

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA *Piper aduncum* L EM MONOGENÉTICOS E NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* CUVIER 1818

Zuleika Tavares de ALMEIDA¹; Marieta Nascimento de QUEIROZ²; Elizabeth Gusmão AFFONSO³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Coorientadora: INPA/UniNilton Lins; ³Orientadora COTI/INPA

1. Introdução

A aquicultura é uma atividade de produção de alimentos que tem se expandido rapidamente, sendo, atualmente, considerada um forte setor econômico no mundo (FAO 2013). De acordo com a estatística da aquicultura, mundial, a produção de peixes, em 2011, atingiu 62,7 milhões de toneladas, com um acréscimo de 6,2% referente à produção de 2010, com um faturamento de USD 130 bilhões (FAO 2013).

O emprego das Boas Práticas de Manejo (BPM), assim como a erradicação de doenças, é fundamental para o bom desenvolvimento dessa atividade. As doenças parasitárias, principalmente aquelas causadas por monogenéticos, representam uma ameaça para a produção de peixes (Pavanelli *et al.* 2008).

O uso de produtos químicos destinados ao tratamento de enfermidades pode ser altamente prejudicial não apenas aos sistemas aquáticos, mas também para a saúde do homem (Holmstrom *et al.* 2003). Atualmente, o uso de produtos de origem vegetal vem crescendo, devido sua alta disponibilidade, baixa toxicidade e sua eficácia no controle de patógenos que afetam a criação de organismos aquáticos.

Para peixes de cultivo da região Amazônica, o uso de fitoterápicos vem sendo testado (Queiroz; Viana; Monteiro 2012 e Brasil 2013). Dentre estas, a *Piper aduncum*, que ocorre naturalmente na Amazônia, possui qualidades medicinais no controle de pragas de importância econômica na agricultura (Fazolin *et al.* 2005; Lobato *et al.* 2007), na veterinária (Silva, 2008), em doenças parasitárias humanas tropicais (Flores *et al.* 2009) e mais recentemente no controle de monogenéticos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Queiroz, 2012), além de ser bacteriostático para *Aeromonas hydrophilas* de tambaqui *Colossoma macropomum* (Brasil, 2013). Com estes resultados positivos citados na literatura, ampliar as pesquisas sobre os efeitos farmacológicos deste fitoterápico vem contribuir com as propostas inovadoras de interesse para a piscicultura regional e nacional. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato aquoso de *P. aduncum* sobre monogenéticos de brânquias do tambaqui *in vitro*, assim como avaliar *in vivo* a toxicidade deste fitoterápico no hospedeiro.

2. Material e Métodos

2.1 Aquisição e aclimação dos peixes

Os alevinos de tambaquis (50,0±10 g) foram adquiridos de produtores locais, e transportados para a Estação Experimental de Aquicultura da Coordenação de Tecnologia e Inovação (COTI) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus, AM. Durante 60 dias, foram aclimatados em tanques com capacidade para 500 L, com fluxo contínuo de água de poço artesiano e aeração constante. A qualidade da água foi avaliada durante todo o experimento, conforme item 2.6. Os peixes foram alimentados com ração comercial com 36% proteína bruta *ad libitum*, duas vezes ao dia. A temperatura média durante os experimentos se manteve em 26,03±0,15°C, oxigênio dissolvido 6,54± 0,35 mg/L e pH 6,87±0,24.

2.2 Aquisição e extração do extrato de *P. aduncum*

No mês de dezembro de 2012, folhas de *P. aduncum* foram coletadas no horto da Universidade Nilton Lins, Manaus, AM. Essas foram secas em estufa a 45±0,5 °C por 72 h e, posteriormente, o material foi triturado em um moinho (Tecnal, Tipo Willy-TE 650). Para o extrato, o material vegetal foi pesado de acordo com as concentrações determinadas para os testes *in vivo* (com o tambaqui) e *in vitro* (com os arcos branquiais infectados com monogenéticos). Foram estimadas cinco concentrações do extrato: 0,5; 1,0; 2,0 3,0 e 5,0 g/L, diluídas em um litro de água, homogeneizadas com bastão de vidro por, aproximadamente, uma hora, e filtrado em filtro de papel (Whatman nº 103).

2.3 Efeito *in vitro* do extrato de *P. aduncum* sobre os monogenéticos e *in vivo* sobre o tambaqui

A sensibilidade dos monogenéticos e a tolerância do tambaqui as diferentes concentrações do extrato foram avaliadas nos testes *in vitro* e *in vivo* respectivamente. No teste *in vitro*, foram utilizadas cinco concentrações do extrato aquoso (0,5; 1,0; 2,0 3,0; 5,0 g) e um controle (sem adição do extrato) conforme citado no item 2.2. Estruturas branquiais de três tambaquis, naturalmente parasitados, foram retiradas e seus arcos individualizados em placas de Petri. Em cada arco branquial foram selecionados vinte monogenéticos, visualmente, e observados a cada 15 minutos num estereomicroscópio da Zeiss®, as concentrações foram aplicadas em duplicatas e observadas simultaneamente. O teste teve duração de três horas, conforme metodologia utilizada por Queiroz (2012).

Para os testes de toxicidade os peixes foram aclimatados durante 24 h, e distribuídos em 15 aquários (80 L de capacidade), cada um com 18 peixes (50,0±10 g). De acordo com os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, foram utilizadas quatro concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 g/L do extrato aquoso, e um grupo controle (sem adição do extrato), por 24 horas, conforme determinado para testes de toxicidade aguda. O sistema foi estático, a oxigenação foi realizada por aeradores, e mantido o fotoperíodo de 12 h. Todas as concentrações foram testadas em triplicata e o bioensaio foi realizado segundo recomendações da USEPA (2002) e ABNT (2004).

Após 24 horas de exposição, foram retirados três peixes de cada aquário para coleta de sangue e análises fisiológicas, como descrito no item 2.5. Durante o período experimental, foram observados a sobrevivência e o comportamento dos peixes, e monitorada a qualidade da água dos aquários (item 2.6).

2.5 Coleta de sangue e determinação dos parâmetros sanguíneos

Amostras de sangue foram coletadas, por punção da veia caudal, utilizando seringas de 3 mL rinsadas com EDTA a (10%) e armazenadas sob refrigeração a 4°C. Foi determinado: hematócrito (Ht), pelo método de microhematócrito, contagem de eritrócitos (RBC) usando câmara de Neubauer® em solução de Natt e Herrick (1952); concentração de hemoglobina ([Hb]) pelo método da cianometahemoglobina. O volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) foram calculados a partir dos valores de Ht, RBC e [Hb], segundo Wintrobe (1934). O plasma sanguíneo foi destinado à análise da glicose plasmática (mg/dL), pelo método enzimático-colorimétrico de glicose oxidase, e as proteínas plasmáticas totais (PPT–g/dL), pelo método de biureto, em espectrofotômetro UV/Visível.

2.6 Monitoramento da qualidade da água

O oxigênio dissolvido (OD), temperatura (°C) e condutividade elétrica (μS^{-1}), foram medidas com o auxílio de um oxímetro digital da YSI, modelo 85/10, pH com pHmetro digital da YSI, modelo 60/10. Gás carbônico (CO_2) segundo Boyd e Tucker (1992).

2.7 Análises estatísticas

Os parâmetros sanguíneos a qualidade da água dos aquários, após 24 h de exposição foram comparados mediante análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Zar 1999) e Kruskal-Wallis.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito in vitro do extrato de *P. aduncum* sobre os monogenéticos e in vivo sobre o tambaqui

O teste *in vitro* é uma importante técnica utilizada quando se pretende avaliar o efeito anti-helmíntico de um novo fármaco, pois é fácil de ser realizado e oferece respostas rápidas, além de auxiliar nos testes de toxicidade. Na figura 1, está representado o efeito de diferentes concentrações do extrato de *P. aduncum* no decorrer de três horas de exposição sobre os monogenéticos.

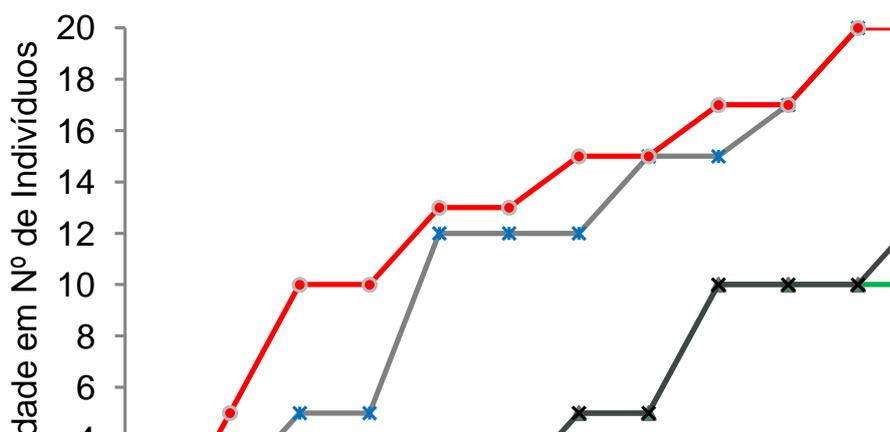


Figura 1. Avaliação da mortalidade dos monogenéticos de brânquias de tambaqui expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso de *P. aduncum* durante 180 minutos de exposição.

Os melhores resultados foram observados nas duas maiores concentrações (5,0 e 3,0 g/L). Após 30 minutos de exposição em 5,0 g/L, foi observado 50% de mortalidade dos monogenéticos. Entretanto, a partir de 135 minutos (2:25 h) de exposição, o efeito da *P. aduncum* nas duas maiores concentrações (3,0 e 5,0 g/L), foi similar, ocorrendo 100% de mortalidade dos monogenéticos em 180 minutos.

Nas concentrações menores (0,5, 1,0 e 2,0 g/L), apesar de não causarem 100% de mortalidade dos monogenéticos, pode-se observar que, a partir de 60 minutos de exposição, os parasitas começaram a morrer (Figura 1). No grupo controle, não foi observado mortalidade dos parasitas durante os 180 minutos. Estes resultados corroboram com os observados por Queiroz (2012), que obteve 100% de mortalidade dos monogenéticos *Dawestrema cycloancistrum* e *D. cycloancistrioides* nas concentrações de 100 e 120 ml/L de extrato, após 2 horas de exposição, em brânquias de pirarucu. O efeito da *P. aduncum* sobre as diferentes espécies de parasitos parece ter uma relação dependente do tempo e da dose administrada no parasita, ou seja, em altas concentrações pode-se obter uma maior eficácia, entretanto, concentrações menores podem alcançar efeitos satisfatórios em maior intervalo de tempo, como foi observado em 2,0 e 1,0 g/L do extrato, e ainda é indispensável considerar que o modo de extração e a parte da planta utilizadas nos extratos podem inferir diretamente na sua eficácia. Por exemplo, Ekanem *et al.* (2004) avaliaram 1,5 e 2,0 mg/L do extrato metanólico de sementes de *P. guineense* (Piperácea) *in vitro*, e verificaram que estas podem causar 80 e 100% de mortalidade dos parasitos de brânquias em *Carassius auratus auratus* respectivamente, que comparadas as concentrações utilizadas no presente trabalho são baixíssimas, e ainda deve considerar que a espécie de planta aqui citada pertence apenas ao gênero Piper.

Das variáveis físico-químicas da água, apenas a condutividade elétrica apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) após 24 h de exposição ($p > 0,05$) com variações de $39,63 \pm 0,25 \mu\text{S}^{-1}$ (controle) a $114,8 \pm 27,39 \mu\text{S}^{-1}$ (3,0 g/L). Queiroz (2012) também atribuiu ao extrato de *P. aduncum* a elevação da condutividade elétrica da água observadas em seus experimentos e observou que o aumento desta variável foi proporcional ao aumento do extrato na água, variando de $28,1 \pm 1,09 \mu\text{S}^{-1}$ (controle) e $107,4,36 \pm 4,36 \mu\text{S}^{-1}$ (100 ml/L). A condutividade elétrica da água está relacionada à presença de íons na água. Neste estudo, provavelmente esteja relacionada ao extrato vegetal utilizado. As plantas são excelentes sequestradoras de minerais do solo, que são distribuídos por toda a planta, onde participam de funções biológicas importantes (Taiz e Zeiger 2002).

Em 24 h de exposição dos peixes ao extrato não houve mortalidade dos peixes. As alterações comportamentais foram observadas imediatamente após a adição do extrato, independente da concentração. Nas menores concentrações (0,5, 1,0 e 2,0 g/L), os peixes estavam muito agitados, com batimentos operculares acelerados. Ao contrário, na maior concentração (3 g/L), os peixes ficaram letárgicos e com movimentos irregulares, que perdurou por, aproximadamente, três horas, após isso retornaram ao estado normal, assim como nos demais tratamentos.

A avaliação de indicadores fisiológicos tem sido importante ferramenta para o entendimento dos processos adaptativos dos peixes (Heath 1995; Wedemeyer 1996). Análises dos parâmetros sanguíneos foram capazes de detectar alterações fisiológicas de peixes diante a exposição de diversos extratos vegetais (Winkler *et al.* 2007; Kavitha *et al.* 2011; Talpur e Ikhwanuddin 2012). Estas alterações podem ser detectadas em casos de estresse animal, devido à capacidade de resposta para manutenção do equilíbrio fisiológico. Esta adaptação é tolerada por certo tempo e, se persistir, pode levar a exaustão e até a morte do animal (Wendeelar-Bonga 1997; Barton 2002).

As alterações nos parâmetros hematológicos podem ocorrer por hemoconcentração ou hemodiluição (Houston *et al.* 1996). A hemoconcentração pode ser uma estratégia para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio do sangue sob situações de elevada demanda de energia (Trenzado *et al.* 2006). Entretanto, agentes estressores que podem comprometer a absorção do ferro, a malformação ou hemólise dos eritrócitos, a inibição da síntese de hemoglobina, a competição pelo sítio de ligação do oxigênio pode causar uma hemodiluição ou anemia nos peixes, dessa forma, reduzindo a capacidade de transporte de oxigênio do sangue (Heath 1995; Tavares-Dias e Moraes 2004).

Na tabela 1 estão representados os parâmetros sanguíneos de tambaqui durante o teste de toxicidade aguda. Ht e RBC não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e o controle.

A diminuição nos valores de VCM na concentração 0,5 g/L em relação ao controle, pode estar relacionada a um processo anemiante (anemia microcítica) onde há uma diminuição do diâmetro dos eritrócitos, provavelmente relacionado ao estresse, conforme foi observado no início do período de exposição. Essa redução ainda pode estar relacionada à diminuição da taxa de hemoglobina e da quantidade de hemoglobina dentro dos eritrócitos (HCM), conforme foi observado em 0,5 e 1,0 g/L do extrato. Entretanto, na concentração (2,0 g/L) houve aumento do VCM, que apesar de estatisticamente ser "igual" aos valores da concentração 0,5 g/L, pode-se inferir que esses resultados estão relacionados às diferentes respostas animal dentro do mesmo grupo. Na concentração máxima observada (3,0 g/L) os valores apresentaram-se próximos aos do grupo controle.

Os valores de CHCM variaram em 0,5 e 1,0 g/L, o que indica que a concentração de hemoglobina dentro dos eritrócitos não permaneceu a mesma. Essa redução provavelmente esteja relacionada com a redução da síntese da hemoglobina pelos eritrócitos ou pela formação de metahemoglobina em decorrência da exposição ao extrato. Esses resultados diferem dos valores encontrados por Brasil (2013), que avaliou cinco concentrações (5, 15, 30, 60 e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do extrato hidroalcolico de *P. aduncum* em juvenis do tambaqui durante 96 h de exposição sem alterações nos parâmetros sanguíneos, e dos encontrados por Queiroz (2012), que avaliou a toxicidade do *A. gigas* com diferentes concentrações (40, 60, 80 e 100 ml/L) de extrato aquoso de *P. aduncum* durante 24 h de exposição onde verificou apenas alteração no percentual de hematócrito nas menores concentrações. A variação dos parâmetros hematológicos citados na literatura para os extratos de *P. aduncum* podem estar relacionados a fatores como: método de extração dos extratos, concentração utilizada e a espécie de peixe avaliado.

Tabela 1. Média \pm desvio padrão de hematócrito (Ht), eritrócitos (RBC), hemoglobina [Hb], volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), glicose, colesterol, e proteínas totais de tambaqui (*C. macropomum*) após 24 h de exposição a diferentes concentrações do extrato de *P. aduncum*: 0 (controle), 0,5; 1,0, 2,0 e 3,0 g/L.

Tratamentos (g/L)	Controle	0,5	1,0	2,0	3,0
Ht (%)	25,55 \pm 4,32	24,43 \pm 2,92	25,00 \pm 3,32	25,85 \pm 3,32	25,72 \pm 0,26
RBC (eritr./ μL)	2,50 \pm 0,42	2,57 \pm 0,34	2,43 \pm 0,24	2,30 \pm 0,45	2,47 \pm 0,01
Hb (g/dl)	7,64 \pm 1,51 ^b	4,68 \pm 1,37 ^a	4,33 \pm 1,32 ^a	6,81 \pm 2,35 ^b	4,29 \pm 0,75 ^a
VCM (fL)	105,24 \pm 17,14 ^b	94,73 \pm 9,82 ^a	105,62 \pm 16,58 ^b	114,00 \pm 25,58 ^a	104,29 \pm 0,68 ^b
HCM (pg)	31,76 \pm 10,74 ^b	18,13 \pm 4,39 ^a	17,87 \pm 5,00 ^a	30,16 \pm 12,39 ^b	25,56 \pm 0,20 ^b
CHCM (g/dL)	29,89 \pm 3,01 ^b	19,44 \pm 6,82 ^a	17,35 \pm 4,28 ^a	26,91 \pm 10,15 ^b	16,68 \pm 2,77 ^b
Glicose ¹	51,60 \pm 15,89	47,90 \pm 12,97	42,71 \pm 11,26	39,82 \pm 8,48	51,48 \pm 16,00
Proteína ²	3,19 \pm 0,33	3,09 \pm 0,23	2,98 \pm 0,33	3,13 \pm 0,39	3,18 \pm 0,02
Colesterol ²	107,33 \pm 9,08	104,36 \pm 27,52	112,33 \pm 5,67	119,64 \pm 8,30	113,69 \pm 1,31

Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

Os níveis de glicose plasmática têm sido bastante utilizados como indicadores de estresse em peixes teleosteos, e suas variações estão relacionadas às respostas secundárias do estresse (Wedemeyer 1996; Barton 1997). A proteína plasmática total e o colesterol são outros importantes indicadores de estresse em peixes, alterações proteicas podem indicar desequilíbrio osmótico, alterações nutricionais, ação de enzimas sobre as proteínas, além de lesão tecidual causada por xenobióticos. Enquanto o colesterol desencadeia a produção de hormônios e vitaminas necessários para os processos vitais de reprodução e manutenção da saúde dos peixes (Wedemeyer 1996; Campbell 2004; Val *et al.* 2004). No presente estudo não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros plasmáticos citados.

4. Conclusão

O extrato de folhas de *P. aduncum*, possui efeito anti-helmíntico contra parasitas monogenéticos do tambaqui, porém pode causar alterações na fisiologia dos peixes.

5. Referências Bibliográficas

- ABNT. 2004. *Ecotoxicologia Aquática-Toxicidade aguda - método de Ensaio com peixes*. 2ª edição. NBR 15088.
- Brasil, E.M. 2013. Efeito terapêutico do extrato hidroalcoólico de pimenta-de-macaco, *Piper aduncum* sobre juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, infectados pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. Dissertação de Mestrado (Agricultura no Trópico Úmido - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA). 70pp.
- Buchmann, K.; Bresciani, J. 2006. *Monogenea (Phylum Platyhelminthes)*. In: *Fish Diseases and Disorders*, University of Guelph Canada, vol. 1, p. 297-344.
- Bastos, C.N.; Albuquerque, P.S.B. 2004. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatologia brasileira*, 29: 555-557.
- Boyd, C.E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn:Auburn University. 183 pp.
- Fazolin, M.; Estrela, J.L.V.; Catani, V.; Lima, M.S.; Alécio, M.R. 2005. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L a adultos de *Ceratomyia tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Crysmelidae). *Neotropical Entomology*, 34: 485-489.
- Fujimoto, R.Y. *et al.* 2012. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. Zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). *Pesq. Vet. Bras.*, 32: 5-10.
- Gomes, A.L. *et al.* 2012. Investigação sanitária de peixes cultivados no Estado do Amazonas. *Anais do V Aquacultura*, Palmas.
- Kubtiza, F. 2003. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundiá. 229p.
- Kubtiza, F. *et al.* 2012. Estatística, espécies, pólos de reprodução e fatores limitantes à expansão da atividade. *Panorama da Aquicultura*, 22: 132.
- Ono, E.A. 2005. Cultivar Peixes na Amazônia: Possibilidade ou Utopia? *Panorama da Aquicultura*, 15: 41-48.
- Lobato, A.K.S. *et al.* 2007. Ação do Óleo Essencial de *Piper aduncum* L utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* L Walp. *Revista Brasileira de Biociências*, 15: 915-917.
- Monteiro, P.C. *et al.* 2012. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso de mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) em monogenéticos parasitos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). I Encontro Nacional de Aquicultura na Amazônia, Manaus-AM, de 28 a 31 de outubro.
- Ono, E.A.A. 2011. Produção de Pirarucu no Brasil: uma revisão geral. *Revista Panorama da Aquicultura*, 124: 40-45.
- Pavanelli, G.C. *et al.* 2008. Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento. UEM, 305p.
- Queiroz, M.N. 2012. Efeito do extrato aquoso da *Piper aduncum* L no controle de parasitas monogenéticos (*Platyhelminthes: Monogenoidea*) e parâmetros fisiológicos do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). Dissertação de Mestrado em Aquicultura, INPA/Uninilton, Manaus, Amazonas. 84p.
- Schalch, S.H.C. *et al.* 2009. Praziquantel, levamisol e diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Revista Brasileira de Parasitologia. Veterinária*, 18: 53-59.
- Silva, W.C. 2008. Potencialidade acaricida sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e estudo fitoquímico de *Piper aduncum* L. (*Piperaceae*), *Palicourea marcgravi* St. Hil (*Rubiaceae*) e *Derris negrensis* Benth (*Fabaceae*). Tese de Doutorado. Universidade Caxias do Sul. 167p.
- Silva, C.G. *et al.* 2009. Eficácia do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*, 10: 625-636.
- Talpur, A.D.; Ikhwanuddin, M. 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, 364-365: 6-12.
- Tavares-Dias, M. *et al.* 2011. *Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and Hematological response of tambaqui Colossoma macropomum*. *Bol. Inst. Pesca*, 37(4): 355-365.
- Trenzado, C E. *et al.* 2008. Physiological changes in rainbow trout held under crowded conditions and fed diets with different levels of vitamins E and C and highly unsaturated fatty acids (HUFA). *Aquaculture*, 277: 293-302.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. NW. Washington, DC. 15ed. 266p.
- Viana, G.M. *et al.* 2012. Uso do cipó-alho (*Adenocalymna alliacea*) em ração para o controle de parasitas monogenéticos (*Platyhelminthes: Monogenoidea*) de tambaquis, *Colossoma macropomum*. I Encontro Nacional de Aquicultura na Amazônia, Manaus-AM, de 28 a 31 de outubro.
- Wang, Y. *et al.* 2011. In vivo anthelmintic activity of bruceine A and bruceine D from *Brucea javanica* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Veterinary Parasitology*, 177: 127-133.
- Winkaler, E. *et al.* 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145: 236-244.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51: 32-49.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 471p.