



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical
Mestrado e Doutorado
UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil



DANIEL SALES SOUSA VALENTIM

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE NANOEMULSÕES COM ÓLEO
ESSENCIAL E ÓLEO RESINA CONTRA MONOGENOIDEA DAS
BRÂNQUIAS DE *Colossoma macropomum* (SERASSALMIDAE)**

MACAPÁ, AP

2017

DANIEL SALES SOUSA VALENTIM

ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE NANOEMULSÕES COM ÓLEO
ESSENCIAL E ÓLEO RESINA CONTRA MONOGENOIDEA DAS
BRÂNQUIAS DE *Colossoma macropomum* (SERASSALMIDAE)

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

Orientador: Dr. Marcos Tavares Dias

Co-Orientador: Dr. Caio Pinho
Fernandes

MACAPÁ, AP

2017

DANIEL SALES SOUSA VALENTIM

ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE NANOEMULSÕES COM ÓLEO
ESSENCIAL E ÓLEO RESINA CONTRA MONOGENOIDEA DAS
BRÂNQUIAS DE *Colossoma macropomum* (SERASSALMIDAE)

Dr. Marcos Tavares Dias
Embrapa Amapá / PPGBIO

Raimundo Nonato Picanço Souto
Universidade Federal do Amapá / PPGBIO

Raquel Rodrigues do Amaral
Universidade Federal do Amapá

PREFÁCIO

Esta dissertação segue o formato proposto pelo Programa de pós-graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) dividida em dois artigos, a primeira parte segue as normas da *Ecology* a segunda parte subdivide-se em dois artigos. O primeiro artigo é um ensaio biológico intitulado “***In vitro* activity of a nanoemulsion prepared with *Copaifera officinalis* oleoresin against monogean parasites from the gills of *Collossoma macropomum* (Serassalmidae)**” foi submetido ao periódico *Aquaculture* (Qualis A2 – 2014) e segue as normas desse periódico. O Segundo artigo intitulado “**Eficácia *in vitro* da nanoemulsão de óleo essencial de *Pterodon emarginatus* (Fabaceae), para monogenoideas de *Collossoma macropomum* (Serassalmidae)**” a ser submetido para o periódico *Journal of Fish Diseases* (Qualis B1 – 2014) e segue as normas desse periódico.

RESUMO

Valentim, D.S. S. Atividade antiparasitária de nanoemulsões com óleo essencial e óleo resina contra monogenoidea das brânquias de *Colossoma macropomum* (serassalmidae). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical), Universidade Federal do Amapá.

Diversas substâncias químicas vêm sendo usadas na aquicultura para controlar e tratar doenças causadas por parasitos. A nanotecnologia, que envolve criar e utilizar sistemas diferentes em escalas nanométricas, poderia auxiliar no uso de baixas concentrações de óleos obtidas de nanoemulsões para uso no controle e tratamento contra parasitos de peixes. Todavia, o uso de nanoemulsões com óleo essencial ou óleo resina não tem sido testadas para controlar e eliminar parasitos de peixes. Esta é a primeira investigação sobre o uso de nanoemulsões contra parasitos de peixes. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antiparasitária *in vitro* de nanoemulsões contendo óleo resina de *Copaifera officinalis* e óleo essencial de *Pterodon emarginatus* contra monogenoideas, ectoparasitos das brânquias de *Colossoma macropomum* (tambaqui). No teste *in vitro*, a nanoemulsão de *C. officinalis* mostrou 100% de atividade antiparasitária contra *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* após 15 minutos de exposição à concentração de 200 mg/L. Concentrações de 100, 200, 400 e 600 mg/L da nanoemulsão de *P. emarginatus* mostraram 100% de atividade antiparasitária contra *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri* das brânquias de *C. macropomum*, mas nas duas maiores concentrações foi observada a imobilização dos parasitos após 15 minutos. Já na concentração de 50 mg/L a imobilização dos parasitos ocorreu após 5 horas da exposição, que foi semelhante aos controles. Portanto, o uso de nanoemulsões de *C. officinalis* e *P. emarginatus* pode ser uma alternativa para eliminar ectoparasitos monogenoideas de peixes, mas precisa ser validado em banhos terapêuticos.

Palavras-chave: Nanoemulsão; óleo essencial, óleo resina, sucupira, copaíba, tambaqui

ABSTRACT

Valentim, D.S. S. Antiparasitic activity of nanoemulsions with essential and resin oil against monogenoideans from the gills of *Colossoma macropomum* (Serassalmidae)). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical), Universidade Federal do Amapá.

Several chemical substances have been used in aquaculture to control and treat diseases caused by parasites. Nanotechnology, which involves creating and utilization of different systems at nanometric scales, could help in the use of low concentrations of nanoemulsion oils for use in the control and treatment of fish parasites. However, the use of nanoemulsions with essential oil or resin oil has not been tested to control and eliminate fish parasites. This is the first report on the use of nanoemulsions with fish parasites. The aim of this study was to investigate the *in vitro* antiparasitic activity of nanoemulsions containing *Copaifera officinalis* resin oil and *Pterodon emarginatus* essential oil, against monogenoideans ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) gills. In the *in vitro* assay, nanoemulsion of *C. officinalis* showed 100% antiparasitic activity against *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* and *Mymarothecium boegeri* after 15 min of exposure to the concentration of 200 mg/L. Concentrations of 100, 200, 400 and 600 mg/L of the *P. emarginatus* nanoemulsion showed 100% antiparasitic activity against *A. spathulatus*, *N. janauachensis* and *M. boegeri* of the gills of *C. macropomum*, but in these two highest concentrations was observed immobilization of the parasites after 15 min. At the concentration of 50 mg/L, the immobilization of the parasites occurred after 5 h of exposure, which was similar to the controls. Therefore, the use of *C. officinalis* and *P. emarginatus* nanoemulsions may be an alternative to eliminate monogenoideans of fish and needs to be tested *in vivo*.

Keywords: nanoemulsions; essential oil, resin oil; sucupira, copaiba, tambaqui

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	8
1.1. Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	9
1.2. Parasitos de brânquias de tambaqui em cultivo.....	10
1.3. Plantas medicinais e seus efeitos antiparasitários em peixes.....	11
1.4. Uso de nanoemulsões a base de plantas medicinais e atividade antiparasitária.....	13
1.5. A planta medicinal <i>Pterodon emarginatus</i>	13
1.6. A planta medicinal <i>Copaifera officinalis</i>	15
2. PROBLEMAS	17
3. HIPÓTESES	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. GERAL.....	19
4.2. ESPECÍFICOS	19
5. REFERÊNCIAS.....	20
ARTIGO 1.....	24
ARTIGO 2.....	41
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	- 57 -
ANEXO 1 - Artigo submetido ao periódico “Aquaculture”	58

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo, produziu mais de 160 milhões de toneladas em 2014. Esta atividade foi responsável por aproximadamente 46% do abastecimento mundial de pescados (FAO 2016). No Brasil, o maior país da região Neotropical, tem uma ictiofauna de água doce muito diversificada, onde podem ser encontradas cerca de 4.035 espécies, representando 31% dos peixes do planeta (Eiras et al. 2010).

No Brasil, em 2011, houve um incremento de aproximadamente 13,2% na sua produção nacional de pescados (1.431.974,4 t), em relação ao ano anterior. Porém, grande parte dessa produção é proveniente da piscicultura. As principais espécies cultivadas são: tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), híbridos tambacu e tambatinga, pintados (*Pseudoplatystoma* spp.) e carpas. Todavia, o tambaqui tem sido a espécie nativa mais produzida. A piscicultura continental também vem crescendo na Amazônia brasileira, pois além da existência de uma grande malha hidrográfica possui temperatura constante durante todo o ano e variedade de espécies nativas com potencial para o cultivo. Todavia, esse incremento na produção aquícola mundial está vulnerável aos impactos ambientais e surtos de doenças, levando a perdas significativas na produção (Tavares-Dias 2011, MPA 2013).

Nos peixes cultivados, os patógenos devem ser frequentemente diagnosticados, uma vez que podem causar doenças e levar a perdas econômicas significativas para o produtor, principalmente nos trópicos onde as parasitoses ocorrem de forma insidiosa. Além disso, na piscicultura, é necessário o constante monitoramento das condições ambientais e sanitárias, para melhor implementar estratégias profiláticas e tratamentos, para mitigar a ocorrência de doenças e mortalidade ainda não estimada no país (Gama 2008, Tavares-Dias 2011, Leung e Bates 2013).

Portanto, esse crescimento da aquicultura de tambaqui vem acompanhado de desafios do desenvolvimento de tecnologias confiáveis e efetivas para o controle de doenças, visando garantir uma maior produtividade deste importante peixe nativo. Dentre os desafios, destaca-se alternativas com uso de produtos naturais para controlar doenças parasitárias, entre essas a monogeniose. Assim, o uso de produtos naturais vem ganhando destaque na sanidade animal, pois podem ser fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitos de peixes (Soares e Tavares-dias 2013, Boijink et

al. 2015, Soares et al. 2016). Além disso, tais produtos são menos prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do homem (Carvalho et al. 2012, Godoi et al. 2012, Soares e Tavares-dias 2013).

Diversas substâncias químicas (cloreto de sódio, sulfato de cobre, permanganato de potássio, diflubenzuron, neguvon, antibióticos, outros) vêm sendo usadas na aquicultura para controlar e tratar doenças causadas por parasitos. Porém, a busca por novos produtos alternativos de baixo custo, com menor risco à saúde dos animais e dos manipuladores tem incentivado a realização de pesquisas com fitoquímicos. Assim, óleos essenciais vêm sendo cada vez mais testados, pois pertencem ao metabolismo secundário das plantas e constituem um dos mais importantes grupos de matéria prima para a indústria alimentícia, farmacêutica, perfumaria e, ainda podem combater parasitos. Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos por moléculas de natureza terpênica (Moraes 2009, Cunha et al. 2011), mas podem ser tóxicos para os peixes, quando usados em elevadas concentrações. Assim, a nanotecnologia poderia auxiliar na redução desta toxicidade.

Para amenizar possíveis problemas de intoxicação, podemos utilizar a nanotecnologia, que envolve criar e utilizar sistemas diferentes em escalas nanométricas, poderia auxiliar no uso de baixas concentrações de óleos obtidas de nanoemulsões para uso no controle e tratamento contra parasitos de peixes. Existem vários tipos de nanoformulações, incluindo nanoemulsões, que são sistemas dispersos constituídos por líquidos imiscíveis. As nanoemulsões são caracterizadas principalmente pela sua estabilidade e tamanho, sendo emulsões em escala nanométrica, ou seja, entre 20 a 200 nm. Neste sentido, os produtos naturais, principalmente através de nanoemulsões devem ser testados para eficácia de atividade antiparasitária em peixes com grande aceitação comercial, como o tambaqui.

1.1. Tambaqui (*Collossoma macropomum*)

Collossoma macropomum Cuvier 1816, conhecido popularmente como tambaqui, é um peixe da família Serrasalminidae que pode alcançar mais de um metro de comprimento e atingir até 30 kg, é considerado o segundo maior peixe de escamas da bacia Amazônica. Este peixe é muito valioso economicamente para a Região Amazônica, sofre forte pressão de pesca de seus estoques naturais (Benetton e Malta

1999). Possui boa adaptação ao cultivo em viveiros ou tanques-rede, e por ser onívoro, apresenta boa aceitação de rações comerciais, rápido crescimento e relativa rusticidade, excelentes características zootécnicas para o seu cultivo. Além disso, sua carne apresenta um bom sabor e boa textura (Goulding e Carvalho 1982, Araújo-Lima e Goulding 1998, Varella et al. 2003, Gomes et al. 2006, Godoi et al. 2012). Por isso, é bastante apreciado no mercado consumidor nacional e internacional.

O cultivo de tambaqui vem crescendo no Brasil, pois este foi o peixe nativo mais cultivado em 2011, com uma produção de 111.084,1 toneladas. Por exemplo, no Estado do Amapá a produção da piscicultura passou de 198 toneladas no ano 2000 para 1.000 toneladas em 2010, e o tambaqui foi responsável por mais de 65% dessa produção. Este peixe pode ser cultivado em viveiros e tanque-redes e análises econômicas mostram que seu desempenho econômico em tanques-rede é mais sensível ao preço de venda e custo alimentar (Gomes et al. 2006, Afonso et al. 2009, MPA 2013, Tavares-Dias et al. 2013, 2014). Porém, um dos problemas no cultivo intensivo do tambaqui são as infecções causadas por parasitos (Tavares-Dias et al. 2013, Boijink et al. 2015, Pinheiro et al. 2015).

Com o bom desempenho do tanque-rede na criação do tambaqui, inclui-se vantagens adicionais para a cultura na Amazônia central, como a alta tolerância à baixa concentração de oxigênio dissolvido e o bom valor de mercado (Araújo-Lima e Goulding 1998). Contudo, o cultivo de tambaqui em tanques-rede, na área do estuário amazônico ainda é pouco utilizado, pois falta inovações tecnológicas e mão de obra qualificada, mas especialmente pela falta de políticas públicas direcionada ao produtor rural (Tavares-Dias 2011).

1.2. Parasitos de brânquias de tambaqui em cultivo

Dentre os vertebrados, os peixes têm maior riqueza de espécies de parasitos (Thatcher 1991). Assim, a piscicultura necessita constantemente de diagnóstico das doenças parasitárias nos animais, pois algumas doenças podem aparecer devido à presença de diferentes organismos patogênicos no ambiente de cultivo e ao estresse de manejo. Em geral, o tratamento é inviável quando as doenças ocorrem de forma insidiosa, assim os procedimentos profiláticos devem ser adequados, para evitar perdas na produção e produtividade na piscicultura de qualquer peixe. Estudos que abordam as relações ecológicas entre hospedeiros e parasitos são ferramentas muito úteis para

prevenir doenças. Quando os parasitos estão presentes nas brânquias, são responsáveis pela perda funcional desse órgão, prejudicando a respiração e troca de sais com a água, podendo levar à mortalidade dos peixes (Godoi et al. 2012, Tavares-Dias et al. 2013). Assim, as infecções parasitárias em tambaqui podem causar danos indiretos aos peixes, tais como a redução do ganho de peso, e danos diretos tais como o comprometimento da sobrevivência. Porém, ambos os feitos causam prejuízos econômicos ao piscicultor (Tavares-Dias et al. 2013).

Entre os parasitos que causam doenças em tambaqui estão monogenoideas (Tabela 1), estes são ectoparasitos de brânquias que causam mortalidade do peixe principalmente nas primeiras fases da vida, porém podem ser encontrados em peixe de qualquer idade (Varella et al. 2003, Eiras et al. 2010, Boijink et al. 2015). Os monogenoideas possuem ciclo de vida direto (Eiras et al. 2010), isso o torna um dos parasitos mais problemáticos para as pisciculturas de tambaqui, devido a sua capacidade de proliferação no corpo e brânquias dos peixes (Tavares-Dias et al. 2013).

Tabela 1 - Espécies de monogenoideas parasitos de tambaqui em pisciculturas de diferentes localidades do Brasil. Adaptado de (Tavares-Dias et al. 2013).

Espécies de parasites	Localidades
Monogenoidea gen. sp	Jaboticabal (SP)
Monogenoidea gen. sp	Pentecoste (CE)
<i>Dactylogyrus</i> sp.	Pirassununga (SP)
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Irاندuba (AM), Manaus (AM) e Macapá (AP)
<i>Mymarotheciun boegeri</i>	Pentecoste (CE) e Macapá (AP)
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	Pirassununga (SP), Irاندuba (AM) e Macapá (AP)
<i>Notozothecium janauachensis</i>	Jaboticabal (SP), Irاندuba (AM) e Macapá (AP)

1.3. Plantas medicinais e seus efeitos antiparasitários em peixes

Plantas medicinais ou seus compostos bioativos tem sido frequente usadas no controle de doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitos no homem, bem como na medicina veterinária (Soares e Tavares-dias 2013, Pandey 2014), que tem por

objetivo reduzir os problemas sanitários controlando as doenças que comprometem a produção e produtividade dos animais de interesse zootécnico (Niezen et al. 1996). Tratamento com plantas medicinais contra doenças parasitárias em peixes é uma alternativa potencialmente benéfica para a piscicultura, quando os medicamentos fitoterápicos são mais baratos e eficazes se comparados aos agentes quimioterápicos comumente usados no controle e tratamento de parasitos (Pandey 2014, Hashimoto et al. 2016, Soares et al. 2016).

Em diferentes espécies de peixes, estudos tem avaliado os efeitos de extrato de *Allium sativum* e *T. catappa* na eliminação de *Trichodina* sp. (Chitmanat et al. 2005); extrato de sementes de mamão *Carica papaya* na eliminação de *I. multifiliis* (Ekanem et al. 2004) e sementes de *Cucurbita maxima* contra *Capillaria*, monogenoideas e Anisakidae (Fujimoto et al. 2012). Óleo essencial de *Mentha piperita* foi testado contra monogenoideas de *Oreochromis niloticus* (Hashimoto et al. 2016), enquanto óleo essencial de *Lippia alba* foi usado contra monogenoideas de *C. macropomum* (Soares et al. 2016) e *Lippia sidoides* contra monogenoideas de *O. niloticus* (Hashimoto et al. 2016), com resultados antiparasitários promissores. Boijink et al. (2015) relataram que o eugenol, um óleo essencial derivado do cravo foi eficaz na eliminação de monogenoideas de *C. macropomum*. Porém, devem ser testados o uso de nanoemulsões contendo óleos essenciais na eliminação de ectoparasitos de brânquias em peixes. Costa et al. (2017) testou os efeitos antihelmínticos *in vitro* de óleo resina de 100, 200, 400, 800 e 1.600 mg/L de *Copaifera duckei* contra monogenoideas *Anacanthorus penilabiatus* e *Mymarothecium viatorum*) de *Piaractus mesopotamicus*, bem como em banhos terapêuticos de 10 e 50 mg/L.

Produtos oriundos de plantas da região amazônica tem grande potencial farmacológico, mas têm sido ainda pouco estudados, considerando a grande diversidade de plantas da região. Porém, vem despertado grande interesse dos setores farmacêutico e biotecnológico. Por isso, o desenvolvimento tecnológico da busca por princípios ativos oriundos de plantas medicinais têm crescido nas últimas décadas, contribuindo assim para as inovações do setor. Óleos essenciais, misturas complexas voláteis com uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo propriedades repelente, inseticida e larvicida (Conti et al. 2010, Vaucher et al. 2015), deveriam ser testados para eliminar os parasitos de peixes, como o tambaqui *C. macropomum*, incluindo nanoformulações.

1.4. Uso de nanoemulsões a base de plantas medicinais e atividade antiparasitária

O sistema de emulsão é caracterizado pela sua capacidade de administrar medicamentos, e dependendo do tamanho e processo utilizado, este pode ser classificado como macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões (Jafari et al. 2007, Araújo-Júnior et al. 2013). Nanoemulsões são emulsões com tamanho em escala nanométrica, ou seja, entre 20 a 200 nm. Assim, as nanoemulsões são caracterizadas principalmente por exibirem uma excelente estabilidade em suspensão, devido a sua reduzida dimensão. As nanoemulsões apresentam características e propriedades que não dependem apenas da composição química, mas também do método de preparação. Apesar do interesse em nanoemulsões ter surgido há mais de 20 anos, somente nos últimos anos houve o crescente interesse no desenvolvimento de produtos à base de nanoemulsões, principalmente pela indústria farmacológica e cosmética (Solans et al. 2005, Anton et al. 2008, Gutiérrez et al. 2008).

Tradicionalmente, óleos essenciais têm sido bastante utilizados para o controle de vetores de doenças, principalmente por possuírem diversas propriedades biológicas úteis, incluindo atividade antiparasitária (Bilia et al. 2014). Recentemente, a utilização de plantas medicinais para o controle de parasitos de peixes tem atraído cada vez mais atenção de pesquisadores. Os estudos têm sugerido que algumas plantas, possuem propriedades antiparasitárias eficazes, pois estes compostos sofrem degeneração em peixes e na água e não demonstram efeitos para a saúde humana ou para o meio ambiente. Neste sentido, o uso de compostos antiparasitários extraídos a partir de plantas pode ser uma nova abordagem para tratar parasitos, principalmente monogenoideas, visto que o mesmo tem sido testado com eficácia em outros parasitos (Zhang et al. 2014, Zheng et al. 2014). Todavia, o uso de nanoemulsões com óleo essencial ou óleo resina não tem sido testadas para controlar e eliminar parasitos de peixes. Portanto, esta é a primeira investigação sobre o tema em foco.

1.5. A planta medicinal *Pterodon emarginatus*

Pterodon emarginatus Vogel é uma Fabaceae do Cerrado conhecida popularmente como sucupira-branca ou faveira, é uma espécie arbórea que atinge até 15 m de altura, tem relevância medicinal e florestal. Popularmente, sua semente é usada antirreumático, anti-inflamatório e também para problemas de coluna. Os frutos podem ser utilizados para o tratamento de dores musculares, bem como artrite e artrose e também apresenta ação anti-inflamatória e analgésica. O chá da casca do caule é utilizado para tratar infecções ginecológicas (Mors et al. 1967, Leite de Almeida e Gottlieb 1975, Lorenzi 2002, Bustamante et al. 2010, Santos et al. 2010, Alves et al. 2013).

Os produtos fitoterápicos são aqueles obtidos do uso exclusivo de matéria-prima de origem vegetal, com propriedades bioativas. Esses produtos podem ser industrializados ou manipulados, tanto para uso do homem como para uso veterinário. Porém, no caso de uso veterinário o órgão regulamentador é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA (Anvisa 2015).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas medicinais e são um dos mais importantes grupos de matéria-prima para indústrias farmacêuticas, perfumarias e outros. Além disso, podem ser utilizados para controle de patógenos, pois estudos indicam que metabólitos secundários de plantas medicinais podem ser utilizados tanto no tratamento quanto na prevenção de doenças em peixes cultivados (Burt 2004, Soares e Tavares-Dias 2013, Hashimoto et al. 2016, Soares et al. 2016). Conseqüentemente, o uso de plantas medicinais vêm ganhando espaço na aquicultura, por apresentarem diversas vantagens, entre elas o fácil cultivo, diminuição do impacto ambiental, por serem produtos biodegradáveis, assim não acumulam nos animais, são produtos menos tóxicos por serem menos concentrados, dentre outras (Coimbra et al. 2006, Soares e Tavares-Dias 2013).

Apesar do gênero *Pterodon* ser bastante estudado, principalmente sob o aspecto fitoquímico, há poucos estudos sobre óleos essenciais de *P. emarginatus* (Mors et al. 1967, Dutra et al. 2009, Santos et al. 2010, Alves et al. 2013, Pascoa et al. 2015) e não existem relatos de seu uso na aquicultura. Ação profilática do óleo essencial dos frutos de *Pterodon pubescens* foi relatada no combate à infecção por cercarias de *Schistosoma mansoni* (Mors et al. 1967, Mahajan e Monteiro 1973), bem como atividade antimicrobiana e leishmanicida de moléculas bioativas das sementes de *P. emarginatus* (Dutra et al. 2009). Óleo de sucupira *P. emarginatus* tem sido usado como um potencial

anti-inflamatório, principalmente na forma farmacêutica de microemulsão (Pascoa et al. 2015). Devido a tais propriedades farmacológicas *P. emarginatus* é uma planta incluída na lista de espécies como prioridade de conservação (Alves et al. 2013). Portanto, como óleos essenciais possuem potencial farmacológico, devem ser então explorados para a obtenção de seus compostos bioativos, que poderiam ser usados na piscicultura.

1.6. A planta medicinal *Copaifera officinalis*

Copaifera officinalis é uma Caesalpinioideae da família Fabaceae conhecida popularmente como copaíba e produz óleo resina obtido de seu tronco. *Copaifera spp.* são utilizadas amplamente na medicina popular da Amazônia, principalmente como anti-inflamatório e bactericida (Simões et al. 2016). As propriedades medicinais do óleo de copaíba foram observadas entre os índios americanos, que provavelmente observaram animais se apoiando no tronco de árvores de copaíba para curar suas feridas, já que a copaíba produz resina através de exsudação nos troncos (Veiga et al. 2006, Dias et al. 2012). Óleo de copaíba tem registro do seu uso desde os tempos antigos por indígenas brasileiros, que mencionou pela primeira vez com o nome de "Copei" em uma carta escrita pelo papa Petrus Martius de Leão X em 1534, onde dizia que a droga era usada com fins medicinais.

O óleo resina de *C. officinalis* é constituído por sesquiterpenos, que correspondem a 90% da composição relativa do óleo, sendo o beta-cariofileno considerado o constituinte principal (Lima et al. 2011, Rodrigues et al. 2014). O óleo de copaíba é, portanto, considerado um dos mais populares medicamentos da região amazônica (Santos et al. 2008, Custódio e Veiga-Junior 2012, Rodrigues et al. 2014), pois tem sido utilizado desde a antiguidade como remédio, principalmente para o tratamento de gonorreia e bronquite. Porém, muitas outras utilizações são consideradas folclóricas tais como o seu uso para fins anti-inflamatório, antisséptico, expectorante, estimulante, bem como para o tratamento de asma, dores de cabeça e afrodisíaco (Comfort 1853, Oliveira 1905, Ribeiro 1971, Ferreira 1980, Barros 1982, Bruneton 1987, Grieve 1994). Contudo, o óleo de copaíba mostrou ação contra *Trypanosoma evansi*, um protozoário flagelado causador de doença endêmica e morte de cavalos e gado no Pantanal. Esse óleo provoca alterações morfológicas estruturais nos parasitos, causando uma permeabilidade de sua membrana plasmática (Dorneles et al. 2013). Com isso, atividade antiparasitária desse óleo não tem sido testada contra ectoparasitos de peixes.

2. PROBLEMAS

Óleos essenciais podem ser tóxicos aos peixes quando em elevada concentração, enquanto nanoemulsões são caracterizadas por exibirem uma excelente estabilidade em suspensão, devido a sua dimensão extremamente reduzida e poderiam ser menos tóxicos e mais eficazes contra parasitos. Porém, não há estudos sobre atividades antiparasitárias de nanoemulsões com óleos de *P. emarginatus* e *C. officinalis* contra monogenoideas de peixes. Portanto, a pergunta central deste trabalho é: nanoemulsões contendo óleos de *P. emarginatus* e *C. officinalis* apresentam atividade *in vitro* contra monogenoideas de brânquias de *C. macropomum*?

3. HIPÓTESES

- Nanoemulsões com óleo essencial de *P. emarginatus* apresentam atividade antiparasitária, *in vitro*, contra monogenoideas das brânquias de *C. macropomum*, pois o óleo dessa planta contém princípios bioativos com atividade antihelmínticas;
- Nanoemulsões com óleo resina de *C. duckei* apresentam atividade anti-helmíntica, *in vitro*, contra monogenoidea das brânquias de *C. macropomum*, pois o óleo de copaíba possui ação antiparasitária.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Investigar a atividade antiparasitária da nanoemulsões contendo óleo essencial de *P. emarginatus* e *C. officinalis* contra monogenoideas, ectoparasitos de *C. macropomum*.

4.2. ESPECÍFICOS

- Preparar nanoemulsão com óleo resina de *C. officinalis*;
- Testar, *in vitro*, diferentes concentrações de nanoemulsão contendo óleo essencial de *P. emarginatus* ou *C. officinalis* contra monogenoideas de brânquias de *C. macropomum*.
- Determinar a concentração letal da nanoemulsão com óleo essencial de *P. emarginatus* ou *C. officinalis* para monogenoideas, ectoparasitos de *C. macropomum*.

5. REFERÊNCIAS

- Afonso, E. G., F. P. Barros, E. M. Brasil, M. Tavares-Dias, e E. A. Ono. 2009. Indicadores fisiológicos de estresse em peixes expostos ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Páginas 346–360 in M. Tavares-Dias, organizador. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Embrapa - Amapá, Macapá.
- Alves, S. F., L. Luiz Borges, J. A. M. de Paula, R. F. Vieira, P. H. Ferri, R. O. do Couto, J. R. de Paula, e M. T. Freitas Bara. 2013. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23:224–229.
- Anton, N., J. P. Benoit, e P. Saulnier. 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *Journal of Controlled Release* 128:185–199.
- ANVISA. 2015. ANVISA. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home>.
- de Araújo-Júnior, C. A., F. S. de Oliveira Costa, S. F. Taveira, R. N. Marreto, M. C. Valadares, e E. M. Lima. 2013. Preparation of pellets containing *Pothomorphe umbellata* extracts by extrusion-spheronization: improvement of 4-nerolidylcatechol photostability. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23:169–174.
- Araújo-Lima, C., e M. Goulding. 1998. Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília.
- Barros, M. A. G. 1982. Flora medicinal do Distrito Federal. *Brasil Florestal* 12:35–45.
- Benetton, M. L. F. N., e J. C. de O. Malta. 1999. Morfologia dos estágios de náuplios e copepodito I de *Perulernaea gamitanae* Thatcher & Paredes, 1985 (Crustacea: Cyclopoida: Lernaecidae), parasita do tabaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), (Osteichthyes: Chracidae), cultivado em laboratório. *Acta Amazonica* 29:97–121.
- Bilia, A. R., C. Guccione, B. Isacchi, C. Righeschi, F. Firenzuoli, e M. C. Bergonzi. 2014. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2014:651593.
- Boijink, C. de L., W. S. da C. Miranda, E. C. Chagas, J. K. Dairiki, e L. A. K. A. Inoue. 2015. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture* 438:138–140.
- Bruneton, J. 1987. *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie*. Lavoisier, Paris.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International journal of food microbiology* 94:223–53.
- Bustamante, K. G. L., a. D. F. Lima, M. L. Soares, T. S. Fiuza, L. M. F. Tresvenzol, M. T. F. Bara, F. C. Pimenta, e J. R. Paula. 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 12:341–345.
- Carvalho, E. D., G. S. David, e R. J. Silva. 2012. *Health and Environment in Aquaculture*. InTech, Croatia.
- Chitmanat, C., K. Tongdonmuan, e W. Nunsong. 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27:359–364.
- Coimbra, J. L., A. C. F. Soares, M. da S. Garrido, C. da S. Sousa, e F. L. B. Ribeiro. 2006. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1209–1211.
- Comfort, J. W. 1853. *The Practice of Medicine on Thomsonian Principles*. Lindsay & Blackiston, Philadelphia.
- Conti, B., A. Canale, A. Bertoli, F. Gozzini, e L. Pistelli. 2010. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes*

- albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research 107:1455–1461.
- Costa, J. C., Valladão, G. M. R., Pala, G., Gallani, S. U., Kotzent, S., Crotti, A. E. M., Fracarolli, L., Silva, J. J. M., Pilarski, P. 2017. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. Aquaculture 471: 72–79.
- Cunha, M. A. da, B. F. da Silva, F. A. C. Delunardo, S. C. Benovit, L. de C. Gomes, B. M. Heinzmann, e B. Baldisserotto. 2011. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. Neotropical Ichthyology 9:683–688.
- Custódio, D. L., e V. F. Veiga-Junior. 2012. True and common balsams. Revista Brasileira de Farmacognosia 22:1372–1383.
- Dias, D. de O., M. Colombo, R. G. Kelmann, T. P. De Souza, V. L. Bassani, H. F. Teixeira, V. F. Veiga, R. P. Limberger, e L. S. Koester. 2012. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. Analytica chimica acta 721:79–84.
- Dorneles, F. D. S., D. Schafer, Aleksandro Silva, C. B. Oliveira, C. E. P. Zimmermann, L. D. Rosa, A. A. Tonin, E. C. P. De Oliveira, J. M. Santurio, e S. G. Monteiro. 2013. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* in the Copaiba Oil: In Vitro Test and in Mice Experimentally Infected with the Parasite. Acta Scientiae Veterinariae 41:1136.
- Dutra, R. C., F. G. Braga, E. S. Coimbra, A. D. Silva, e N. R. Barbosa. 2009. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. Revista Brasileira de Farmacognosia 19:429–435.
- Eiras, J. C., R. M. Takemoto, e G. C. Pavanelli. 2010. Diversidade de parasitos de peixe de água doce. Cicletec, Maringá.
- Ekanem, A. P., A. Obiekezie, W. Kloas, e K. Knopf. 2004. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitology Research 92:361–366.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the Nations). 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos.
- Ferreira, M. B. 1980. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas de uso popular nos cerrados de Minas Gerais. Informe Agropecuário 6:19–24.
- Fujimoto, R. Y., H. C. da Costa, e F. M. Ramos. 2012. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). Pesquisa Veterinária Brasileira 32:5–10.
- Gama, C. de S. 2008. A criação de tilápia no estado do Amapá como fonte de risco ambiental. Acta Amazonica 38:525–530.
- Godoi, M. M. I. de M., V. Engracia, M. de L. A. P. Lizama, e R. M. Takemoto. 2012. Parasite-host relationship between the tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818) and ectoparasites, collected from fish farms in the city of Rolim de Moura, State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. Acta Amazonica 42:515–524.
- Gomes, L. D. C., E. C. Chagas, H. Martins-Junior, R. Roubach, E. A. Ono, e J. N. De Paula Lourenço. 2006. Cage culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a central Amazon floodplain lake. Aquaculture 253:374–384.
- Goulding, M., e M. L. Carvalho. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. Revista Brasileira de Zoologia 1:107–133.
- Grieve, M. 1994. A modern herbal. Tiger Books International, London.
- Gutiérrez, J. M., C. González, A. Maestro, I. Solè, C. M. Pey, e J. Nolla. 2008. Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation. Current Opinion in

- COLLOID and INTERFACE SCIENCE 13:245–251.
- Hashimoto, G. S. de O., F. M. Neto, M. L. Ruiz, M. Acchile, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves, e M. L. Martins. 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 450:182–186.
- Jafari, S. M., Y. He, e B. Bhandari. 2007. Encapsulation of Nanoparticles of d-Limonene by Spray Drying: Role of Emulsifiers and Emulsifying Techniques. *Drying Technology* 25:1069–1079.
- Leite de Almeida, M. E., e O. R. Gottlieb. 1975. The chemistry of Brazilian Leguminosae, further isoflavones from *Pterodon apparicia*. *Phytochemistry* 14:2716–2720.
- Leung, T. L. F., e A. E. Bates. 2013. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: Implications for food security. *Journal of Applied Ecology* 50:215–222.
- Lima, C. S., B. J. L. Medeiros, H. A. S. Favacho, K. C. Santos, B. R. Oliveira, J. C. Taglialegna, E. V. M. da Costa, K. J. de Campos, e J. C. T. Carvalho. 2011. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 18:1013–23.
- Lorenzi, H. 2002. Árvores Brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Quarto edição. São Paulo.
- Mahajan, J. R., e M. B. Monteiro. 1973. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* vog. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1:520.
- Moraes, L. A. S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* 27:4050–4063.
- Mors, W. B., F. M. F. Santos, H. J. Monteiro, e B. Gilbert. 1967. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14,15-epoxygeranilgeraniol. *Science* 157:950–951.
- MPA. 2013. Ministério da Pesca e Aquicultura. Produção Pesqueira e Aquícola. Brasília. DF.
- Niezen, J. H., W. A. G. Charleston, J. Hodgson, A. D. Mackay, e D. M. Leathwick. 1996. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: Approaches, experiences and prospects. *International Journal for Parasitology* 26:983–992.
- Oliveira, F. M. M. 1905. Estudos de Matéria Médica Vegetal. Escola Typographica Salesiana, São Paulo.
- Pandey, G. 2014. Some medicinal plants to treat fish ectoparasitic infections. *Int. J. Pharm. Reas Sci.* 2:532–538.
- Pascoa, H., D. G. A. Diniz, I. F. Florentino, E. A. Costa, e M. T. F. Bara. 2015. Microemulsion based on *Pterodon emarginatus* oil and its anti-inflammatory potential. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 51:117–125.
- Pinheiro, D. A., E. F. Santos, L. R. Neves, e M. Tavares-Dias. 2015. Ectoparasitos em híbrido Tambatinga provenientes de piscicultura em tanque-rede no Estado do Amapá (Brasil). *Boletim do Instituto Pesca* 41:1–9.
- Ribeiro, L. 1971. Medicina no Brasil colonial. Sul Americana, Rio de Janeiro.
- Rodrigues, E. D. C. R., A. M. Ferreira, J. C. E. Vilhena, F. B. Almeida, R. a. S. Cruz, A. C. Florentino, R. N. P. Souto, J. C. T. Carvalho, e C. P. Fernandes. 2014. Development of a larvicidal nanoemulsion with copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 24:699–705.
- Santos, A. O., T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias Filho, V. F. Veiga Junior, A. C. Pinto, e C. V. Nakamura. 2008. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *Journal of ethnopharmacology* 120:204–8.
- Santos, A. P., D. T. Zatta, W. F. Moraes, M. T. F. Bara, P. H. Ferri, M. do R. R. Silva, e J. R. Paula. 2010. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e

- ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20:891–896.
- Simões, C. A. C. G., N. C. de O. Conde, G. N. Venâncio, P. S. L. L. Milério, M. F. C. L. Bandeira, e V. F. da Veiga Júnior. 2016. Antibacterial Activity of Copaiba Oil Gel on Dental Biofilm. *The Open Dentistry Journal* 10:188–195.
- Soares, B. V., L. R. Neves, M. S. B. Oliveira, F. C. M. Chaves, M. K. R. Dias, E. C. Chagas, e M. Tavares-Dias. 2016. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture* 452:107–114.
- Soares, B. V., e M. Tavares-dias. 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia* 3:109–123.
- Solans, C., P. Izquierdo, J. Nolla, e N. Azemar. 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10:102–110.
- Tavares-Dias, M. 2011. Piscicultura continental no estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 81:1–38.
- Tavares-Dias, M., C. S. O. Araújo, S. M. A. Porto, G. M. Viana, e P. C. Monteiro. 2013. Sanidade do Tambaqui *Colossoma macropomum* nas Fases de Larvicultura e Alevinagem. 1º. Embrapa - Amapá, Macapá.
- Thatcher, V. E. 1991. Amazon fish parasites. 11^a. Amazoniana.
- Varella, M. B. A., S. N. Peiro, e S. N. Malta. 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Charidae) cultivado em tanques rede em um lago de várzea na Amazônia. *Aquabio. XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura* 2:95–105.
- Vaucher, R. de A., J. L. Giongo, L. P. Bolzan, M. S. Côrrea, V. P. Fausto, C. F. dos S. Alves, L. Q. S. Lopes, A. A. Boligon, M. L. Athayde, A. P. Moreira, A. Brandelli, R. P. Raffin, e R. C. V. Santos. 2015. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 18:205–210.
- Veiga, V. F., L. Zunino, M. L. Patitucci, A. C. Pinto, e J. B. Calixto. 2006. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58:1405–1410.
- Zhang, X. P., W. X. Li, T. S. Ai, H. Zou, S. G. Wu, e G. T. Wang. 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture* 420–421:302–307.
- Zheng, W., C.-M. Yan, Y.-B. Zhang, Z.-H. Li, Z. Li, X.-Y. Li, Z.-W. Wang, X. Wang, W.-Q. Chen, e X.-H. Yu. 2014. Antiparasitic efficacy of *Gracillin* and *Zingiberis newsaponin* from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology* 142:473–479.

ARTIGO 1

Atividade *in vitro* de nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera officinalis* (Caesalpinioideae), contra monogenoideas de brânquias de *Collossoma macropomum* (Serassalmidae)

Artigo submetido ao periódico "Aquaculture"

***In vitro* activity of a nanoemulsion prepared with *Copaifera officinalis* oleoresin against monogean parasites from the gills of *Colossoma macropomum* (Serassalmidae)**

Daniel S. S. Valentim^a, Fernanda. B. de Almeida^b, Jonatas L. Duarte^b, Anna E.M.F.M. Oliveira^b, Rodrigo. A.S. Cruz^b, José C.T. Carvalho^{a,c}, C. Solans^d, Caio P. Fernandes^{a,b}, Marcos Tavares-Dias^e

^aPost-graduate Program in Tropical Biodiversity, Federal University of Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, KM-02, Macapá, Brazil

^bLaboratory of Phytopharmaceutical Nanobiotechnology Federal University of Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek KM-02, Macapá, Brazil

^cLaboratory of Drug Research, Federal University of Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, KM-02, Macapá, Brazil

^dInstitute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), C/Jordi Girona, 18-26, Barcelona, Spain

^eEmbrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, 2600, Macapá, Brazil

Abstract

Parasites that affect gills of fish are a great economic problem for worldwide aquaculture. Monogenoidean are ectoparasites that causes loss in the production and productivity on aquaculture of *Collossoma macropomum*. Usually, chemicals used in aquaculture has major impairment on fish and human health, thus utilization of natural products has been considered good advantage because is an ecofriendly alternative. Since the high concentrations of natural products are required to treatment of ectoparasites, nanostructures may be very promising to enhance water solubility of compounds and improvement of bioactivity. The present study investigated the antiparasitic activity of a nanoemulsion prepared with *Copaifera officinalis* oleoresin in monogenoideans of *C. macropomum*. Particle size distribution and zeta potential suggested generation of potentially kinetic stable system. High efficacy (100%) of nanoemulsion with *C. officinalis* oleoresin was achieved using low concentrations (200 and 300 mg/L) after 15 minutes of exposure. This was the first time that a nanoemulsion was generated with *C. officinalis* oleoresin using a solvent-free, non-heating and low energy method. Finally, this was the first time that an antiparasitic based on *C. officinalis* oleoresin against monogenoideans of gills fish was tested.

Key words: Efficacy, Fresh water fish, Parasites, tambaqui

1. Introduction

Colossoma macropomum Cuvier 1816 (tambaqui) is a fish from the family Serrasalminidae that can reach more than one meter length and even 30 kg on its natural environment. It is economically important on the Amazon region and presents high demand on Brazil, being about 140 thousand tons produced by the aquiculture in 2004 (IBGE, 2015; Valladão et al., 2016). However, their fish stocks are under high fishery pressure, being extinct on some localities (Araújo-Lima e Goulding, 1998; Benetton e Malta, 1999; Godoi et al., 2012; Gomes et al., 2006; Goulding e Carvalho, 1982; Varella et al., 2003). Intensive fish farming of tambaqui has a critical problem that is associated to ectoparasites such as monogenean *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni*, which can cause economic loss to aquiculture (Boijink et al., 2015; Soares et al., 2016).

Continuous monitoring is required for diagnostic and control of parasitic infections on tambaqui aquaculture. The main substances that has been used for treatment and parasite control, even they are not satisfactorily effective, are chemicals highly toxic to fish and human. Thus, phototherapeutic agents with bioactive properties and their derivatives have been assayed *in vitro* and *in vivo*, aiming to furnish a better strategy for fish ectoparasites control on aquaculture (Boijink et al., 2015; Pandey, 2014; Soares et al., 2016; Zhang et al., 2014). Phototherapeutic agents have shown high *in vitro* efficacy against monogenean species of tambaqui. However, low *in vivo* efficacy has been observed, due to low tolerance of fish to high toxic concentrations of some natural product (Soares et al., 2016). Several bioactive natural products has low water solubility due to oily characteristic and this is considered a main disadvantage for aquaculture, since it difficult availability of the compounds in water media. Therefore, emerging technologies such as preparation of nanoemulsions has been considered very promising to solve this problem and allow treatment of parasitic infections, without major toxicity for fishes (Soares et al., 2016).

Aqueous nanodispersions, including nanoemulsions are kinetic stable systems constituted by fine droplets or particles that are disperse into an aqueous external phase. Often, the mean droplet size of nanoemulsions is within the range of 20-200 nm (Solans et al., 2005); however, this criteria may vary according to different authors (Solans & Solè, 2012). It is worth mentioning that the nanosize is responsible by the main advantages of nanoemulsions, such as system stability, potential improved bioavailability, enhanced water solubility (oil in water nanoemulsion) and others (Ostertag et al., 2012), The intrinsic low solubility or immiscibility of the internal phase components make this type of novel delivery

system very promising for control of fish diseases (Thomas et al., 2013). Moreover, the nanosize potentially increase the bioactivity of the compounds (Irache et al., 2011), being very promising for effective treatment even at lower concentrations than usual antiparasitic products. *Copaifera officinalis* (Caesalpinoideae) belongs to the family Fabaceae and it is commonly known as copaiba. The oleoresin obtained from this plant is widely used on folk medicine, mainly as anti-inflammatory and bactericidal agent (Simões et al., 2016). *Copaifera* spp. is a mixture of several substances, being the sesquiterpene β -caryophyllene the main constituent (Veiga et al., 2006); Lima et al., 2011).

According to our knowledge, no studies were carried out in order to evaluate the antiparasitic activity of a nanoemulsion prepared with *C. officinalis* against parasites of fish. Thus, the aim of the present study was to perform *in vitro* investigation of this nanoprodut of *C. officinalis* oleoresin against monogenoideans of *C. macropomum* gills.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Copaifera officinalis oleoresin was obtained from Amazon Ervas (Brazil, lot number 009105845) and polysorbate 80 was obtained from Praid (SP, Brazil).

2.2. Gas-chromatograph analysis of *Copaifera officinalis* oleoresin

The chemical analysis of the oleoresin was performed on a GCMS-QP5000 (SHIMADZU) gas chromatograph equipped with a mass spectrometer, using electron ionization, according to the following experimental conditions: injector temperature, 200°C; detector temperature, 250 °C; carrier gas, Helium; flow rate 1 mL/min; split injection with split ratio 1:40. The oven temperature was programmed from 50 °C (isothermal for 10 min), with an increase of 2°C/min to 200°C and increase of 10 °C/min to 290 °C (isothermal for 10 min). RTx5-5MS column (i.d. = 0.25 mm, length 30 m, film thickness = 0.25 μ m). Mass spectrometry (MS) conditions were as follows: ionization voltage, 70 eV; scan rate, 1 scan/s; mass range, m/z 50-600.

2.3. *Copaifera officinalis* oleoresin nanoemulsion

The oil in water nanoemulsion containing *C. officinalis* oleoresin was prepared by a low energy method. The oily phase, constituted by non-ionic surfactant (polysorbate 80) and *C. officinalis* oleoresin was vigorously mixed until a clear transparent homogeneous phase was observed. Then water was added drop wise under continuous homogenization using a

vortex stirrer (Warmnest - Ionlab – Brazil) and final concentration of oleoresin was 5000 ppm. The oil to surfactant ratio was 1:1 and final mass of nanoemulsion was 10 g. Dynamic light scattering (DLS) analysis was carried out for particle size distribution using a Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) equipped with a 10 mW “red” laser ($\lambda = 632.8$ nm) and samples were measured at a 90° scattering detector angle for size measurements. The nanoemulsion was diluted in deionize water (1:25) and results (droplet size and polydispersity index) were expressed as mean \pm standard deviation.

2.3. Fish

Fry of *C. macropomum* (± 25 g) were obtained from commercial fish farms from Macapá, Amapá State (Brazil). Acclimation of fishes was conducted on 500 L water tanks for seven days at Aquaculture and Fishery Laboratory of Embrapa Amapá (Macapá, Brazil). They were fed with fish food containing 32% crude protein and the tanks were kept under constant water recirculation.

2.4. *In vitro* assay with monogenoideans of *Collossoma macropomum*

Gills of *C. macropomum* (47.5 ± 14.7 g e 13.4 ± 2.1 cm), naturally infected by species of monogenoidean were removed and individually in Petri dishes, where they have been submerged in solutions of different nanoemulsion *C. officinalis* oil. In this trial *in vitro* gill arches containing monogenoideans was exposed to different concentrations of nanoemulsion *C. officinalis* oleoresin. To this end, a control group was employed using only water cultivation tanks, and five different concentrations of nanoemulsion *C. officinalis* oleoresin, 50; 100; 150; 200 e 300 mg/L. All experiments were performed in triplicate. All *in vitro* assays were performed in environment temperature of 23° C and using stereomicroscopes of cold light. Using a stereomicroscope, fields of view containing a minimum of 25 monogenoideans were selected for each repetition. After the gill arches had been immersed in different concentrations of the nanoemulsion *C. officinalis* oleoresin, these were viewed every 5 min to quantify the numbers of live and dead monogenoideans. Parasites were considered to be dead if they detached from the tissue or, while still attached, had totally lost their mobility (Soares et al., 2016). Following this, the efficacy of each treatment was calculated according to Zhang et al.

(2014).

4. Results

4.1. Gas-chromatograph analysis

The gas-chromatograph analysis revealed the presence of several substances on *C. officinalis oleoresin* (Fig. 1), being mass spectra in accordance with sesquiterpenes from NIST library. High abundant peak was observed at retention time (Rt) of 44.715 min. Analysis of mass spectra (Fig. 2) and comparison to NIST library and literature data (Lucca et al., 2015) revealed a fragmentation pattern in accordance with β -caryophyllene.

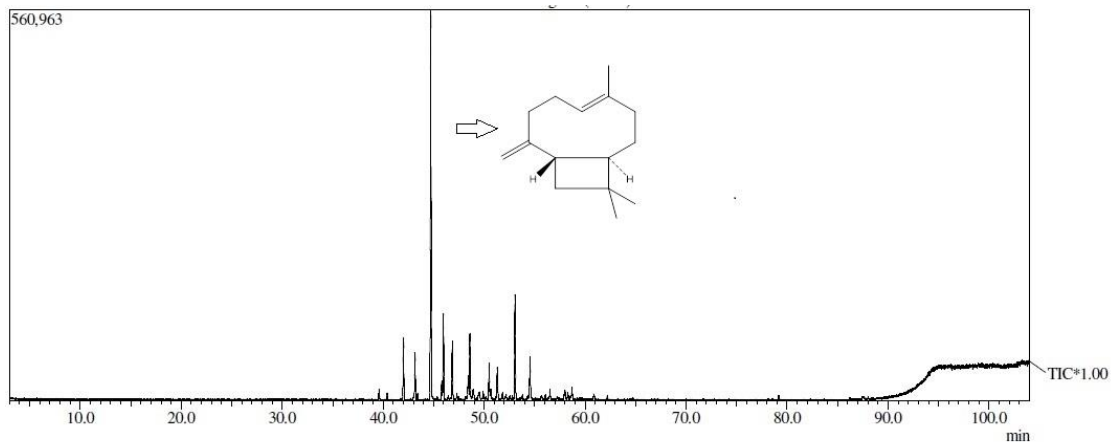


Fig. 1. Total ion chromatogram of *C. officinalis* oleoresin. High abundant peak at Rt = 44.715 min is related to the sesquiterpene β -caryophyllene.

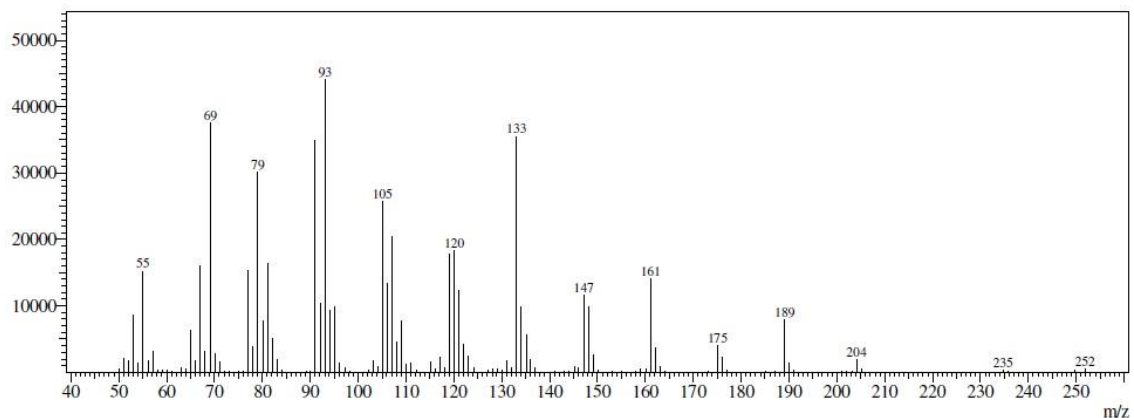


Fig. 2. Mass spectra showing the fragmentation pattern of the sesquiterpene β -caryophyllene.

4.2. *Copaifera officinalis* oleoresin nanoemulsion

The nanoemulsion prepared with *C. officinalis* oleoresin presented an homogeneous translucent aspect with bluish reflect (Fig. 3A). The mixture of water, polysorbate 80 and *C. officinalis* oleoresin at the same ratios that were used on the nanoemulsion preparation were not able to induce formation of nanoemulsion, being observed heterogeneous aspect immediately after homogenization of the three components (Fig. 3B). Droplet size distribution of *C. officinalis* nanoemulsion revealed mean droplet size of 161.2 ± 0.808 nm and polydispersity index of 0.340 ± 0.007 mV, while zeta potential was -22.1 ± 0.764 mV. Analysis of these parameter after seven days of storage (Figure 4) under controlled temperature (25 ± 2 °C) showed slight decrease on mean droplet size (132.4 ± 1.2 nm) and polydispersity index (0.297 ± 0.006) and slight increase on zeta potential (-21.3 ± 0.643 mV). No alteration on macroscopical aspect of the nanoemulsion was observed, after this period.

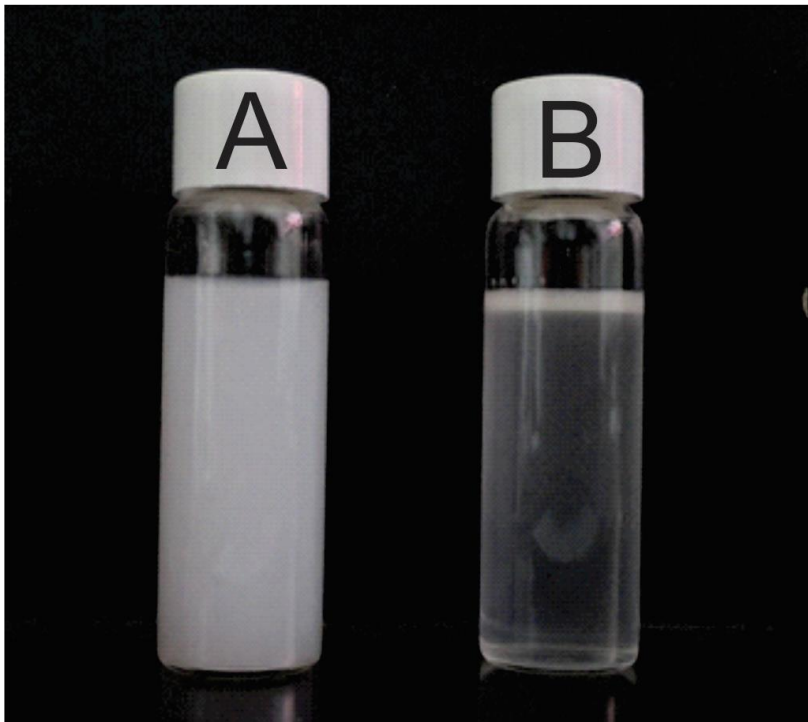


Fig. 3. Photograph of glass vials containing (A) nanoemulsion prepared with *Copaifera officinalis* oleoresin (5000 ppm), polysorbate 80 (5000 ppm) and water; or (B) mixture of *Copaifera officinalis* oleoresin (5000 ppm), polysorbate 80 (5000 ppm).

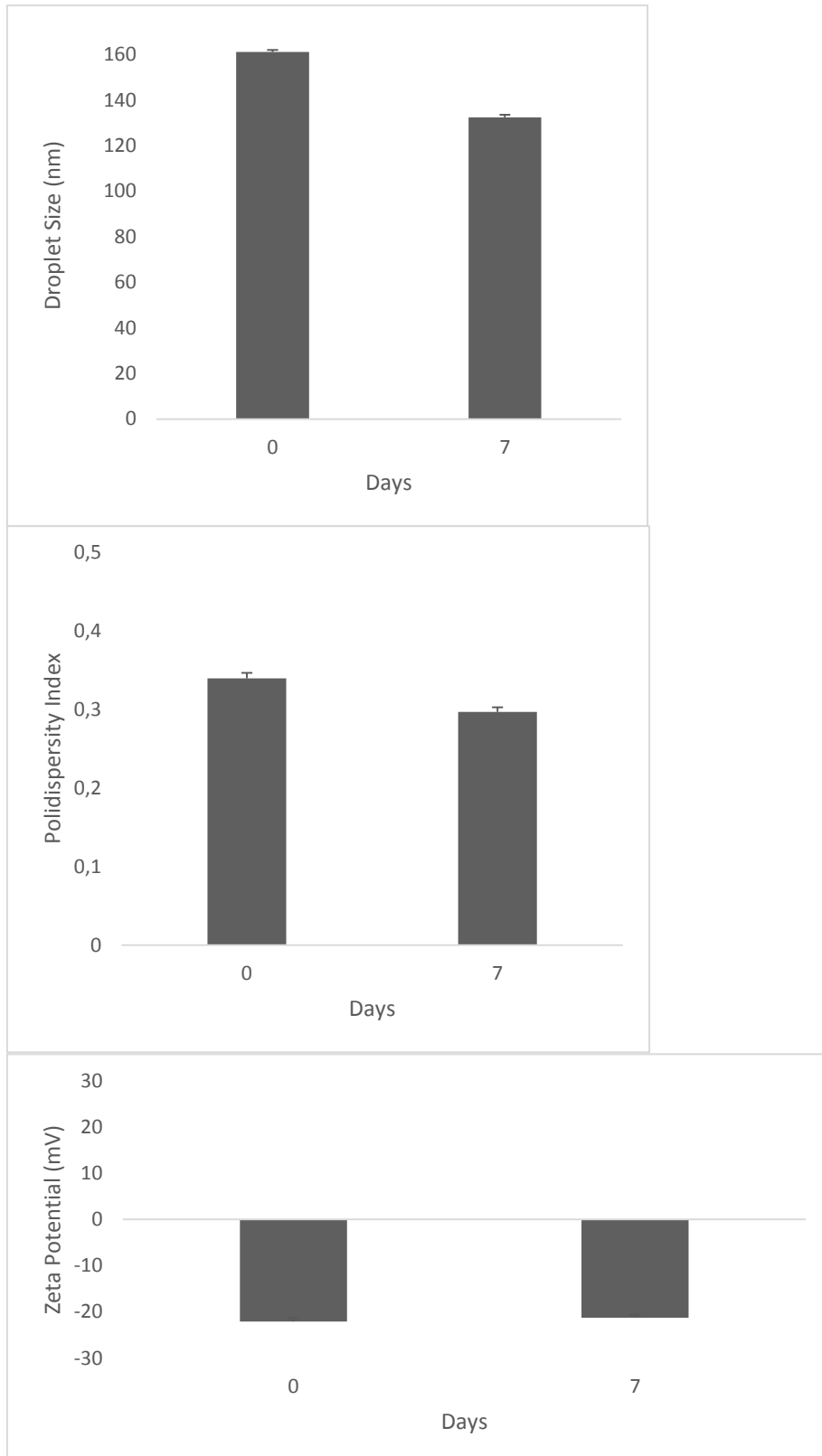


Fig. 4. Barr graphs showing particle size distribution (droplet size and polydispersity index) and zeta potential of nanoemulsion after preparation (Day 0) and seven days of storage (Day 7) of the *Copaifera officinalis* oleoresin emulsion.

4.3. Antiparasitic efficacy of the *in vitro* treatments

The *in vitro* assay revealed that the nanoemulsion prepared with *C. officinalis* oleoresin induced 100% of antiparasitic activity against monogenoideans *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* and *Mymarothecium boegeri* of *C. macropomum* gills. This level of mortality was reached after 15 minutes of exposure at 200 mg/L, while the same efficacy was reached after 90 minutes of exposure at 50 mg/L with nanoemulsion of *C. officinalis* oleoresin. In control group, the mortality of parasites initiated after 70 minutes of exposure and total immobilization of the monogenoideans was observed after 7 h of exposure to nanoemulsion of *C. officinalis* oleoresin (Table 1 and Fig. 5).

Table 1. *In vitro* antiparasitic action of nanoemulsion prepared with *Copaifera officinalis* oleoresin at different concentrations, against parasites *Colossoma macropomum* gills, as function of time of exposure.

Time	Concentration (mg/L)	Live parasites	Dead parasites (%)
0 h	0	18.0 ± 3.0	0
	50	25.0 ± 0.0	0
	100	20.3 ± 4.2	0
	150	25.3 ± 1.5	0
	200	23.3 ± 2.9	0
	300	19.0 ± 1.7	0
	10 min	0	18.0 ± 3.0
50		25.0 ± 0.0	0
100		15.0 ± 5.3	26.2
150		18.3 ± 6.4	27.6
200		4.0 ± 3.5	82.9
300		0.7 ± 1.2	96.5
15 min		0	18.0 ± 3.0
	50	25.0 ± 0.0	0
	100	11.3 ± 5.5	44.3
	150	15.7 ± 8.4	38.2
	200	0.0 ± 0.0	100
	300	0.0 ± 0.0	100

Table 1. Continuation.....

40 min	0	18.0 ± 3.0	0
	50	19.0 ± 1.0	24.0
	100	6.0 ± 3.6	70.5
	150	0.7 ± 1.2	97.4
	200	0.0 ± 0.0	100
	300	0.0 ± 0.0	100
70 min	0	17.7 ± 3.1	1.9
	50	4.7 ± 0.6	81.3
	100	0.0 ± 0.0	100
	150	0.0 ± 0.0	100
	200	0.0 ± 0.0	100
	300	0.0 ± 0.0	100
90 min	0	17.7 ± 3.1	1.9
	50	0.0 ± 0.0	100
	100	0.0 ± 0.0	100
	150	0.0 ± 0.0	100
	200	0.0 ± 0.0	100
	300	0.0 ± 0.0	100
2h	0	17.7 ± 3.1	1.9
	50	0.0 ± 0.0	100
	100	0.0 ± 0.0	100
	150	0.0 ± 0.0	100
	200	0.0 ± 0.0	100
	300	0.0 ± 0.0	100
5h	0	6.0 ± 1.0	66.7
	50	0.0 ± 0.0	100
	100	0.0 ± 0.0	100
	150	0.0 ± 0.0	100
	200	0.0 ± 0.0	100
	300	0.0 ± 0.0	100
7h	0	0.0 ± 0.0	100
	50	0.0 ± 0.0	100
	100	0.0 ± 0.0	100
	150	0.0 ± 0.0	100
	200	0.0 ± 0.0	100
	300	0.0 ± 0.0	100

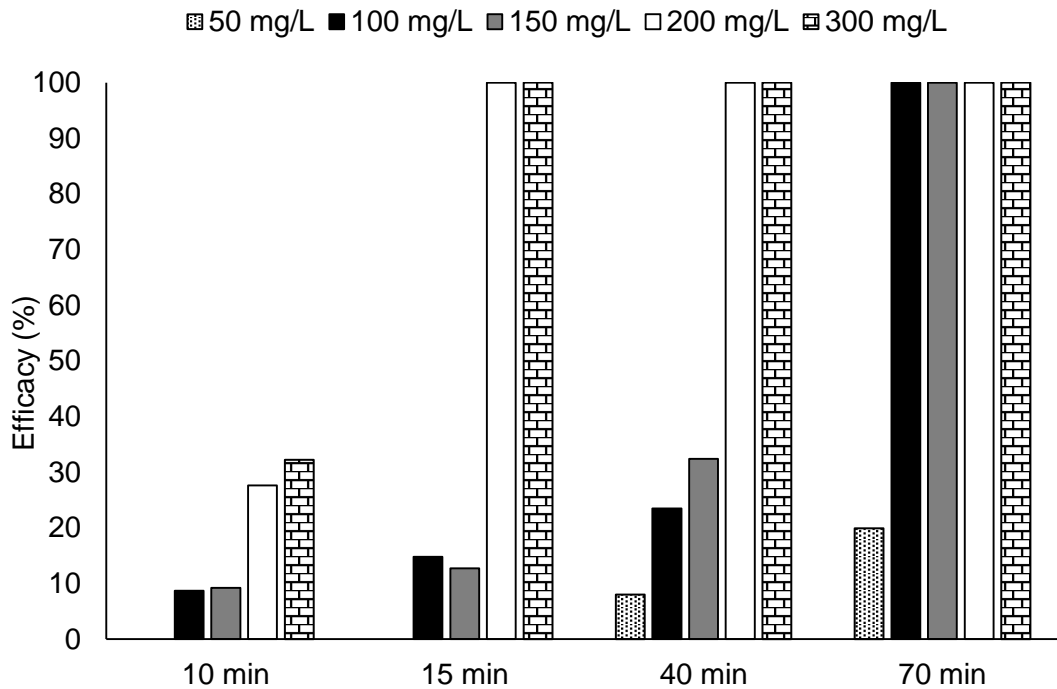


Fig. 5. *In vitro* efficacy of different concentrations of nanoemulsion prepared with *Copaifera officinalis* oleoresin against monogenoideans of *Colossoma macropomum* gills.

5. Discussion

We prepared by first time a nanoemulsion with *C. officinalis* oleoresin. Oleoresin nanoemulsion of *Copaifera multijuga* was successfully achieved; however, volatile organic solvents were used on a spontaneous nanoemulsifying method (Dias et al., 2014). High pressure homogenizer was also used for preparation of *C. multijuga* oleoresin nanoemulsions (Dias et al., 2012, 2014; Lucca et al., 2015). Vaucher et al. (2015) used also this high-energy method for preparation of a nanoemulsion with *C. officinalis* oleoresin. Ecofriendly processes for nanoemulsion preparation with less impairment to the fish, human and environment are very desirable. Methods that are able to generate the nanostructures without using high energy equipment should also be encouraged. Our results suggest that it is possible to obtain *C. officinalis* nanoemulsions using a simple approach. Self-emulsification due to dilution of microemulsion (Solè et al., 2012) or cubic liquid crystal (Solè et al., 2012; Solans & Solè, 2012) are considered a possible mechanism for nanoemulsion formation. Moreover, phase inversion at constant temperature (Phase Inversion Composition – PIT) due to change in

spontaneous curvature of the surfactant from negative to positive, passing through a zero curvature (e.g. bicontinuous microemulsion or lamellar liquid crystal) seems to develop a main role on nanoemulsion formation by low energy method that not involve heating (Solans & Solè, 2012). However, most of studies that aimed to investigate mechanisms of nanoemulsification were carried out with synthetic and/or pure lipophilic components that constituted the internal phase. Thus, considering the complexity of natural oils, such as *C. officinalis*, oleoresin, deeper investigation regarding these processes should be performed. Droplet size distribution of nanoemulsions prepared with *C. multijuga* oleoresin revealed mean size diameter in the range 160-300 nm (Dias et al., 2014). Our results shows the successful generation of fine droplets by non-heating and low energy method, when compared to high-pressure homogenization and/or utilization of organic solvents. The polydispersity index is a parameter associated to homogeneity of particle population and results. Desirable values may be within the range 0 (monodisperse) to 0.500 (relatively broad distribution) (Cheong et al., 2008), being acceptable polydispersity index below 0.700 (Leong et al., 2011). Zeta potential is an important parameter related to surface potential of the droplets and high values (in module) are associated to kinetic stable systems (Heurtault et al., 2003). Previous study performed with a nanoemulsion prepared with copaiba oleoresin from *C. multijuga* shows zeta potential around -23 mV (Dias et al., 2012), being close to values achieved on the present study.

β -caryophyllene is the main constituent of *Copaifera* spp. oleoresins (Cascon e Gilbert, 2000; Simões et al., 2016). This sesquiterpene is the chemical marker from *Copaifera* species and it is responsible by several biological activities of the oleoresin these plant (Tappin et al., 2004; Lima et al., 2011). Preparation of nanoemulsions proved to be a good strategy to avoid volatile loss, including of this bioactive compound of *Copaifera* spp. oleoresin (Dias et al., 2014). The oleoresin from *Copaifera duckei* was heated prior to emulsification method that generate oil in water nanoemulsions (Rodrigues et al., 2014). However, it is worth mentioning that some loss of volatile may occur on this step. Thus, our study provide an alternative method for preparation of nanoemulsions with *Copaifera* spp. oleoresin, potentially useful due to the several advantages aforementioned, such as low cost, non-heating and solvent-free method.

It was observed the survival of *A. spathulatus*, *N. janauachensis* and *M. boegeri* until 7 h of assay at 23 °C and using tank water of fish cultivation (control group). On another in vitro study carried out with these same monogenoideans of *C. macropomum* gills and performed at 17-18° C, it was observed extended survival for a period of 9 h (Soares et al.,

2016). Therefore, the environment temperature is an important factor for monogenoideans survival during the *in vitro* trials.

Although aquaculture is an activity of great importance in Brazil, this industry has been affected by economic losses caused by parasitic diseases in fish farming (Hashimoto et al., 2016; Soares et al., 2016). The main products used for parasite treatment and control of fish parasites are chemotherapeutic substances that cause high toxicity to the fish (Boijink et al., 2015), environment and human. Thus, the need for less toxic and novel bioactive compounds has been associated to investigations using phytotherapy and natural product agents by researchers worldwide (Zhang et al., 2014, Hashimoto et al., 2016; Soares et al., 2016). The present study showed 100% of efficacy against parasites of *C. macropomum* gills after 15 minutes of exposure to a nanoemulsion prepared with *C. officinalis* oleoresin at 200 and 300 mg/L. Soares et al. (2016) reported 100% of antihelminthic activity after 20 minutes of exposure of monogenoideans from gills of *C. macropomum* to *Lippia alba* essential oil at 1280 mg/L and 2560 mg/L. The level of efficacy against *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* and *Scutogyrus longicornis*, which are monogenoideans of *Oreochromis niloticus* gills, was reached after 10 minutes of exposure with *L. alba* essential oil at 160 mg/L or *Mentha piperita* essential oil at 320 mg/L (Hashimoto et al., 2016). In contrast, no efficacy was observed after exposure of monogenoideans *Anacanthorus spathulatus* of the *C. macropomum* gills exposure to *Bixa orellana* extract at 125 mg/L and concentrations below (Andrade et al., 2016).

Utilization of nanoemulsion prepared with neem oil (*Azadiracta indica*) was considered an effective alternative for treatment of bacterial infection induced by *Aeromonas salmonicida* on catfish *Clarias batrachus* (Thomas et al., 2013). Regarding literature data, studies on natural product nanoemulsions as alternative to synthetic chemotherapeutics are still an open field for research. A nanoemulsion prepared with *C. officinalis* oleoresin proved to be safe also for adult bees (Vaucher et al., 2015), an important non-target organism that is highly affected by pesticides and that have been historically used on aquaculture.

In summary, the present study showed great efficacy induce by the nanoemulsion prepared with *C. officinalis* oleoresin, against monogenoideans of *C. macropomum*. Thus, the utilization of natural product-based nanostructures can be considered a great potential for effective veterinary novel products for aquaculture. Moreover, it may present less impairment to fish's health, due to biodegradable nature of these nanoproducts and ecofriendly characteristics. The utilization of an plant species that is widely used as a on integrated

sustainable use also offer a main advantage, since the natural raw material could be obtained on great amounts. Further studies using water therapeutic bath at 200 and 300 mg/L of this nanoemulsion are required for validation in baths using this nanoemulsion as a phytotherapeutic for aquaculture of this important amazon fish.

6. Acknowledgements

The authors thank FAPEAP (Prodetec Araguari – process nº 250.203.035/2013) for the financial support. We also thank CAPES for the student scholarship awarded to the first author and CNPQ for the research fellowship granted to Dr. Marcos Tavares Dias.

References

- Araújo-Lima, C., Goulding, M., 1998. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília.
- Benetton, M.L.F.N., Malta, J.C. de O., 1999. Morfologia dos estágios de náuplios e copepodito I de *Perulernaea gamitanae* Thatcher & Paredes, 1985 (Crustacea: Cyclopoida: Lernaecidae), parasita do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), (Osteichthyes: Characidae), cultivado em laboratório. *Acta Amaz.* 29, 97–121.
- Boijink, C. de L., Miranda, W.S. da C., Chagas, E.C., Dairiki, J.K., Inoue, L.A.K.A., 2015. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture* 438, 138–140.
- Cascon, V., Gilbert, B., 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 55, 773–778. doi:10.1016/S0031-9422(00)00284-3
- Godoi, M.M.I. de M., Engracia, V., Lizama, M. de L.A.P., Takemoto, R.M., 2012. Parasite-host relationship between the tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818) and ectoparasites, collected from fish farms in the city of Rolim de Moura, State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Acta Amaz.* 42, 515–524. doi:10.1590/S0044-59672012000400009
- Gomes, L.D.C., Chagas, E.C., Martins-Junior, H., Roubach, R., Ono, E.A., De Paula Lourenço, J.N., 2006. Cage culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a central

- Amazon floodplain lake. *Aquaculture* 253, 374–384. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.08.020
- Goulding, M., Carvalho, M.L., 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Rev. Bras. Zool.* 1, 107–133. doi:10.1590/S0101-81751982000200001
- Hashimoto, G.S. de 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.07.029
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., Benoit, J.-P., 2003. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24, 4283–4300. doi:10.1016/S0142-9612(03)00331-4
- IBGE, 2014. Quantidade e valor dos produtos de origem animal e variação anual [WWW Document]. IBGE - Pesqui. Pecuária Munic. URL ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2014/xls/tab02_brasil.zip (acessado 6.29.16).
- Lima, C.S., Medeiros, B.J.L., Favacho, H.A.S., Santos, K.C., Oliveira, B.R., Taglialegna, J.C., da Costa, E.V.M., de Campos, K.J., Carvalho, J.C.T., 2011. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). *Phytomedicine Int. J. Phyther. Phytopharm.* 18, 1013–23. doi:10.1016/j.phymed.2011.05.004
- Ostertag, F., Weiss, J., McClements, D.J., 2012. Low-energy formation of edible nanoemulsions : Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *J. Colloid Interface Sci.* 388, 95–102. doi:10.1016/j.jcis.2012.07.089
- Pandey, G., 2014. Some medicinal plants to treat fish ectoparasitic infections. *Int. J. Pharm. Reas Sci.* 2, 532–538.
- Simões, C.A.C.G., Conde, N.C. de O., Venâncio, G.N., Milério, P.S.L.L., Bandeira, M.F.C.L., da Veiga Júnior, V.F., 2016. Antibacterial Activity of Copaiba Oil Gel on Dental Biofilm. *Open Dent. J.* 10, 188–195. doi:10.2174/1874210601610010188

- 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.029
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., 2005. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10, 102–110. doi:10.1016/j.cocis.2005.06.004
- Solè, I., Solans, C., Maestro, A., González, C., Gutiérrez, J.M., 2012. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 376, 133–139. doi:10.1016/j.jcis.2012.02.063
- Tappin, M.R.R., Pereira, J.F.G., Lima, L.A., Siani, A.C., Mazzei, J.L., Ramos, M.F.S., 2004. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Quim. Nova* 27, 236–240. doi:10.1590/S0100-40422004000200012
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2016. South American fish for continental aquaculture. *Rev. Aquac.* 0, 1–19. doi:10.1111/raq.12164
- Varella, M.B.A., Peiro, S.N., Malta, S.N., 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) (Osteichthyes: Charidae) cultivado em tanques rede em um lago de várzea na Amazônia. *Aquabio. XII Simpósio Bras. Aquicultura* 2, 95–105.
- Veiga, V.F., Zunino, L., Patitucci, M.L., Pinto, A.C., Calixto, J.B., 2006. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1405–1410. doi:10.1111/j.2042-7158.2006.tb01659.x
- 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.09.022

ARTIGO 2

Nanoemulsão de óleo essencial de *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) tem eficácia *in vitro* da contra monogenoideas das brânquias de *Colossoma macropomum* (Serassalmidae)

A ser submetido ao periódico “Journal of Fish Diseases”

Nanoemulsão de óleo essencial de *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) tem eficácia *in vitro* da contra monogenoideas das brânquias de *Colossoma macropomum* (Serassalmidae)

Daniel S. S. Valentim¹, Jonatas L. Duarte², Anna E.M.F.M. Oliveira², Rodrigo. A.S. Cruz², José C.T. Carvalho^{1, 2}, Edemilson C. Conceição², Caio P. Fernandes^{1,2}, Marcos Tavares-Dias^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brasil.

²Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, Universidade de Federal do Amapá, Macapá, Brasil

³Embrapa Amapá Macapá, AP, Brasi

Autor para correspondência: Marcos Tavares-Dias

Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, 2600, 68903-419, Macapá, AP, Brasil. E-mails: marcos.tavares@embrapa.br

Resumo

Este estudo investigou os efeitos antiparasitários, *in vitro*, de uma nanoemulsão de óleo essencial de *Pterodon emarginatus* contra monogenoideas de *Colossoma macropomum*. Arcos branquiais de *C. macropomum* ($47,6 \pm 14,5$ g e $13,5 \pm 1,4$ cm), naturalmente parasitados por *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* foram imersos em diferentes soluções de nanoemulsão do óleo de *P. emarginatus* (0, 50, 100, 200, 400 e 600 mg/L). O óleo de *P. emarginatus* possui como constituintes principais o β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno. Observou-se na caracterização na nanoemulsão o baixo tamanho médio de gotículas e índice de polidispersão. No ensaio *in vitro*, as concentrações de 100, 200, 400 e 600 mg/L da nanoemulsão de *P. emarginatus* mostram 100% de eficácia helmíntica contra monogenoideas das brânquias de *C. macropomum*, mas nas duas maiores concentrações usadas (400 e 600 mg/L) foi observada a imobilização dos parasitos após 15 minutos. Portanto tais concentrações podem ser testadas em banhos terapêuticos contra monogenoideas de *C. macropomum*.

Palavras chaves: nanotecnologia, parasitos, peixe, sucupira.

Introdução

Produtos fitoterápicos possuem propriedades bioativas obtidos exclusivamente de plantas medicinais. Tais produtos podem ser industrializados ou manipulados, tanto para uso do homem como para uso veterinário. Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas medicinais que podem ser extraídos de diversas fontes vegetais e vem sendo utilizados para diversas finalidades farmacêuticas e industriais (Burt, 2004), bem como para controle e tratamento de ectoparasitos de peixes (Zhang et al., 2014; Hashimoto et al., 2016; Soares et al., 2016; Valladão et al., 2016; Costa et al., 2017). Assim, o uso de plantas medicinais vêm ganhando espaço na aquicultura mundial, devido ao fácil cultivo dessas plantas, ação biodegradável, não acumulação em tecidos animais e baixa toxicidade (Coimbra et al. 2006, Soares e Tavares-Dias 2013). Porém, estudos relatam que a baixa dispersão de óleos essenciais em água dificulta o uso na aquicultura (Hashimoto et al. 2016; Soares et al. 2016; Soares et al., 2017; Costa et al., 2017), necessitando assim de métodos que facilitam essa dispersão para uso em banhos terapêuticos em peixes. Além disso, a perda de compostos devidos à volatilização dos óleos essenciais é um outro desafio tecnológico para esses produtos. Neste contexto, as nanoemulsões podem ser uma boa alternativa para resolver tais problemas no uso de óleos essenciais. Nanoformulações, incluindo nanoemulsões, são sistemas dispersos constituídos por líquidos imiscíveis que poderiam ser utilizadas em baixas concentrações terapêuticas para controle e tratamento contra parasitos de peixes.

Pterodon emarginatus Vogel 1837, é uma Fabaceae da região de Cerrado conhecida popularmente como sucupira-branca ou faveira. Esta espécie arbórea que atinge até 15 m de altura, tem relevância medicinal e florestal, pois sua semente é usada como antirreumático, antiinflamatório e problemas de coluna. Os frutos são grandes fontes de óleos essenciais e comumente usados no tratamento de dores musculares, artrite e artrose, e apresentam ação anti-inflamatória e analgésica. Foi relatada também ação antimicrobiana, antiulcerogênicas e leishmanicida das sementes de *P. emarginatus* (Dutra et al., 2009). O chá da casca do caule é utilizado para tratar infecções ginecológicas (Alves et al., 2013; Bustamante et al., 2010; Leite de Almeida e Gottlieb, 1975; Lorenzi, 2002; Mors et al., 1967; Santos et al., 2010). Óleo de *P. emarginatus* tem sido usado como anti-inflamatório, principalmente na forma de microemulsão (Pascoa et al., 2015), bem como no controle biológico de larvas de *Aedes aegypti* (Oliveira et al., 2016). Porém, não há estudos do uso de óleo essencial de *P. emarginatus* na aquicultura.

Apesar de *P. emarginatus* ser considerada uma importante fonte fitoterápica devido aos seus aspectos fitoquímicos e propriedades bioativas (Machado et al., 2015), há poucos estudos sobre o uso de seu óleo essencial (Alves et al., 2013; Dutra et al., 2009; Mors et al., 1967; Pascoa et al., 2015; Santos et al., 2010). Devido a tais aspectos e propriedades de *P. emarginatus*, essa planta foi incluída na lista de espécies com prioridade de conservação (Alves et al., 2013). Portanto, o óleo essencial de *P. emarginatus* deveria ser testado contra ectoparasitos de *Colossoma macropomum* Cuvier 1816 (tambaqui).

Colossoma macropomum é um Serrasalmidae neotropical de grande importância para Amazônia, onde tem consumo elevado. Peixe nativo economicamente importante para a aquicultura da região amazônica, no Brasil sua produção oriunda da aquicultura foi de aproximadamente 140 mil toneladas em 2014 (IBGE, 2015; Valladão et al., 2016). Porém, um dos grandes problemas no cultivo intensivo de *C. macropomum* são as infecções por monogenoídeos *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni*, que podem comprometer a produção (Boijink et al., 2015; Soares et al., 2016). Fitoterapia é um tratamento alternativo que tem mostrado efeitos antiparasitários promissores, especialmente contra monogenoídeos (Zhang et al., 2014; Hashimoto et al. 2016; Valladão et al., 2016; Costa et al., 2017). Atualmente, há poucos estudos usando óleos essenciais no controle de monogenoídeos em *C. macropomum* (Soares et al. 2016; Soares et al., 2017) e nanoemulsões contêm óleos essenciais não foram testados em peixes para esta finalidade. Assim, o objetivo deste estudo foi testar os efeitos antiparasitários, *in vitro*, de uma nanoemulsão de óleo essencial de *P. emarginatus* contra monogenoídeos de *C. macropomum*.

Materiais e métodos

Obtenção do óleo essencial de *P. emarginatus*

Pterodon emarginatus foi identificado pelo Dr. José Realino de Paula, e um espécime Voucher foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Goiás (Brasil). O óleo essencial de *P. emarginatus* foi extraído, a partir das sementes, por prensagem a frio, e este material foi submetido a hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo de Clevenger. Após a extração, o óleo essencial foi coletado, filtrado sob sulfato de sódio anidro e armazenado a 4°C, para posterior análise.

Perfil cromatográfico

A análise química do óleo essencial de *P. emarginatus* foi realizada em cromatógrafo de gás (GCMS-QP5000, Shimadzu) equipado com um espectrômetro de massa, utilizando ionização eletrônica, com as seguintes condições experimentais: temperatura do injetor de

200 °C, temperatura do detector de 250 °C, gás transportador hélio, caudal de 1 mL/minuto e injeção dividida com razão de divisão 1:40. A temperatura do forno foi programada a partir de 50° C (isotérmica por 10 minutos), com um aumento de 2 °C/minutos a 200°C e depois um aumento de 10°C/minutos a 290°C (isotérmica por 10 min). Os parâmetros da coluna RTx5-5MS foram: i.d. = 0,25 mm; comprimento 30 m e espessura do filme = 0,25 µm. As condições de espectrometria de massa foram: tensão de ionização de 70 eV; taxa de varredura de 1 varredura/s e gama de massa m / z 50-400. A identificação dos compostos foi realizada por comparação do padrão de fragmentação com espectros de massa de substâncias da biblioteca NIST

Preparação da nanoemulsão de óleo essencial de *P. emarginatus*

A nanoemulsão óleo-em-água contendo óleo essencial de *P. emarginatus* foi preparada por meio de um método de baixo aporte de energia. A fase oleosa, constituída por um surfactante não iônico (polissorbato 80) e óleo essencial de *P. emarginatus*, foi vigorosamente misturada até se observar uma fase homogênea transparente. Depois adicionou-se gota a gota água sob homogeneização contínua utilizando um agitador de turbilhão (Warmnest, Ionlab, Brasil), de modo que a concentração final de oleorresina fosse de 5000 ppm. A proporção de óleo para surfactante foi de 1:1 e a massa final da nanoemulsão foi de 10 g. A análise de dispersão dinâmica de luz (DLS) foi realizada na distribuição de tamanho de partícula utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido) equipado com um laser "vermelho" de 10 mW ($\lambda = 632,8$ nm) e as amostras foram medidas num ângulo de detecção de dispersão de 90° , Para medições de tamanho. A nanoemulsão foi diluída em água desionizada (1:25) e os resultados (tamanho das gotículas e índice de polidispersidade) foram expressos como média \pm desvio padrão

Peixes

Para este estudo, alevinos de *C. macropomum* foram obtidos de uma piscicultura comercial de Macapá, estado do Amapá (Brasil) e transportados para o Laboratório de Sanidade de Organismo Aquáticos da Embrapa Amapá. Os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanque de 500 L de água e alimentados com ração comercial contendo 32% proteína bruta (PB). Os tanques foram mantidos com sistema constante de renovação da água e aeração.

Ensaio *in vitro* com nanoemulsão de óleo essencial de *P. emarginatus*

Arcos branquiais de *C. macropomum* ($47,6 \pm 14,5$ g e $13,5 \pm 1,4$ cm), naturalmente parasitados por espécies de monogenoideas, foram retirados e individualizados em placas de Petri. Para este ensaio, os arcos branquiais foram submersos em diferentes soluções de nanoemulsão do óleo de *P. emarginatus* (0, 50, 100, 200, 400 e 600 mg/L). Para tal, foi empregado um grupo controle usando somente água do tanque de cultivo, e as cinco diferentes concentrações da nanoemulsão do óleo de *P. emarginatus*, com três repetições para cada tratamento. Todos os testes *in vitro* foram realizados em temperatura ambiente de 23°C. Usando estereomicroscópios de luz fria, campo de visão contendo no mínimo 25 monogenoideas foi selecionado para cada repetição, e após a submersão dos arcos branquiais nas diferentes concentrações da nanoemulsão do óleo de *P. emarginatus* ou água do tanque, foram realizadas visualizações a cada 5 minutos para quantificação do número de monogenoideas vivos e mortos em cada placa de Petri. Foram considerados parasitos mortos aqueles que se desprenderam do tecido branquial e os aderidos ao tecido branquial que perderam totalmente a mobilidade (Hashimoto et al., 2016). Em seguida, a eficácia de cada tratamento foi determinada (Zhang et al., 2014).

Resultados

Análise de cromatografia em fase gasosa

O cromatograma (Fig. 1) obtido a partir da análise qualitativa de cromatografia gasosa revelou a presença de alguns sesquiterpenos constituintes químicos do óleo essencial de *P. emarginatus* tais como o β -elemeno (Rt = 43.180 min), β -cariofileno (Rt = 44.820 min) e a-humuleno (Rt = 46,870 min). Os espectros de massa dos sesquiterpenos identificados são apresentados na figura 2.

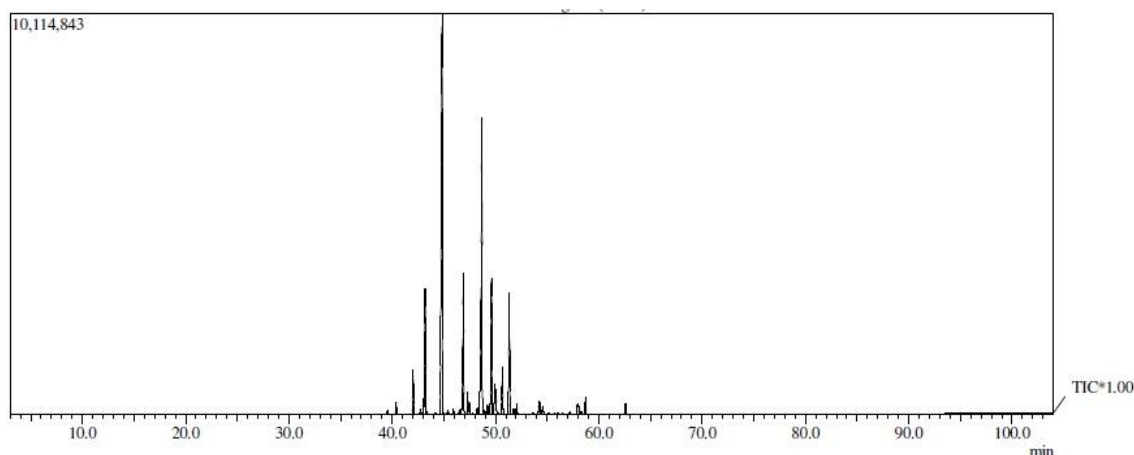


FIG. 1. Cromatograma iônico total do óleo essencial de *Pterodon emarginatus* mostrando pico de abundância elevada de β -cariofileno.

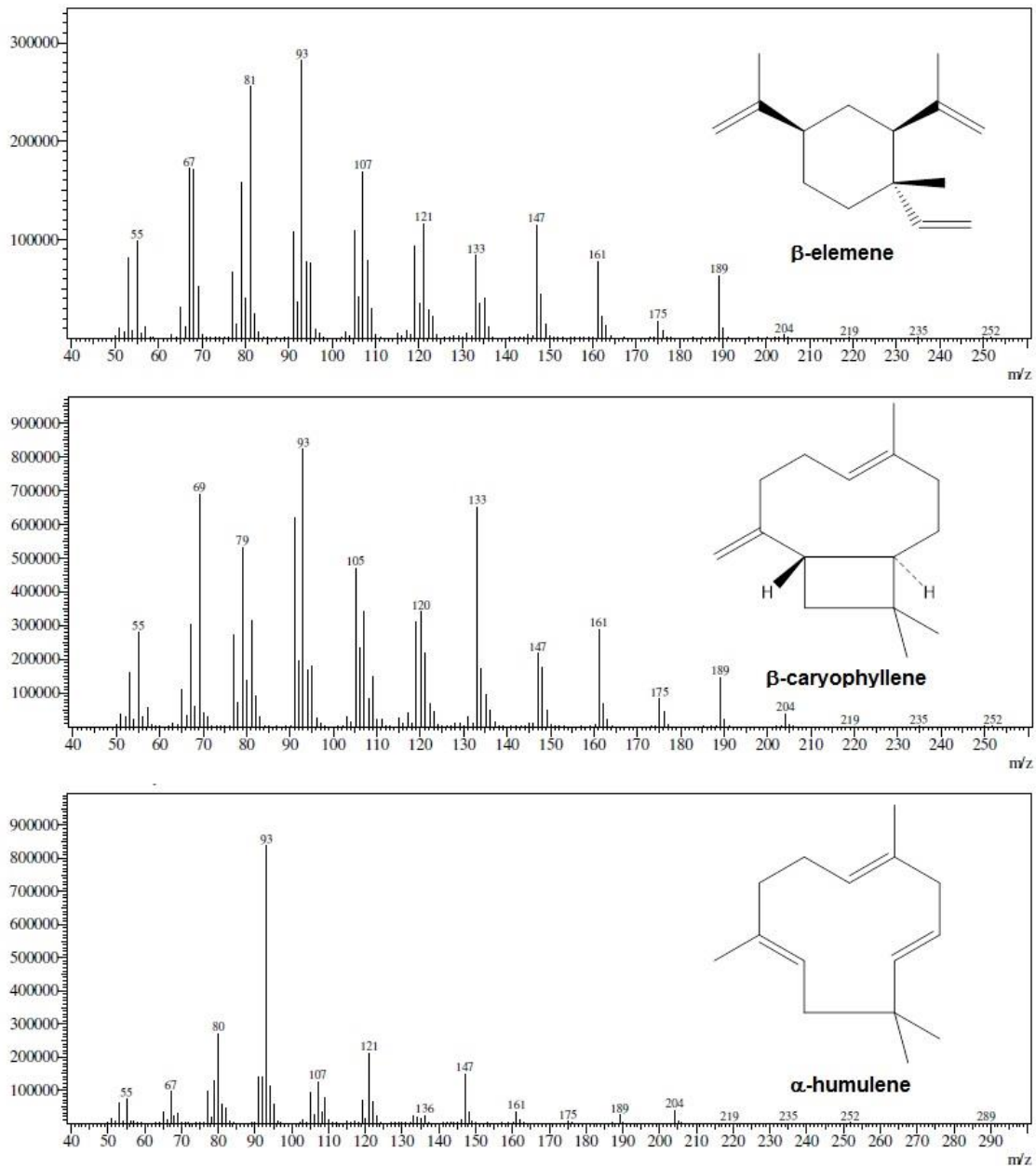


FIG. 2. Espectro de massa mostrando o padrão de fragmentação dos sesquiterpenos β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno em óleo essencial de *Pterodon emarginatus*.

Caracterização da nanoemulsão de *Pterodon emarginatus*

A Figura 3 mostra o perfil de distribuição de tamanho de partícula da nanoemulsão preparada com óleo essencial de *P. emarginatus*. Observou-se baixo tamanho médio de gotículas e

índice de polidispersão, respectivamente, $116,8 \pm 0,3606$ nm e $0,187 \pm 0,008$. O índice de polidispersidade foi $0,187 \pm 0,008$ e potencial zeta $-19,9 \pm 2,23$ mV.

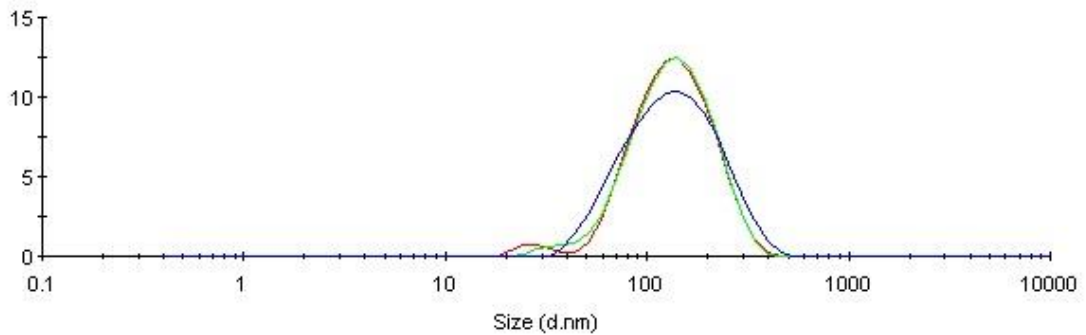


FIG. 3. Distribuição de tamanho de partícula de nanoemulsão preparada com óleo essencial de *Pterodon emarginatus*.

Eficácia antiparasitária, *in vitro*, da nanoemulsão de *P. emarginatus*

Durante teste *in vitro*, as concentrações de 100, 200, 400 e 600 mg/L da nanoemulsão de *P. emarginatus* mostraram 100% de atividade antiparasitária contra monogenoideas *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* das brânquias de *C. macropomum*, mas nas duas maiores concentrações foi observada a imobilização dos parasitos após 15 minutos. Já na concentração de 50 mg/L a imobilização dos parasitos ocorreu após 5 horas da exposição, que foi semelhante aos controles (Tabela 2 e Figura 4).

Tabela 2. Ação antiparasitária *in vitro* de diferentes concentrações da nanoemulsão do óleo essencial de *Pterodon emarginatus* contra monogenoideas das brânquias de *Colossoma macropomum*, em relação ao tempo de exposição.

Te mpo	Concentração (mg/L)	Parasitas vivos	Parasitas mortos (%)
0 h	0	21,7 ± 5,8	0
	50	18,3 ± 2,9	0
	100	15,7 ± 0,6	0
	200	18,0 ± 4,4	0
	400	19,0 ± 6,9	0
	600	17,0 ± 6,1	0
15 min	0	21,7 ± 5,8	0
	50	18,3 ± 2,9	0
	100	14,3 ± 0,6	8,5
	200	1,3 ± 1,2	92,6
	400	0,0 ± 0,0	100
	600	0,0 ± 0,0	100
40 min	0	21,7 ± 5,8	0
	50	18,3 ± 2,9	0
	100	13,7 ± 0,6	12,8
	200	0 ± 0	100
	400	0 ± 0	100
	600	0 ± 0	100
70 min	0	21,7 ± 5,8	0
	50	18,3 ± 2,9	0
	100	8,7 ± 1,5	44,7
	200	0 ± 0	100
	400	0 ± 0	100
	600	0 ± 0	100
90 min	0	21,7 ± 5,8	0
	50	18,0 ± 2,6	1,8
	100	0 ± 0	100
	200	0 ± 0	100
	400	0 ± 0	100
	600	0 ± 0	100
2 h	0	14,0 ± 1,7	58,5
	50	0 ± 0	100
	100	0 ± 0	100
	200	0 ± 0	100
	400	0 ± 0	100
	600	0 ± 0	100
5 h	0	0 ± 0	100
	50	0 ± 0	100
	100	0 ± 0	100
	150	0 ± 0	100
	150	0 ± 0	100

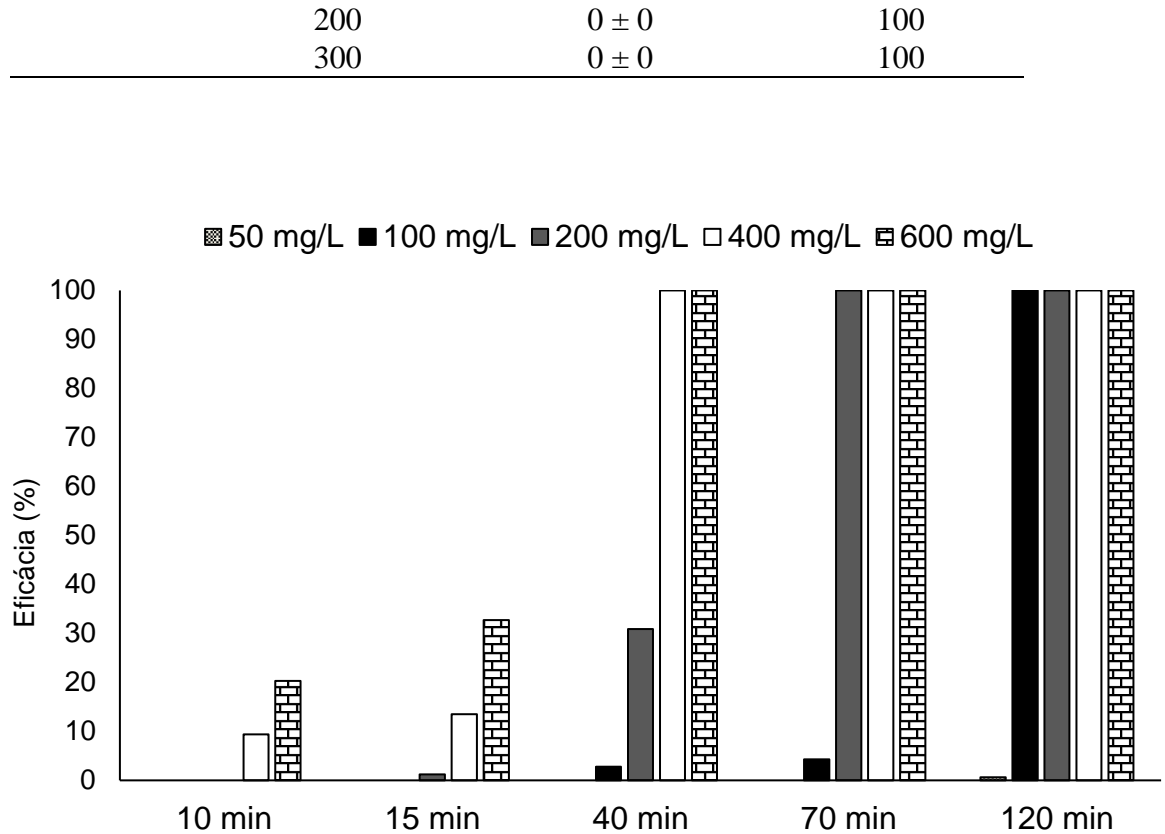


Figura 4. Eficácia *in vitro* das diferentes concentrações da nanoemulsão do óleo essencial de *Pterodon emarginatus* contra monogenoídeas das brânquias de *Colossoma macropomum*.

Discussão

A caracterização química mostrou que o óleo de *P. emarginatus* é constituído por sesquiterpenos, sendo β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno os constituintes majoritários. Similarmente, a presença desses compostos foi também relatada em outros estudos com óleo essencial de *P. emarginatus* (Alves et al., 2013; Dutra et al., 2012). Porém, alta variabilidade na composição química de óleo essencial de *P. emarginatus* pode ocorrer (Alves et al., 2013).

A nanoemulsão obtida apresentou partículas com tamanho médio de 192 nm. Não houve diferença no tamanho dessas partículas entre as formulações durante sete dias de armazenagem da nanoemulsão de *P. emarginatus*. O potencial zeta um indicador potencial para prever a estabilidade de partículas, variou de -19,9 à -46,2 mV, nos 7 dias de armazenagem. Em geral, as partículas com valor, em módulo, superior à 30 mV são consideradas estáveis, uma vez que as forças de repulsão entre as gotas são predominantes (Heurtault et al., 2003). O pequeno tamanho das gotas da nanoemulsão, que pode ser

alcançado mesmo com baixa concentração de surfactante, está diretamente associado a várias vantagens deste sistema coloidal, como a estabilidade cinética e aparência fina (Solè et al., 2012). A viabilidade do método de baixo aporte de energia para a preparação de nanoemulsão com óleos essenciais, semelhante ao óleo de laranja e limão foi relatada (Komaiko et al., 2015). A ausência de qualquer passo de aquecimento pode ser considerada uma vantagem, uma vez que pode diminuir a perda de compostos, considerando a natureza volátil dos constituintes dos óleos essenciais. Como a nanoemulsão de óleo essencial de *P. emarginatus* aqui formulada teve excelente estabilidade em suspensão e estabilidade física de longo prazo (Solans et al., 2005; Solè et al., 2012), foi então usada no tratamento antiparasitário *in vitro* contra monogenoideas das brânquias de *C. macropomum*.

Nanoemulsões contendo óleo essencial são sistemas dispersos constituídos por líquidos imiscíveis que podem ser utilizados em baixas concentrações terapêuticas para controle e tratamento contra ectoparasitos de *C. macropomum*. Este estudo usando 400 e 600 mg/L de uma nanoemulsão de óleo essencial de *P. emarginatus* mostrou 100% de eficácia contra *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri* de *C. macropomum*, após 15 minutos da exposição. Óleo essencial obtido dos frutos de *Pterodon pubescens* também mostrou ação terapêutica no combate a cercarias de *Schistosoma mansoni* (Mahajan e Monteiro, 1973; Mors et al., 1967). Estudos também relataram atividade antihelmíntica do óleo essencial de *Lippia alba* (Soares et al., 2016) e *Lippia origanoides* (Soares et al., 2017) contra monogenoideas de *C. macropomum* e do óleo resina de *Copaifera duckei* contra monogenoideas de *Piaractus mesopotamicus* (Costa et al., 2017). Hashimoto et al. (2016) mostrou encontrou 100% de eficácia, *in vitro*, de *Mentha piperita* e *Lippia sioides* contra monogenoideas de *Oreocromis niloticus*. Contudo, nesses estudos (Hashimoto et al., 2016; Soares et al., 2017; Costa et al., 2017) com óleos essenciais ou óleo resina as concentrações usadas nos banhos terapêuticos foram baixas devido a toxicidade. Porém, as nanoemulsões poderiam reduzir essa toxicidade de produtos fitoterápicos que possuem propriedades bioativas, entre elas ações antiparasitárias.

Em resumo, nanoemulsões contendo 400 e 600 mg/L óleo essencial de *P. emarginatus* mostraram eficácia antiparasitária contra monogenoideas de tambaqui, devido ao potencial biológico e estabilidade das nanoformulações. Portanto, essas nanoformulações contendo *P. emarginatus* podem ser um tratamentos alternativos promissores contra monogenoideas de tambaqui, assim precisam ser testadas em banhos terapêuticos, para indicação da melhor concentração.

Agradecimentos

Os autores a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor e agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo bolsa produtividade em pesquisa concedida ao Dr. Marcos Tavares-Dias.

Referências

- Alves, S.F., Luiz Borges, L., de Paula, J.A.M., Vieira, R.F., Ferri, P.H., do Couto, R.O., de Paula, J.R., Freitas Bara, M.T., 2013. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23, 224–229.
- Boijink, C. de L., Miranda, W.S. da C., Chagas, E.C., Dairiki, J.K., Inoue, L.A.K.A., 2015. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture* 438, 138–140.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International journal of food microbiology* 94, 223–53.
- Bustamante, K.G.L., Lima, a. D.F., Soares, M.L., Fiuza, T.S., Tresvenzol, L.M.F., Bara, M.T.F., Pimenta, F.C., Paula, J.R., 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 12, 341–345.
- Cho, J.Y., Chang, H.J., Lee, S.K., Kim, H.J., Hwang, J.K., Chun, H.S., 2007. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Sciences* 80, 932–939. doi:10.1016/j.lfs.2006.11.038
- Coimbra, J.L., Soares, A.C.F., Garrido, M.S., Sousa, C. S., Ribeiro, F.L.B., 2006. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 1209–1211.
- Costa, J. C., Valladão, G. M. R, Pala, G., Gallani, S. U., Kotzent, S., Crotti, A. E. M., Fracarolli, L., Silva, J. J. M., Pilarski, P. 2017. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture* 471: 72–79. Doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.041
- Di Sotto, A., Mazzanti, G., Carbone, F., Hrelia, P., Maffei, F., 2010. Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human

- lymphocytes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 699, 23–28. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.04.008
- Dutra, R.C., Braga, F.G., Coimbra, E.S., Silva, A.D., Barbosa, N.R., 2009. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 429–435. Doi:10.1590/S0102-695X2009000300016
- Fernandes, E.S., Passos, G.F., Medeiros, R., da Cunha, F.M., Ferreira, J., Campos, M.M., Pianowski, L.F., Calixto, J.B., 2007. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology* 569, 228–236. Doi:10.1016/j.ejphar.2007.04.059
- Galdino, P.M., Nascimento, M.V.M., Florentino, I.F., Lino, R.C., Fajemiroye, J.O., Chaibub, B.A., de Paula, J.R., de Lima, T.C.M., Costa, E.A., 2012. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 38, 276–284. Doi:10.1016/j.pnpbp.2012.04.012
- Hashimoto, G.S. de 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. Doi:10.1016/j.aquaculture.2015.07.029
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., Benoit, J.-P., 2003. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24, 4283–4300. Doi:10.1016/S0142-9612(03)00331-4
- Horváth, B., Mukhopadhyay, P., Kechrid, M., Patel, V., Tanchian, G., Wink, D.A., Gertsch, J., Pacher, P., 2012. β -Caryophyllene Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in a Cannabinoid 2 Receptor-Dependent Manner. *Free Radical Biology and Medicine* 52, 1325–1333. Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.014
- IBGE, 2015. Quantidade e valor dos produtos de origem animal e variação anual [WWW Document]. IBGE - Pesquisa Pecuária Municipal. URL ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2014/xls/tab02_brasil.zip (acessado 6.29.16).
- Leite de Almeida, M.E., Gottlieb, O.R., 1975. The chemistry of Brazilian Leguminosae, further isoflavones from *Pterodon apparicia*. *Phytochemistry* 14, 2716–2720.
- Lorenzi, H., 2002. *Árvores Brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, 4ª ed. São Paulo.

- Machado, R.R.P., Dutra, R.C., Pittella, F., Raposo, N.R.B., Lesche, B., Duarte, R.S., Soares, G.L.G., Kaplan, M.A.C., 2015. Screening antimycobacterial activity of *Baccharis dracunculifolia*, *Centella asiatica*, *Lantana camara* and *Pterodon emarginatus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 17, 891–899. Doi:10.1590/1983-084X/14_148
- Mahajan, J.R., Monteiro, M.B., 1973. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* vog. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1 520. Doi:10.1039/p19730000520
- Mors, W.B., Santos, F.M.F., Monteiro, H.J., Gilbert, B., 1967. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14,15-epoxygeranylgeraniol. *Science* 157, 950–951.
- Oliveira, A.E.M.F.M., Duarte, J.L., Amado, J.R.R., Cruz, R.A.S., Rocha, C.F., Souto, R.N.P., Ferreira, R.M.A., Santos, K., da Conceição, E.C., de Oliveira, L.A.R., Kelecom, A., Fernandes, C.P., Carvalho, J.C.T., 2016. Development of a larvicidal nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. *PloS one* 11, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0145835
- Pascoa, H., Diniz, D.G.A., Florentino, I.F., Costa, E.A., Bara, M.T.F., 2015. Microemulsion based on *Pterodon emarginatus* oil and its anti-inflammatory potential. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 51, 117–125. Doi:10.1590/S1984-82502015000100013
- Sabulal, B., Dan, M., J, A.J., Kurup, R., Pradeep, N.S., Valsamma, R.K., George, V., 2006. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry* 67, 2469–2473. Doi:10.1016/j.phytochem.2006.08.003
- Santos, A.P., Zatta, D.T., Moraes, W.F., Bara, M.T.F., Ferri, P.H., Silva, M. do R.R., Paula, J.R., 2010. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20, 891–896. Doi:10.1590/S0102-695X2010005000052.
- Soares, B.V., Tavares-dias, M., 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia* 3, 109–123.
- 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. Doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.029.
- Soares, B.V., Cardoso, A.C.F., Campos, R.R., Gonçalves, B.B, Gracienhe Gomes Santos, G.G., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., Tavares-Dias, M. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native

freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469: 72–78. Doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10, 102–110. doi:10.1016/j.cocis.2005.06.004

Solè, I., Solans, C., Maestro, A., González, C., Gutiérrez, J.M., 2012. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 376, 133–139. Doi:10.1016/j.jcis.2012.02.063

Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Ikefuti, C.V., Cruz, C., Levy-Pereira, N., Rodrigues, M.V.N Pilarski, F., 2016. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Fish Diseases*, 39: 1143-1152, 2016.

6. CONCLUSÕES FINAIS

- A nanoemulsão de óleo resina de *C. officinalis* teve excelente estabilidade em suspensão e estabilidade física de longo prazo, assim foi usada no tratamento antiparasitário em tambaqui;
- A nanoemulsão do óleo resina de *C. officinalis* (200 and 300 mg/L) e do óleo essencial de *P. emarginatus* (400 e 600 mg/L) apresentou ação antiparasitária *in vitro* contra monogenoideas de *C. macropomum*, e esta eficácia foi dose-dependente;
- O uso de *C. officinalis* e *P. emarginatus* pode ser uma alternativa para eliminar ectoparasitos monogenoideas de peixes. Portanto, é necessário validar o uso dessas concentrações de nanoemulsão do óleo resina de *C. officinalis* e óleo essencial de *P. emarginatus* em banhos terapêuticos em *C. macropomum*;
- Este foi o primeiro estudo sobre o uso de nanoemulsões contra parasitos de peixes.

ANEXO 1 – *Artigo submetido ao periódico “Aquaculture”*

