), pois esse óleo não tem sido ainda testado no controle e tratamento de parasitos em peixes.

1.1. *Colossoma macropomum* e infecções por monogeneas

O continente sul-americano se destaca mundialmente pela produção de organismos aquáticos, e a piscicultura continental brasileira é responsável por grande parte dessa produção (Valladão et al., 2018). As principais espécies de peixes produzidas no Brasil são: *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo), carpas, *Pseudoplatystoma* spp. (surubins), *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *C. macropomum* e *Arapaima gigas* (pirarucu), sendo que esses dois últimos peixes têm se destacado por representar um mercado promissor, especialmente na Amazônia (IBGE, 2017). No Brasil, o cultivo de peixes nativos é comum em praticamente todo o país e sua produção tem grande expressividade, pois representou 39,8% do total produzido em 2018, sendo o restante representado por peixes não-nativos, como carpas e tilápia-do-nilo (PeixeBR, 2019).

Dentre essas principais espécies de peixes nativos está o *C. macropomum*, que pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Serrasalminidae e ocorre naturalmente na bacia no sistema do Rio Amazonas. O tambaqui é o peixe nativo mais produzido no Brasil, pois é cultivado em quase todos os estados da federação, principalmente nas regiões norte e nordeste (IBGE, 2017; Valenti et al., 2021). É um peixe que possui diversas características zootécnicas favoráveis ao cultivo intensivo como resistência a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água, fácil obtenção de alevinos, bom crescimento e capacidade de aproveitar alimentos naturais, o que reduz a necessidade de incremento nutricional, diminuindo os custos de produção (Baldiasserotto and Gomes, 2013).

Além dessas características zootécnicas favoráveis, a produtividade nos sistemas de cultivo de *C. macropomum* também é fortemente influenciada pelo manejo adequado (ex. manuseio, transporte, densidade de estocagem, outros) e pelas condições ambientais adequadas tais como boas características físicas e químicas da água, pois quando os peixes são expostos ao desequilíbrio desses condicionantes ocorre ativação do sistema de estresse, induzindo efeitos negativos em diferentes processos fisiológicos dos animais como crescimento, reprodução e imunidade, tornando-os mais susceptíveis a infecções parasitárias (Franceschini et al., 2013; Portella et al., 2013; Lieke et al., 2019; Souza et al., 2019), como as causadas por monogeneas *Anacanthorus spatulatus*, *Linguadactyloides brinkmanni*, *Mymarothecium boegeri*, *Notozothecium janauachensis* e *Notozothecium euzeti*, Dactylogyridae que podem causar perdas significativas na produção desse peixe (Baldiasserotto and Gomes, 2013; Pavanelli et al., 2013).

A classe Monogenea Van Beneden, 1858 pertence ao filo Platyhelminthes, que em sua maioria são ectoparasitos com ciclo biológico simples e direto (monóxeno), cujas larvas (oncomirácídios) e adultos vivem no hospedeiro definitivo, os peixes (Kohn et al., 2006; Pavanelli et al., 2013; Morales-Serna et al., 2019). Caracterizam-se pela presença do haptor, estrutura formada por uma série de ganchos, barras e âncoras, utilizadas para fixação no corpo do hospedeiro (Pavanelli et al., 2013).

As doenças provocadas por monogenea estão entre as mais importantes para a piscicultura, pois grandes mortalidades já foram verificadas, principalmente em criações intensivas (Pavanelli et al., 2008; Tavares-Dias and Martins, 2017). As consequências das infecções variam de acordo com a abundância e sítio de fixação dos parasitos nos hospedeiros. Nos peixes, os monogenea se fixam principalmente nos filamentos branquiais, provocando frequentemente hiperplasia celular e hipersecreção de muco e, em alguns casos, fusão de filamentos das lamelas branquiais (Eiras et al., 2006; Pavanelli et al., 2008, 2013; Francis-floyd et al., 2009; Soares et al., 2016, 2017a, 2017b), além de diversas outras alterações histopatológicas (Costa et al., 2017). As infecções parasitárias e esses graves distúrbios branquiais podem estar associados à diminuição da resistência imunológica e pode levar perda de peso e aumento das infecções secundárias causadas principalmente por bactérias oportunistas que, consequentemente, causam a morte dos peixes (Pavanelli et al., 2008; Moreira et al., 2014; Bader et al., 2019). Portanto, há necessidade de intervir com tratamentos para controlar infecções por monogeneas em *C. macropomum*, evitando assim perdas econômicas na produção dessa importante espécie para a piscicultura amazônica.

1.2. Óleos essenciais no controle e tratamento contra monogenea em peixes

Diversos quimioterápicos vêm sendo utilizados há muito tempo para controle e tratamento de doenças que afetam peixes de cultivo (Costello et al., 2001; Srivastava et al., 2004; Maximiano et al., 2006; Tavares-Dias et al., 2011; Zhang et al., 2014; Chagas et al., 2016; Enevova et al., 2018; Alves et al., 2019; Bader et al., 2019; Garcia Magana et al., 2019; Tancredo et al., 2019; Tavares-Dias, 2021). Porém, o uso contínuo desses compostos tem levado a diversas questões preocupantes. Assim, para manter a sustentabilidade e a viabilidade da indústria da piscicultura a longo prazo, faz-se necessário identificar e implementar mudanças de paradigma que levem em consideração os riscos de efeitos tóxicos e medidas de biossegurança nos tratamentos de doenças (Martinez-Porchas and Martinez-Cordova, 2012; Rico and Brink, 2014; FAO, 2018).

Atualmente, uma ampla variedade de plantas medicinais e seus derivados (extratos e óleos essenciais) vêm sendo usada na aquicultura, pois os estudos frequentemente têm mostrado diversos benefícios à saúde de diferentes espécies de peixes (Valladão et al., 2015; Van Hai, 2015). Por exemplo, algumas espécies de plantas medicinais e seus derivados tem efeito imunostimulante que melhora a saúde e crescimento dos peixes, aumentando assim a sua resistência ao estresse e às infecções e, conseqüentemente, reduzindo a mortalidade, além de não causarem contaminação residual na carne dos peixes (Martins et al., 2002; Diab et al., 2008; Harikrishnan et al., 2011; Pandey, 2013; Van Hai, 2015).

Plantas medicinais são aquelas com atividade biológica, contendo um ou mais princípios bioativos úteis com potencial para produção de fármacos, pois possuem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários podem ser produzidos nas diversas partes da planta, folhas, caules, raízes, flores e sementes (Soares and Tavares-Dias, 2013; Tavares-Dias, 2018). Em geral, seus metabólitos secundários (Figura 1) são constituídos por mais de 20 compostos diferentes e em concentrações variáveis (Sharifi-Rad et al., 2017; Tavares-Dias, 2018).

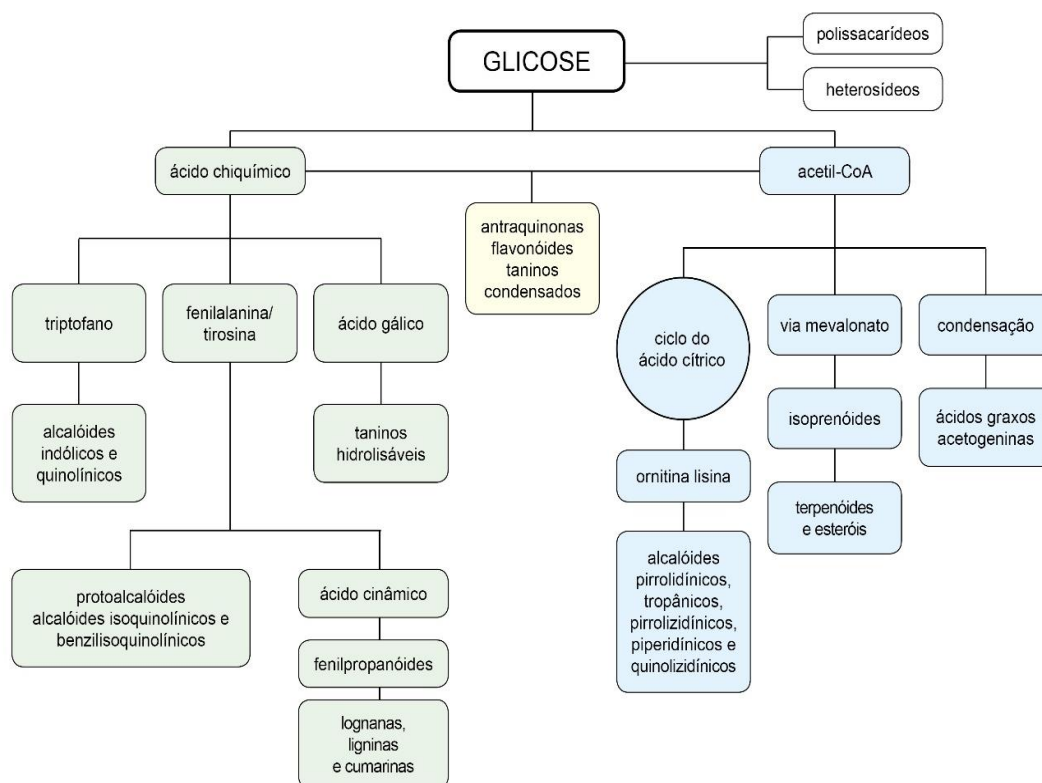


Figura 1. Ciclo de biossíntese dos metabólitos secundários de plantas medicinais (Tavares-Dias, 2018).

Os óleos essenciais tem um importante papel na estratégia de sobrevivência, proteção química e resistência das plantas, contra uma ampla variedade de patógenos como bactérias, fungos, herbívoros, artrópodes e vertebrados (Wink, 1988). São formados por uma vasta gama de compostos químicos produzidas naturalmente no metabolismo secundário das plantas (Hartmann, 2007). A composição química dessas substâncias pode ser alterada por diversos fatores naturais como variações fisiológicas, condições ambientais, variações geográficas, fatores genéticos e evolução (Figueiredo et al., 2008; Murakami et al., 2009a; Soares and Tavares-Dias, 2013; Canuto et al., 2015).

Recentemente, vários estudos avaliando a atividade anti-helmíntica de diferentes óleos essenciais contra monogeneas de peixes, relataram resultados promissores. Banhos terapêuticos com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (Meneses et al., 2018) e *Mentha piperita* (Hashimoto et al., 2016) apresentaram atividade anti-helmíntica contra monogeneas das brânquias de *O. niloticus*. Ensaio *in vitro* com óleo essencial de *M. piperita* mostram atividade anti-helmíntica contra monogenea *Dawestrema* spp. das brânquias de *A. gigas* (Malheiros et al., 2016). Costa et al. (2017) mostraram que óleo resina de *Copaifera duckei* possui ação anti-helmíntica contra monogeneas das brânquias de *P. mesopotamicus*. Terpeno (+)-óxido de limoneno, composto isolado presente em diversos óleos essenciais, testado contra monogeneas de tilápia-do-nilo apresentou bom potencial anti-helmíntico (Morales-Serna et al., 2019).

Estudos listaram atividade anti-helmíntica *in vitro* de óleo essencial de *Pimenta racemosa* e *Melaleuca cajuputi* contra *Gyrodactylus turnbulli* de *Poecilia reticulata*; eugenol em *Gyrodactylus* sp. de *Rhamdia quelen*; óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em *Gyrodactylus* sp. de *Gasterosteus aculeatus*; compostos cinamaldeído e ácido cinâmico em *Dactylogyrus intermedius* de *Carassius auratus*. Porém, citaram que foi baixa a atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e *Hesperozygis ringens* em *Gyrodactylus* sp. de *R. quelen* (Tavares-Dias, 2018).

Em *C. macropomum*, diversos estudos vêm testando diferentes óleos essenciais no controle e tratamento contra monogeneas. Nanoemulsões preparadas com óleo essencial de *Pterodon emarginatus* (Valentim et al., 2018a) e óleo resina de *Copaifera officinalis* (Valentim et al., 2018b) tiveram atividade anti-helmíntica com eficácia de 100% *in vitro*. Óleo essencial de *Lippia alba* (Soares et al., 2016), *Lippia sidoides* (Soares et al., 2017b) e *Lippia organoides* (Soares et al., 2017a) tiveram 100% de eficácia *in vitro*, apesar de uma baixa anti-helmíntica nos banhos terapêuticos, uma vez que baixas concentrações foram usadas devido aos efeitos tóxicos. Óleo essencial de *O. gratissimum* mostrou ser seguro e eficiente para uso como anti-

helmíntico em monogeneas de *C. macropomum* (Boijink et al., 2016), assim como o óleo essencial de *Lippia grata* que foi efetivo no controle de infecções monogênicas nas brânquias de *C. macropomum* (Barriga et al., 2020).

Considerando que o modelo de desenvolvimento da aquicultura brasileira tem se mostrado contrário aos princípios de sustentabilidade, gerando impactos ecológicos (Nobile et al., 2019), e que do grande número de óleos essenciais conhecidos (mais de 3.000 espécies) menos de 0,4% foram testados em parasitos de peixes (Tavares-Dias, 2018), os estudos com tais fitoterápicos deverão auxiliar nos desenvolvimento de novos protocolos de controle e tratamento alternativo contra monogeneas em peixes, visando uma produção mais sustentável da piscicultura. Assim, é possível também que, no futuro próximo, esses produtos fitoterápicos estejam disponíveis comercialmente em larga escala e sejam fortemente recomendados para uso piscicultura global (Van Hai, 2015). Portanto, a adoção de fitoterápicos, seguros, eficazes, com menor toxicidade e mais aceitáveis do ponto de vista ambiental que os quimioterápicos, para controle e tratamento de doenças na piscicultura, é urgente e necessário para o futuro dessa importante atividade aquícola mundial (Hu et al., 2014; Zhou et al., 2017).

1.3. Fitoterapia e uso de óleo essencial de *Alpinia zerumbet* na aquicultura

Apesar do uso terapêutico de plantas medicinais há séculos, o marco da fitoquímica científica (pesquisa de produtos secundários de plantas) ocorreu somente há cerca de 200 anos atrás, com os estudos de Friedrich Wilhelm Sertürner sobre isolamento da *Principium somniferum* (morfina), derivada do ópio do leite da papoula (Hartmann, 2007). Atualmente, pesquisas sobre drogas derivadas de plantas medicinais têm recebido bastante atenção, pois representam uma promissora alternativa aos tratamentos convencionais, apesar dos muitos desafios a serem superados (Veiga Junior et al., 2005; Vanwyk and Wink, 2009).

No Brasil, o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais também tem sido transmitido ao longo dos séculos, principalmente entre as comunidades tradicionais e aquelas economicamente desfavorecidas (Vanwyk and Wink, 2009). Essa utilização empírica também tem sido amplamente usada no controle e tratamento de doenças que acometem os animais domésticos, principalmente longe dos grandes centros urbanos, onde o acesso à saúde animal é menor (Marinho et al., 2007; Monteiro et al., 2011).

Estudos sobre a utilização de fitoterápicos na medicina veterinária têm ganhado cada vez mais destaque, devido aos diversos resultados positivos da ação dos compostos bioativos das plantas medicinais (ex. imunoestimulante, anti-helmíntica, antimicrobiana, antiinflamatória,

analgésica, anestésica e antitumoral, outros) em diversos animais, incluindo peixes. Esses múltiplos efeitos sugerem um grande potencial do uso de fitoterápicos no controle de doenças que cometem animais, com destaque as infecções por monogeneas em peixes (Diab et al., 2008; Lu et al., 2011; Mousavi et al., 2011; Ji et al., 2012; Huang et al., 2013; Pandey, 2013; Soares and Tavares-Dias, 2013; Tu et al., 2013; Hu et al., 2014; Trasviña-Moreno et al., 2017; Zhou et al., 2017; Zoral et al., 2017; Castro et al., 2018; Corral et al., 2018; Cunha et al., 2018; Meneses et al., 2018; Valentim et al., 2018a, 2018b; Pimentel-Acosta et al., 2019).

Entre as diversas plantas utilizadas de forma profilática e terapêutica no tratamento de doenças pelo homem, está *A. zerumbet*, conhecida popularmente como colônia. Na literatura esta espécie é encontrada também com as sinonímias de *Costus zerumbet* Pers., *Zerumbet speciosum* J. C. Wendel, *Alpinia speciosa* K. Shum, *Languas speciosa* Small. Pertencente à família Zingiberaceae, é uma espécie herbácea, perene, de uso ornamental e medicinal, originária da Índia e comum nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Foi introduzida no Brasil no século 19, sendo comumente encontrada nas regiões norte e nordeste, para uso na medicina popular como anti-hipertensiva, ansiolítica, sedativa, diurética e febrífuga (Lorenzi and Souza, 1995; Zoghbi et al., 1999; Marinho et al., 2007; Matos, 2007; Correa et al., 2010; Macêdo, 2013).

Propriedades terapêuticas do extrato e chá das folhas de *A. zerumbet* têm sido comprovadas em diversos estudos. Resultados promissores na medicina, farmacologia e química destacam atividades anti-hipertensiva, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, antipirética, antifúngica e antioxidativa de *A. zerumbet* (Mendonça et al., 1991; Tawata et al., 1996; Elzaawely et al., 2007; Ghareeb et al., 2018; Tavichakorntrakool et al., 2019; Zahra et al., 2019).

Óleo essencial de *A. zerumbet* também tem sido estudado, principalmente devido a aplicações como agentes promotores de atividades biológicas. Esse óleo essencial apresenta efeito analgésico, ansiolítico, antiespasmódico e miorrelaxante, ações sobre a excitabilidade neuronal, aumento dos níveis do colesterol HDL (Bezerra et al., 2000; Leal-Cardoso et al., 2004; Pinho et al., 2005; Lin et al., 2008; Murakami et al., 2009b), assim como atividade antibiótica e inseticida, as quais variam de acordo com a composição química do óleo (Victório et al., 2009; Mendes et al., 2015; Castro et al., 2016; Kerdudo et al., 2017;). Além disso, esse óleo essencial apresentou forte ação inibitória de uma variedade de enzimas associadas ao processo de envelhecimento, sugerindo contribuir significativamente para a longevidade do

homem (Tu and Tawata, 2015; Teschke and Xuan, 2018), além de não apresentar efeitos mutagênicos ou prejudiciais ao DNA (Cavalcanti et al., 2012).

A atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *A. zerumbet* também foi avaliada em larvas de nematóide *Haemonchus contortus* de ovinos, na concentração de 2,5 mg/mL, e os resultados mostraram inibição de 81,2% dos nematoides (Macedo et al., 2013). Portanto, como óleo essencial de *A. zerumbet* apresenta atividade anti-helmíntica, é possível que ele possua potencial terapêutico contra monogeneas de *C. macropomum*. Porém, é necessário realizar estudos *in vitro* e *in vivo*, além de avaliar a tolerância e efeitos tóxicos de *A. zerumbet* visando subsidiar o avanço da formulação de um protocolo de controle e tratamento contra monogenea de *C. macropomum*, uma vez que esse óleo essencial não tem sido ainda testado contra esses parasitos de peixes.

1.4. Efeitos adversos de óleos essenciais na hematologia e histologia de peixes

Os peixes possuem enorme diversidade morfológica em sua biologia e suas adaptações morfofuncionais garantiram o sucesso do povoamento em ambientes aquáticos ao longo de sua evolução. Nesse contexto adaptativo, as brânquias são estruturas fundamentais para a sobrevivência dos peixes, visto que além de estarem envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio acidobásico e excreção de compostos nitrogenados, são o principal sítio de trocas gasosas (Machado, 1999), as quais são realizadas usando mecanismo chamado contracorrente, onde o sangue rico em gás carbônico (CO₂) é trazido dos tecidos e bombeado pelo coração até as brânquias, passando então entre as lamelas branquiais em sentido contrário à passagem de água, possibilitando as trocas gasosas até em águas com pouco O₂ dissolvido (Withers, 1992).

Nas brânquias, as lamelas branquiais são recobertas pelo epitélio respiratório, constituído de uma única camada de células pavimentosas, através das quais ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e meio aquático. Revestindo o arco branquial, filamentos, lamelas secundárias e as regiões interlamelares encontra-se o epitélio branquial composto por diversos tipos de células, como células secretoras de muco (Evans et al., 1982). O muco pode ser encontrado sobre o epitélio respiratório em peixes expostos a condições de estresse, sugerindo que a camada de muco proteja as superfícies lamelares contra agentes infecciosos (Mallatt, 1985). Portanto, as brânquias são de fundamental importância para a respiração dos peixes e podem responder a estímulos de estresse, agressão ambiental e toxicidade (Machado, 1999; Martins et al., 2018), como por exemplo os efeitos tóxicos provocados por óleos essenciais

(Malheiros et al., 2016; Soares et al., 2016, 2017a, 2017b). Desse modo, a avaliação das diversas alterações branquiais pode auxiliar no monitoramento do estado de saúde dos peixes.

Peixes de piscicultura podem ser afetados por diversos patógenos e sofrer também por estresse ambiental. Assim, o monitoramento do estado de saúde dos peixes é indispensável para o sucesso da piscicultura e esse controle pode ser realizado também com auxílio das análises hematológicas e histopatológicas. A análise hematológica pode ser usada para diagnóstico e prognóstico de possíveis doenças, uma vez que as variáveis relativas ao eritrograma auxiliam na identificação de processos anemiantes, o leucograma pode fornecer informações importantes sobre o sistema imunológico e auxiliar no diagnóstico de processos infecciosos e o trombograma pode identificar problemas na hemostasia dos peixes (Ranzani-Paiva et al., 2013; Jerônimo et al., 2015; Tavares-Dias, 2015). A análise histológica é uma técnica na qual é possível visualizar alterações estruturais a níveis celulares e teciduais, desse modo é considerada uma importante ferramenta para auxiliar na compreensão e prevenção de doenças (Martins et al., 2018).

Os óleos essenciais ou seus compostos podem apresentar toxicidade para diferentes espécies peixes de clima tropical e temperado como tem sido citado nos estudos de Tavares-Dias (2018). Portanto, com auxílio das análises hematológicas e histopatológicas, estudos com óleos essenciais em tratamentos anti-helmínticos têm verificado que concentrações elevadas em protocolos de tratamento não adequados podem ocasionar efeitos tóxicos para aos peixes. Óleo essencial de *O. gratissimum* em banhos de 40,70 mg L⁻¹ causou hiperplasia e edema nas brânquias de em *O. niloticus* (Meneses et al., 2018). Esse mesmo óleo essencial usado na concentração de 15 mg L⁻¹ em banhos terapêuticos para *C. macropomum*, aumentou a concentração de amônia no soro dos peixes (Boijink et al., 2016). Óleos essencial de *L. sidoides* e *M. piperita* causaram efeitos tóxicos que aumentaram à medida do aumento das concentrações usadas nos banhos terapêuticos em *O. niloticus*. Além disso, causou redução no número de trombócitos devido à ação irritativa do óleo de *L. sidoides*, confirmada pelo aumento do número de neutrófilos e concentração de glicose (Hashimoto et al., 2016).

Óleo essencial de *L. sidoides* (10 e 20 mg L⁻¹) causou hiperplasia, fusão do epitélio e aneurisma lamelar, descolamento do epitélio branquial, edema, necrose e hipertrofia lamelar nas brânquias de *C. macropomum*, acompanhado da diminuição do número de eritrócitos totais (Soares et al., 2017b). Óleo essencial de *L. origanoides* (20 e 40 mg L⁻¹) além de provocar hiperplasia, aneurisma, fusão e deslocamento do epitélio lamelar em *C. macropomum*, reduziu o hematócrito, aumentou o número de monócitos e neutrófilos, bem como os níveis de proteínas

totais (Soares et al., 2017a). O óleo essencial de *L. origanoides* (7,6 e 11,4 mg L⁻¹) provocou alteração no volume corpuscular médio e decréscimo nos valores de proteínas totais, enquanto que concentrações acima de 15,2 mg L⁻¹ apresentaram efeitos tóxicos letais após banhos de *C. macropomum* (Oliveira et al., 2018). Óleo essencial de *L. alba* (100 e 150 mg L⁻¹) provocou hiperplasia, hipertrofia, aneurisma, fusão do epitélio lamelar das brânquias, alterações histopatológicas acompanhadas de aumento nos níveis de proteínas totais, hemoglobina, hematócrito, eritrócitos e outras células sanguíneas, após banhos terapêuticos em *C. macropomum* (Soares et al., 2016).

Malheiros et al. (2016) avaliando os efeitos tóxicos do óleo essencial de *M. piperita* em *A. gigas* encontraram fusão das lamelas secundárias, hipertrofia, aneurisma, necrose entre outras alterações teciduais. Banhos com óleo essencial de *M. piperita* (20 e 40 mg L⁻¹) em *C. macropomum* levaram ao aumento do número de trombócitos e diminuição do número de neutrófilos e níveis de glicose plasmática (Ferreira et al., 2019). Suplementação da ração de *A. gigas* com óleo essencial de *Piper aduncum* causou baixos efeitos tóxicos, pois a via de administração pode fazer diferenças no uso de óleos para tratamento antiparasitário (Corral et al., 2018). Portanto, como o uso de banhos terapêuticos é uma prática usual na piscicultura, devido sua praticidade no tratamento contra monogeneas, é necessário desenvolver protocolos de controle e tratamento usando concentrações toleradas pelos peixes e tempo de exposição do óleo essencial de *A. zerumbet* que apresenta eficácia anti-helmíntica, mas sem causar efeitos adversos na fisiologia e histologia dos peixes expostos.

2. PROBLEMAS

Óleo essencial de *A. zerumbet* tem eficácia anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* no controle e tratamento de monogenea das brânquias de *C. macropomum*? Quais concentrações do óleo essencial de *A. zerumbet* com eficácia *in vitro* são toleradas pelo *C. macropomum*? O óleo essencial de *A. zerumbet* usado nos banhos terapêuticos de *C. macropomum* provoca alterações hematológicas e histopatológicas nos peixes expostos? Essas questões norteiam o presente estudo.

3. HIPÓTESES

- Óleo essencial de *A. zerumbet* tem eficácia anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* contra monogenea de *C. macropomum*, devido à ação de seus constituintes químicos.

- As concentrações do óleo essencial de *A. zerumbet* com eficácia *in vitro* são toleradas pelo *C. macropomum* devido à baixa toxicidade desse óleo.
- As concentrações de óleo essencial de *A. zerumbet* usadas nos banhos terapêuticos em *C. macropomum* não provocam alterações hematológicas e histopatológicas, pois não apresentam efeitos tóxicos indesejáveis na fisiologia e histologia dos peixes por se tratar de produto natural com baixa toxicidade para esse peixe.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Investigar a eficácia anti-helmíntica (*in vitro* e *in vivo*) do óleo essencial de *A. zerumbet* em monogenea de *C. macropomum*, bem como os seus efeitos hematológicos e histopatológicos após banhos terapêuticos para este hospedeiro.

4.2. Específicos

- Determinar a composição química do óleo essencial de *A. zerumbet*;
- Avaliar *in vitro* a eficácia anti-helmíntica de quatro concentrações (300, 600, 1200 e 2400 mg L⁻¹) do óleo essencial de *A. zerumbet* contra monogenea das brânquias de *C. macropomum*;
- Avaliar *in vivo* a eficácia anti-helmíntica do óleo essencial de *A. zerumbet* em banhos terapêuticos contra monogenea das brânquias de *C. macropomum*;
- Avaliar possíveis alterações hematológicas e histopatológicas causadas pelos banhos terapêuticos com óleo essencial de *A. zerumbet* em *C. macropomum*;
- Em caso de comprovação de eficácia, indicar o melhor protocolo de tratamento (tempo de exposição e concentração em mg L⁻¹) do óleo essencial de *A. zerumbet* contra monogenea das brânquias de *C. macropomum*

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- Alves, C.M.G., Nogueira, J.N., Barriga, I.B., dos Santos, J.R., Santos, G.G., Tavares-Dias, M., 2019. Albendazole, levamisole and ivermectin are effective against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae). J. Fish Dis. 42, 405–412. <https://doi.org/10.1111/jfd.12952>
- Assefa, A., Abunna, F., 2018. Maintenance of fish health in aquaculture: Review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. Vet. Med. Int. 2018, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Bader, C., Starling, D.E., Jones, D.E., Brewer, M.T., 2019. Use of praziquantel to control platyhelminth parasites of fish. J. Vet. Pharmacol. Ther. 42, 139–153. <https://doi.org/10.1111/jvp.12735>
- Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (org.), 2013. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Editora UFMS, p. 175–204, Santa Maria, RS.
- Barriga, I.B., Gonzales, A.P.P.F., Brasiliense, A.R.P., Castro, K.N.C., Tavares-Dias, M., 2020. Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills, a large Serrasalminidae fish from Amazon. Aquac. Res. 51, 3804–3812. <https://doi.org/10.1111/are.14728>
- Bezerra, M.A.C., Leal-Cardoso, J.H., Coelho-de-Souza, A.N., Criddle, D.N., Fonteles, M.C., 2000. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on Rat Ileum. Phyther. Res. 14, 549–551. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200011\)14:7<549::AID-PTR623>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200011)14:7<549::AID-PTR623>3.0.CO;2-T)
- Boijink, C.L., Queiroz, C.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A., 2016. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquaculture 457, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.010>
- Buchmann, K., Roepstorff, A., Waller, P.J., 1992. Experimental selection of mebendazole-resistant gill monogeneans from the European eel, *Anguilla*. J. Fish Dis. 15, 393–400. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb01238.x>
- Canuto, K.M., Pereira, R.C.A., Rodrigues, T.H.S., Brito, E.S., Lima, Y.C., Pimentel, F.A., 2015. Influência do horário de colheita das folhas na composição química do óleo essencial de colônia (*Alpinia zerumbet*). Bol. Pesqui. e Desenvol. 102, 1–16.
- Castro, K.N. de C., Canuto, K.M., Brito, E. de S., Costa-Júnior, L.M., Andrade, I.M. de,

- Magalhães, J.A., Barros, D.M.A., 2018. *In vitro* efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 27, 203–210. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180015>
- Castro, K.N. C., Lima, D.F., Vasconcelos, L.C., Santos, R.C., Pereira, A.M.L., Fogaça, F.H. S., Canuto, K.M., Brito, E.S., Calvet, R.M., 2016. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo). 83, 1–7. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000192014>
- Cavalcanti, B.C., Ferreira, J.R.O., Cabral, I.O., Magalhães, H.I.F., de Oliveira, C.C., Rodrigues, F.A.R., Rocha, D.D., Barros, F.W.A., da Silva, C.R., Júnior, H.V.N., Canuto, K.M., Silveira, E.R., Pessoa, C., Moraes, M.O., 2012. Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. Food Chem. Toxicol. 50, 4051–4061. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.038>
- Chagas, E.C., de Araújo, L.D., Martins, M.L., Carvalho Gomes, L., de Oliveira Malta, J.C., Varella, A.B., Jerônimo, G.T., 2016. Mebendazole dietary supplementation controls Monogenoidea (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Aquaculture 464, 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.022>
- Corral, A.C.T., de Queiroz, M.N., de Andrade-Porto, S.M., Morey, G.A.M., Chaves, F.C.M., Fernandes, V.L.A., Ono, E.A., Affonso, E.G., 2018. Control of *Hysterothylacium* sp . (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. Aquaculture 494, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.062>
- Correa, A.J., Lima, C., Costa, M.C.C., 2010. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. Rev. Bras. Plantas Med. 12, 113–119. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000100016>
- Costa, J.C., Valladão, G.M.R., Pala, G., Gallani, S.U., Kotzent, S., Crotti, A.E.M., Fracarolli, L., Silva, J.J. da M., Pilarski, F., 2017. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. Aquaculture 471, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.041>
- Costello, M.J., Grant, A., Davies, I.M., Cecchini, S., Papoutsoglou, P., Quigley, D., Saroglia, M., 2001. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. Aquac. Eur. J. Appl.

- Ichthyol. 17, 173–180. <https://doi.org/https://doi-org.ez7.periodicos.capes.gov.br/10.1046/j.1439-0426.2001.00314.x>
- Cunha, J.A., Ávila Scheeren, C., Fausto, V.P., Melo, L.D.W., Henneman, B., Frizzo, C.P., Almeida Vaucher, R., Castagna de Vargas, A., Baldisserotto, B., 2018. The antibacterial and physiological effects of pure and nanoencapsulated *Origanum majorana* essential oil on fish infected with *Aeromonas hydrophila*. Microb. Pathog. 124, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.040>
- Diab, A.S., Aly, S.M., John, G., Abde-Hadi, Y., Mohammed, M.F., 2008. Effect of garlic, black seed and Biogen as immunostimulants on the growth and survival of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae), and their response to artificial infection with *Pseudomonas fluorescens*. African J. Aquat. Sci. 33, 63–68. <https://doi.org/10.2989/AJAS.2007.33.1.7.391>
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., 2006. Métodos de estudos e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Editora UEM, p. 173, Maringá.
- Elzaawely, A., Xuan, T., Koyama, H., Tawata, S., 2007. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt. & R.M. Sm. Food Chem. 104, 1648–1653. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.016>
- Enevova, V., Palikova, M., Blahova, J., Modra, H., Vojtek, L., Papezikova, I., Tichy, F., Mares, J., Navratil, S., Vecerek, V., Svobodova, Z., 2018. Sodium chloride treatment effects on rainbow trout suffering from proliferative kidney disease caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Dis. Aquat. Organ. 131, 157–166. <https://doi.org/10.3354/dao03287>
- Evans, D.H., Claiborne, J.B., Farmer, L., Mallery, C., Krasny, E.J., 1982. Fish gill ionic transport: methods and models. Biol. Bull. 163, 108–130. <https://doi.org/10.2307/1541502>
- FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Food Agric. Organ. United Nations 1–210.
- Ferreira, L.C., Cruz, M.G. da, Lima, T.B.C., Serra, B.N.V., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., 2019. Antiparasitic activity of *Mentha piperita* (Lamiaceae) essential oil against *Piscinoodinium pillulare* and its physiological effects on *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Aquaculture 512, 734343. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734343>
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C., 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour Fragr. J.

- 23, 213–226. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>
- Franceschini, L., Zago, A.C., Schalch, S.H.C., Garcia, F., Romera, D.M., Silva, R.J. da, 2013. Parasitic infections of *Piaractus mesopotamicus* and hybrid (*P. mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*) cultured in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 407–414. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000300015>
- Francis-floyd, R., Klinger, R., Petty, D., Pouder, D., 2009. Monogenean Parasites of Fish. Univ. Florida IFAS Ext. 1–4.
- Garcia Magana, L., Jimenez Vasconcelos, L., Rodriguez Santiago, A., Grano Maldonado, M., Laffon Leal, S., 2019. The effectiveness of sodium chloride and formalin in trichodiniasis of farmed freshwater tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in southeastern Mexico. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 47, 164–174. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue1-fulltext-18>
- Ghareeb, M., Sobeh, M., Rezq, S., El-Shazly, A., Mahmoud, M., Wink, M., 2018. HPLC-ESI-MS/MS profiling of polyphenolics of a leaf extract from *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) and its anti-inflammatory, anti-nociceptive, and antipyretic activities in vivo. *Molecules* 23, 3238. <https://doi.org/10.3390/molecules23123238>
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>
- Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831–2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hashimoto, G.S.O., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Acchile, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>
- Hoof, V.L., Fabi, G., Johansen, V., Steenbergen, J., Irigoien, X., Smith, S., Lisbjerg, D., Kraus, G., 2019. Food from the ocean; towards a research agenda for sustainable use of our oceans' natural resources. *Mar. Policy* 105, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2019.02.046>
- Hu, Y., Ji, J., Ling, F., Chen, Y., Lu, L., Zhang, Q., Wang, G., 2014. Screening medicinal plants for use against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) Infection in Goldfish. *J. Aquat. Anim. Health* 26, 127–136. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.902872>

- Huang, A.-G., Yi, Y.-L., Ling, F., Lu, L., Zhang, Q.-Z., Wang, G.-X., 2013. Screening of plant extracts for anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol. Res. 112, 4065–4072. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3597-7>
- Hur, J., Jawale, C., Lee, J.H., 2012. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. Food Res. Int. 45, 819–830. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.014>
- IBGE, 2017. CENSO AGRO IBGE 2017 [WWW Document]. D. URL <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado> (accessed 8.21.19).
- Ina-Salwany, M., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F., Mohd-ariss, A., Amal, M.N.A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., 2019. Vibriosis in fish : A review on disease development and prevention 3–22. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Jerônimo, G.T., Franceschini, L., Zago, A.C., Silva, R.J. da, Pádua, S.B. de, Ventura, A.S., Ishikawa, M.M., Tavares-Dias, M., Martins, M.L., 2015. Parasitos de peixes Characiformes e seus híbridos cultivados no Brasil., in: Tavares - Dias, M. & Mariano, W. S (Orgs.). Aquicultura no Brasil: Novas perspectivas. Editora Pedro & João , p. 283-304, São Carlos.
- Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G.-X., Chen, P., 2012. Screening of 42 medicinal plants for in vivo anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol. Res. 111, 97–104. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2805-6>
- Kerdudo, A., Ellong, E.N., Burger, P., Gonnot, V., Boyer, L., Chandre, F., Adenet, S., Rochefort, K., Michel, T., Fernandez, X., 2017. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of flowers essential oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. from Martinique Island. Chem. Biodivers. 14, e1600344. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600344>
- Kohn, A., Cohen, S.C., Salgado-Maldonado, G., 2006. Checklist of monogenea parasites of freshwater and marine fishes, amphibians and reptiles from Mexico, Central America and Caribbean. Zootaxa 1289, 1–114.
- Leal-Cardoso, J.H., Moreira, M.R., Pinto da Cruz, G.M., Morais, S.M., Lahlou, M.S., Coelho-de-Souza, A.N., 2004. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. Phytomedicine 11, 549–553. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.07.008>

- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S.H., Pan, B., Straus, D.L., Steinberg, C.E.W., 2019. Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Rev. Aquac.* raq.12365. <https://doi.org/10.1111/raq.12365>
- Lin, L.-Y., Peng, C.-C., Liang, Y.-J., Yeh, W.-T., Wang, H.-E., Yu, T.-H., Peng, R.Y., 2008. *Alpinia zerumbet* potentially elevates high-density lipoprotein cholesterol level in hamsters. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4435–4443. <https://doi.org/10.1021/jf800195d>
- Lopez, V., Cascella, M., Maggi, F., Gómez-Rincón, C., Benelli, G., 2018. Correction to: Green drugs in the fight against *Anisakis simplex* larvicidal activity and acetylcholinesterase inhibition of *Origanum compactum* essential oil. *Parasitol. Res.* 117, 1669–1669. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5825-7>
- Lorenzi, H., Souza, H.M., 1995. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. *Plantarum*, p. 720, São Paulo.
- Lu, C., Zhang, H.Y., Ji, J., Wang, G.X., 2011. *In vivo* anthelmintic activity of *Dryopteris crassirhizoma*, *Kochia scoparia*, and *Polygala tenuifolia* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res.* 110, 1085–1090. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2592-0>
- Macêdo, D.S., 2013. *Alpinia zerumbet*, in: Viana, G. S. B.; Leal, L. K. A. M.; Vasconcelos, S. M. M. Plantas medicinais da caatinga: Atividades biológicas e potencial terapêutico. Expressão Gráfica, p. 492, Fortaleza.
- Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Ribeiro, W.L.C., Santos, J.M.L., Morais, S.M., Paula, H.C.B., Bevilaqua, C.M.L., 2013. *In vitro* effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 463–469. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400004>
- Machado, M.R., 1999. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *Ciênc. Biol. Saúde* 1, 63–76. <https://doi.org/10.17921/2447-8938.1999v1n1p%p>
- Malheiros, D.F., Maciel, P.O., Videira, M.N., Tavares-Dias, M., 2016. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture* 455, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.018>
- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 630–648. <https://doi.org/10.1139/f85-083>
- Marinho, M.L., Alves, M.S., Rodrigues, M.L.C., Rotondano, T.E.F., Vidal, I.F., Silva, W.W.,

- Athayde, A.C.R., 2007. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária : um resgate do saber popular. *Rev. Bras. Plantas Med.* 9, 64–69.
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., 2012. World aquaculture: Environmental impacts and troubleshooting alternatives. *Sci. World J.* <https://doi.org/10.1100/2012/389623>
- Martins, M.L., Cardoso, L., Furtado, W.E., Tancredo, K.R., Lehmann, N.B., Figueredo, A.B., Steckert, L.D., Addam, K., Pádua, S.B., Ferreira, T.H., 2018. Histopathology guide for freshwater fish, Editora UFSC. Editora UFSC, Florianópolis.
- Martins, M.L., Moraes, F.R., Miyazaki, D.M.Y., Brum, C.D., Onaka, E.M., Fenerick, J., Bozzo, F.R., 2002. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatu*s (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haematological effects. *Parasite* 9, 175–180. <https://doi.org/10.1051/parasite/2002092175>
- Matos, F.J. de A., 2007. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Editora da UFC, p. 344, Fortaleza.
- Maximiano, A. de A., Fernandes, R.O. de, Nunes, F.P., Assis, M.P. de, Matos, R.V. de, Barbosa, C.G.S., Oliveira-Filho, E.C., 2006. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. *Cien. Saude Colet.* 10, 483–491. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232005000200026>
- Mendes, F.R.S., Silva, F.G.E., Sousa, E.O., Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M., Monte, F.J.Q., Lemos, T.L.G., Assunção, J.C.C., 2015. Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. (Zingiberaceae): chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics. *J. Essent. Oil Res.* 27, 259–263. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1014935>
- Mendonça, V.L.M., Oliveira, C.L.A., Craveiro, A.A., Rao, V.S., Fonteles, M.C., 1991. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 93–97. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000600023>
- Meneses, J.O., Couto, M.V.S. do, Sousa, N.C., Cunha, F. S., Abe, H.A., Ramos, F.M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., Maria, A.N., Carneiro, P.F., Fujimoto, R.Y., 2018. Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus tilapia*e gill parasite of Nile tilapia. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 70, 497–504. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9667>

- Monteiro, M.V.B., Bevilaqua, C.M.L., Palha, M. das D.C., Braga, R.R., Schwanke, K., Rodrigues, S.T., Lameira, O.A., 2011. Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, Eastern Amazonia, Brazil. *Acta Amaz.* 41, 233–242. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000200007>
- 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. Parasit. Dis.* 43, 739–742. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01150-2>
- Moreira, C.B., Hashimoto, G.S.O., Rombenso, A.N., Candiottto, F.B., Martins, M.L., Tsuzuki, M.Y., 2014. Outbreak of mortality among cage-reared cobia (*Rachycentron canadum*) associated with parasitism. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 588–591. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000400021>
- Mousavi, S.M., Wilson, G., Raftos, D., Mirzargar, S.S., Omidbaigi, R., 2011. Antibacterial activities of a new combination of essential oils against marine bacteria. *Aquac. Int.* 19, 205–214. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9354-3>
- Murakami, S., Li, W., Matsuura, M., Satou, T., Hayashi, S., Koike, K., 2009a. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. *J. Nat. Med.* 63, 204–208. <https://doi.org/10.1007/s11418-008-0306-4>
- Murakami, S., Matsuura, M., Satou, T., Hayashi, S., Koike, K., 2009b. Effects of the essential oil from leaves of *Alpinia zerumbet* on behavioral alterations in mice. *Nat. Prod. Commun.* 4, 129–132. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400128>
- Murthy, K.S., Kiran, B.R., 2013. Review on usage of medicinal plants in fish diseases. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 4, 975–986.
- Nobile, A.B., Cunico, A.M., Vitule, J.R.S., Queiroz, J., Vidotto-Magnoni, A.P., Garcia, D.A.Z., Orsi, M.L., Lima, F.P., Acosta, A.A., da Silva, R.J., do Prado, F.D., Porto-Foresti, F., Brandão, H., Foresti, F., Oliveira, C., Ramos, I.P., 2019. Status and recommendations for sustainable freshwater aquaculture in Brazil. *Rev. Aquac. raq.12393*. <https://doi.org/10.1111/raq.12393>
- Oliveira, S.R.N. de, Oliveira, M.A.S. de, Brandão, F.R., Majolo, C., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., 2018. Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in Tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*. *Bol. do Inst. Pesca* 44, 1–7. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.346>
- ONU, 2019. Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050

- and could peak at nearly 11 billion around 2100 : UN Report. Commun. United Nations Dep. Glob. 1–3.
- Pandey, G., 2013. Some medicinal plants to treat fish ectoparasitic infections. *Int. J. Pharm. Res. Sci.* 2, 532–538.
- Pavanelli, G.C., Eiras, J.C., Takemoto, R.M., 2008. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento., 3ª. ed. Editora UEM, p. 95-99, Maringá: Eduem - PR,.
- Pavanelli, G.C., Takemoto, R.M., Eiras, J.C., 2013. Parasitologia de peixes de água doce do Brasil. Editora UEM, p. 273, Maringá: Eduem - PR.
- PeixeBR, 2019. Anuário PeixeBR da Piscicultura 2019. Assoc. Bras. da Piscic.
- Pimentel-Acosta, C.A., Morales-Serna, F.N., Chávez-Sánchez, M.C., Lara, H.H., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N., Fajer-Ávila, E.J., 2019. Efficacy of silver nanoparticles against the adults and eggs of monogenean parasites of fish. *Parasitol. Res.* 1741–1749. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06315-9>
- Pinho, F.V.S., Coelho-de-Souza, A.N., Morais, S.M., Santos, C., Leal-Cardoso, J.H., 2005. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine* 12, 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.04.006>
- Portella, M.C., Jomori, R.K., Leitão, N.J., Menossi, O.C.C., Freitas, T.M., Kojima, J.T., Lopes, T.S., Clavijo-ayala, J.A., Carneiro, D.J., 2013. Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review. *Aquaculture* 432, 402–417. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.032>
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematologia de peixes. 1, UEM. Edum, Maringá.
- Rico, A., Brink, P.J. Van Den, 2014. Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Sci. Total Environ.* 468–469, 630–641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.063>
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G., Daglia, M., Sharifi-Rad, Mehdi, Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, Marziah, Loizzo, M., Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S., Iriti, M., 2017. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules* 22, 70. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>
- Shinn, A., Pratoomyot, J., Bron, J., Paladini, G., Brooker, E., Brooker, A., 2015. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. *Glob. Aquac. advocate* 82–84.
- 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. <https://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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.012>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>
- Soares, B.V., Tavares-Dias, M., 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amaz.* 3, 109–123. <https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v3n1p109-123>
- Souza, C.D.F., Baldissera, M.D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Martos-Sitcha, J.A., Mancera, J.M., 2019. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>
- Srivastava, S., Sinha, R., Roy, D., 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aquat. Toxicol.* 66, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.008>
- Tancredo, K.R., Ferrarezi, J.V., Marchiori, N. da C., Martins, M.L., 2019. Ecotoxicological assays to determine the median lethal concentration (LC₅₀) of formalin for fish. *Aquac. Int.* 685–694.
- Tavares-Dias, M., 2021. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. *Aquaculture* 535, 736350. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736350>
- Tavares-Dias, M., 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquat. Living Resour.* 31, 13. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J. Parasit. Dis.* 41, 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>

- Tavares-Dias, M., 2015. Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados., in: Tavares - Dias, M. & Mariano, W. S (Orgs.). Aquicultura no Brasil: Novas Perspectivas. Editora Pedro & João , p.11-30, São Carlos.
- Tavares-Dias, M., Ferreira, J.S., Affonso, E.G., Ono, E.A., Martins, M.L., 2011. Toxicidade e efeitos do sulfato de cobre no controle parasitário e na resposta hematológica de tambaqui *Colossoma macropomum*. Bol. do Inst. Pesca 37, 355–365.
- Tavechio, W.L.G., Guidelli, G., Portz, L., 2009. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. B. Inst. Pesca, São Paulo 35, 335–341.
- Tavichakorntrakool, R., Lulitanond, A., Sangka, A., Sungkeeree, S., Weerapreeyakul, N., 2019. Antibacterial activity and bioactive compounds of 50% hydroethanolic extract of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 9, 204. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.259000>
- Tawata, S., Taira, S., Kobamoto, N., Ishihara, M., Toyama, S., 1996. Syntheses and biological activities of dihydro-5,6-dehydrokawain derivatives. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60, 1643–1645. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.1643>
- Teschke, R., Xuan, T., 2018. Viewpoint: A contributory role of shell ginger (*Alpinia zerumbet*) for human longevity in Okinawa, Japan? Nutrients 10, 166. <https://doi.org/10.3390/nu10020166>
- Trasviña-Moreno, A.G., Ascencio, F., Angulo, C., Hutson, K.S., Avilés-Quevedo, A., Inohuye-Rivera, R.B., Pérez-Urbiola, J.C., 2017. Plant extracts as a natural treatment against the fish ectoparasite *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae). J. Helminthol. 93, 57–65. <https://doi.org/10.1017/S0022149X17001122>
- Tu, P., Tawata, S., 2015. Anti-Oxidant, Anti-aging, and anti-melanogenic properties of the essential oils from two varieties of *Alpinia zerumbet*. Molecules 20, 16723–16740. <https://doi.org/10.3390/molecules200916723>
- Tu, X., Ling, F., Huang, A., Zhang, Q., Wang, G., 2013. Anthelmintic efficacy of *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. Parasitol. Res. 112, 2839–2845. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3455-7>
- Valenti, W.C., Barros, H.P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G.W., Cavalli, R.O., 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. Aquac. Reports 19, 100611. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>
- Valentim, D.S.S., Duarte, J.L., Oliveira, A.E.M.F.M., Cruz, R.A.S., Carvalho, J.C.T., Conceição, E.C., Fernandes, C.P., Tavares-Dias, M., 2018a. Nanoemulsion from essential

- oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows in vitro efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalmidae). J. Fish Dis. 41, 443–449. <https://doi.org/10.1111/jfd.12739>
- Valentim, D.S.S., Duarte, J.L., Oliveira, A.E.M.F.M., Cruz, R.A.S., Carvalho, J.C.T., Solans, C., Fernandes, C.P., Tavares-Dias, M., 2018b. Effects of a nanoemulsion with *Copaifera officinalis* oleoresin against monogenean parasites of *Colossoma macropomum*: A Neotropical Serrasalmidae. J. Fish Dis. 41, 1041–1048. <https://doi.org/10.1111/jfd.12793>
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. Rev. Aquac. 10, 351–369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. J. Vet. Pharmacol. Ther. 38, 417–428. <https://doi.org/10.1111/jvp.12202>
- Van Hai, N., 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. Aquaculture 446, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014>
- Vanwyk, B.E., Wink, M., 2009. Medicinal plant of the world, 1. ed. Briz Publication, South Africa.
- Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C.P., Maceil, M.A.M., 2005. Plantas medicinais: cura segura? Quim. Nova 28, 519–528. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>
- Victório, C.P., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Lage, C.L.S., 2009. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. Rev. Bras. Farmacogn. 19, 697–701. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000500008>
- Wink, M., 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. Theor. Appl. Genet. 75, 225–233. <https://doi.org/10.1007/BF00303957>
- Withers, P.C., 1992. Comparative animal physiology, 1. ed. Saunders College Publishing, Texas.
- Zahra, M.H., Salem, T.A.R., El-Aarag, B., Yosri, N., EL-Ghlban, S., Zaki, K., Marei, A.H., Abd El-Wahed, A., Saeed, A., Khatib, A., AlAjmi, M.F., Shathili, A.M., Xiao, J., Khalifa, S.A.M., El-Seedi, H.R., 2019. *Alpinia zerumbet* (Pers.): food and medicinal plant with potential *in vitro* and *in vivo* anti-cancer activities. Molecules 24, 2495. <https://doi.org/10.3390/molecules24132495>
- 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* 420–421, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.022>
- Zhou, S., Li, W.X., Wang, Y.Q., Zou, H., Wu, S.G., Wang, G.T., 2017. Anthelmintic efficacies of three common disinfectants and extracts of four traditional Chinese medicinal plants against *Gyrodactylus kobayashii* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 466, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.048>
- Zoghbi, M.D.G.B., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S., 1999. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. purpurata* (Viell.) Schum. *Flavour Fragr. J.* 14, 411–414. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199911/12\)14:6<411::AID-FFJ854>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199911/12)14:6<411::AID-FFJ854>3.0.CO;2-U)
- Zoral, M.A., Futami, K., Endo, M., Maita, M., Katagiri, T., 2017. Anthelmintic activity of *Rosmarinus officinalis* against *Dactylogyrus minutus* (Monogenea) infections in *Cyprinus carpio*. *Vet. Parasitol.* 247, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.013>

ARTIGO 1: Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) has anthelmintic efficacy against monogenean of *Colossoma macropomum*, a Neotropical Serrasalminidae

Artigo submetido ao periódico Aquaculture (Anexo 1)

Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) has anthelmintic efficacy against monogenean of *Colossoma macropomum*, a Neotropical Serrasalminidae

Running Head: Essential oil is effective against monogeneans of tambaqui

João Gabriel Rosário Luz¹, Joziele Neves Nogueira², Marcela Nunes Videira², Kirley Marques Canuto³, Karina Neoob Carvalho Castro⁴ and Marcos Tavares-Dias^{1,5*}

¹ Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA), Macapá, AP, Brasil.

² Universidade do Estado do Amapá (UEAP), Macapá, AP, Brasil

³ Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brasil

⁴ Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brasil.

⁵ Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brasil.

* Corresponding Author: marcos.tavares@embrapa.br

ABSTRACT

This study investigated for the first time the anthelmintic efficacy of essential oil (EO) of *Alpinia zerumbet* against monogeneans of *Colossoma macropomum*, as well as the blood and histological effects for this fish. In *in vitro* assays, different concentrations of *A. zerumbet* EO (300, 600, 1200 and 2400 mg L⁻¹) and two control groups were evaluated: with water from the culture tank and water from the culture tank + 70% alcohol. Monogeneans showed 100% immobilization *in vitro* with all tested EO concentrations, with a dose dependent effect. Scanning electron microscopy showed that the monogeneans exposed to *A. zerumbet* showed more deep wrinkling and damage in the integument. The fish showed tolerance to the concentration of 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, which was used in therapeutic baths for six consecutive days. Therapeutic baths with 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO had anthelmintic efficacy of 94% and low toxicity to fish, as there were few changes to the blood parameters (plasma glucose and total protein, number of leukocytes, neutrophils and monocytes) and mild changes histopathological findings that did not compromise the functioning of the gills of *C. macropomum*. Therefore, 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO can be used in therapeutic baths to control and treat infections by monogeneans in *C. macropomum*.

Keywords: Aquaculture, Blood, Parasite, Treatment, Tolerance, Toxicity

1. INTRODUCTION

The world population is estimated to reach close to 10 billion inhabitants by 2050, thus increasing the global demand for energy, drinking water and food (ONU, 2019). Given this scenario and the decline of natural fish stocks, aquaculture has been the subject of rapid development. Aquaculture has grown faster than other major food production sectors as it contributes to the supply of animal protein of high biological value for human consumption, job creation, and income, thereby boosting the economic development of several countries (FAO, 2018). However, aquaculture activities around the world have suffered from outbreaks of parasitic diseases, which cause losses in production and affect profitability and sustainability (Assefa and Abunna, 2018). Losses in aquaculture caused by parasitic diseases are estimated at US \$ 1.05-9.58 billion/year (Shinn et al., 2015). Losses from parasitic diseases are also attributed to stressful handling conditions, high stocking densities and inadequate water quality during the cultivation.

Parasitic diseases in fish farming include those caused by monogeneans, which are mainly ectoparasites with simple and direct life cycle. These ectoparasites can cause significant losses in farmed fish for their histopathological changes in the gills, in addition to reduced growth, morbidity, secondary infections and mortality of fish (Boijink et al., 2016; Tavares-Dias, 2018; Morales-Serna et al., 2019; Hoai, 2020; Barriga et al., 2020). The conventional control and treatment of parasitic diseases caused by monogeneans includes the use of chemotherapeutic products (Wang et al., 2008; Bader et al., 2019; Ina-Salwany et al., 2019). Chemotherapeutic products can be toxic to fish depending on of the concentrations used and have potential risk to human health, pollution to the environment and resistance of parasites, thus limiting their antiparasitic efficacy (Buchmann et al., 1992; Tavechio et al., 2009; Rico and Brink, 2014; Barriga et al., 2020). Consequently, many chemotherapeutics have been banned for use in aquaculture in several countries (Lieke et al., 2019). Hence, it is necessary to reduce the side effects of these chemotherapy treatments to maintain the sustainability of fish farming (Martinez-Porchas and Martinez-Cordova, 2012). The use of essential oils and their bioactive compounds has been a viable alternative to control and treatment diseases caused by monogeneans of some fish species (Tavares-Dias, 2018; Doan et al., 2020; Barriga et al., 2020). Given that these phytotherapies generally have less toxic effects on fish (Souza et al., 2019) and have anthelmintic efficacy against different monogenean species (Boijink et al., 2016; Tavares-Dias, 2018; Morales-Serna et al., 2019; Barriga et al., 2020), its use has been

recommended. However, some species of essential oils like *Alpinia zerumbet* Burt & Smith have not yet been tested against fish monogeneans.

Alpinia zerumbet is a medicinal plant of Asian origin that belongs to the Zingiberaceae family, has been introduced in several regions of the world, and is commonly found in the north and northeast regions of Brazil (Lorenzi and Souza, 1995; Matos, 2007; Correa et al., 2010). It has several phytotherapeutic properties given its chemical constituents (Chan et al., 2017), which showed anthelmintic activity against the nematode *Haemonchus contortus* (Macedo et al., 2013), suggesting possible anthelmintic potential against fish monogeneans. Therefore, it is important to investigate the anthelmintic activity of the essential oil of *A. zerumbet* against monogeneans of *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, an important fish for Brazilian and Amazonian fish farming, in order to improve infection control protocols for such parasites. Thus, the present study investigated the *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of the essential oil of *A. zerumbet* against monogeneans of the gills of *C. macropomum*, as well as the effects of therapeutic baths on the hematology and histopathology of the exposed fish.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Fish and acclimation

Colossoma macropomum fingerlings were obtained from a commercial fish farm in Macapá, Amapá state (Brazil) and kept at the Embrapa Aquaculture and Fisheries Laboratory, Macapá, Amapá (Brazil). These fish were acclimated in 500 L tanks with constant aeration and continuous water renewal (1.1 L/min), fed twice a day with a commercial diet containing 32% crude protein (Guabi®, Brazil). This stock of fingerlings was naturally infected with monogeneans and was used in all tests. The following water parameters were monitored daily: temperature (29.8 ± 0.1 °C), dissolved oxygen (5.6 ± 0.2 mg L⁻¹), pH (5.7 ± 0.2), ammonia (0.4 ± 0.2 mg L⁻¹), alkalinity (10.0 ± 0.001 mg L⁻¹) and hardness (10.0 ± 0 mg L⁻¹), with the aid of the multiparameter probe (YSI, USA). The tank was siphoned weekly to remove the accumulated organic matter.

2.2 Obtaining and chemical composition of *A. zerumbet* essential oil

Aerial parts of *A. zerumbet* were collected at Fazenda Tabuleiros II of the Company Anidro do Brasil Extractions S.A., Parnaíba, in State of Piauí, Brazil (03°01'27.5''S and 41°44'53.5''W). The essential oil was extracted through hydrodistillation with a Clevenger apparatus for 4 h. Chemical composition of the essential oil was determined using gas

chromatography mass spectrometry (GC-MS - Shimadzu QP5050A, Japan). The separation was performed using a silica SBP-5 capillary column composed of 5% phenylmethylpolysiloxane (30 m, length x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m, and phase thickness). The sample was dissolved in dichloromethane and analyzed according to the following experimental conditions: injection mode split, 1:40; injector temperature 250°C; carrier gas, helium; flow rate of 1.0 mL/min; oven temperature, 100 °C for 5 min and then raised to 260 °C at a rate of 4°C/min, ending with an isothermal treatment of 20 min. Mass spectra was acquired in electron ionization mode at 70 eV using a scan range of 40-350 M/z and a sampling rate of 1.0 scans/s. The ion source temperature was 200°C, interface temperature was 250 °C and solvent cut time was 2.5 min (see Adams, 2007).

2.3 *In vitro* assay with monogeneans of *Colossoma macropomum*

Fish were euthanized by medullar section and the gills of six *C. macropomum* (118.3 $\pm$ 46.6 g and 18.8 $\pm$ 2.3 cm) were removed and their branchial arches were separated in 5.5 cm petri dishes. The essential oil (EO) was diluted in 70% ethyl alcohol (1:10 g) and then mixed in the water in the packaging tank. Each branchial arch was immersed in a concentration (300, 600, 1200 and 2400 mg L⁻¹) of *A. zerumbet* EO. In addition, two control groups were formed, one with water from the culture tank and the other with water from the culture tank + ethyl alcohol (70%). Each assay had three replicates.

The *in vitro* test was carried out at room temperature (20°C). In a stereomicroscope with cold light, fields of vision were selected that contained at least 20 monogeneans per repetition. After immersing the gill arches in each treatment, the monogeneans were observed every 15 min to quantify the live and dead parasites. Parasites were considered dead when detached from the tissue or with no mobility while still attached (Soares et al., 2016). The efficacy of treatments was calculated using methods described in Wang et al. (2008). The monogeneans were collected, fixed in formalin (5%) and prepared for identification as described in Eiras et al. (2006).

2.4 Scanning electron microscopy of the monogeneans used in the *in vitro* assays

At the end of the *in vitro* tests, the gill arches used in the treatments with *A. zerumbet* EO (300, 600, 1200 and 2400 mg L⁻¹) and in the two control groups, were fixed in 2.5% glutaraldehyde prepared in phosphate buffer 0.1 M pH 7.2. Then, the gills were subjected to three washes in 0.1 M phosphate buffer at 15-min intervals. The samples were dehydrated in

increasing concentrations of ethyl alcohol (70, 80, 90, 96, 100 and 100), for 10 min at each concentration. The samples were analyzed and photomicrographed using a Scanning Electron Microscope (Hitach, Tokyo, Japan, Mod. TM3030Plud).

2.5 Tolerance test of the *C. macropomum* to different concentrations of the *A. zerumbet* EO

The tests were carried out to evaluate the tolerance of the fish exposed to the essential oil of *A. zerumbet*, to determine the ideal time and concentration for therapeutic baths. For the tolerance tests, 60 *C. macropomum* fingerlings (42.1 ± 10.6 g and 13.9 ± 1.0 cm) were used. The fish were exposed to 300, 600, 1200 and 2400 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO. Five fish were used in each replicate (15 fish per treatment) in a 40 L tank. The EO was diluted in 70% ethyl alcohol (1:10 g) and then added to the water in the tanks. The time of mortality and behavior of the fish was observed during 1 h of exposure.

2.6 Therapeutic baths with *A. zerumbet* EO in *C. macropomum*

In therapeutic baths, 90 *C. macropomum* fingerlings (43.08 ± 14.4 g and 13.8 ± 1.5 cm) were used in tanks with 100 L of water. The fish were exposed to 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, 30 min for six consecutive days, except for the fish in the two control groups. The EO was diluted with 70% ethyl alcohol (1:10 g) before being added to the water in the tanks. The two control groups were: water from the culture tank and water from the culture tank + ethyl alcohol (70%). Each treatment consisted of 3 replicates with 10 fish per repetition (30 fish per treatment).

On the sixth day of treatment after the therapeutic baths, fish were euthanized by medullar section and the gills of the fish were collected to quantify the monogeneans (Eiras et al., 2006) and to determine the prevalence and mean abundance of parasites (Bush et al., 1997). The effectiveness of the treatments was calculated according to Wang et al. (2008).

2.7 Blood analyses in *C. macropomum* after therapeutic baths with *A. zerumbet* EO

On the sixth day of treatment after therapeutic baths, blood samples were taken from 5 fish per replicate (15 fish per treatment). The blood was sampled by puncturing the caudal vessel using syringes containing EDTA (10%). The blood was used to determine the hematocrit, using the microhematocrit method; the total number of erythrocytes using a Neubauer chamber and hemoglobin concentration by the cyanomethaemoglobin method. The hematimetric indices

of mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated from the data values of erythrocytes, hematocrit and hemoglobin. Blood extensions were made and stained panchromatically with a combination of May Grünwald-Giemsa-Wright for differential leukocyte count in up to 200 cells of interest in each extension. Blood extensions were also used to determine the number of total leukocytes and thrombocytes (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A portion of the blood was centrifuged to obtain blood plasma and analyze glucose levels by the enzymatic-colorimetric method of glucose oxidase and total proteins, by the biuret method using kits (Dolles, GO, Brazil) and readings on a spectrophotometer (Biospectro SP-220, Curitiba, Brazil).

2.8 Histopathological analyses of the gills of *C. macropomum* after therapeutic baths with *A. zerumbet* EO

On the sixth day and after therapeutic baths, fish were euthanized by medullar section and the gills of nine per treatment, three per replicate were collected for histopathological analysis. The first gill arches (right and left) of each fish were collected and fixed in formalin buffer (10%), then dehydrated using a gradual series of ethanol and xylol, embedded in paraffin and cut in a microtome (Easypath EP 31-20093, Brazil), to obtain consecutive sections. The histological sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and analyzed using a common light microscope. The images were captured using a light microscope coupled to a photographic camera (Leica DM 1000, USA) and computer containing the image capture software (Leica Application Suite 1.6.0). Histopathological analyses were semi-quantitative using mean alteration value / MAV (Guerra-Santos et al., 2012) and histopathological alteration index / HAI (Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994).

2.9 Statistical analyses

All data were previously evaluated for normality and homoscedasticity using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. Since the data did not follow a normal distribution, the Kruskal-Wallis test was used followed by the Dunn test, for comparison between medians at the significance level of $p < 0.05$ (Zar, 2010).

3. RESULTS

3.1. Composition of *A. zerumbet* EO

The chemical components of the *A. zerumbet* EO used are shown in Table 1. Twenty-eight compounds were identified, but the major compounds are terpinen-4-ol (27.7%), eucalyptol (19.2%) and γ -terpinene (14.9%).

Table 1. Chemical constituents of the essential oil of *Alpinia zerumbet*.

Compounds	Retention index	Content (%)
α -tujene	937	4.41
α -pinene	946	1.55
Camphene	963	0.19
Sabine	984	7.68
β -pinene	990	2.68
Mircene	995	1.00
α -terpinene	1026	3.46
p-cymene	1034	8.55
Limonene	1039	2.03
Eucalyptol	1043	19.24
γ -terpinene	1068	14.94
Cis-sabinene hydrate	1081	0.03
Terpinolene	1096	1.80
Trans-sabinene hydrate	1107	0.50
Tans-p-menth-2-en-1-ol	1149	0.63
Isopulegol	1158	0.06
Borneol	1177	0.18
Terpinen-4-ol	1188	27.73
α -terpineol	1198	1.38
Trans-Piperytol	1216	0.27
Bornyl acetate	1294	0.09
E-caryophyllene	1429	0.03
α -humulene	1455	0.03
α -muurolene	1515	0.05
Zonarene	1526	0.08
E-Nerolidol	1569	0.21
Caryophyllene oxide	1598	0.85
β -Eudesmol	1667	0.08
Identified total (%)		99.7

3.2. *In vitro* efficacy of the *A. zerumbet* EO against monogeneans of *C. macropomum*

The gills of *C. macropomum*, used in *in vitro* assays, were parasitized by monogeneans *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* and *Notozothecium janauachensis*. At concentrations of 300 and 600 mg L⁻¹, immobilization of 100% of the parasites occurred after

5 and 3 hours of exposure, respectively. At concentrations of 1200 and 2400 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, immobilization of 100% of the parasites occurred after 1h and 8 min, respectively. In the two control groups (only tank water and tank water + 70% ethyl alcohol), all parasites died after 9.05 h and 7.43 h, respectively (Table 2 and Fig. 1).

Table 2. *In vitro* antiparasitic action of essential oil of *Alpinia zerumbet* against monogeneans in relation to the concentration and time of exposure.

Time of exposure	Treatments	Live parasites	Dead parasites (%)
0 min	Water	20.0 ± 1.0	0
	Water + alcohol	22.0 ± 2.6	0
	300 mg L ⁻¹	21.3 ± 2.9	0
	600 mg L ⁻¹	20.0 ± 2.0	0
	1200 mg L ⁻¹	20.3 ± 0.6	0
	2400 mg L ⁻¹	21.0 ± 1.0	0
8 min	Water	20.0 ± 1.0	0
	Water + alcohol	22.0 ± 2.6	0
	300 mg L ⁻¹	16.7 ± 6.5	21.9
	600 mg L ⁻¹	14.3 ± 2.9	28.3
	1200 mg L ⁻¹	6.3 ± 5.8	68.9
	2400 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
1 h	Water	20.0 ± 1.0	0
	Water + alcohol	22.0 ± 2.6	0
	300 mg L ⁻¹	9.0 ± 1.0	58.0
	600 mg L ⁻¹	8.0 ± 1.0	60.0
	1200 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
	2400 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
2 h	Water	20.0 ± 1.0	0
	Water + alcohol	22.0 ± 2.6	0
	300 mg L ⁻¹	8.0 ± 2.0	62.5
	600 mg L ⁻¹	6.0 ± 1.0	70.0
	1200 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
	2400 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100

Table 3 (Continued). *In vitro* antiparasitic action of essential oil of *Alpinia zerumbet* against monogeneans in relation to the concentration and time of exposure.

Time of exposure	Treatments	Live parasites	Dead parasites (%)
3 h	Water	20.0 ± 1.0	0
	Water + alcohol	22.0 ± 2.6	0
	300 mg L ⁻¹	7.0 ± 5.6	67.2
	600 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
	1200 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
	2400 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
5 h	Water	20.0 ± 1.0	0
	Water + alcohol	18.0 ± 1.0	18.0
	300 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
	600 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
	1200 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100
	2400 mg L ⁻¹	0.0 ± 0.0	100

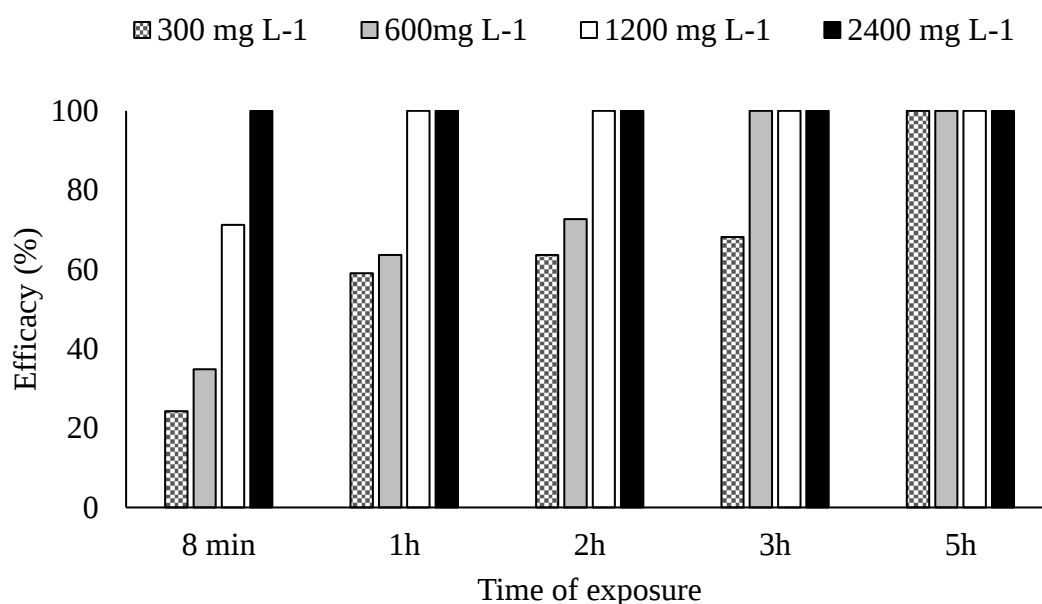


Fig. 1. *In vitro* efficacy of different concentrations of *Alpinia zerumbet* essential oil against monogeneans.

3.3. Scanning electronic microscopy of monogeneans exposed to *A. zerumbet* EO

Monogeneans exposed to tank water (Figure 2 A) and tank water + alcohol (Figure 2 B) presented a defined body shape and with shallow wrinkles on the surface. In contrast, the parasites exposed to the 300 and 2400 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO showed tegument covered with more deep wrinkles (Figure 2 C-D) and damage in the tegument (Circle).

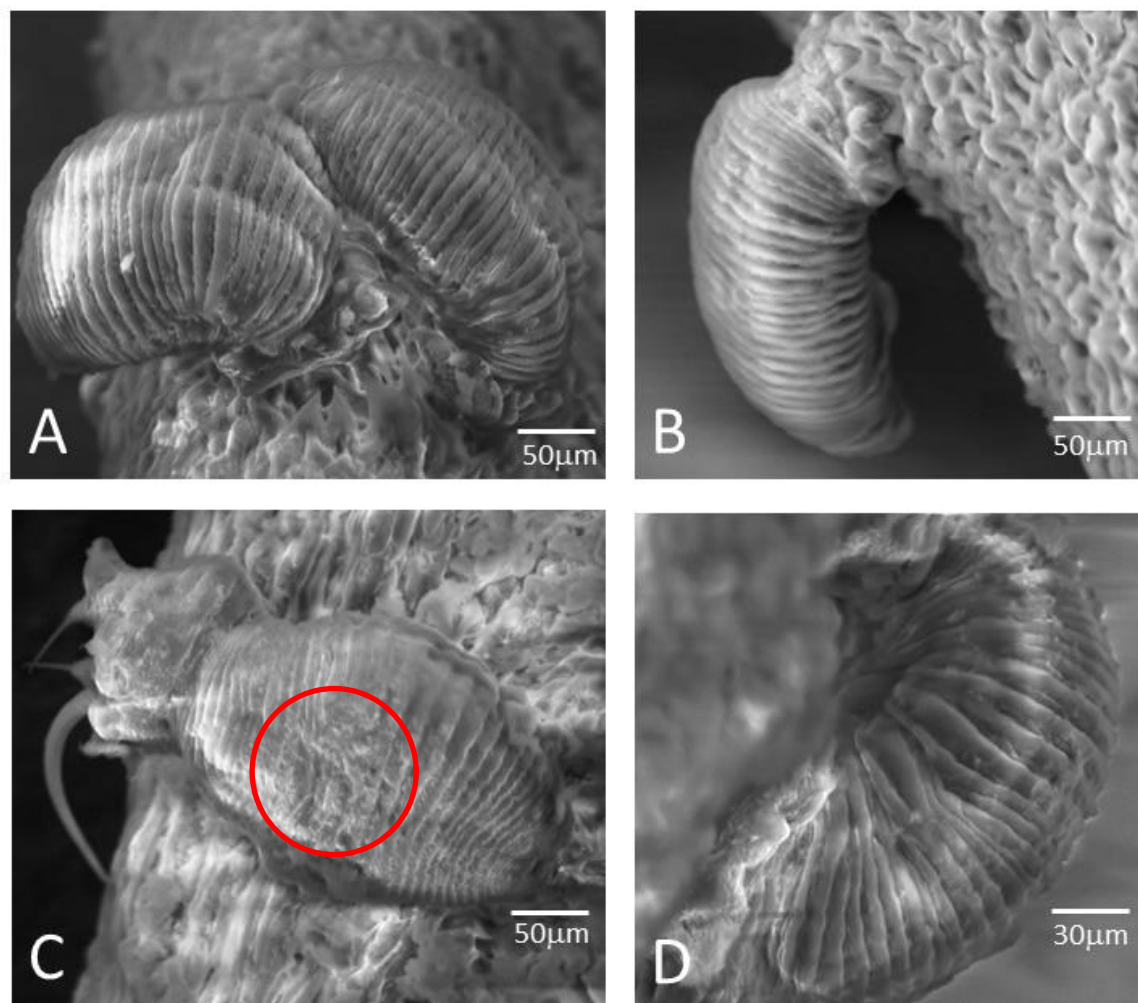


Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) of monogeneans on *Colossoma macropomum* exposed to *Alpinia zerumbet* essential oil. Untreated parasite (A). Parasite exposed to alcohol (B). Parasite exposed to 300 mg L⁻¹ of *Alpinia zerumbet* essential oil (C) with damage to the tegument (Circle). Parasite exposed to 2400 mg L⁻¹ of *Alpinia zerumbet* essential oil (D).

3.4. Tolerance of *C. macropomum* to different concentrations of *A. zerumbet* EO

During the tolerance tests, fish exposed to 300, 600, 1200 and 2400 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO showed behavioral changes such as agitation, accelerated movement of the operculum, erratic swimming, and lethargy. Eventually, the fish lost their movements and after

5 min of exposure, a sedative effect was observed, when the fish showed no reaction to mechanical stimuli. After 1 h of exposure it was observed that at the highest concentrations of *A. zerumbet* EO (600, 1200 and 2400 mg L⁻¹) there was 100% mortality of the fish. However, at the lowest concentration (300 mg L⁻¹) there was no mortality and the full recovery from sedative effects occurred at 20 min. Thus, this concentration was chosen for therapeutic baths.

3.5. Therapeutic baths and anthelmintic action of *A. zerumbet* EO in *C. macropomum*

The behavioral changes observed during therapeutic baths with 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO were similar to those observed in the tolerance test (agitation, accelerated movement of the operculum, erratic swimming and lethargy). There was a sedative effect and total paralysis of the fish after 5 minutes of the therapeutic bath. The total recovery of movements occurred 20 minutes after the end of treatment. There was no change in the behavior of the fish in the two control groups (tank water and water + 70% alcohol). During the 6 days of treatment the fish ate normally and there was no mortality during or after the therapeutic baths.

In the gills of *C. macropomum*, the prevalence and abundance of monogeneans (*A. spathulatus*, *M. boegeri* and *N. janauachensis*) was lower ($p < 0.05$) in fish exposed to 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO. There were no differences ($p > 0.05$) in prevalence and abundance between the two control groups: water from the culture tank and water from the culture tank + 70% alcohol (Table 3). Therapeutic baths with 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO showed 94.0% anthelmintic efficacy against monogeneans of the gills of *C. macropomum*.

Table 3. Prevalence (P) and mean abundance (MA) of monogeneans on gills of *Colossoma macropomum* exposed to the essential oil of *Alpinia zerumbet*.

Water		Water + alcohol		300 mg L ⁻¹	
P (%)	MA	P (%)	MA	P (%)	MA
100	41.2 ± 24.3 ^a	100	34.2 ± 9.8 ^a	72.0	2.04 ± 2.4 ^b

Data are expressed as mean ± standard deviation. Different letters in the same line indicate differences according to the Dunn test ($p < 0.05$).

3.6. Blood parameters of the *C. macropomum* exposed to *Alpinia zerumbet* EO

The glucose concentration of the fish in the control group exposed to water in the culture tank was higher ($p < 0.05$) than in the control with water + 70% alcohol and the fish

exposed to 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO. The level of total protein decreased ($p < 0.05$) after therapeutic bath treatment with 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, compared to the control groups (only water and water + alcohol). The number of total leukocytes and total neutrophils were reduced ($p < 0.05$) in fish exposed to water + 70% alcohol (control) and to 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, when compared to the control group using only water from the culture tank. The number of monocytes decreased ($p < 0.05$) in fish exposed to 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, when compared to the control group with water from the culture tank. However, the other blood parameters showed no significant changes ($p > 0.05$) (Table 4).

Table 4. Hematological parameters of *Colossoma macropomum* after therapeutic baths with of *Alpinia zerumbet* essential oil.

Parameters	Water	Water + alcohol	300 mg L ⁻¹
Glucose (g dL ⁻¹)	100.6 ± 13.8 ^a	86.7 ± 16.8 ^b	83.6 ± 19.3 ^b
Total protein (g dL ⁻¹)	3.0 ± 0.5 ^a	3.5 ± 0.5 ^b	2.4 ± 0.6 ^c
Erythrocytes (x10 ⁶ µL ⁻¹)	1.2 ± 0.3 ^a	1.1 ± 0.2 ^a	1.2 ± 0.2 ^a
Hemoglobin (g dL ⁻¹)	6.6 ± 1.2 ^a	6.3 ± 0.9 ^a	6.3 ± 1.1 ^a
Hematocrit (%)	20.1 ± 2.0 ^a	20.9 ± 1.4 ^a	20.5 ± 1.2 ^a
MCV (fL ⁻¹)	169.0 ± 40.1 ^a	184.9 ± 34.8 ^a	180.8 ± 35.1 ^a
MCHC (g dL ⁻¹)	32.6 ± 5.5 ^a	30.4 ± 4.9 ^a	31.0 ± 5.2 ^a
Thrombocytes (µL ⁻¹)	23858 ± 9210 ^a	19977 ± 9514 ^a	22518 ± 9831 ^a
Leukocytes (µL ⁻¹)	21037 ± 4170 ^a	16195 ± 5076 ^b	16677 ± 5437 ^b
Lymphocytes (µL ⁻¹)	16051 ± 4399 ^a	12889 ± 4086 ^a	13574 ± 4728 ^a
Monocytes (µL ⁻¹)	1168 ± 409 ^a	1070 ± 488 ^{ab}	739 ± 345 ^b
Neutrophils (µL ⁻¹)	3535 ± 1501 ^a	2120 ± 1398 ^b	2203 ± 1403 ^b
LG-PAS (µL ⁻¹)	203 ± 270 ^a	36 ± 72 ^a	45 ± 85 ^a
Eosinophils (µL ⁻¹)	81 ± 124 ^a	80 ± 75 ^a	89 ± 67 ^a

Data are expressed as mean ± standard deviation. RBC: red blood cells, MCV: mean corpuscular volume, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, LG-PAS: positive granular leukocytes. Different letters in the same line indicate differences according to the Tukey or Dunn test ($p < 0.05$).

3.7. Histopathological analyses of the gills of *C. macropomum* after therapeutic baths with *A. zerumbet* EO

Gills of fish exposed to the cultivation tank water (control) were observed for the primary and secondary lamellas (Fig 3 A). In the histopathological analyses, there were mild changes in the gills of fish exposed to the essential oil of *A. zerumbet* 300 mg L⁻¹, as well as moderate and mild changes in the control groups (tank water and water + alcohol). However, these changes had no effects on the normal functioning of the gills, according to the degree of severity of the HAI lesions (Table 5). The following stage I histopathological changes occurred in the gills: epithelial hyperplasia (32.5%), vascular congestion (16.3%), lamellar fusion (16.3%), as well as detachment of the lamellar epithelium (9.3 %) and vasodilation (9.3%), both less frequently (Fig. 3 B-E). For stage II histopathological changes, only aneurysm (16.3%) was observed in the gills (Fig. 3 B-C, E). Monogenean parasites were observed in the gills of the fish (Fig. 3 F).

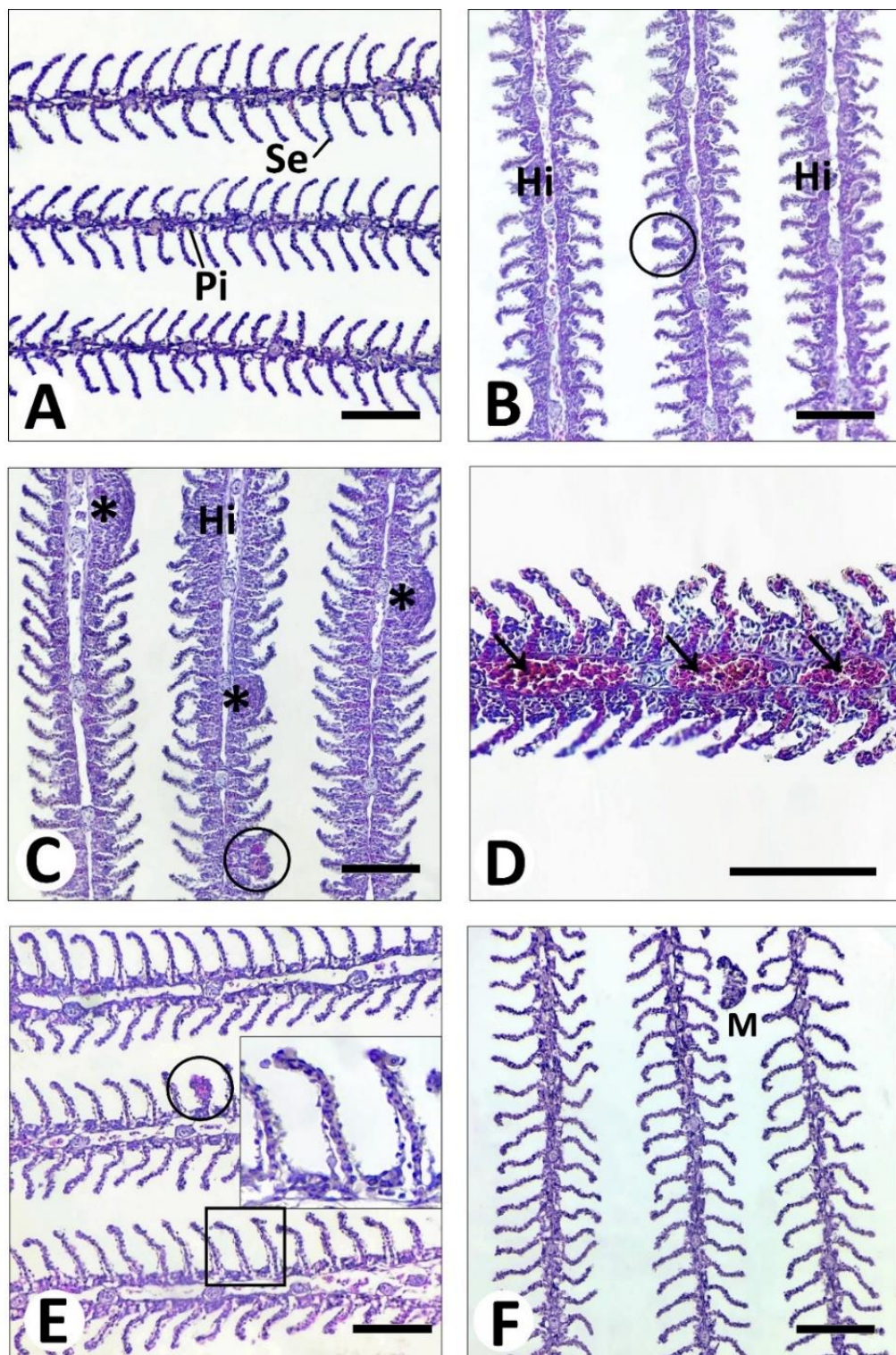


Fig. 3. *Colossoma macropomum* gills exposed to *Alpinia zerumbet* essential oil. (A) Gills of fish exposed to water of culture tank (control) showing primary (Pi) and secondary lamellas (Se). (B) Aneurism (circle) and lamellar hyperplasia (Hi). (C-D) Lamellar hyperplasia (Hi), hyperplasia with fusion of secondary lamellas (*), aneurism lamellar (circle) and areas of congestion (arrow) in gills of fish exposed to control group (water + alcohol 70%). (E-F) Aneurism lamellar (circle), detachment of lamellar epithelium (□) and monogenean (M) in gills of fish exposed to 300mg L⁻¹ *Alpinia zerumbet* essential oil. Scale bar: 20 μm.

In relation to the MAV, the gills of fish exposed to the essential oil of *A. zerumbet* 300 mg L⁻¹ showed a lower mean value of change ($p < 0.05$) when compared to the control groups (tank water and water + alcohol), while the HAI showed no differences ($p > 0.05$) between treatments (Table 5).

Table 5. Values of mean alteration value (MAV) and histopathological alteration index (HAI) for gills of *Colossoma macropomum* exposed to different treatments.

Treatments	N	MAV	HAI	Severity of the lesions according to the HAI
Water	5	6.8 ± 1.1 ^a	7.2 ± 5.8 ^a	Normal function
Water + alcohol	5	6.8 ± 1.9 ^a	9.4 ± 6.1 ^a	Normal function
300 mg L ⁻¹	5	2.0 ± 1.0 ^b	5.6 ± 5.9 ^a	Normal function

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

4. DISCUSSION

Essential oils are mixtures of volatile metabolites that generally consist of more than 20 different bioactive compounds and in varying concentrations. Hence, the bioactive effects of EOs are often due to the synergy of their bioactive compounds (Tavares-Dias, 2018; Barriga et al., 2020), many of which consist of bioactive compounds that induce anesthesia in fish (Aydın and Barbas, 2020; Barriga et al., 2020). In the present study, the major chemical constituents in the composition of *A. zerumbet* EO were terpinen-4-ol, eucalyptol and γ -terpinene, which constituted 61.9% of this essential oil. However, different chemical composition has been described for *A. zerumbet* EO from different locations, (Mendiola et al., 2015; Castro et al., 2016; Kerdudo et al., 2017; Souza et al., 2018). These differences in the composition of *A. zerumbet* EO may be the result of several factors such as collection and extraction methodology, environmental conditions, physiological variations and genetic factors (Figueiredo et al., 2008; Murakami et al., 2009; Soares and Tavares-Dias, 2013; Canuto et al., 2015).

In the present study, it was observed an anesthetic effect in *C. macropomum* from exposure to *A. zerumbet* EO at 300 mg L⁻¹, with rapid sedation and recovery after exposure. A suitable anesthetic should quickly immobilize the fish and result in an uneventful recovery. In addition, it must have high potency, be widely available, be cost-effective and have low or no toxicity (Aydın and Barbas, 2020). Therapeutic baths with 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO in the present study caused only mild histopathological changes in the gills of *C. macropomum*, which

have no effects on the functioning of the gills of exposed fish. A similar result was reported for *C. macropomum* exposed to 700 mg L⁻¹ of *Lippia grata* EO (Barriga et al., 2020).

The *in vitro* tests showed that all concentrations of *A. zerumbet* EO (300, 600, 1200 and 2400 mg L⁻¹) showed anthelmintic activity against *A. spathulatus*, *M. boegeri* and *N. janauachensis*, since there was immobilization of 100% of these monogeneans in all these concentrations. However, this efficacy was dose dependent and similar to what was reported for *Mentha piperita* OE (Malheiros et al., 2016), *Lippia alba* EO (Soares et al., 2016) and *L. grata* EO (Barriga et al., 2020). After *in vitro* exposure, more deep wrinkling and damage in the tegument were observed for the monogeneans exposed to *A. zerumbet* EO, similar to that reported for the essential oil of *Cymbopogon citratus* (Gonzales et al., 2020). The tegument of parasites plays an essential role in their survival, such as absorption and secretion of substances, osmoregulation and mechanical support (Dalton et al., 2004). Thus, serious damage to the tegument can eliminate the monogeneans.

The negative aspects of chemotherapeutics and the legal prohibition of these products for use in aquaculture in several countries lead to the need for alternative therapies such as EOs (Tavares-Dias, 2018; Barriga et al., 2020). Since several bioactive compounds from EOs have anthelmintic effects, different species of medicinal plants have been used to control and treat fish infected with monogeneans (Tavares-Dias, 2018). The 30 min therapeutic baths with 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, for six consecutive days, were efficient (94%) in reducing infections by monogeneans (*A. spathulatus*, *M. boegeri* and *N. janauachensis*) in the gills of *C. macropomum*. This was the first study with *A. zerumbet* EO to control and treat fish parasites.

After therapeutic baths of *C. macropomum* with 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO, the concentration of glucose and total protein, number of total leukocytes, neutrophils and monocytes decreased possibly due to the sedative effect of this EO. In general, there may be an increase in glucose levels in response to stress during physiological disturbances, but sedative and anesthetic substances can reduce these levels in exposed fish (Gomes et al., 2006; Roohi and Imanpoor, 2015). In addition, the total protein level depends on intracellular mechanisms and specific proteins that can be affected by stress and health conditions of fish (Zhou et al., 2009; Corral et al., 2018). Leukocytes are important defense cells that respond to parasitic infections and stress in fish (Reite and Evensen, 2006; Martins et al., 2008; Ranzani-Paiva et al., 2013). Therefore, 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO showed low toxicity for *C. macropomum*.

5. CONCLUSIONS

Alpinia zerumbet EO had *in vitro* anthelmintic activity and high efficacy (94%) in therapeutic baths in *C. macropomum*, in addition to presenting low toxicity. Thus, the present study recommends 300 mg L⁻¹ of *A. zerumbet* EO for treatments of *C. macropomum* infected with monogeneans, using therapeutic baths of 30 min/day for six consecutive days.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for the productivity research grant awarded to M. Tavares-Dias (#303013/2015-0)

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICAL DISCLOSURES

This study was developed in accordance with the principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and authorization from Ethics Committee in the Use of Animal of the Embrapa Amapá (#013/2018) was carried out.

REFERENCES

- Assefa, A., Abunna, F., 2018. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Vet. Med. Int.* 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Aydın, B., Barbas, L.A.L., 2020. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture* 520, 734999. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>
- Bader, C., Starling, D.E., Jones, D.E., Brewer, M.T., 2019. Use of praziquantel to control platyhelminth parasites of fish. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 42, 139–153. <https://doi.org/10.1111/jvp.12735>
- Barriga, I.B., Gonzales, A.P.P.F., Brasiliense, A.R.P., Castro, K.N.C., Tavares-Dias, M., 2020. Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills, a large Serrasalminidae fish from Amazon. *Aquac. Res.* 51, 3804–3812. <https://doi.org/10.1111/are.14728>
- Boijink, C.L., Queiroz, C.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A., 2016. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui

- (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture* 457, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.010>
- Buchmann, K., Roepstorff, A., Waller, P.J., 1992. Experimental selection of mebendazole-resistant gill monogeneans from the European eel, *Anguilla*. *J. Fish Dis.* 15, 393–400. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb01238.x>
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., W., S.A., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>
- Canuto, K.M., Pereira, R.C.A., Rodrigues, T.H.S., Brito, E.S., Lima, Y.C., Pimentel, F.A., 2015. Influência do horário de colheita das folhas na composição química do óleo essencial de colônia (*Alpinia zerumbet*). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 102, 1-16.
- Castro, K.N. C., Lima, D.F., Vasconcelos, L.C., Santos, R.C., Pereira, A.M.L., Fogaça, F.H. S., Canuto, K.M., Brito, E.S., Calvet, R.M., 2016. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. 83, 1–7. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000192014>
- Chan, E.W.C., Wong, S.K., Chan, H.T., 2017. *Alpinia zerumbet*, a ginger plant with a multitude of medicinal properties: An update on its research findings. *J. Chinese Pharm. Sci.* 26, 775–788. <https://doi.org/10.5246/jcps.2017.11.088>
- Corral, A.C.T., de Queiroz, M.N., de Andrade-Porto, S.M., Morey, G.A.M., Chaves, F.C.M., Fernandes, V.L.A., Ono, E.A., Affonso, E.G., 2018. Control of *Hysterothylacium* sp . (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. *Aquaculture* 494, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.062>
- Correa, A.J., Lima, C., Costa, M.C.C., 2010. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. *Rev. Bras. Plantas Med.* 12, 113–119. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000100016>
- Dalton, J.P., Skelly, P., Halton, D.W., 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Can. J. Zool.* 82, 211–232. <https://doi.org/10.1139/z03-213>
- Doan, H. Van, Soltani, E., Ingelbrecht, J., Soltani, M., 2020. Medicinal herbs and plants: potential treatment of monogenean infections in fish. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 28, 260–282. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1712325>
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., 2006. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Eduem, Maringá-PR, 1-199.

- FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Food Agric. Organ. United Nations 1–210.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C., 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23, 213–226. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>
- Gomes, L.C., Chagas, E.C., Brinn, R.P., Roubach, R., Coppati, C.E., Baldisserotto, B., 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture* 256, 521–528. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.004>
- Gonzales, A.P.P.F., Yoshioka, E.T.O., Mathews, P.D., Mertins, O., Chaves, F.C.M., Videira, M.N., Tavares-Dias, M., 2020. Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. *Aquaculture* 528, 735500. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735500>
- Guerra-Santos, B., Albinati, R.C.B., Moreira, E.L.T., Lima, F.W.M., Azevedo, T.M.P. de, Costa, D.S.P., Medeiros, S.D.C. de, Lira, A.D., 2012. Parâmetros hematológicos e alterações histopatológicas em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com amyloodiniose. *Pes. Vet. Bras.* 32, 1184–1190. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100019>
- Hoai, T.D., 2020. Reproductive strategies of parasitic flatworms (Platyhelminthes, Monogenea): the impact on parasite management in aquaculture. *Aquac. Int.* 28, 421–447. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00471-6>
- Ina-Salwany, M., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F., Mohd-ariss, A., Amal, M.N.A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., 2019. Vibriosis in fish : A review on disease development and prevention 3–22. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Indrayan, A.K., Tyagi, P.K., Agrawal, N.K., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Alpinia speciosa* K. Schum. rhizome from India. *J. Essent. Oil Res.* 22, 179–182. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700297>
- Kerdudo, A., Ellong, E.N., Burger, P., Gonnot, V., Boyer, L., Chandre, F., Adenet, S., Rochefort, K., Michel, T., Fernandez, X., 2017. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of flowers essential oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. from Martinique Island. *Chem. Biodivers.* 14, e1600344. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600344>

- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S.H., Pan, B., Straus, D.L., Steinberg, C.E.W., 2019. Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Rev. Aquac.* raq.12365. <https://doi.org/10.1111/raq.12365>
- Lorenzi, H., Souza, H.M., 1995. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Plantarum, São Paulo, 720 p.
- Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B. de, Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Ribeiro, W.L.C., Santos, J.M.L., Morais, S.M., Paula, H.C.B. de, Bevilaqua, C.M.L., 2013. *In vitro* effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 463–469. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400004>
- Malheiros, D.F., Maciel, P.O., Videira, M.N., Tavares-Dias, M., 2016. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture* 455, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.018>
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., 2012. World aquaculture: Environmental impacts and troubleshooting alternatives. *Sci. World J.* 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/389623>
- Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Amaral, G. V., Vieira, F.N., Dotta, G., Jatobá, A.M.B., Pedrotti, F.S., Jerônimo, G.T., Buglione-Neto, C.C., Pereira, G., 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Braz. J. Biol.* 68, 657–661. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000300025>
- Matos, F.J. de A., 2007. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Editora da UFC, Fortaleza, 344 p.
- Mendiola, J., Pino, J.A., Fernández-Calienes, A., Mendoza, D., Herrera, P., 2015. Chemical composition and *in vitro* antiplasmodial activity of essential oils of leaves and flowers of *Alpinia zerumbet* grown in Cuba. *Pharmacologyonline* 2, 1–5.
- 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. Parasit. Dis.* 43, 739–742. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01150-2>
- Murakami, S., Matsuura, M., Satou, T., Hayashi, S., Koike, K., 2009. Effects of the essential oil from leaves of *Alpinia zerumbet* on behavioral alterations in mice. *Nat. Prod. Commun.* 4, 129–132. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400128>

- ONU, 2019. Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050 and could peak at nearly 11 billion around 2100 : UN Report. Commun. United Nations Dep. Glob. 1–3.
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Sublethal Chronic Eff. Pollut. Freshw. Fish 339–352.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematologia de peixes. Eduem, Maringá, 140p.
- Reite, O.B., Evensen, Ø., 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. Fish Shellfish Immunol. 20, 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.012>
- Rico, A., Brink, P.J. Van Den, 2014. Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. Sci. Total Environ. 468–469, 630–641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.063>
- Roohi, Z., Imanpoor, M.R., 2015. The efficacy of the oils of spearmint and methyl salicylate as new anesthetics and their effect on glucose levels in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) juveniles. Aquaculture 437, 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.019>
- Shinn, A., Pratoomyot, J., Bron, J., Paladini, G., Brooker, E., Brooker, A., 2015. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. Glob. Aquac. Advoc. 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>
- Soares, B.V., Tavares-Dias, M., 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. Biota Amaz. 3, 109–123. <https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v3n1p109-123>
- Souza, C.D.F., Baldissera, M.D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Martos-Sitcha, J.A., Mancera, J.M., 2019. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. Front. Physiol. 10. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>
- Souza, T. de A. de, Lopes, M.B.P., Ramos, A. de S., Ferreira, J.L.P., Silva, J.R. de A., Queiroz, M.M.C., Araújo, K.G. de L., Amaral, A.C.F., 2018. *Alpinia* essential oils and their major

- components against *Rhodnius nasutus*, a vector of Chagas Disease. Sci. World J. 2018, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/2393858>
- Tavares-Dias, M., 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. Aquat. Liv. Resour. 31, 13. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>
- Tavechio, W.L.G., Guidelli, G., Portz, L., 2009. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. B. Inst. Pesca, 35, 335–341.
- Wang, G., Zhou, Z., Cheng, C., Yao, J., Yang, Z., 2008. Osthonol and isopimpinellin from *Fructus cnicoides* for the control of *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. Vet. Parasitol. 158, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.034>
- Zar, J.H., 2010. Biostatistical analysis, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 4th Edition. 944 pp.
- Zhou, X., Li, M., Abbas, K., Wang, W., 2009. Comparison of haematology and serum biochemistry of cultured and wild dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Fish Physiol. Biochem. 35, 435–441. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9268-4>

CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ Nos ensaios *in vitro* contra monogeneas de *C. macropomum*, todas as concentrações do óleo essencial de *A. zerumbet* (300, 600, 1200 e 2400 mg L⁻¹) mostraram 100% de imobilização contra *A. spathulatus*, *M. boegeri* e *N. janauachensis*, com efeito dose dependente.
- ✓ Os peixes mostraram tolerância à concentração de 300 mg L⁻¹ do óleo essencial de *A. zerumbet*, que foi usada nos banhos terapêuticos durante seis dias consecutivos e não houve mortalidade dos peixes durante e após os banhos.
- ✓ Banhos terapêuticos com 300 mg L⁻¹ do óleo essencial de *A. zerumbet* tiveram eficácia anti-helmíntica de 94% e baixa toxicidade para os peixes, pois houve poucas alterações sanguíneas e alterações histopatológicas leves que não comprometeram o funcionamento das brânquias de *C. macropomum*.
- ✓ Os resultados indicaram que 300 mg L⁻¹ do óleo essencial de *A. zerumbet* pode ser usado em banhos terapêuticos para controlar e tratar infecção por monogeneas nas brânquias de *C. macropomum*.

ANEXO 1

Comprovante de submissão do artigo.

E-mail de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Submission to... <https://mail.google.com/mail/u/2?ik=a8ecfa2f31&view=pt&search=all&...>



Marcos Tavares Dias <marcos.tavares@embrapa.br>

Submission to Aquaculture - manuscript number

2 mensagens

Aquaculture <em@editorialmanager.com>

23 de março de 2021 04:04

Responder a: Aquaculture <aqua@elsevier.com>

Para: Marcos Tavares-Dias <marcos.tavares@embrapa.br>

This is an automated message.

Manuscript Number: AQUACULTURE-D-21-00856

Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) has anthelmintic efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum*, a Neotropical fish

Dear Professor Tavares-Dias,

Your above referenced submission has been assigned a manuscript number: AQUACULTURE-D-21-00856.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/aquaculture/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Aquaculture

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial+manager/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/aquaculture/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Marcos Tavares Dias <marcos.tavares@embrapa.br>

23 de março de 2021 04:04

Para: em.aquaculture.0.72245e.85243e20@editorialmanager.com

=====

Marcos Tavares Dias - Pesquisador A

Sanidade de Organismos Aquáticos

Embrapa Amapá

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Macapá/AP

marcos.tavares@embrapa.br

Fones: (96) 3203-0250 e Celular: 99118-9226 e 98122-1925

www.embrapa.br | fb.com/embrapa | twitter.com/embrapa

E-mail de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Submission to... <https://mail.google.com/mail/u/2?ik=a8ecfa2f31&view=pt&search=all&...>

--

Marcos Tavares Dias - Pesquisador A
Sanidade de Organismos Aquáticos
Embrapa Amapá
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)
Macapá/AP

marcos.tavares@embrapa.br
Fones: (96) 3203-0250 e Celular: 99118-9226 e 98122-1925
www.embrapa.br | fb.com/embrapa | twitter.com/embrapa

