



Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA
Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação Tecnológica-PROPPIT
Instituto de Ciências e Tecnologia das águas-ICTA
Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos-
PPGRACAM

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM SANTO (*Cymbopogon*
*citratu*s) (STAPF) DC. (POACEAE) EM ARGULÍDEOS (CRUSTACEA,
BRANCHIURA): *Argulus* sp e *Dolops discoidalis***

ELCIMARA CARDOSO PEREIRA

Santarém, Pará

Março, 2019

ELCIMARA CARDOSO PEREIRA

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM SANTO (*Cymbopogon citratus*) (STAPF) D.C. (POACEAE) EM ARGULÍDEOS (CRUSTACEA, BRANCHIURA): *Argulus* sp e *Dolops discoidalis*

ORIENTADORA: PROFESSORA Dr.^a LENISE VARGAS FLORES DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos

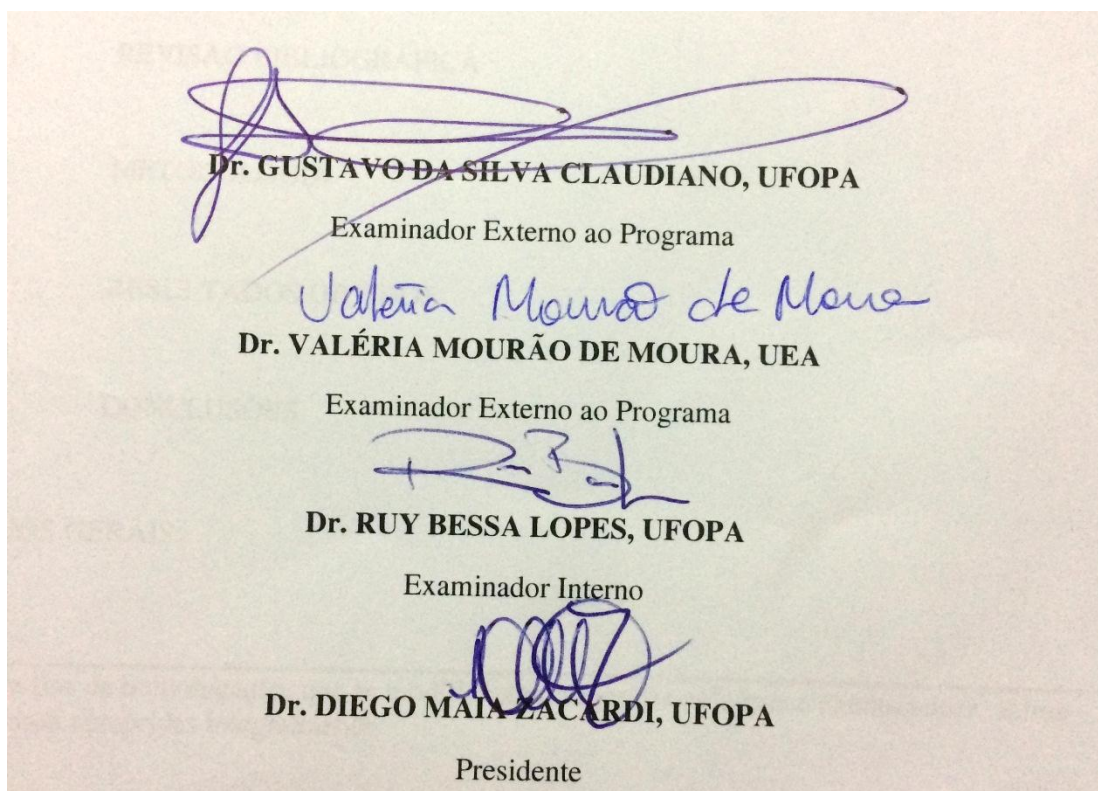
Santarém, Pará
Março, 2019

ELCIMARA CARDOSO PEREIRA

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM SANTO (*Cymbopogon citratus*) (STAPF) DC. (POACEAE) EM ARGULÍDEOS (Crustacea, Branchiura): *Argulus* sp e *Dolops discoidalis*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos pela Universidade Federal do Oeste do Pará.

Aprovada em: 27 de Fevereiro de 2019.



Santarém/Pará
Março de 2019

Sinopse:

Estudou o efeito do óleo essencial do Capim santo (*Cymbopogon citratus*) em representantes da família Argulidae (*Dolops discoidalis* e *Argulus* sp.). Aspectos como definição da Concentração Letal do óleo nos parasitos adultos e oviposições foram avaliados.

Palavras-chave: Aquicultura, Fitoterápicos, Sanidade.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

P436e Pereira, Elcimara Cardoso
Efeito do óleo essencial de capim santo (*Cymbopogon citratus*) (Stapf)
DC. (Poaceae) em Argulíneos (Crustacea, Branchiura): *Argulus sp* e *Dolops
discoidalis* / Elcimara Cardoso Pereira. - Santarém, 2019.
54 f. : il. color.

Orientadora: Dra. Lenise Vargas Flores da Silva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Insti-
tuto de Ciências e Tecnologia das Águas, Programa de Pós-graduação em
Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos.

1. Aquicultura 2. Fitoterápicos 3. Sanidade. I . Silva, Lenise Vargas Flo-
res da, orient. II. Título.

CDD: 23. ed. 639.3

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Raimunda Cardoso e Lucimir Batista Pereira, por todos os ensinamentos e educação expressados na formação e todo o incentivo durante minha vida. A minha irmã Elizomara Cardoso Pereira por todo carinho e apoio, e aos todos meus amigos.

Agradecimentos

Agradecer a Deus, pelo dom da vida e discernimento para elaboração desta dissertação

Meus pais Lucimir Batista Pereira e Maria Raimunda Cardoso por todo o apoio emocional, ao meu amigo Sullivan Farias que muitas vezes me ajudou no cultivo do parasito e apoio psicológico.

Meus colegas de Turma em especial ao “Trio do RACAM” composto por Andreia Abreu, Tatiane Santo e Elcimara.

Meus amigos do laboratório de Química Multiusuário: a Mestre Elen Monique, Mestre Hugo Napoleão, Simone; Jonas, Sand Dara e a Tec. Suelen Taise que me acolheram e auxiliaram no decorrer dos experimentos.

Minha amiga Elzamara de Castro Oliveira por compartilhar comigo o “cultivo dos parasitos” e na realização dos testes, além do apoio psicológico neste mestrado.

Minha Orientadora Dr^a Lenise Vargas Flores da Silva por confiar em mim na elaboração desta dissertação e todo apoio técnico e emocional que me proporcionou nestes 2 anos de mestrado.

Ao Laboratório de Bioprospecção e Biologia experimental (LABBEX-UFOPA) em especial a prof. Dr^a Rosa Helena Veras Mourão por disponibilizar o óleo essencial e sanar diversas dúvidas sobre a temática e a Farmacêutica Irene Jorge que compartilhou comigo toda a experiência sobre o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (extração e análise química).

Ao prof. Dr^o Lincoln Lima Correa por todo auxílio relacionado a sanidade animal, cultivo e controle dos parasitos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E a REDE NORTE DE PESQUISAS E APLICAÇÕES SOBRE ÓLEOS TÍPICOS DA AMAZÔNIA através do Programa Pró-Amazônia-CAPES pelo auxílio e fomento à pesquisa.

Resumo

Com o aumento do número de pisciculturas no território nacional associado à intensificação da produção, tem se observado surtos e altas mortalidades de pescado decorrentes das enfermidades. Um dos principais entraves é a ocorrência de infestações parasitárias, seguida ou não pela presença de patógenos oportunistas. Entre esses patógenos oportunistas estão os crustáceos, ectoparasitos periódicos de peixes marinhos e dulcícolas. Dentre os crustáceos, está a subclasse Branchiura, popularmente chamados de “piolho de peixe” ou Argulídeos, que compromete a sanidade na aquicultura, por isso seu controle é fundamental. Contudo, o uso de produtos naturais (fitoterápicos) vem ganhando destaque na sanidade animal, principalmente por se tratar de substâncias bioativas eficientes no controle parasitário. Uma destas plantas com potencial uso na aquicultura é o capim santo (*Cymbopogon citratus*), o óleo essencial extraído desta planta é eficiente no controle de ectoparasitos bovinos. Este trabalho estudou efeitos do óleo essencial do *C. citratus* (compostos majoritários: *geranial*, *neral* e *mirreno*) no controle de ectoparasitas de peixes pertencentes a família argulidae (*Dolops discoidalis* e *Argulus* sp), através do teste de CL_{50-24h} com dosagens 20 µg/L, 40 µg/L; 60 µg/L, 80 µg/L, 100 µg/L, 120 µg/L, 140 µg/L e 160 µg/L. A mortalidade máxima para os representantes do *Argulus* sp iniciou a partir da concentração de 100 µg/L, enquanto a mortalidade máxima do *Dolops discoidalis* iniciou no tratamento de 80 µg/L. A Concentração Letal (CL_{50-24h}) para o *Argulus* sp adulto foi 76,3µg/L e *Dolops discoidalis* adulto foi 59,3µg/L. Foi observado que toda mortalidade no teste (CL_{50-24h}) ocorreu na primeira hora. O óleo essencial de *C. citratus* também foi testado (CL_{50-24h}) nas oviposições dos argulídeos, em ambos a mortalidade máxima (100%) das oviposições iniciou a partir dos tratamentos de 140 µg/L e 160 µg/L. A Concentração Letal (CL_{50-24h}) para as oviposições do *Argulus* sp e *Dolops discoidalis* foram 99,7 µg/L e 99,3 µg/L, respectivamente. A fase do parasita se mostrou importante para definição da concentração de controle. Além disso, é necessário estudos para avaliar o efeito em peixes infectados para a indicação deste óleo na aquicultura, uma vez que neste trabalho foram determinadas concentrações efetivas no controle de argulídeos adultos.

Abstract

The increase in the number of fish farms in the national territory associated to the intensification of production, there have been outbreaks and high fish mortalities due to the diseases. One of the main obstacles is the occurrence of parasitic infestations, followed or not by the presence of opportunistic pathogens. Among these opportunistic pathogens are crustaceans, periodic ectoparasites of marine and sweet fish. Among the crustaceans, there is the subclass Branchiura, popularly called "fish lice" or Argulídeos, which compromises sanity in aquaculture, so its control is fundamental. However, the use of natural products (phytotherapics) has been gaining prominence in animal health, mainly because they are efficient bioactive substances in parasitic control. One of these plants with potential use in aquaculture is the holy grass (*Cymbopogon citratus*), the essential oil extracted from this plant is efficient in the control of bovine ectoparasites. This thesis studied the effects of the essential oil of *C. citratus* (major components *geranial*, *neral* and *mirceo*) in the control of ectoparasites of fish belonging to the family Argulidae (*Dolops discoidalis* and *Argulus* sp), through the LC_{50-24h} test with dosages 20 µg/L, 40 µg/L; 60 µg/L, 80 µg/L, 100 µg/L, 120 µg/L, 140 µg/L and 160 µg/L. The maximum mortality for the representatives of *Argulus* sp started from the concentration of 100 µg/L, while the maximum mortality of *Dolops discoidalis* started in the treatment of 80 µg/L. The Lethal Concentration (LC_{50-24h}) for adult *Argulus* sp was 76,3µg / L and adult *Dolops discoidalis* was 59,3µg / L. It was observed that all mortality in the test (LC_{50-24h}) occurred in the first hour. The essential oil of *C. citratus* was also tested (LC_{50-24h}) in the ovipositions of argulids, in both the maximum mortality (100%) of the ovipositions started from the treatments of 140µg / L and 160µg / L. The Lethal Concentration (LC_{50-24h}) for the ovipositions of *Argulus* sp and *Dolops discoidalis* were 99,7 µg / L and 99,3 µg / L, respectively. The parasite phase was important for the definition of the control concentration. In addition, studies are required to evaluate the effect on infected fish for the indication of this oil in aquaculture, since in this work, low concentrations of *C. citratus* O.E. CL were determined in the control of adult Argulids.

Agradecimentos -----	vi
Resumo -----	vii
Abstract -----	viii
Lista de figuras -----	10
Introdução geral -----	11
Objetivos -----	16
Geral: -----	16
Específicos: -----	16
Artigo: Efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon Citratus</i> em Argulidae (Leach,1819) -----	17
Resumo -----	17
Introdução -----	18
Material e métodos-----	19
Cultivo dos argulídeos -----	19
Obtenção e Caracterização química do óleo essencial do <i>Cymbopogon citratus</i> -----	20
Procedimento Experimental-CL _{50-24h} do <i>Cymbopogon citratus</i> -----	21
Avaliação histológica -----	22
Análise estatística-----	23
Resultados-----	24
Caracterização do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> -----	24
CL _{50-24h} do óleo essencial do <i>Cymbopogon citratus</i> -----	24
Parasitas adultos -----	25
Oviposições dos argulídeos -----	27
Efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> sobre a morfologia dos argulídeos. -	29
Discussão-----	32
Agradecimentos -----	35
Financiamento -----	35
Referencias do artigo (normas <i>Journal Experimental Biology</i>)-----	35
Considerações Finais -----	39
Referências-----	40
Anexo A -----	44
Anexo B -----	54

Lista de Figuras

Fig. 1 Argulídeos	19
Fig. 2 Oviposição dos argulídeos.	20
Fig. 3 Morfologia dos Argulídeos. Adaptado de Lemos de Castro, 1985.	23
Fig. 4 Mortalidade dos argulídeos submetidos ao teste de CL _{50-24h} com óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> .	26
Fig. 5 Mortalidade e tempo de observação dos argulídeos no teste CL _{50-24h} do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> .	26
Fig. 6 Concentração Letal 50% (CL _{50-24h}) dos argulídeos submetidos ao teste de CL _{50-24h} com óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> .	27
Fig. 7 Mortalidade das oviposições dos argulídeos submetidos ao teste de CL _{50-24h} com óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> .	27
Fig. 8 Concentração Letal 50% para as oviposições dos argulídeos submetidos ao teste de CL _{50-24h} com óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> .	28
Fig. 9 Oviposições dos argulídeos submetidos ao teste CL _{50-24h} .	29
Fig. 10 Olhos composto dos argulídeos.	29
Fig. 11 Cortes histológicos demonstrando os olhos dos <i>Argulus</i> sp. Submetidos a CL _{50 24h} do óleo essencial de <i>C. citratus</i> .	30
Fig. 12 corte histológico demonstrando os olhos dos <i>Dolops discoidalis</i> . Submetidos a CL _{50-24h} do óleo essencial de <i>C. citratus</i> .	31

Introdução geral

A aquicultura é uma das atividades agroindustriais com maior destaque mundial. Até 2025, deve-se registrar um crescimento de 104% na produção de pescado derivados da pesca e da aquicultura, sendo que este crescimento se dá pelos investimentos no setor aquícola nos últimos anos (FAO, 2016). Dentre as atividades da aquicultura, a piscicultura é a que mais cresce no Brasil, com diversas espécies nativas e não nativas cultivadas por pequenos e médios produtores. No Brasil, dados do IBGE apontam que em 2015, foram produzidos 483 mil toneladas de peixe, com incremento de 1,5% em relação a 2014 (BRASIL, 2017). O aumento do número de pisciculturas no território nacional associado à intensificação da produção, tem se observado surtos e altas mortalidades de pescado decorrentes das enfermidades.

Um dos principais entraves sanitários ocasionados pela intensificação na criação de peixes é a ocorrência de infestações parasitárias que afetam a produção de peixes, causando queda de produtividade, que geram perdas econômicas significativas e provocam diminuição do valor comercial dos animais parasitados (Evans *et al.*, 2007). A fauna parasitária pode apresentar diferentes composições, dependendo da espécie de hospedeiro, nível da cadeia trófica, idade, tamanho, sexo e outros fatores bióticos e abióticos (Takemoto *et al.*, 2004). Entre os parasitos na aquicultura estão os protozoários, monogeneas, nematodas e crustáceos (Ranzani-Paiva *et al.*, 2004).

Os crustáceos são animais pertencentes ao filo Arthropoda (artrópodes), subfilo (Crustácea) que agrupa um numeroso e diversificado conjunto de invertebrados com aproximadamente 67.000 espécies válidas. O subfilo Crustácea abrange seis classes, dentre elas a classe Maxillopoda, que é composta por outras seis subclasses (Mystacocarida, Pentastomida, Tantulocarida, Thecostraca, Copepoda e Branchiura) (Barnes *et al.*, 2008).

Os parasitos da subclasse Branchiura, são caracterizados como ectoparasitas periódicos de peixes marinhos e de água doce. Os Branchiura são popularmente chamados de “piolho de peixe” ou argulídeos, referente ao gênero *Argulus*, que de maneira geral refere-se a todas as espécies de branquiúros (Lamarre e Cochran 1992; Barnes *et al.*, 2008).

Os argulídeos atualmente apresentam espécies distribuídas em quatro gêneros: *Chonopeltis* Thieli, 1901, *Dipteropeltis* Calman, 1912, *Argulus* Muller, 1785 e *Dolops* Audoin, 1857. Os principais representantes desta família é o gênero *Argulus* que é amplamente

difundido sobre o globo e o gênero *Dolops* que encontra-se restrito a América Central e do Sul, África e Oceania (Castro e Fernandes, 2009).

Os argulídeos são caracterizados por apresentarem carapaça em forma de escudo dorsal bilobado; número constante de quatro somitos no pereion (tórax) livre; corpo sem segmentação posteriormente à abertura genital; mandíbulas sem palpo no adulto; apêndices do pereion birramificados; um par de olhos compostos e espermatozoides transferidos para as espermatecas da fêmea sem órgãos copuladores especiais ou formação de espermatóforos (Lemos de Castro, 1985).

Não possuem hospedeiros específicos, assim, pode encontrar uma mesma espécie de argulídeos parasitando várias espécies de peixes, como também uma mesma espécie de peixe pode ser atacada por diversas espécies destes parasitas. Estes parasitas na fase adulta podem apresentar em torno de 5 a 22 mm de comprimento, facilmente visíveis a olho nu (Lemos de Castro, 1985; Barnes *et al.*, 2008).

Por serem parasitas não fixos, podem originar lesões múltiplas, deslocando-se à superfície do hospedeiro, penetram no tegumento, destruindo a epiderme, derme e músculos ou apenas lesões epidérmicas com destruição das escamas e células superficiais, formando lesões que podem vir constituir uma oportunidade para o ataque de fungos e bactérias em seu hospedeiro (Luque, 2004; Vasconcelos, 2014). Alimentam-se fazendo com que seu aparelho bucal, dotado de estrutura semelhante a uma probóscide, penetram profundamente no hospedeiro, sugando os fluídos. A penetração do aparelho bucal causa dano mecânico, inflamação local e irritação no peixe. A perfuração do tegumento pode causar problemas de natureza osmorregulatória e contribuir para a morte do hospedeiro, uma vez que poderá gerar intensa resposta inflamatória no ferimento. Assim, a gravidade das lesões estará relacionada, sobretudo com a intensidade da parasitose (Vasconcelos, 2014; Neethling e Venant-oldewage, 2016).

Nos sítios de agressão, os peixes apresentam hemorragia puntiforme, produção excessiva de muco e, em algumas espécies, hiperpigmentação da pele. Nas brânquias, a presença do parasito provoca hiperplasia das células da mucosa, que se traduz por hipertrofia do epitélio de revestimento. Focos de necrose nos locais agredidos também podem ser observados. O *Argulus* pode fixar-se no globo ocular, provocando lesões causadas tanto pela agressão por fixação quanto pelas decorrentes infecções secundárias (Shimura, 1983).

O ciclo de vida é direto, os ovos podem eclodir em 10 a 50 dias após a desova e as posturas podem ser visualizadas a olho nu. Não carregam seus ovos em sacos, os depositam em substratos sólidos: pedras, troncos, paredes de aquários e tanques. Durante a época de reprodução ambos os sexos abandonam o hospedeiro e saem à procura de um local para postura. Suas larvas são livres em uma ou várias fases de seu desenvolvimento e no último estágio larval tendem a fixar-se nos hospedeiros, do qual se alimentam daí em diante. Essas características fazem com que a população de parasitas aumente progressivamente, tornando-se verdadeiras pragas em cultivo de peixes (Malta e Varela, 2000; Gomes e Malta, 2002).

Em se tratando de perdas na piscicultura, observa-se que o *Dolops* é mais prejudicial que o *Argulus*, devido sua forma de fixação e pela facilidade com que se movimentam sobre a superfície do peixe, provocando diversas lesões em várias partes do corpo de seu hospedeiro (Malta e Varela, 1983). Por isso, o tratamento faz-se necessário independentemente da espécie ou tipo de criação.

As substâncias mais utilizadas como antiparasitário na aquicultura é o diflubenzuron , que caracterizam-se por reduzir a carga de organismos patogênicos sobre a superfície biológica dos organismos aquáticos, e o uso destes está associado a seu amplo espectro, rápida ação e baixo preço. Entretanto, a utilização dos quimioterápicos na aquicultura pode representar riscos à segurança alimentar dos consumidores de peixes, bem como proporcionar lesões tóxicas aos peixes e danos ao ecossistema aquático (Soares e Tavares-dias, 2013; Reverter *et al.*, 2014).

Neste contexto, uso de produtos naturais (fitoterápicos) vem ganhando destaque na sanidade animal, pois, podem ser fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitos e microrganismos. Além disso, tais produtos são considerados menos prejudiciais ao meio ambiente e apresentam-se como menos agressivos à saúde do homem, por indicar menor possibilidade de resíduo. Em relação às propriedades terapêuticas destes produtos, estudos sobre o controle das infestações parasitárias de humanos e animais, incluindo os peixes têm sido estimulados (Nascimento *et al.*, 2007; Soares e Tavares-dias, 2013).

Os fitoterápicos, por definição, são produtos obtidos de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014).

As plantas conhecidas como medicinais apresentam ampla atividade antiparasitária, antibacteriana e antifúngica comprovada por estudos científicos em animais. Seus derivados são produto da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que contém substâncias responsáveis pela ação terapêutica, podendo ocorrer na forma de extrato, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros (BRASIL, 2014).

Os óleos essenciais destacam-se por serem misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odorífera e líquida, constituída, em sua maioria, por moléculas de natureza terapêutica (Bakkali *et al.*, 2008; Soares e Tavares-Dias, 2013).

Os óleos essenciais quando aplicados à aquicultura apresentam-se como estimulante, promotor do crescimento, e antiparasitário (Chakraborty *et al.*, 2013; Dota *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015, Hashimoto *et al.*, 2016). Essas funções estão ligadas principalmente a substâncias (moléculas) que podem atuar de forma isolada ou combinada por meio de sinergismo entre as moléculas (Chakraborty *et al.*, 2013). Na aquicultura, a aplicação dos óleos essenciais na prevenção e tratamento dessas doenças pode ser feita de duas formas: administração oral, adicionando os óleos na ração, ou na forma de banhos, também conhecidos por banhos terapêuticos e tem demonstrados promissores no controle parasitário (Ekanem *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011).

Por isso, a aplicação de óleos essenciais e extratos de plantas na aquicultura vêm sendo estudada como método alternativo à utilização de quimioterápicos (Chagas *et al.*, 2015). Uma das plantas com propriedades medicinais, com potencial quimioterápico na aquicultura é o Capim santo (*Cymbopogon citratus*).

O *Cymbopogon citratus* é originário da Índia, sendo conhecido popularmente como Capim-cheiroso, capim cidreira, ou capim-limão. A espécie é resistente às variações do solo e clima, contudo, as condições climáticas ideais para o seu desenvolvimento são calor e clima úmido com plena exposição solar e chuvas uniformemente distribuídas. É uma espécie herbácea pertencente à família POACEAE, com longas folhas aromáticas, estreitas, agudas e ásperas e com nervura central proeminente (Ortiz *et al.*, 2002 e Santos *et al.*, 2009).

A espécie é cultivada para produção comercial de óleo essencial, denominado internacionalmente como “lemon grass”. O óleo essencial desta planta é amplamente utilizado

para fins medicinais, tem seu uso e aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos e perfumaria, bem como para obtenção do *citral*, o principal componente do óleo (Pinto *et al.*, 2013).

Nascimento *et al.* (2003) relatam que o componente químico mais representativo no óleo essencial extraído do capim-santo é o *citral*, sendo este uma mistura de isômeros, *geranial* (*a-citral*) e *neral* (*b-citral*), que é utilizada pela indústria farmacêutica para síntese de ianonas e vitamina A, acompanhado de pequena quantidade de *mirceno*. O O.E. do *C. citratus* tem ação espasmolítica e calmante comprovada, atribuída à presença do *citral* (Matos, 2000).

Como antiparasitário, o óleo de *C. citratus*, apresentou controle da população de *Haemonchus contortus* (nematoides bovino) nos estágios larvais e posturas deste parasito. Analisando a composição química, o *citral* foi o principal constituinte do óleo essencial de *C. citratus*, sendo assim, a substância ativa responsável pela atividade antiparasitária (Macedo *et al.*, 2015). Em ectoparasita bovino, o óleo de *C. citratus* apresenta controle parcial de ovos e larvas de *Rhipicephalus microplus*, na qual apresentou como um uso promissor como carrapaticida, inclusive em populações resistentes a bases químicas (Santos e Vogel, 2012).

No entanto, não foram encontrados estudos de óleos essenciais no combate aos Argulídeos. Dessa forma, este trabalho investiga a necessidade de alternativas naturais no tratamento destes parasitos, visto que estes podem ocorrer tanto em ambiente natural como em ambiente de criação, por causarem danos ao seu hospedeiro em um período curto de tempo. Contudo, antes da indicação de óleos essenciais para o uso na aquicultura, é preciso realizar teste de eficiência com o foco para viabilidade de uso destas possíveis alternativas vinculadas ao uso de produtos naturais.

Esta dissertação foi organizada em forma de uma introdução geral, objetivos gerais específicos e um artigo científico, a ser submetido para a revista *Journal Experimental Biology* (normas em anexo-A). As figuras e tabelas foram inseridas no corpo do texto para melhor compreensão das informações e visualização dos resultados. Entretanto, na formatação final (figuras e tabelas) serão organizadas conforme as normas da revista

Objetivos

Geral:

Avaliar os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no controle de Argulidae (Crustácea, Branchiura).

Específicos:

Verificar a eficiência do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e determinar a concentração letal (CL_{50-24h}) no controle de argulídeos adultos;

Verificar a eficiência do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e determinar a concentração letal (CL_{50-24h}) no controle das oviposições dos argulídeos;

Verificar o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre a morfologia ocular dos argulídeos.

Artigo: Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon Citratus* em Argulidae (Leach,1819)

Elcimara Cardoso Pereira ^{1,2}; Elzamara de Castro Oliveira ^{1,3} ; Lincoln Lima Correa ^{1,2}; Rosa Helena Veras Mourão ⁴; Lenise Vargas Flores da Silva ^{1,2}

¹Laboratório de Química, Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas, Universidade Federal do Oeste do Pará;

²Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos- PPGRACAM;

³Graduanda em Bacharelado em Engenharia de Pesca, Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas, Universidade Federal do Oeste do Pará.

⁴Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Oeste do Pará;

Correspondência: Elcimara Cardoso Pereira, Email: elcimaracarodoso94@gmail.com

Resumo

Os crustáceos argulídeos são ectoparasitos de peixes, que causam prejuízos na piscicultura, por isso seu controle é fundamental. Este trabalho estudou efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (compostos majoritários: *geranial*, *neral* e *mirceno*) no controle de ectoparasitas de peixes pertencentes à família Argulidae (*Dolops discoidalis* e *Argulus* sp) adultos e em oviposições, através do teste CL_{50-24h}. No teste foram utilizados dois grupos controle (água e álcool) e as concentrações de 20 µg/L, 40 µg/L; 60 µg/L, 80 µg/L, 100 µg/L, 120 µg/L, 140 µg/L e 160 µg/L de óleo essencial de *C. citratus*. Os resultados demonstraram que os argulídeos adultos tem reações diferentes para o óleo essencial de *C. citratus*, a mortalidade máxima para os representantes do *Argulus* sp iniciou a partir da concentração de 100 µg/L, enquanto a mortalidade máxima do *Dolops discoidalis* iniciou no tratamento de 80 µg/L. A Concentração Letal 50% (CL_{50-24h}) para o *Argulus* sp adulto foi 76,3 µg/L e para o *Dolops discoidalis* adulto foi 59,3 µg/L. Foi observado que toda mortalidade no teste (CL_{50-24h}) ocorreu na primeira hora. Em relação às oviposições dos argulídeos, o óleo essencial de *C. citratus* tiveram resultados semelhantes, em ambos, a mortalidade máxima (100%) das oviposições iniciou a partir dos tratamentos de 140 µg/L e 160 µg/L. A Concentração Letal 50% (CL_{50-24h}) para as oviposições do *Argulus* sp e *Dolops discoidalis* foram 99,7 µg/L e 99,3 µg/L, respectivamente.

Palavras chaves: Fitoterápico, Ectoparasitos, Crustáceos.

Introdução

A aquicultura é uma das atividades agropecuárias em crescimento, contudo, é observado mortalidades de pescado decorrente das enfermidades provenientes de infestações parasitárias, que afetam a produtividade, causando perdas significativas para o setor aquícola (Evans et al., 2007). Entre os parasitos na aquicultura estão os crustáceos pertencentes a subclasse Branchiura denominados de argulídeos.

Os argulídeos pertencem a ordem Arguloidea, família Argulidae. Os principais gêneros pertencentes desta família são *Argulus* e *Dolops*. O gênero *Argulus* é amplamente difundido sobre o globo, enquanto o gênero *Dolops* encontra-se restrito a América Central e do Sul, África e Oceania (Castro e Fernandes, 2009).

O ciclo de vida é direto. As oviposições são depositadas sobre uma superfície, tipicamente enfileiradas paralelamente, após a eclosão, a forma larval infesta o hospedeiro e assemelha-se a forma adulta (Walker et al., 2004), na fase adulta podem apresentar tamanho em torno de 5 e 22 mm (Lemos de Castro).

Em geral, apresentam baixa especificidade parasitária, aderem-se à superfície corporal e em alguns casos, na cavidade branquial de seus hospedeiros (Malta e Varella, 1983). Possuem um aparelho bucal desenvolvido, constituído de apêndices anteriores localizados na superfície ventral. No caso do gênero *Argulus*, o primeiro par de maxilas se modificou em ventosas tubulares, enquanto no gênero *Dolops* modificou-se em ganchos; as antênulas dos argulídeos modificaram-se em formas de ganhos para melhor fixação nos hospedeiros. Estas modificações intensificam os danos mecânicos que contribuem para a morte do hospedeiro (Castro e Fernandes, 2009; Vasconcelos, 2014).

Na sanidade animal, a fitoterapia é uma alternativa de tratamento, que apresenta fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitos e microrganismos, dado os efeitos minimizados frente às drogas sintéticas aplicadas na aquicultura para o controle parasitário (Soares e Tavares-Dias, 2013). Uma das plantas com propriedades medicinais e com potencial quimioterápico é o Capim santo (*Cymbopogon citratus*).

O *Cymbopogon citratus* é uma planta herbácea pertencente à família POACEAE, com longas folhas aromáticas, estreitas, agudas e ásperas e com nervura central proeminente. O óleo

essencial desta planta é amplamente utilizado para fins medicinais, farmacêuticos e alimentícios (Ortiz et al., 2002; Santos et al., 2009).

O óleo essencial do *C. citratus* apresentou-se eficiente no controle de nematoides gastrointestinais bovinos (*Haemonchus contortus*) e em ectoparasitos bovinos (*Rhipicephalus microplus* tanto nas fases adultas como nas oviposições parasitárias (Macedo et al., 2015; Santos e Vogel, 2012). Contudo, não há estudos de óleos essenciais de *C. citratus* aplicados na sanidade e controle de ectoparasitos na aquicultura. Por isso este trabalho busca alternativas naturais para o tratamento de Argulídeos, tendo como objetivo avaliar os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no controle de Argulidae (Crustácea, Branchiura).

Material e métodos

Cultivo dos argulídeos

O cultivo dos parasitos ocorreu nas dependências do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA-Campus Tapajó (Santarém-Pará- Brasil). Os exemplares dos argulídeos: *Argulus* sp (Fig. 1A, Fig. 1B) e *Dolops discoidalis* (Fig. 1C, Fig. 1D) foram obtidos de Aracú (*Schizodon fasciatus*) infectados em ambiente natural (Lago do Maicá e Lago do Mapiri-Santarém-Pará- Brasil).

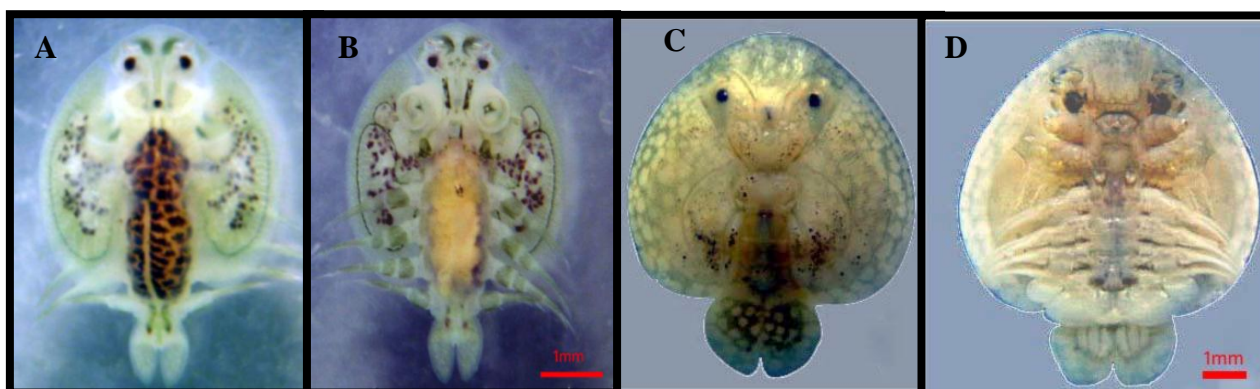


Fig. 1 Argulídeos: Fig. 1A Vista dorsal do *Argulus* sp, Fig. 1B Vista ventral do *Argulus* sp, Fig. 1C Vista dorsal do *Dolops discoidalis*, Fig. 1D Vista ventral do *Dolops discoidalis*

Os animais foram mantidos em caixas experimentais (500L) acopladas com aeradores e filtro mecânico e monitorados diariamente os parâmetros físico-químicos da água (pH,

condutividade elétrica, oxigênio dissolvido; sólidos dissolvidos totais e temperatura) com o auxílio do Multiparâmetro (Extec L150 e Lovibond Senso Direct 150).

Para obtenção das posturas (Fig. 2) as caixas experimentais foram forradas com estruturas plásticas removíveis transparentes nas bordas e no fundo. Após a desova, as posturas foram recortadas e analisadas em estereomicroscópio (Bel photonics) antes dos testes.

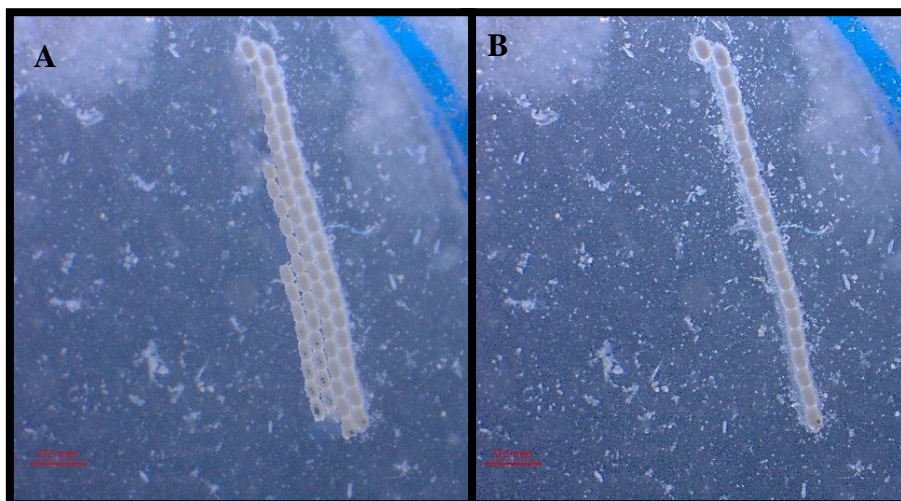


Fig. 2 Oviposições dos argulídeos: Fig. 2A *Argulus* sp e Fig. 2B *Dolops discoidalis*.

Obtenção e Caracterização química do óleo essencial do *Cymbopogon citratus*

O óleo essencial foi obtido no Laboratório de Bioprospecção e Biologia experimental (LABBEX-UFOPA) (Santarém- Pará – Brasil) pelo método de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Marca Vidrolabor) o tempo de extração foi fixado em 120 min (Ming et al. 1996). Após a extração do óleo essencial de *Cymbopogon Citratus*, este foi armazenado em recipiente de vidro âmbar, etiquetado e mantido sob refrigeração à temperatura de 5°C, até o momento do início dos experimentos.

A caracterização química do óleo essencial ocorreu por meio de cromatografia gasosa (cromatógrafo Agilent Technologies, acoplado a um detector seletivo de massa Agilent Technologies) os dados foram analisados no programa GCMS Prostrun Analysis.

Procedimento Experimental-CL_{50-24h} do *Cymbopogon citratus*

Concentração Letal (CL_{50-24h}) nos argulídeos adultos

Os testes ocorreram no Laboratório de Química Multiusuário-ICTA, seguindo a metodologia proposta por Ekanen et al. (2004) com modificação nas concentrações. As concentrações para o teste da concentração letal CL_{50-24h} do *Cymbopogon citratus* foram: 20 µg/L; 40 µg/L; 60 µg/L; 80 µg/L; 100 µg/L; 120 µg/L; 140 µg/L e 160 µg/L e dois tratamentos controles; controle água e controle álcool.

Os parasitos adultos foram retirados dos peixes com o auxílio de pinça e colocados em um Becker com água do tanque e aeração constante. O teste consistiu na utilização de 5 parasitas em cada placa de Petri (25 ml), cada tratamento foi em triplicata, totalizando 15 parasitos por tratamento (150 *Dolops discoidalis* e 150 *Argulus* sp) expostos por 24h.

Os parasitos foram submetidos simultaneamente em cada placa de Petri. As placas não foram tampadas e as observações ocorreram nos seguintes horários: 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 10h, 11h, 12h e 24h. Foram realizadas observações quanto ao movimento dos parasitos (natação, movimentos nas antênulas, apêndices, movimentos musculares) com auxílio do estereomicroscópio. Confirmada a ausência de movimentos nos parasitos, os mesmos foram submetidos à recuperação.

A recuperação consistiu em submeter os parasitos em um recipiente com água sem óleo essencial (retirada do tanque de cultivo) e aeração constante. Foi observado o tempo em segundos ou minutos para o retorno dos movimentos. O tempo máximo de recuperação foi 60 min (1h), após este tempo, não observado movimentação, foi considerado a morte do parasito.

Concentração Letal (CL_{50-24h}) nas oviposições

O teste de CL_{50-24h} aplicado nas oviposições dos parasitos, consistiu no monitoramento do tempo de vida das oviposições, retiradas destas do tanque de cultivo, onde foram recortadas e analisadas em estereomicroscópio para registro fotográfico e contagem dos ovos.

No teste da CL_{50-24h}, foram utilizadas uma oviposição em cada placa de Petri (25 ml), cada tratamento foi em triplicata, totalizando 60 oviposições (30 oviposições do *Dolops discoidalis* e 30 oviposições do *Argulus* sp) expostas por 1h nas concentrações de 20 µg/L;

40µg/L; 60 µg/L; 80 µg/L; 100 µg/L; 120 µg/L; 140 µg/L e 160 µg/L de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Após a exposição às posturas foram observadas por 30 dias, a fim de observar as características das posturas como pigmentação, fixação, desenvolvimento dos embriões e eclosões das oviposições (eficiência do tratamento).

Após os testes as oviposições e os parasitos adultos foram fixados em solução de formol 10% (por 24 horas) e posteriormente foram armazenados em álcool 70% para o processamento histológico.

Avaliação histológica

O processamento histológico das amostras foi realizado no laboratório de Química Multiusuário da UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará, campus de Santarém-Pará. Os procedimentos foram adaptados de protocolos de Sousa (2014).

Inicialmente, o material biológico foi desidratado a partir de uma sequência de banhos crescente de álcool com 30 minutos de duração cada um (75%, 80%, 90%, 95% finalizando com um banho triplo com álcool etílico 100I, 100II e 100III). Após essa etapa, as amostras foram diafanizadas com xilol duas vezes para que o material se tornasse translúcido (5 minutos cada) em seguida, realizados mais dois banhos, com intervalo de uma hora, de parafina líquida em estufa a 60°C.

Cada amostra foi emblocada em perfil sagital parafina para que fosse possível a realização das sequências de cortes histológicos em perfil sagital com auxílio de micrótomo no laboratório. Na etapa de preparação de lâminas, as secções de parafina foram fixadas com gelatina diluída.

Para a desparafinização das lâminas, o material passou por sucessivos banhos de xilol (xilol I e xilol II, 5 minutos cada) quatro concentrações decrescentes diferentes de álcool etílico (três minutos cada) e água destilada (três minutos). Em seguida, as lâminas foram coradas a partir da imersão em hematoxilina durante 50 segundos e eosina durante 15 segundos.

Posteriormente, realizou-se a desidratação das lâminas com imersão crescente de álcool etílico e xilol para então iniciar o processo de montagem das lâminas, o qual foi aplicado o gotejamento (três gotas) de verniz vitral Acrilex sobre a lâmina, recobrando o material com lamínula e encaminhado para secagem em temperatura ambiente antes de iniciar as análises.

Para a análise da morfologia dos argulídeos foram observadas as seguintes estruturas: antênulas, olhos, olho “nauplius”, pereion, pleon, segunda antena, primeira maxila, segunda maxila, área respiratória superior e área respiratória inferior (Fig. 3)

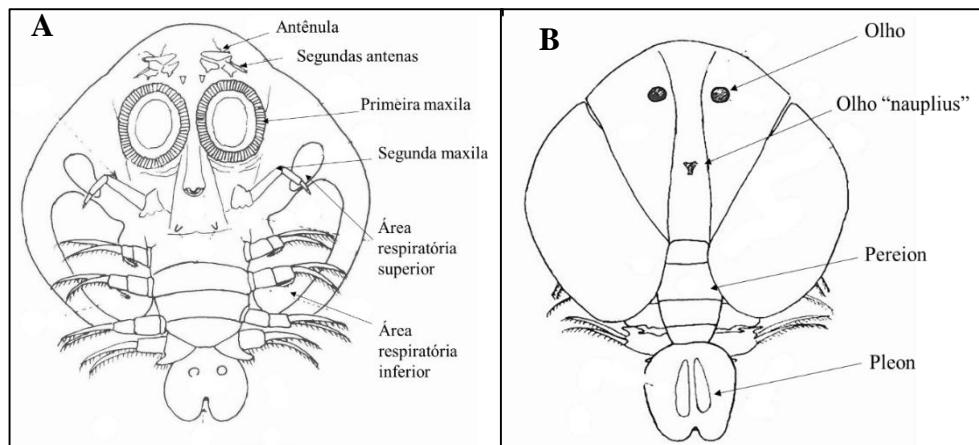


Fig. 3 Morfologia dos Argulídeos: Fig. 3A Vista Dorsal, Fig. 3B Vista ventral. Adaptado de Lemos de Castro, 1985.

Análise estatística

Os valores dos parâmetros físico-químicos da água foram expressos em média e erro padrão, as diferenças foram avaliadas através do teste ANOVA no programa no Programa SigmaPlot11.

Os dados referentes ao uso do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no controle de posturas e argulídeos adultos estão expressos em média e erro padrão, O teste de Shapiro-Wilk foi feito para avaliar normalidade.

A homogeneidade das três repetições foi verificada pelo teste de Kruskal-Wallis, no programa SigmaPlot11.

A Concentração Letal (CL_{50-24h}) foi determinada pelo método Probita através do programa SSPP6.

Resultados

Caracterização do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

O óleo essencial extraído do *Cymbopogon citratus* apresentou rendimento superior a 1%, e Monoterpenos Oxigenados como componentes majoritários, seguido dos Monoterpenos hidrocarbonetos, os constituintes químicos majoritários é o *Geranial* (47,5%) seguido do *Neral* (35,6%) e *Mirceno* (6,7%) (Tabela 1).

Tabela 1 Rendimento e componentes químicos majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. RI_{calc} = tempo de retenção calculado; RI_{lit} = tempo de retenção da literatura.

Rendimento do óleo (%)	1,8%		
Constituinte do óleo (%)	RI _{calc}	RI _{lit}	A%
Octano	798	800	0,1
Hex-3E-enal	847	792	0,0
6-metil-5-Hepten-2-ona	983	981	0,4
Mirceno	989	988	6,7
Limoneno	1027	1024	0,0
Z -β- Ocimeno	1034	1032	0,2
E-β-Ocimeno	1044	1044	0,1
6,7- Epoxidomirceno	1091	1090	0,2
Linalol	1098	1095	0,6
Perileno	1100	1102	0,2
Oxido de α-pineno	1103	1099	0,3
Limonona cetona	1134	1131	0,1
Exo-Isocitral	1142	1140	0,3
Trans -α-necrodol	1147	1144	0,2
Citronelal	1150	1148	0,1
Oxido de β-pineno	1154	1154	0,1
Z- Isocitral	1162	1160	0,8
Epoxido de rosafurano	1173	1173	0,4
E- Isocitral	1180	1177	1,0
Cis-piperitol	1200	1195	0,1
Citronelol	1227	1223	0,4
Nerol	1232	1227	0,2
Neral	1241	1235	35,6
Geraniol	1253	1249	3,0
Geranial	1271	1264	47,5
2-Undecanona	1292	1293	0,3
Formato de geranila	1301	1298	0,1
Acetato de citronelila	1352	1350	0,0
Acetato de geranila	1382	1379	0,3
β-Cariofileno	1418	1417	0,2
α-trans-bergamoteno	1434	1432	0,1
Z-β- farneseno	1442	1440	0,2
α-Humeleno	1452	1452	0,1
E-β-farneseno	1455	1454	0,6
E- β- Ionona	1485	1487	0,1

2- Tridecanona	1493	1495	0,3
Oxido de Cariofileno	1579	1482	0,4
Selin-11-en- α -ol	1658	1658	0,2
2-Pentadecanona	1696	1697	0,3
2E,6E-farnesal	1741	1740	0,1
Hexadecanoato de geranila	1753	1748	0,2
Hexadecanol	1877	1874	0,2
Octanoato de geranila	1947	1943	0,5
Monoterpenos hidrocarbonetos			6,9
Monoterpenos Oxigenados			90,7
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			0,4
Sesquiterpenos Oxigenados			0,4
Outros			1,3
Total (%)			99,2

Concentração Letal CL_{50-24h} do óleo essencial do *Cymbopogon citratus*

Parasitas adultos

Os valores dos parâmetros físico químicos da água nas caixas experimentais de cultivo dos argulídeos não apresentaram diferença no decorrer do experimento ($p > 0,05$) a temperatura apresentou média de 27,5° ($\pm 0,91$); Oxigênio dissolvido 6,7 mg/l ($\pm 0,38$); pH 7,3 ($\pm 0,11$); Condutividade elétrica 92 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ($\pm 0,46$).

No teste CL_{50-24h} do óleo essencial de *C. citratus* no *Argulus* sp adulto, a mortalidade teve início no tratamento de 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ com total de 3 (± 1) *Argulus* mortos, conforme aumenta concentração do óleo essencial, aumenta também a mortalidade, até atingir a mortalidade máxima na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ com mortalidade de 15 (± 5) *Argulus* sp. Houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,050$) (Fig. 4A).

Para os representantes do *Dolops discoidalis* adultos submetidos ao teste CL_{50-24h} do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, a mortalidade iniciou a partir do tratamento de 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ com o total de 6 (± 2) *Dolops discoidalis* mortos. Conforme aumenta a concentração do óleo essencial, aumenta também a mortalidade, até atingir a mortalidade máxima na concentração de 80 $\mu\text{g}/\text{L}$ com mortalidade de 15 (± 5) *Dolops discoidalis*. Houve diferença entre os tratamentos ($p < 0,050$). (Fig. 4B).

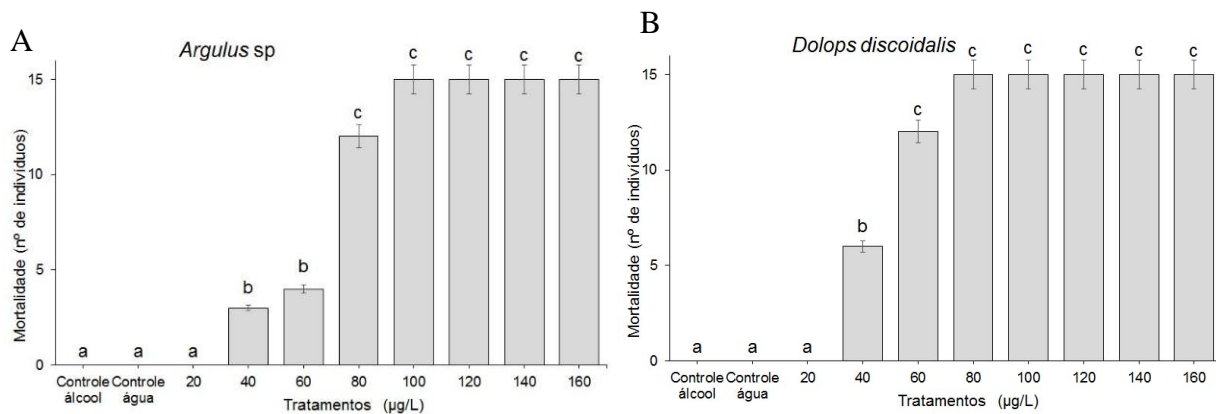


Fig. 4 mortalidade dos argulídeos: Fig. 4A Mortalidade *Argulus sp* submetidos ao teste de CL_{50-24h} com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, Fig. 4B Mortalidade do *Dolops discoidalis* submetidos aos testes de CL_{50-24h} com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos ($p < 0,050$).

Observa-se que os representantes da família Argulidae reagem diferente em relação a CL_{50-24h} com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. O *Dolops discoidalis* demonstrou ser mais sensível ao produto que o *Argulus sp*.

Analisando o tempo de ação do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* nos argulídeos. A mortalidade no *Argulus sp* ocorreu na primeira hora do teste (Fig. 5A), esta mesma situação também foi registrada para o *Dolops discoidalis* (Fig. 5B).

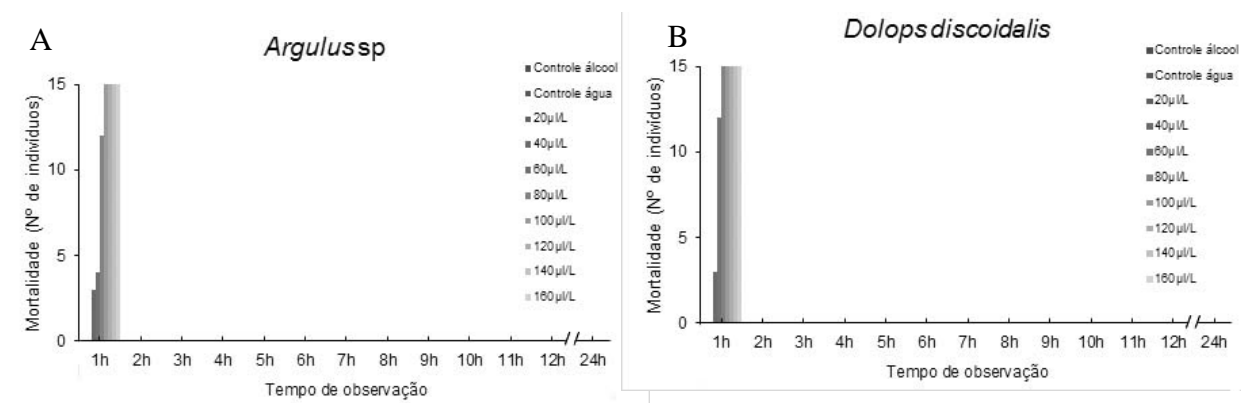


Fig. 5 Mortalidade e tempos de observação: Fig. 5A Mortalidade e tempo de observação do *Argulus sp* no teste CL_{50-24h} do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, Fig. 5B Mortalidade e tempo de observação do *Dolops discoidalis* no teste CL_{50-24h} do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

A CL 50 do óleo essencial de *C. citratus* para o *Argulus sp* adulto foi 76,3 µg/L (Fig. 6A). A CL 50 determinada para o *Dolops discoidalis* adulto é 59,3 µg/L do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (Fig. 6B).

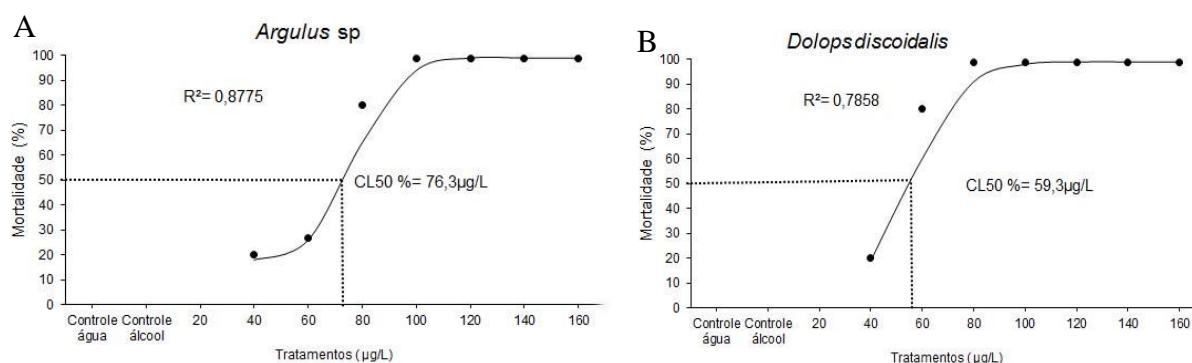


Fig. 6 Concentração Letal para os argulídeos adultos: Fig. 6A Concentração Letal 50% (CL_{50-24h}) dos *Argulus sp* submetidos ao teste de CL_{50-24h} com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, Fig. 6B Concentração Letal 50% (CL_{50-24h}) *Dolops discoidalis* submetidos ao teste de CL_{50-24h} com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Oviposições dos argulídeos

Observou que em ambas as espécies dos argulídeos (*Argulus sp* e *Dolops discoidalis*), não houve mortalidade das oviposições nos tratamentos controles (água e álcool) e nos tratamentos de 20 µg/L e 40 µg/L do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. A mortalidade das oviposições para ambas as espécies iniciou nos tratamentos de 60 µg/L com mortalidade de 25% das oviposições do *Argulus sp* (Fig. 7A) e 26 % das oviposições do *Dolops discoidalis* (Fig. 7B), em ambos, a mortalidade máxima (100%) das oviposições iniciou a partir dos tratamentos de 140 µg/L e 160 µg/L, os tratamentos diferenciaram ($P < 0,050$).

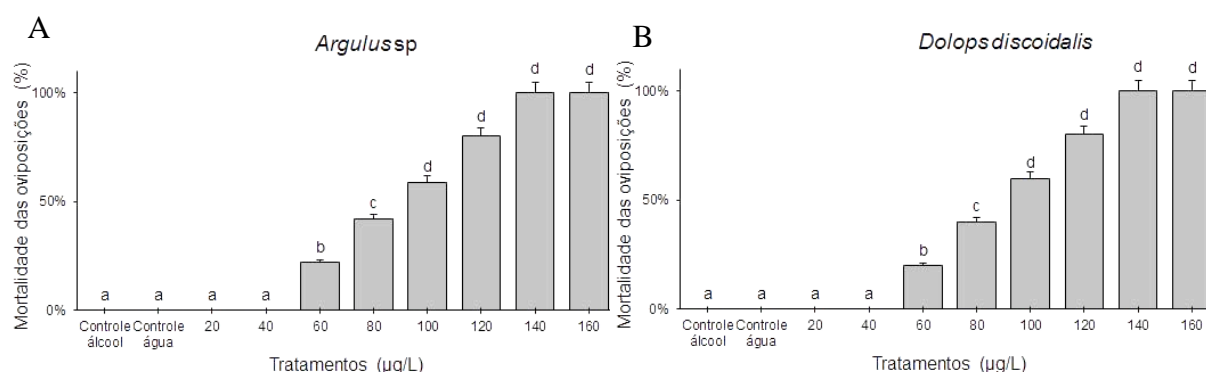


Fig. 7 Mortalidade das oviposições dos argulídeos: Fig. 7A Mortalidade das oviposições do *Argulus sp* do submetidos ao teste de CL_{50-24h}, Fig. 7B Mortalidade das oviposições *Dolops discoidalis* submetidos ao teste de CL_{50-24h} com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos ($p < 0,050$).

A CL 50 determinada para as oviposições do *Argulus* sp foi 99,7 $\mu\text{g/L}$ do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Fig. 8A). A CL50 determinada para as oviposições do *Dolops discoidalis* foi 99,3 $\mu\text{g/L}$ do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Fig. 8B).

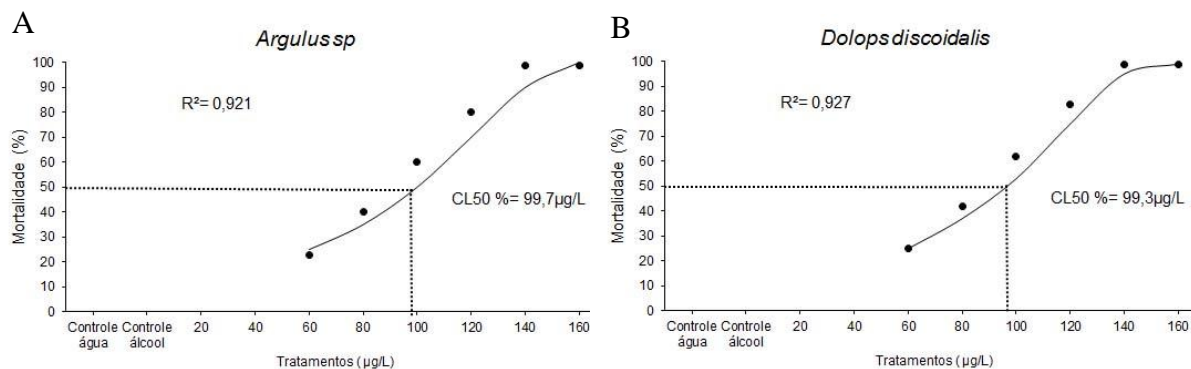


Fig. 8 Concentração Letal das oviposições dos argulídeos: Fig. 8A Concentração Letal 50% para as oviposições do *Argulus* sp submetidos ao teste de CL_{50-24h} com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, Fig. 8B Concentração Letal 50% para as oviposições do *Dolops discoidalis* submetidos ao teste de CL_{50-24h} com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Após o tempo de observação (30 dias), foi notado que as oviposições dos argulídeos (*Argulus* sp e *Dolops discoidalis*) em que ocorreu mortalidade, apresentaram alteração no formato elipsoide característico das oviposições dos argulídeos, perda de aderência ao substrato e coloração escura. (Figura 9).

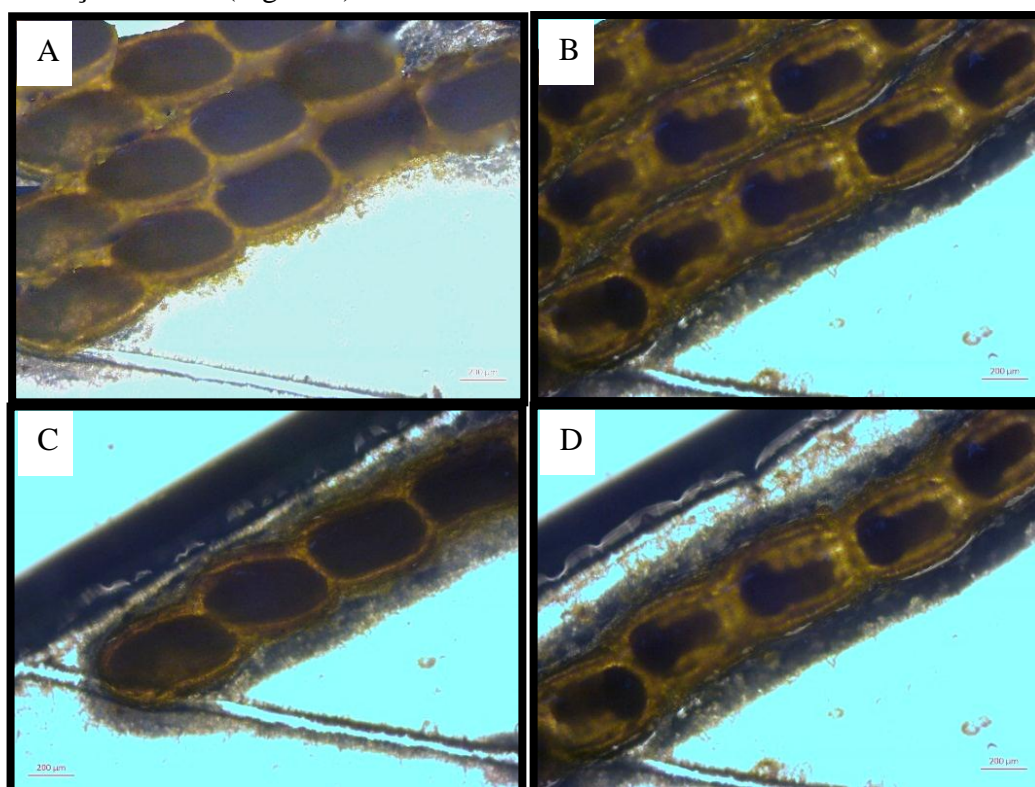


Fig. 9 Oviposições dos argulídeos no teste CL_{50-24h}: Fig. 9A oviposições do *Argulus* sp antes do teste CL_{50-24h}, Fig. 9B Oviposição do *Argulus* sp após o tempo de observação do teste CL_{50-24h}, Fig. 9C oviposição do *Dolops discoidalis* antes do teste CL_{50-24h}, Fig. 9D Oviposição do *Dolops discoidalis* após o tempo de observação do teste CL_{50-24h}.

Analisando os dados obtidos no teste da CL_{50-24h} com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, aponta que este óleo mostrou-se efetivo para o controle contra os argulídeos adultos e nas oviposições. Para o caso, é necessário conhecer os efeitos deste óleo sobre a morfologia do *Argulus* sp e *Dolops discoidalis* submetido ao teste da CL_{50-24h}.

Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre a morfologia dos argulídeos.

As estruturas dos argulídeos analisadas foram os olhos, olho “nauplius”, pereion, pleon, antênula, segunda antenas, primeira maxila, segunda maxila, área respiratória superior e área respiratória inferior, a fim de determinar alguma alteração morfológica nos grupos controles (água, álcool) e tratamentos 20 µg/L, 40 µg/L e 80 µg/L.

Dentre as estruturas analisadas, a que apresentou algum tipo de alteração morfológica no grupo controle (controle água e controle álcool) em relação aos tratamentos usados no teste da CL_{50 24h} com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foram os olhos compostos dos argulídeos (Fig.10).

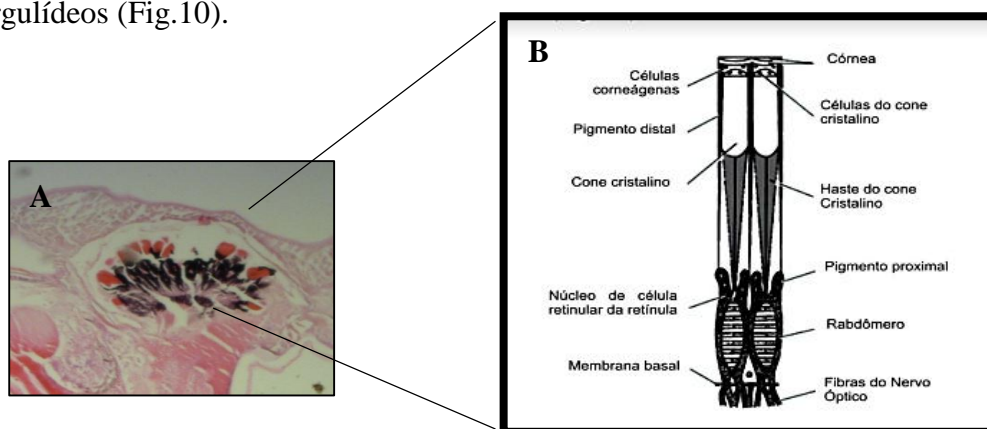


Fig. 10A olhos composto dos argulídeos, Fig. 10B estrutura de um omatídeo de um crustáceo. Adaptado de Boulhosa 2011.

Os argulídeos (*Argulus* sp e *Dolops discoidalis*) apresentam olhos compostos, foi observado os omatídeos apresentaram alteração no formato destas estruturas conforme a presença do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na água (20 µg/L, 40 µg/L e 80 µg/L), conforme o aumento da concentração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na água, estas

alterações no formato dos omatídeos torna-se mais evidente. As alterações dos omatídeos do *Argulus* sp estão indicadas com setas (Figura 11)

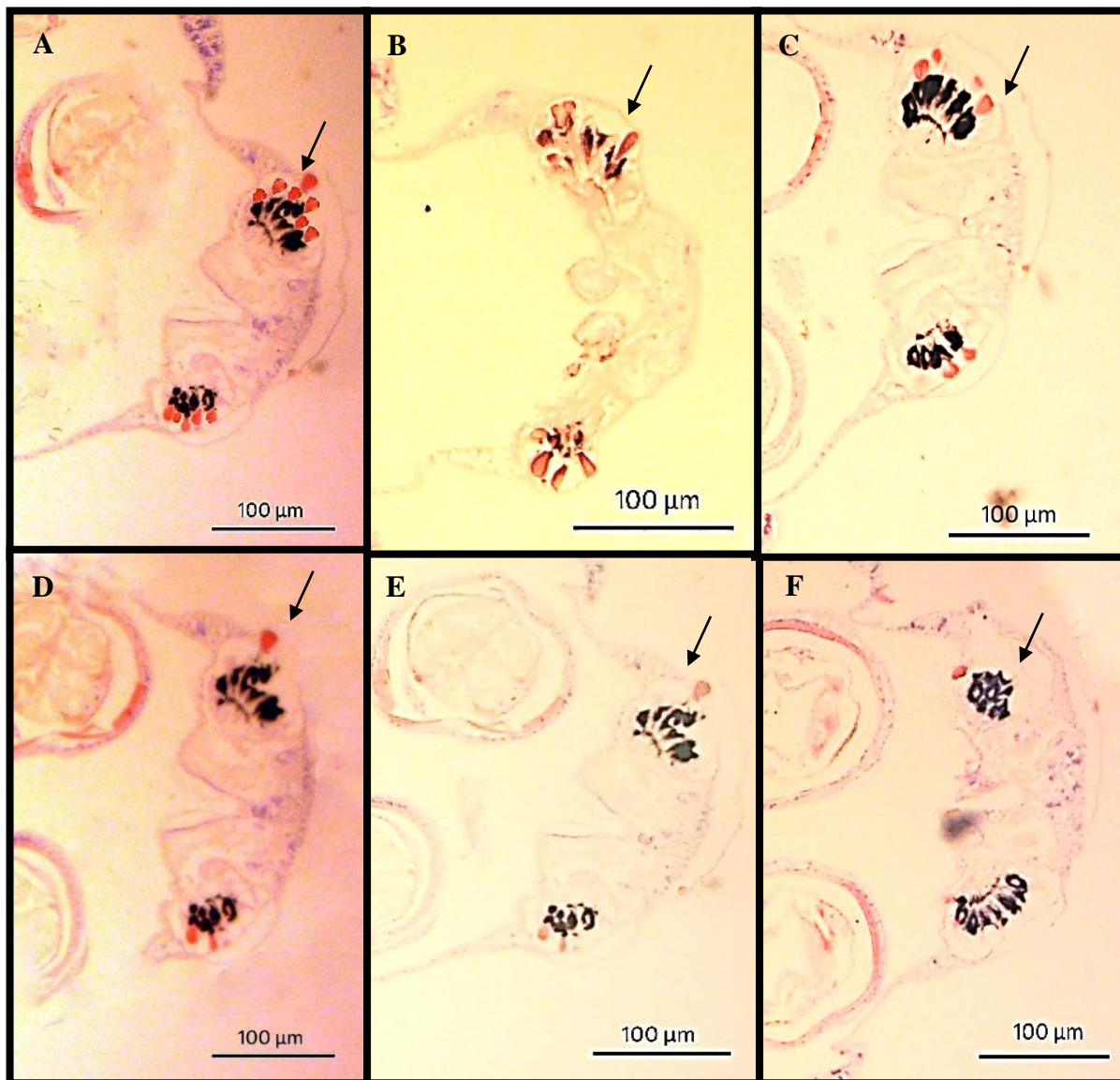


Fig. 11 Cortes histológicas demonstrando os olhos dos *Argulus* sp. Submetidos a CL_{50} 24h Fig. 11A Controle água, Fig. 11B Controle álcool, Fig. 11C Tratamento 20 µg/L, Fig. 11D Tratamento 40 µg/L, Fig. 11E Tratamento 60 µg/L, Fig. 11F Tratamento 80 µg/L. Escala de 100 µm. (Seta indica alteração dos omatídeos conforme os tratamentos no teste da CL_{50} 24h).

As alterações dos omatídeos do *Dolops discoidalis* estão indicadas com setas (Figura 12).

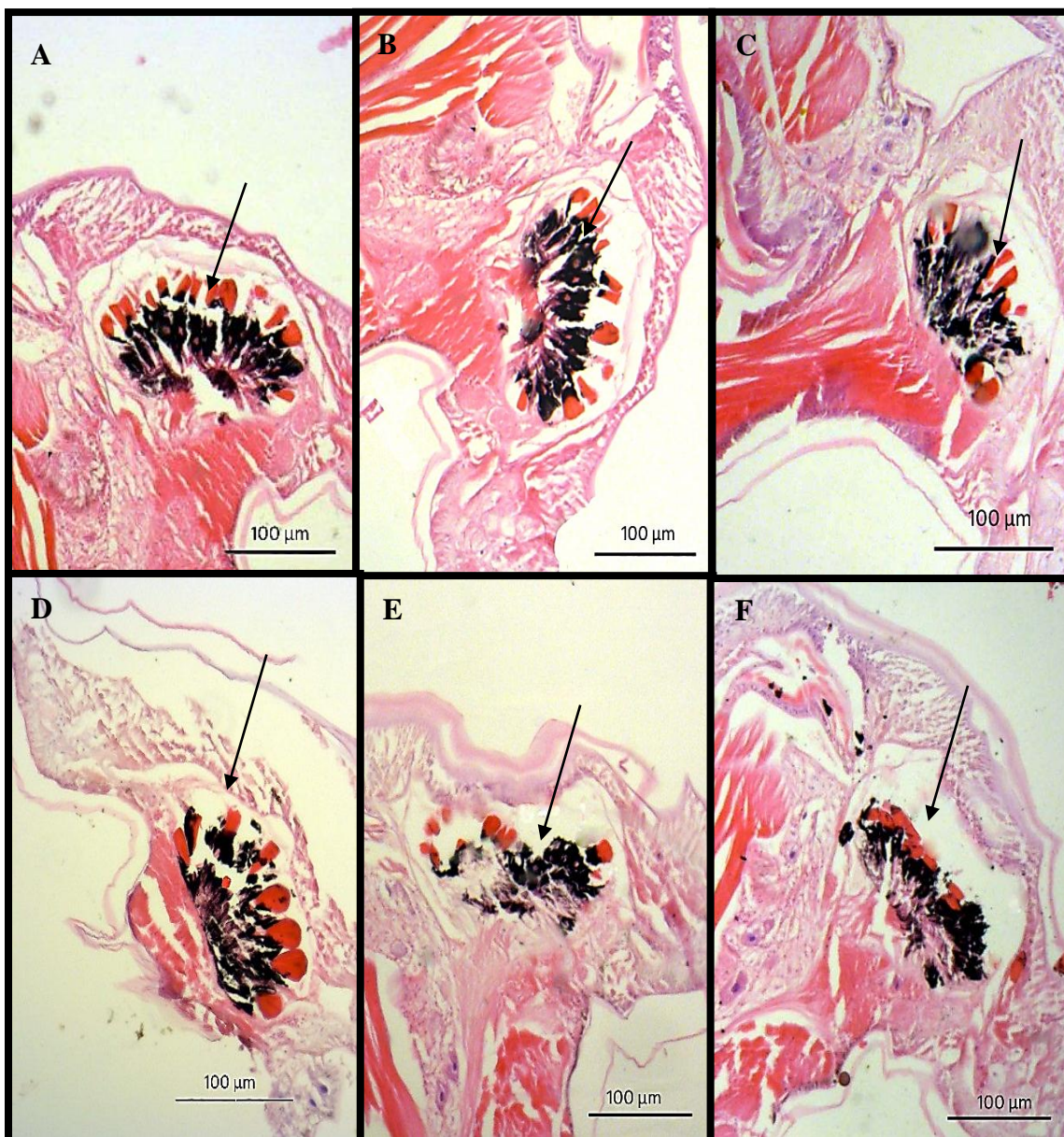


Fig. 12 corte histológico demonstrando os olhos dos *Dolops discoidalis*. Submetidos a CL_{50-24h} Fig. 12A Controle água, Fig. 12B Controle álcool, Fig. 12C Tratamento 20 µg/L, Fig. 12D Tratamento 40 µg/L, Fig. 12E Tratamento 60 µg/L, Fig. 12F Tratamento 80 µg/L. Escala de 100 µm. (Seta indica a alteração dos omatídeos conforme os tratamentos usados no teste da CL_{50 24h}).

Nota-se que após análise das amostras dos argulídeos submetidos ao teste da CL_{50-24h} do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi possível observar que houve alteração no sistema ocular destes parasitos.

Discussão

O óleo essencial extraído do *Cymbopogon citratus* apresenta um bom rendimento (acima de 1%) e seus constituintes majoritários assemelham-se aos de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* cultivados em outras regiões do país em diferentes lâminas de irrigação (Pinto et al., 2013; Macedo et al., 2015). Estas características tornam o óleo essencial do *C citratus* promissor para o cultivo e aplicação como um bioproduto na aquicultura.

Na aquicultura o *Citral* é o composto majoritário do óleo essencial extraído do *Cymbopogon flexuosus*, e tem eficácia comprovada como anestésico em alevinos do híbrido tambacu na concentração de 330µl/L (Lima-neto et al., 2016). Ao analisar o grupo dos Monoterpenos, os componentes *mentol*, *timol* e *carvona* mostraram-se ativos durante o tratamento contra ectoparasitos monogenoides de *Colossoma macropomum* e *Oreochromis niloticus* indicando efetivos na atividade antiparasitária de monogenias (Soares et al., 2017; Hashimoto et al., 2016).

Analisando os componentes monoterpenicos, o *geraniol* mostrou-se ativo durante o tratamento *in vitro* contra larvas de *Contracaecum* sp. em traíra *Hoplias malabaricus*, indicando atividade anti-helmíntica promissora contra o parasito supra-citado (Barros et al. 2009). O *geraniol* é um dos constituintes majoritários mais abundantes nos óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sp, conferindo a essas plantas potencial antiparasitário promissor para uso em piscicultura (Soares e Tavares-Dias 2013) este mesmo composto foi encontrado no óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Em óleos essencial extraídos de plantas do gênero *Lippia*, foram: *geranial*, *neral*, β -*cariofileno*, *carvona*, *limoneno*, *geraniol*, *mirceno*, 1,8-*cineole* e *germacreno D*, dentre outros que demonstraram atividade antiparasitária em *colossoma macropomum* (Soares, 2016).

Neste estudo, o *geraniol*, *neral* e *mirceno* que foram os compostos majoritários do óleo essencial do *Cymbopogon citratus*, apresenta-se como um potencial bioproduto no controle de ectoparasitos da família Argulidae (*Argulus* sp e *Dolops discoidalis*) e responsável pela mortalidade destes argulídeos.

O tratamento com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em representantes do *Argulus sp* e *Dolops discoidalis* apresentaram mortalidade máxima nas concentrações de 100 µg/L e 80 µg/L, respectivamente. Estas concentrações são inferiores das encontradas por Soares et al. (2017) na eficácia do tratamento com óleo essencial de *Lippia origanoides* em monógenas de brânquias de *Colossoma macropomum* que relataram a mortalidade máxima na concentração de 160 mg/L⁻¹. E também inferiores as apresentadas por Hashimoto et al. (2016) na eficácia do tratamento de monógenas parasitos de brânquias de peixes com óleo essencial de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* nas concentrações de 160 mg L⁻¹ e 320 mg L⁻¹, respectivamente.

Os testes do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* nos argulídeos são experimentos de curta duração que permitem respostas rápidas na estimativa dos efeitos tóxicos letais, a CL_(50-24h) determinada para o *Argulus sp* foi 76,3 µg/L e para o *Dolops discoidalis* foi 59,3 µg/L. Esses resultados de Concentração Letal 50% podem ser facilmente apresentados através de gráficos, como por exemplo a curva logística, usada para demonstrar que as porcentagens de organismos que exibem respostas adversas estão diretamente relacionadas com as concentrações utilizadas nos teste de CL_{50-24h} do óleo essencial. Buratini e Bertoletti (2014) afirmam que normalmente essa curva apresenta o formato de “S”. Esse fato ocorreu no presente estudo, pois a mortalidade dos argulídeos nos testes Cl_{50-24h} se deu em função das concentrações de exposição.

A mortalidade do *Argulus sp.* e *Dolops discoidalis* submetidos a CL_{50-24h} ocorreram na primeira hora de exposição do óleo essencial. Este resultado assemelha-se aos encontrados por Soares et al. (2017) que indicaram 100% de eficácia em até uma hora de exposição nas concentrações superior a 160 mg/L⁻¹. Com este resultado sugere-se banhos terapêuticos de curta duração de 30 a 60 minutos (Alexandrino e Raia, 1997) para o controle de argulídeos adultos (*Argulus sp* e *Dolops discoidalis*).

No tratamento contra *Argulus sp* Kumar et al. (2012) empregaram a substância de azadiractina EC 25% (SOM Phytopharma, Índia) que é um composto químico pertencente ao grupo monoterpene obtida da planta nenn, em teste *in vitro* da solução de azadiractina levou a uma mortalidade de 100% de *Argulus sp* nas concentrações de 20 e 15 mg L⁻¹ durante 2,5 e 3 h, respectivamente. Enquanto que, no teste *in vivo*, a eficácia 100% antiparasitária da solução de Azadiractina foi encontrada em 15 e 20 mg L⁻¹ por 72 e 48 h, respectivamente. A CL₅₀ por 48 horas foi de 20 mg L⁻¹.

Nas oviposições, do *Argulus* sp e *Dolops discoidalis* a mortalidade máxima ocorrem a partir do tratamento de 140 µg/L e 160 µg/L. segundo Gomes e Malta (2002) os ovos dos argulídeos são cobertos por uma camada gelatinosa que o encobre logo após a desova, esta camada endurece rapidamente ao entrar em contato com água, na qual protege e o fixa firmemente no substrato, neste contexto presume-se que esta camada protegeu as oviposições das concentrações de 20 µg/L e 40 µg/ onde não ocorreu mortalidade das oviposições. Contudo, a medida que aumenta as concentrações do O.E de *C. citratus*, aumenta a mortalidade das oviposições.

A Concentração Letal necessária para inibir 50% das oviposições do *Argulus* sp e *Dolops discoidalis* foram bem próximas (99,7 µg/L e 99,3 µg/L respectivamente), no entanto, não foram encontrados trabalhos relacionados ao tratamento das oviposições parasitárias na aquicultura. Porém, Macedo et al. (2015) ao estudar a eficácia do óleo *C. citratus* na inibição das oviposições parasitárias de *Haemonchus contortus* (nematóide de ruminante), determinou que a concentração necessária para inibir 50% das eclosões dos ovos foi 0,14 mg/mL⁻¹. O componente químico majoritário do óleo essencial no referido estudo foi o *Citral*, na qual indica esta substância como responsável pela atividade de inibição das posturas.

O efeito do óleo essencial de *C. citratus* sobre a morfologia dos argulídeos, e todas as estruturas observadas (antênulas, olhos, olho “nauplius”, pereion, pleon, segunda antena, primeira maxila, segunda maxila, área respiratória superior e área respiratória inferior), a estrutura que apresentou alteração foram os olhos dos argulídeos. O sistema visual dos crustáceos é constituído por olhos compostos que contêm milhares de unidades ópticas, chamadas de omatídeos (Brusca e Brusca, 2007), morfologicamente notou que tanto nos *Argulus* sp quanto no *Dolops discoidalis* houve alteração no formato dos omatídeos nos tratamentos com o óleo essencial.

O omatídeo é a estrutura do sistema ocular dos argulídeos que distingue a claridade da escuridão, cada omatídeo consiste em córnea, cone cristalino, células pigmentares e o rabdoma. Cada omatídeo recebe estímulos visuais de um ponto diferente que o omatídeo vizinho (Boulhosa, 2011), pressupõe que esta situação acentua a sensibilidade dos olhos compostos, evidenciando a sensibilidade dos olhos frente a substâncias presentes na água.

Neste trabalho, os resultados obtidos através do teste CL_{50-24h} do óleo essencial de *C. citratus* demonstram que este óleo é promissor no controle deste parasito adulto e nas

oviposições. Estas concentrações estão abaixo das concentrações em que o *citral* atua como anestésico em alevinos do híbrido tambacu na concentração de 330µl/L (Lima-neto et al., 2016) o que possibilita investigar a aplicabilidade deste óleo em peixes parasitados.

O óleo essencial é um produto de origem natural e com características voláteis, e apresenta um efeito residual no ambiente menor os quimioterápicos usados no controle parasitário na aquicultura. Porém, são necessários estudos para implementação de protocolos farmacológicos e terapêuticos visando o controle de argulídeos, bem como o aprimoramento do manejo de animais de interesse zootécnico.

Agradecimentos

Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos, Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBBEx) e Laboratório de Química Multiusuário.

Financiamento

A Rede Norte de Pesquisas e Aplicações Sobre Óleos Típicos da Amazônia através do Programa Pró-Amazônia-CAPES

Referencias do artigo (normas *Journal Experimental Biology*)

Alexandrino, A. C e Raia, R. (1997). *Patologia dos peixes*. São Paulo, São Paulo.

Buratini, S. V. e Bertoletti, E. (2014). Análise estatística. *In: Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. (eds. Zagatto, P. A. e Bertoletti, E.) São Carlos, São Paulo.

Boulhosa, S. M. P. (2011). Estrutura do olho do *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (CRUSTACEA, DECAPODA, PALAEMONIDAE): estudo utilizando microscopia óptica de varredura. *Dissertação*. Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.

Brusca, R. C. e Brusca, G.J. (2007) Invertebrados in: Invertebrados (eds. Brusca, R. C. e Brusca, G.J.). Guanabara Koogan.

- Castro, F. J e Fernandes, M. N.** (2009). Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. In: *Manejo e sanidade de peixes em cultivo* (ed. Tavares-Dias), pp.3861-388. Macapá, Amapá.
- Ekanem, A. P., Obiekezie, A., Knopf, K.** (2004). Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitol Revist.* **92**, 361–366.
- Evans, J. J; Klesius, P. H., Pasnik, D. J. e Shoemaker, C.** (2007). A Influence of natural *Trichodina* sp. parasitism on experimental *Streptococcus iniae* or *Streptococcus agalactiae* infection and survival of young channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Aquacult. Res.* **38**, 664-667.
- Gomes, A. L. S e Malta, J. C. O.** (2002). Postura, desenvolvimento e eclosão dos ovos de *Dolops carvalhoi*; Lemos de Castro (Crustácea, Branchiura) em laboratório, parasita de peixes da Amazônia Central. *Rev. Bra. Zool.* **19**, 141 – 149.
- Hashimoto, G. S. O., Marinho-Neto, F., Ruiz, M.L, Acchile, M., Chagas, E.C., Chaves, F. C. M. e Martins, M.L.** (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquacult. Res.* **450**, 182–186.
- Kumar, S., Raman, R. P., Kumar, K., Pandey, P. K., Kumar, N., Mohanty, S e Kumar, A.** (2012) In vitro and in vivo antiparasitic activity of Azadirachtin against *Argulus* spp. in *Carassius auratus* (Linn. 1758). *Parasitol. Res.* **110**, 1795-1800.
- Lemos de Castro, A.L.** (1985). Branchiura; In *Manual de Identificação de Invertebrados Límnicos do Brasil* (ed. Schaden, R.) 1985. Brasília, CNPQ.
- Lima- Neto, J.D., Sena, A. C. e Copatti, C. E.** (2016). Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female). *Bol. Inst. Pes.* **42**, .727-733.
- Macedo, I. T. F., Oliveira, L. M. B., Ribeiro, W. L.C., Santos, J.M.L., Silva, K.C., Araujo-filho, J. V., Carmuça-vasconcelos, A. L. F. e Bevilaqua, C. M. L.** (2015). Anthelmintc

activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. *Rev. Bra. Parasitol.* **24**, 268-275.

Malta, J. C. O e Varela, A. M. B. (1983). Os *argulídeos* (Crustacea: Branchiura) da Amazônia brasileira 3. Aspectos da ecologia de *Dolops striata* Bouvier, 1899 e *Dolops carvalhoi* Castro, *Acta Amaz.* **13**,299-306.

Ming, L. C., Figueiredo, R.O., Machado S. R. e Andrade, R. M. C. (1996). Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf).*Acta Hort.* **426**,555-559.

Ortiz, R.S., Marrero, G. V e Navarro, A. L. T. (2002) Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Caña Santa). *Rev. Cub. Pl. Med.* **7**, 89-95.

Pinto, D. A., Mantovani, E. C., Melo, E. C; Sedyama, G.C. e Vieira, G. H. S. (2013). Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2016**, 54-61.

Santos, F. C. C. e Vogel, F. S. F. (2012) Avaliação *in vitro* da ação do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Pl. Med.***14**, 712-716.

Santos, A., Paduan, R. H., Gazin, Z. C., Jacomassi, E., Oliveira, P. S., Cortez, A.G. e Cortez, L. E. R. (2009). Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. *Bra. Jour. Phar.* **19**, 436-441.

Soares, B. V. e Tavares-Dias, M. (2013). Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Bio. Amaz.* **3**, 09–123.

Soares, B.V. (2016). Efeito antiparasitário e fisiológico de *Lippia* spp. (Verbenaceae) em *Colossoma macropomum* e uso dessas plantas na medicina veterinária e aquicultura. Estado Amapá, Brasil. *Dissertação* Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá.

Soares, B.V., Cardoso, A. C. F; Campos, R. R., Gonçalves, B. B., Santos, G. G., Chaves, F. C. M.; Chagas, E. C. e Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic, physiological and

histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquacult. Res.* **469**, 72–78.

Sousa, L. H. M. (2014). Perfil morfológico do desenvolvimento da retina em larvas de Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e do híbrido Tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomus*). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará.

Vasconcelos, H. C. G. (2014). Crustáceos Ectoparasitos de Seis Espécies de Peixes do Reservatório Coaracy Nunes, Estado Amapá, Brasil. *Dissertação* Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá.

Walker, P. D., Flik, G. e Bonga, S.W. (2004). The biology of parasites from the genus *Argulus* and a review of the interactions with its host. *Symp Soc Exp Biol.* **55**,107-129.

Considerações Finais

O uso de produtos naturais no controle de ectoparasitos é um campo em ascensão e com grandes expectativas de crescimento na aquicultura. Este trabalho é o primeiro estudo com o uso de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no controle de ectoparasitos de peixes da família Argulidae. Contudo, estudo em peixes infectados devem ser realizados para a indicação deste óleo na aquicultura, uma vez que neste trabalho foram determinadas as concentrações que ocorram a mortalidade desses ectoparasitas adultos e em oviposições através do teste CL_{50-24h} com O.E de *C. citratus*. A utilização desta substância deve ser considerada devido às evidências de suas substancias bioativas com potencial uso no controle parasitário.

Referências

- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46:446–475.
- Barnes, R.S.K.; Calow, P.; Oliver, P.J.W.; Golding, D.W.; Spicer, J.L. 2008. *Os invertebrados Uma síntese*. Atheneu, São Paulo. 495 pp.
- Brasil. 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Anvisa. Brasília:, 126pp.
- Brasil. 2014. Instrução normativa, número 24, 4 de junho de 2014. ANVISA, D.F. Brasília.
- Brasil. 2017. Portal Brasil, (www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa). Acesso em 30 de agosto de 2017.
- Castro, F. J.; Fernandes, M. N. 2009. Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. In: Tavares-dias, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Embrapa, Amapá, Macapá p. 361-388.
- Chagas, E.C.; Maciel P.O.; Porto S.M.A.; Majolo, C.; Boijink C.L. 2015. *Protocolos para Emprego de Óleos Essenciais no Controle de Monogenoídeos, Parasitas de Brânquias de Peixes*. Embrapa Amazônia Ocidental, Amazonas, Manaus. 32pp.
- Chakraborty, S. B.; Horn, P.; Hancz, C. 2013. Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 5:1-19.
- Dotta, G.; Brum, A.; Jerônimo, G. T.; Maraschin, M.; Martins, M. L. 2015. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitismo in Nile tilapia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, 24:66-71.
- Ekanem, A.P.; Obiekezie, A. ; Kloas, W. ; Knopf, K. 2004. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitol Revista*, 92: 361–366.

Evans, J.J.; Klesius, P.H.; Pasnik, D.J.; Shoemaker, C. 2007, A Influence of natural *Trichodina* sp. parasitism on experimental *Streptococcus iniae* or *Streptococcus agalactiae* infection and survival of young channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Aquaculture Research*, 38: 664-667.

FAO. 2016. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Organizações das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, Roma. 224 pp.

Gomes, A.L.S.; Malta, J.C.O. 2002. Postura, desenvolvimento e eclosão dos ovos de *Dolops carvalhoi*; Lemos de Castro (Crustácea, Branchiura) em laboratório, parasita de peixes da Amazônia Central. *Revista Brasileira de Zoologia* 19 (2): 141 – 149.

Hashimoto, G.S.O.; Marinho Neto, F.; 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.

Lamarre, E.; Cochram, P. A. 1992. Lack of host Species selection by the exotic parasitic crustacean, *Argulus foliaceus*. *Journal Freshwater Ecology*, 7: 77-80. 1992.

Lemos de Castro, A. L 1985. Branchiura; p. 1-23 In Schaden, R. 1985. *Manual de Identificação de Invertebrados Límnicos do Brasil*. CNPQ, Brasília.

Luque J.L. 2004. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Revista Brasileira Parasitologia*, 13(1):161-165.

Macedo, I.T.F; Oliveira, L.M.B.; Ribeiro, W.L.C. Santos, J.M.L.; Silva, K.C.; Araujo-filho, J.V.; Carmuça-vasconcelos, A.L.F.; Bevilaqua, C.M.L. 2015. Anthelmintc activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. *Ver. Bras. Parasitol.* 24(3):268-275.

Malta, J.C.O.; Varela, A.M.B. 1983. Os *argulídeos* (Crustacea: Branchiura) da Amazônia brasileira 3. Aspectos da ecologia de *Dolops striata* Bouvier, 1899 e *Dolops carvalhoi* Castro, *Acta Amazônica*, 13(2):299-306.

Malta, J.C.O.; Varela, A.M.B. 2000. *Argulus chicomendesi* sp. n. (Crustacea: Argulidae) parasita de peixes na Amazônia brasielira. *Acta amazonica* 30 (1):481-498.

Matos, F.J.A. 2000. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. Fortaleza: UFC 344 p.

Nascimento, I.B. do; Innecco, R.; Marco, C.A.; Mattos, S.H.; Nagao, E.O. 2003. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo. *Revista Ciência Agronômica*, 34: 169-172.

Nascimento, P. F. C.; Nascimento, A. L. C.; Rodrigues, C. S.; Antonioli, A. R.; Santos, P. O.; Barbosa Júnior, A. M.; Trindade, R. C. 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, 17:108-113.

Neethling, L.A.M.; Avenant-oldewage, A. 2016. Branchiura, a compendium of the geographical distribution and a summary of their biology. *Crustaceana* 89 (11-12):1243-1446.

Ortiz R.S; Marrero G.V; Navarro, A.L.T. 2002. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Caña Santa). *Rev Cubana Plant Med* 7: 89-95.

Pinto D.A.; Mantovani E.C.; Melo E. de C.; Sedyama, G.C.; Vieira G.H.S. 2013 Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 2016: .54-61.

Ranzani-paiva, M. J. T.; Silva-Souza, A. T. 2004. *Hematologia de peixes brasileiros. Sanidade de organismos aquáticos*. Varela, São Paulo. 120pp.

Reverter, M.; Bontemps, N.; Lecchini, D.; Banaigs, B.; Sasal, P. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 443, p. 50-61, 2014.

Santos, F.C.C.; Vogel, F.S.F.2012. Avaliação *in vitro* da ação do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 14:712-716.

Santos, A.; Paduan, R.H.; Gazin, Z.C.; Jacomassi, E.; Oliveira, P.S.; Cortez, A.G.; Cortez, L.E.R. 2009. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(2): 436-441.

Shimura, S. 1983 Seasonal occurrence, sex ratio and site preference of *Argulus coregoni* Thorell (Crustacea: Branchiura) parasitic on cultured freshwater salmonids in Japan. *Parasitology* 86(3): 537-552.

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.; Chagas, E.C.; Tavares-Dias, M. 2015. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological. *Aquaculture*.

Takemoto, R. M.; Lizama, M. A.; Guidelli, G. M.; e Pavanelli, G. C. 2004. Parasitos de peixes de águas continentais. p. 179-197, *In: Ranzani-paiva, M. J. T.; Silva-Souza, A. T. 2004. Hematologia de peixes brasileiros. Sanidade de organismos aquáticos v. 1. Varela, São Paulo. 120pp.*

Vasconcelos, H.C.G. 2014. *Crustáceos Ectoparasitos de Seis Espécies de Peixes do Reservatório Coaracy Nunes, Estado Amapá, Brasil*. 2014. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá. 85pp.

Wu, Z. F.; Zhu, B.; Wang, Y.; Lu, C.; Wang, G. X. 2011. In vivo evaluation of anthelmintic potential of medicinal plant extracts against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 108:1557-1563.

Zhang, Q.; Xu, D.H.; Klesius, H. P. 2013. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, 198:45–53.

Anexo A

Normas para submissão de artigo para revista *Journal Experimental Biology* Esta revista possui o fator de impacto 1.095 e qualis-CAPES B1 na área de Biodiversidade.

Periódicos			
0022-0949	JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY	BIODIVERSIDADE	A2
1477-9145	JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY (ONLINE)	BIODIVERSIDADE	A2

1. General information

JEB requires authors to submit their manuscripts online using the [Bench>Press manuscript processing system](#). Authors are required to read our [journal policies](#) before preparing their manuscripts, and all manuscripts should adhere to the journal's [terms of submission](#). All pre-submission or general editorial queries should be directed to the [Editorial Office](#).

1.1. New submissions – format free

To make manuscript submission as easy as possible for authors, JEB allows format-free submission.

At first submission, authors may submit their manuscript in any format; however, we do encourage authors to read the [manuscript preparation](#) guidelines below and to consider how easy a manuscript is to read by reviewers and editors (e.g. line spacing, line numbers).

All manuscripts must adhere to our guidelines regarding [manuscript length](#).

1.2. Revised submissions

On JEB, >95% of revised submissions are accepted for publication.

All revised manuscripts should adhere to the guidelines below on preparing [text and tables](#), [figures](#), [movies](#) and [supplementary information](#).

Authors should complete and submit a [submission checklist](#) with their manuscripts. This form asks authors to confirm that they have followed best practice guidelines regarding experimental subjects, data reporting and statistics. The checklist is based on the [NIH Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research](#) and is intended to help ensure high standards for reporting and to aid reproducibility.

2. Manuscript length

The following table shows the maximum word count of the main text (including the main text and figure legends, but not the title page, abstract, materials and methods section or reference list) and maximum number of display items (figures and tables) for different article types.

Article type	Maximum word count	Maximum no. of display items
Research Article	7000	10

Articles exceeding the limits specified above will be returned to authors at submission. Note that final word limits will depend on the paper submitted and are at the discretion of the Editors.

Short Communications	2500	3
Methods & Techniques	2500	3
Review	7000	8
Commentary	4500	5

Preparing the text and tables

The information below relates to a standard Research Article. For all other article types, please refer to the style and layout guidelines provided on our [article types](#) page.

3.1 File formats

For manuscript text and tables, our preferred **file format** is **Microsoft Word .docx** (or **.doc**). We also accept Pages (rtf format) and LaTeX.

Please include tables as part of the manuscript file. Tables must be editable and not embedded as an image.

If you are submitting a LaTeX file, please include any component files, such as .st (style file), .cls (class file) and .bib (bibliography file) in your file submission. Please note that LaTeX files will be converted to Microsoft Word files during the production process and that authors will be required to check the conversion of symbols and special characters carefully at the proofing stage.

For mathematical equations, our preferred file format is MathType. We also accept Equation Editor (Microsoft Word) and LaTeX.

3.2. Article sections

3.2.1. Title page

This section should include a **title** of 120 characters or less that clearly and concisely summarises your specific findings and avoids specialist abbreviations, a **running title** of 40 characters or less, the full **names** (including middle initials) **and affiliations of all authors** (including present addresses for authors who have moved), and the **corresponding author's email address**. Please note any cases where authors contributed equally to the work. Please also include **3-6 key words** for indexing purposes (select key words that will make your manuscript easily searchable).

3.2.2. Summary statement

Provide a brief Summary Statement for use in emailed and online tables of content alerts. The text should be between 15 and 30 words, and should explain, without overstatement, why someone should read the article. Please do not simply repeat the title, and avoid unfamiliar terms and abbreviations, as the text should be comprehensible to non-experts. We reserve the right to edit the text.

3.2.3. Abstract

Provide a brief abstract of no more than 250 words for Research Articles (150 words for Short Communications and Methods & Techniques). This should succinctly and clearly introduce the topic of the

paper, summarise the main findings and highlight the significance of the data and main conclusions. The abstract is used by abstracting services without modification and is often read more frequently than the full paper and therefore needs to be comprehensible in its own right. Do not include subheadings or references, and avoid any non-standard abbreviations.

3.2.4. Introduction

This section should succinctly provide the background information that is required to set the results into their proper biological context. It should not contain subheadings.

3.2.5. Materials and methods

This section should include sufficient detail to understand and to replicate the experiments performed, in conjunction with cited references. To facilitate detailed description of materials and methods (allowing the reader to fully understand and replicate the experimental protocols), this section does not count towards the word limit for article length. The materials and methods should be divided into sections, and should include subsections detailing reagents, animal models and statistical analysis. Provide names and locations (town, state, country) for ALL equipment and reagent suppliers. Give Latin names and taxonomic authority (e.g. Linnaeus) for all experimental species. Reporting standards should follow those recommended in our [journal policies](#) and [submission checklist](#).

3.2.6. Results

This section should describe the results of the experiments performed and should be broken up by subheadings to organise the findings presented and walk the reader through the results. Reproducibility of results must be included – see our [submission checklist](#) for further information. Please ensure that the distinction between new results and published findings/established facts is clear.

3.2.7. Discussion

This section should explain the significance of the results and should place them into the broader context of the current literature. The Discussion may contain subheadings to highlight important areas that are expanded on in the text.

3.2.8. Acknowledgements

This section should mention any individuals or groups that are not named as authors but have contributed to the research presented (e.g. in terms of reagents, time, expertise) or writing of the manuscript.

3.2.9. Competing interests

Include a statement to identify any potential influences that readers may need to know about when thinking about the implications of the presented research. For more specific information regarding the affiliations and associations that must be disclosed, please see our [journal policies](#) page. Authors without financial or competing interests should explicitly assert this and include the statement 'No competing interests declared'.

3.2.10. Funding

Details of all funding sources must be provided. It is the responsibility of the corresponding author to provide the relevant funding information from ALL authors. Please provide the official funding agency name as listed on the [Crossref Funder Registry](#), i.e. 'National Institutes of Health', not 'NIH', and all relevant grant numbers. If your Funder is not listed in the Registry, please provide the name in full.

Where individuals need to be specified for certain sources of funding, please add initials after the relevant agency or grant number. Please use the following format: This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council

[hfygr667789]. Where no specific funding has been provided for the research, please state ‘This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors’.

3.2.11. Data availability

All publicly available datasets supporting your work should be included in the Data availability section. Details should include repository name, identifier such as accession number or doi and, where possible, include a hyperlink to the URL of the dataset. Datasets should be made publicly available at the time of publication. For more information on our data deposition requirements, see our [Journal Policies](#).

Please note that JEB endorses the [Force 11 Data Citation Principles](#) and recommends that references to datasets should also be included in the reference list with DOIs/accession numbers and hyperlinks, where available.

3.2.12. References

All references cited in the text, tables and figure legends should be included in a single reference list at the end of the article. We strongly encourage the citation of the primary literature over review articles wherever possible, and for this reason do not have a limit on the number of references that can be included. For specific information about reference formatting, please see the [references](#) section below.

3.2.13. Figure legends

Figure legends should be listed at the end of the manuscript. The first sentence of the legend should summarise the figure and be in bold. Each figure legend should stand alone and should contain enough information to ensure that the figure is understandable without having to refer to the main text. Figure panels should be labelled with uppercase letters (A, B, C, etc.), and each panel should be described in the legend. Any abbreviations not given in the main text should be defined. For further details on what should be included in figure legends, please refer to our [submission checklist](#).

3.2.14. Appendices

This optional section can be used for information that is critical to the manuscript but would interrupt the flow of the article and is not suitable for inclusion as [supplementary information](#). It should be formatted according to normal journal style. All figures, tables and equations should be numbered separately from the main text as Fig. A1, Table A1, Eqn A1, etc. Please note that the text, figures and tables in an Appendix count towards the overall [manuscript length](#).

3.3. Preparing the text

3.3.1. General information

- Prepare manuscripts in English (either US or UK spelling is acceptable but be consistent within the manuscript). Your writing should be comprehensible to editors and reviewers, and your writing style should be concise and accessible. If English is not your first language, please consider using a language editing service prior to submission.
- Ensure that the language in your manuscript is original and does not contain previously published passages of text (including those from your own publications) – see our [journal policies](#) for more details. All accepted manuscripts are routinely screened using plagiarism-detection software.
- Use 1.5 line spacing and continuous line numbering throughout the paper in order to facilitate online reviewing.
- Do not embed figures in the text.
- Cite each figure, table and movie in the text in numerical order. Figure or table parts should be labelled with uppercase letters (A, B, C, etc.). Use the following format for citations: Fig. 1A,B or Figs 1, 2 or Table 1 or Movie 1.

- If necessary, display equations should be cited using the following format: Eqn 1.
- For supplementary figures, tables and equations, cite as Fig. S1, Table S1, Eqn S1.
- Define abbreviations at first mention and include a List of Symbols and Abbreviations used.
- For special characters not available on a standard keyboard (e.g. Greek characters, mathematical symbols), use the Symbol font or the ‘Insert Symbol’ function in Microsoft Word, where possible. For special characters that are not available via this route, please use MathType characters; do not use embedded images (e.g. GIF).

3.3.2. Units and nomenclature

- Units of measurement should follow the SI system, e.g. ml s⁻¹ rather than ml/s. Guidance on using the SI convention can be found [here](#). Type a space between a digit and a unit, e.g. 1 mm (except 1%, 1°C).
- Use s.e.m. and s.d. for standard errors, etc.
- Taxonomic nomenclature: the Latin names and taxonomic authority (e.g. Linnaeus) should be provided for all experimental species. All species names should be italicized.
- Genetic nomenclature: gene names should be in italic type, but the protein product of a gene should be in Roman type. Genetic nomenclature should be in accordance with established conventions and should be approved by the relevant nomenclature curator if applicable. See below for some relevant links.
- HGNC list of genome databases: <http://www.genenames.org/useful/all-links#ovgdb>
- *Caenorhabditis elegans*: <http://www.wormbase.org>
- *Dictyostelium*: <http://dictybase.org/>
- Chicken: <http://birdgenenames.org/cgnc/guidelines>
- *Drosophila*: <http://flybase.org/wiki/FlyBase:Nomenclature>
- Human: <http://www.genenames.org/about/guidelines>
- Maize: http://www.maizegdb.org/maize_nomenclature.php
- Mouse: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/lists/lists.shtml>
- *Saccharomyces cerevisiae*: <http://www.yeastgenome.org/>
- *Schizosaccharomyces pombe*: <http://www.pombase.org/submit-data/gene-naming-guidelines>
- *Xenopus*: <http://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>
- Zebrafish: <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

3.3.3. References

3.3.3.1. References in text

References in the text should be cited using the Harvard (name, date) referencing system.

Each reference cited in the text must be listed in the Reference list and vice versa: please check these carefully. Where references are cited only in supplementary information, please provide a separate supplementary reference list and do not include these in the main reference list.

Literature citations in text are as follows.

- One author – (Jones, 1995) or (Jones, 1995; Smith, 1996).
- Two authors – (Jones and Kane, 1994) or (Jones and Kane, 1994; Smith, 1996).
- More than two authors – (Jones et al., 1995) or (Jones et al., 1995a,b; Smith et al., 1994, 1995).
- Manuscripts accepted for publication but not yet published: include in Reference list and cite as (Jones et al., in press).
- Manuscripts posted on preprint servers but not yet published: include in Reference list and cite as (Smith et al., 2016 preprint).
- Citation of unpublished work: we discourage citation of unpublished data; if it is necessary, use the format (S. P. Jones, unpublished observations/data). Unpublished data cannot be included in the Reference list.
- PhD theses: include in Reference list and cite as (Smith, 2016).
- Website URLs: cite in the text but do not include in the Reference list; provide the URL and, if the website is frequently updated, the date that the site was accessed.
- Personal communications (i.e. the unpublished observations of other scientists): when a person who is not an author on the paper is the source of unpublished data, those data should be cited as a personal communication

using the format (full name, institution, personal communication). Personal communications should not be cited in the Reference list and will only be published when substantiated by written permission (e.g. email) from the scientist cited.

- Dataset: we recommend that all publicly available datasets are fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a DOI. Cite as (Jones and Jane, 1994).

3.3.3.2. Reference List

References are listed in alphabetical order according to surname and initials of first author.

- Use the following style:

Journal

Rivera, A. R. V., Wyneken, J. and Blob, R. W. (2011). Forelimb kinematics and motor patterns of swimming loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): are motor patterns conserved in the evolution of new locomotor strategies? *J. Exp. Biol.* **214**, 3314-3323.

Book

Hochachka, P. W. and Somero, G. N. (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Book chapter

Feller, G. (2008). Enzyme function at low temperatures in psychrophiles. In *Protein Adaptation in Extremophiles* (ed. K. S. Siddiqui and T. Thomas), pp. 35-69. New York: Nova Science Publishers, Inc.

Preprint server

Baillie-Johnson, P., van den Brink, S. C., Balayo, T., Turner, D. A. and Martinez Arias, A. (2014). Generation of aggregates of mouse ES cells that show symmetry breaking, polarisation and emergent collective behaviour in vitro. *bioRxiv* doi:10.1101/005215.

PhD thesis

Jones, A. R. (2016). Title of thesis. *PhD thesis*, University of Washington, Seattle, WA.

Dataset with persistent identifier

Zheng, L.-Y., Guo, X.-S., He, B., Sun, L.-J., Peng, Y. and Dong, S.-S. (2011). Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *GigaScience Database*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Kingsolver, J. G., Hoekstra, H. E., Hoekstra, J. M., Berrigan, D., Vignieri, S. N., Hill, C. E., Hoang, A., Gibert, P. and Beerli, P. (2001). Data from: The strength of phenotypic selection in natural populations. *Dryad Digital Repository*. <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.166>.

- If there are more than 10 authors, use 'et al.' after the 10th author.
- Within a group of papers with the same first author, list single author papers first, then papers with two authors, then et al. papers. If more than one reference exists for each type, arrange in date order. Use a and b for papers published in the same year.
- 'In press' citations must have been accepted for publication and the name of the journal or publisher included.

3.4. Preparing tables

Prepare tables in 'cell' format and include in the same file as the main text. Tables must be editable and not embedded as an image.

The title of the table should be a single sentence and should summarise the contents of the table. Details referring to one or more isolated item(s) in the table are best given in a table footnote. Units should be given in parentheses at the top of each column (do not repeat in the table).

3.5. Preparing display equations

Our preferred file format for equations is MathType. We also accept Equation Editor (Microsoft Word) or LaTeX.

Please number all display equations, consecutively. They should take the form:

$$\dot{Q} = \frac{-\kappa A_p [P]}{\mu T_p}, \quad (1).$$

Units should be defined in the text rather than included in the equation.

[Back to top](#)

4. Preparing figures

4.1. General information

Figures should be numbered in a single series that reflects the order in which they are referred to in the text.

Figures should be prepared at the smallest size that will convey the essential scientific information; final figure size is at the discretion of the journal. For further information on how to arrange your figures to optimise viewing by reviewers and readers, download our [figure layout](#) guidelines.

At initial submission, you may submit a single PDF file containing all text and figures. Once an article has been accepted for publication, you are required to submit separate files for each figure (see below for file formats).

Figure legends should be included in the main text file and not in the figure file.

There are no charges for the use of colour in figures, although gratuitous use of colour in graphs and diagrams should be avoided and colour should only be used to improve scientific clarity.

We strongly encourage the use of colours that are suitable for colour-blind readers, particularly in the preparation of fluorescent microscopy images. Most notably, we discourage the use of red/green for the display of 2-channel images; authors should consider an alternative colour combination (e.g. magenta/green).

4.2. Preparing graphs and diagrams (line art)

4.2.1. General information

- The maximum figure size, including lettering and labels, is 180 mm × 210 mm.
- Line thicknesses and symbols should be of sufficient size to ensure clarity if the figure is reduced in size.
- For graphs, our preferred symbols are filled and open circles, triangles, squares, or diamonds; where possible, the same symbol should be used for the same entity in different figures.
- Colour: supply line art in RGB (not CMYK) mode, as this maximizes colour quality and is how the figures will be displayed online; do NOT use Spot, Pantone or Hex colours and do NOT assign a colour profile.
- Text labelling: use 12 pt bold uppercase letters (A, B, C, etc.) to distinguish figure panels; other labelling should be 8 pt Arial font (sentence case) (headings should be bold); for gene sequences, use Courier font to ensure that each letter is the same width; use Symbol font for Greek characters.

4.2.2. File formats

Authors should submit their source figures in an editable format (vector graphic) that retains font, line and shape information. This format ensures that we can edit where necessary and produce high-quality print and online PDFs.

We accept the following file formats for graphs/line art: EPS, PDF, and WMF.

- Applications such as Adobe Illustrator, Canvas, DeltaGraph, Corel Draw, Freehand, MatLab and SigmaPlot provide these formats.
- Please ensure that you 'export' or 'save' with (text/font) information included
- Save text/font information as 'text' not 'curves' or 'outlines'.
- If combining images, always 'embed' images; do NOT simply 'link' them. In Adobe Illustrator, copying and pasting or dragging an image directly from Adobe Photoshop will embed the image. Alternatively, if you use the 'Place' command, uncheck 'Link' in the dialogue box. For other software applications, please refer to the documentation (often there will be a 'link', 'proxy', 'OLE' or 'OPI' option, which must NOT be used with EPS files).
- *Note that submission of JPEG or TIFF format for graphs/line art may delay production of your article.*

4.3. Preparing photographic images

4.3.1. General information

Photographic images (also known as bitmap images) are made up of pixels (e.g. light, fluorescence and electron microscopy, gels, and traditional photography)

- The maximum figure size, including lettering and labels, is 180 mm x 210 mm.
- Images should be saved at a resolution of 300 pixels per inch. Any image quality option should be set to maximum.
- For micrographs, use a scale bar to show the magnification and give the length of this in the figure legend.
- Colour: supply images in RGB (not CMYK) mode, as this maximizes colour quality and is how the figures will be displayed online; do NOT use Spot, Pantone or Hex colours and do NOT assign a colour profile.
- Text labelling: use 12 pt bold uppercase letters (A, B, C, etc.) to distinguish figure panels; other labelling should be 8 pt Arial font (sentence case) (headings should be bold); for gene sequences, use Courier font to ensure that each letter is the same width; use Symbol font for Greek characters.

4.3.2. File formats

Accepted file formats are: **EPS/PDF** (vector based, such as Adobe Illustrator).

- EPS / PDF format for figures with mixed data, such as line drawn vector-graphs and Photographic Images.
 - TIFF format with text-layers enabled, for Photographic Images only.
 - ARIAL or HELVETICA must be the font choice used throughout figure preparation.
- PowerPoint images:** we do NOT accept PowerPoint files. Instead, please save as PDF using the instructions below.
- Go to 'print' and then choose 'Save as PDF' in the print dialogue box
 - You can download free software which will enable you to print EPS/PDF files to disk: [Download software for Windows](#)
[Download software for Mac](#)

4.4. Image manipulation

Any alterations made to figures using computer software must be consistent with our [image manipulation](#) policy. The images presented in the manuscript must remain representative of the original data, and the corresponding author will be asked to confirm this at submission. Please read our requirements for

preparing your figures ([download PDF](#)) to avoid a potential delay in the publication process or rejection on the basis of non-compliance with these guidelines.

All accepted manuscripts are routinely screened by our production department for any indication of image manipulation. If evidence of inappropriate manipulation is detected, the journal's Editors might ask for the original data to be supplied and, if necessary, may revoke the acceptance of the article.

4.5. Figure permissions

It is the responsibility of the author to obtain permission to use figures from another publication in any article submitted to JEB and to ensure that any such use is credited to the source. Any fees associated with use of the figure are the responsibility of the author. Written permission from the author and/or publisher of the original material, as appropriate, should be provided at the time of submission, otherwise publication may be delayed. If a figure has been modified from a previously published figure, please check with the copyright owners to see whether permission is required and include a complete citation/reference for the original article.

5. Preparing movies

Our preferred **file format** for movies is **.mp4**, but we also accept .mov. Movies should be prepared at the smallest file-size that will convey the essential scientific information. We have a limit of 500 MB for all movie files. If your movies exceed this limit, please contact the [Editorial Office](#) for advice before submission. Please include the titles and captions of all movies in your supplementary information PDF (see section on preparing [supplementary information](#)). Please keep captions as short as possible and ensure that they explain what is being shown in the movie and any necessary details of how the movie was made.

Movies should be numbered in a single series that reflects the order in which they are cited in the text, e.g. see Movie 1. Movie 2, etc. Please do not use alphabetical labelling, e.g. Movies 1A-C should be relabelled as Movies 1-3.

All movies will play in place in the full-text online version of the article and a link to each movie will be included in the supplementary information PDF.

When preparing your movies, please note the recommendations below :

- Use a resolution of no greater than 1280x720 (720p), as most readers will view on a desktop or mobile device
- Use a well-characterized video compression codec such as H.264 and use multi-pass encoding if available
- Do not exceed a bitrate of 2500mbps for 720p H.264-encoded video
- Keep duration to the minimum required to illustrate your point
- Do not include an audio track unless it is essential
- If including audio, use a well-characterized audio compression codec such as AAC
- Do not exceed a bitrate of 128kbps, sample rate of 44.1kHz, or channel count of 2 for encoded audio

Please note that we reserve the right to make movies or other data forms available on an Open Access basis via The Company of Biologists' [website](#), [You Tube](#) and other online channels. Where we do, the movies and other data forms may on occasion be made available under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC-BY) Licence (the terms of which are set out at <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>). These terms permit the copying and/or adaptation of the movie and the distribution of the movie or any such adaptation by any means and in any medium or format to any other person, including for commercial purposes, provided that you are credited as the original author. There would be no additional cost to you, the author.

6. Supplementary information

Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. Supplementary information provides access to supporting data that do not appear in the printed article or PDF but that accompany the final version of a paper online.

Data type	Criteria	Citation style
Figures and tables	Max. of 6 items per article (should not exceed the total number of figures/tables in the main article)	Fig. S1, Fig. S2; Table S1, Table S2, etc.
Datasets	Include as supplementary tables	Table S1, Table S2, etc.
Movies and audio clips	Max. of 3 movies/audio per article	Movie 1, Movie 2, etc.; Audio 1, Audio 2, etc.

These data are peer reviewed and subject to the same criteria as the data that are to be published in the paper itself. During peer review, editors and reviewers are asked to assess whether supplementary information is appropriate and essential for supporting the findings of a paper.

All supplementary data will be strictly limited to **a total of 50 MB per article (excluding movie files and cover art submissions)**.

We only accept data files - such as datasets, movies, audio, figures and tables - as supplementary information. We do NOT accept text files that provide additional materials and methods, results or discussions related to the article; these should be included in the article itself. Statistical and computational analyses should ideally be included in the methods section or as an appendix in the main article. Very large files or those requiring specialist software are not suitable as supplementary information. For large datasets, e.g. computational analyses, please see our guidelines on [data deposition](#).

Criteria for each supplementary information type are listed in the table below. The total number of supplementary information items of all types (figures, tables, movies, etc.) per article should not exceed the total number of figures and tables in the main article.

With the exception of movies (see section on [preparing the movies](#)) and large tables, **all supplementary information, including movie titles and captions, should be collated into a single PDF file**. If your table is very large, or you wish readers to be able to export and/or manipulate the data, we would prefer you to submit it as a Microsoft Excel file.

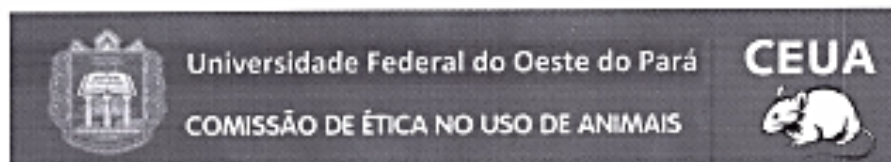
Use a separate numbering system from that used in the main article and use the format Fig. S1, Fig. S2, Table S1 etc. If a supplementary figure relates to a particular figure in the text, please cite it as close to this figure as possible. For the convenience of readers, please place each figure next to the corresponding legend in the supplementary information PDF. Please include a legend for each figure and a title for each table.

Please note that supplementary information files are not copyedited by JEB and therefore authors must ensure that all files are checked carefully before submission and that the style of terms and figures conforms to that of the article. Modification of supplementary information after publication will require a formal correction.

Refer to each piece of supplementary information at least once within the text of the main article (the article that is published in the print issue of the journal).

Anexo B

Parecer do comitê de ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 12008-2017, intitulado "ESTUDO DOS EFEITOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FORMULAÇÕES PARA O TRATAMENTO DE CRUSTÁCEOS ECTOPARASITAS DE PEIXES", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Lincoln Lima Corrêa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 12008-2017, entitled "ESTUDO DOS EFEITOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FORMULAÇÕES PARA O TRATAMENTO DE CRUSTÁCEOS ECTOPARASITAS DE PEIXES", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA.

Santarém-PA, 13 de março de 2018.



Prof. Dr.  Adenomar Neves de Carvalho
Presidente

Adenomar Neves de Carvalho
Professora UFOPA
DAPES 1775982