

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA CURSO DE TECNOLOGIA EM
AQUICULTURA**

KIMBERLY COSTA DIAS

**EFEITO DA AÇÃO ANTIPARASITÁRIA DE EXTRATOS DE ACÍCULAS DE
Pinus sp. SOBRE O MODELO DE *Artemia franciscana***

URUGUAIANA, RS

2022

KIMBERLY COSTA DIAS

**EFEITO DA AÇÃO ANTIPARASITÁRIA DE EXTRATOS DE ACÍCULAS DE
Pinus sp. SOBRE O MODELO DE *Artemia franciscana***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Tecnologia em
Aquicultura da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para obtenção do
Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Orientador: Cátia Aline Veiverberg

Uruguaiiana, RS

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

D541e Dias, Kimberly Costa

EFEITO DA AÇÃO ANTIPARASITÁRIA DE EXTRATOS DE ACÍCULAS DE
Pinus sp. SOBRE O MODELO DE Artemia franciscana / Kimberly
Costa Dias.

54 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade
Federal do Pampa, AQUICULTURA, 2022.

"Orientação: Catia Aline Veiverberg".

1. aquicultura. 2. extratos vegetais. 3. fitoterápicos. 4.
lernea. 5. parasitose. I. Título.

KIMBERLY COSTA DIAS

EFEITO DA AÇÃO ANTIPARASITÁRIA DE EXTRATOS DE ACÍCULAS DE *Pinus* sp. SOBRE O MODELO DE *Artemia franciscana*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 18 de março de 2022.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Cátia Aline Veiverberg

Orientadora

(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Giovanni Taffarel Bergamin

(UNIPAMPA)

Prof. Dra. Fernanda Rodrigues Goulart Ferrigolo
(UNIPAMPA)



Assinado eletronicamente por **CATIA ALINE VEIVERBERG, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/03/2022, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **GIOVANI TAFFAREL BERGAMIN, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/03/2022, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **FERNANDA RODRIGUES GOULART FERRIGOLO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/03/2022, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0762645** e o código CRC **17707D9F**.

Dedico esse trabalho primeiramente a minha mãe que sem ela nada disso seria possível. Dedico esse trabalho ao Silvano Castro e Cássia Castro que durante toda a minha jornada estiveram comigo, tanto durante as horas boas quanto nas ruins. Dedico as minhas amigas Andressa Bitencourt e Jéssica Villanova que sem elas esse trabalho não teria sido realizado, a minha companheira Bruna Souza. Dedico aos meus professores, em especial a professora Cátia Veiverberg por me orientar, ao professor Giovani Bergamin que me deu a minha primeira oportunidade de estágio, e ao professor Antônio Camargo que tornou possível a minha graduação. Dedico esse trabalho a todos os envolvidos diretamente e indiretamente. Muito obrigada a todos.

RESUMO

Ao longo dos anos, a aquicultura tem mostrado desenvolvimento crescente em termos de produção. Em sistemas de cultivo intensivos, as parasitoses podem representar grande problema nas pisciculturas, causando perdas econômicas significativas. As alternativas de controle de parasitas com quimioterápicos são pouco eficazes e apresentam grande risco de dano ambiental. Por essas razões, cada vez mais, se tem procurado alternativas de tratamento naturais utilizando extratos vegetais. O tratamento com extrato aquoso de acículas de *Pinus sp.* é utilizado popularmente entre alguns piscicultores e a resina apresentou resultados eficazes no tratamento *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar os melhores métodos de obtenção do extrato de Pinus e testar a toxicidade contra o modelo experimental de *Artemia franciscana*. Foram testados dois tipos de solvente (etanol e água) para extração das acículas secas e verdes, sendo caracterizados quanto à concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH e FRAP). A segunda etapa do projeto foi determinar a concentração letal (CL50 - 24 horas) dos extratos de Pinus contra *Artemia franciscana*. Os extratos de acículas verdes apresentaram maior concentração de todos os parâmetros analisados, e o melhor solvente observado foi o etanol. Os resultados do ensaio toxicológico se mostraram promissores, obtendo valores de CL50 de 3,27 ppm para o extrato aquoso de acículas verdes, 2,89 ppm para o extrato etanólico de acículas verdes e 2,12 ppm para o extrato etanólico de acículas secas. No extrato aquoso de acículas secas, não foi possível determinar o valor de CL50, uma vez que não foi atingido 50% de mortalidade em nenhuma das concentrações testadas. Conclui-se que os extratos aquosos e etanólico de acículas verdes e o extrato etanólico de acículas secas possuem efeito tóxico sobre as artêmias. Sendo assim, podem ser um recurso promissor para o controle de parasitas em pisciculturas e uma possível alternativa natural contra a lerneia e outros ectoparasitas.

Palavras-chave: aquicultura; extratos vegetais; fitoterápicos; lerneia; parasitose; peixes.

ABSTRACT

Over the years, aquaculture has shown increasing development in terms of production. In intensive farming systems, parasitic diseases can represent a major problem in fish farms, causing significant economic losses. Alternatives to control parasites with chemotherapeutic are ineffective and present a great risk of environmental damage. For these reasons, more and more, natural treatment alternatives using plant extracts have been sought. The treatment with aqueous extract of needles of *Pinus sp.* is popularly used among some fish farmers and the resin showed effective results *in vitro* treatment. The objective of this work was to evaluate the best methods to obtain the *Pinus* extract and to test the toxicity against the experimental model of *Artemia franciscana*. Two types of solvent (ethanol and water) were tested for the extraction of dry and green needles, being characterized as to the concentration of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity (DPPH and FRAP). The second stage of the project was to determine the lethal concentration (LC₅₀ - 24 hours) of *Pinus* extracts against *Artemia franciscana*. The extracts of green needles showed the highest concentration of all parameters analyzed, and the best solvent observed was ethanol. The results of the toxicological test were promising, obtaining LC-50 values of 3.27 ppm for the aqueous extract of green needles, 2.89 ppm for the ethanolic extract of green needles and 2.12 ppm for the ethanolic extract of dry needles. In the aqueous extract of dried needles, it was not possible to determine the value of LC-50, since 50% mortality was not reached in any of the concentrations tested. It is concluded that the aqueous and ethanolic extracts of green needles and the ethanolic extract of dry needles have a toxic effect on brine shrimp. Therefore, they can be a promising resource for the control of parasites in fish farms and a possible natural alternative against *lernea* and other ectoparasites.

Keywords: aquaculture; fish; *lernea*; parasitosis; phytotherapeutics; plant extracts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mortalidade de <i>Artemia franciscana</i> após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de extrato aquoso de acículas verdes	28
Figura 2 - Mortalidade de <i>Artemia franciscana</i> após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de extrato aquoso de acículas secas	28
Figura 3 - Mortalidade de <i>Artemia franciscana</i> após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de extrato etanólico de acículas verdes	29
Figura 4 - Mortalidade de <i>Artemia franciscana</i> após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de extrato etanólico de acículas seca	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de compostos fenólicos totais (μg de equivalentes de ácido gálico/ml) dos extratos de acículas de <i>Pinus</i> sp.	24
Tabela 2 - Concentração de flavonoides ($\mu\text{g/g}$ amostra) dos extratos de acículas de <i>Pinus</i> sp.	25
Tabela 3 - Concentração de DPPH (g acículas/g DPPH) dos extratos de acículas de <i>Pinus</i> sp.	25
Tabela 4 - Concentração de FRAP (μmol sulfato ferroso/g de acícula) dos extratos de acículas de <i>Pinus</i> sp.	26

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEORICO	13
2.1. <i>Lernaea cyprinacea cyprinacea</i>	13
2.2. Utilização de extratos vegetais para controle de parasitas.....	14
2.3. Compostos bioativos em extratos de plantas	16
2.4. Avaliação da atividade tóxica de extratos vegetais em <i>Artemia franciscana</i>	18
3 OBJETIVO	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Preparo e análise dos extratos.....	21
4.2 Análise toxicológica em <i>Artemia franciscana</i>	22
4.3 Análise estatística	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1 Avaliação da composição química dos extratos.....	24
5.2 Avaliação toxicológica dos extratos sobre <i>Artemia franciscana</i>	27
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS	33
APÊNDICES	44

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira é um setor com grande potencial, atingindo produção de 841.005 toneladas em 2021, com receita de cerca de R\$ 8 bilhões (PEIXE BR, 2022). Nos últimos sete anos, a atividade já cresceu 45,7%, equivalente à média de 5,6% ao ano no período (PEIXE BR, 2022). Esse crescimento se deve ao fato do aumento dos investimentos nas agroindústrias, a simplificação do licenciamento ambiental, investimentos em novas tecnologias, aumento das áreas de cultivo e frequente evolução dos meios de cultivo, os quais tem sido amplamente intensificado (PEIXE BR, 2022).

A intensificação do cultivo torna a piscicultura vulnerável ao aumento de surtos de doenças, podendo resultar em perda parcial ou total da produção (REVERTER *et al.*, 2014). Fatores como superlotação, manejo frequente, mudança repentina na temperatura, baixa qualidade da água e problemas nutricionais contribuem para mudanças fisiológicas nos peixes, como estresse ou imunossupressão e, assim, aumentam a suscetibilidade a infecções e patógenos oportunistas (REVERTER *et al.*, 2014).

Uma das principais causas de prejuízos na piscicultura são os parasitas, que se alojam externa ou internamente no corpo do hospedeiro, causando vários danos à sua saúde (FURTADO *et al.*, 2021). No Rio Grande do Sul, um dos principais parasitas que afeta a piscicultura é a *lernea* (*Lernaea cyprinacea cyprinacea*), crustáceo que se fixa à superfície corporal ou as brânquias do peixe, causando lesões hemorrágicas, infecções secundárias e podendo levar até a morte (PIZZOLATTI, 2000). Os métodos de controle mais conhecidos para *lernea* são quimioterápicos, adicionados na ração ou aplicados diretamente na água (FURTADO *et al.*, 2021). Entretanto, estes compostos apresentam muitos malefícios, como o desenvolvimento de resistência e danos ambientais. Ainda, há poucos quimioterápicos específicos para a piscicultura, sendo a maioria pouco eficiente contra a infestação por *lernea* (PIZZOLATTI, 2000).

Uma alternativa ao uso de quimioterápicos pode ser a utilização de extratos de plantas, pois estes apresentam princípios ativos alcalóides, terpenóides, taninos, saponinas, glicosídeos, flavonóides, fenólicos ou esteróides que podem resultar em diversos benefícios ao organismo

dos peixes, como a redução do estresse, promoção do crescimento, estimulação do apetite, aumento da tonicidade e imunoestimulação, além de ação antiparasitária (REVERTER *et al.*, 2014).

Os extratos da resina de *Pinus sp.* (extrato do óleo da resina em clorofórmio, resina crua, óleo da resina cozido no vapor e compostos puros α e β -pinenes) foram testados contra a *lernea in vitro*, com um resultado muito promissor (TÓRO *et al.*, 2003). Além disso, o extrato de acículas de *Pinus sp.* já se mostrou eficaz contra vários tipos de bactérias que atingem de modo habitual o ser humano, e que já são resistentes à maioria dos antibióticos (LEANDRO *et al.*, 2014). As artêmias (*Artemia salina* e *Artemia franciscana*) são amplamente utilizadas na pesquisa de produtos naturais para avaliar sua toxicidade (HIROTA *et al.*, 2012), tendo como vantagem a sua aplicabilidade, baixo custo e facilidade de realizar a reprodução do teste (MOREIRA, 2013). Entretanto, não há trabalhos avaliando os extratos de acículas de *Pinus*.

O diferencial deste trabalho consiste em determinar qual o tipo de acícula (verde ou seca) que possui a melhor eficiência antiparasitária e qual o tipo de solvente realiza a melhor extração dos compostos dessas acículas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Lernaea cyprinacea cyprinacea*

Ectoparasitas são parasitas que se alojam na parte externa do corpo do hospedeiro, causando prejuízo para o mesmo. Dentre os diversos ectoparasitas de peixes de água doce, os crustáceos são o grupo que mais ocasiona prejuízos aos peixes cultivados (PAVANELLI *et al.*, 2008). No Sul do Brasil, o principal crustáceo parasita, responsável por grande prejuízo econômico, é a *Lernaea cyprinacea cyprinacea* (CASACA *et al.*, 2005).

A *Lernaea cyprinacea cyprinacea*, comumente conhecida como lerneia ou verme âncora, pertence à classe Crustacea, subclasse Copepoda, ordem Lernaeoidea, família Lernaeidae, gênero *Lernaea* (PIZZOLATTI, 2000). São conhecidas aproximadamente 110 espécies no gênero *Lernaea* no mundo (WORMS, 2019). É um parasita cosmopolita, ocorrendo normalmente em carpas (*Cyprinus carpio*) (AZOPA, 1999), mas também sendo identificada em várias outras espécies de peixes. De acordo com PAVANELLI *et al.* (2008), o parasita foi introduzido no Brasil junto com carpas que foram importadas da Hungria. O transporte de animais de origem desconhecida, sem a devida profilaxia e quarentena, causou a disseminação desse parasita pelo país. Devido ao escape de peixes de ambientes de cativeiro para a natureza, animais infestados pela lerneia chegam aos ambientes naturais e finalizam seu percurso nos rios brasileiros. No norte do Paraná, a lerneia foi identificada em várias espécies nativas, como lambari (*Astyanax bimaculatus*), piapara (*Leporinus elongatus*), piauí (*Leporinus friderici*) (GABRIELLI; ORSI, 2000).

O estágio parasitário da lerneia é na sua fase de copepodito, onde procuram algum peixe para se alojarem e permaneceram nas brânquias ou na parte externa do peixe até a sua maturação sexual. A lerneia fêmea é bilateralmente simétrica, com corpo segmentado, provido de apêndices articulados e cobertos por uma cutícula de quitina rígida ou semirrígida (ROBERTS, 1981). Quando comparada ao resto do corpo, a cabeça da lerneia tem um tamanho desproporcional, sendo bem reduzida, onde se localizam os órgãos da boca e o dos sentidos (BOEGER, 1999). Logo após a cabeça, vem a porção onde se localizam as âncoras, que são utilizadas para se fixar ao hospedeiro. O restante do seu corpo é em formato de tubo, com dois sacos de ovos ao final, presos aos seus poros genitais.

A fecundação dos ovos de *L. cyprinacea cyprinacea* ocorre na água. Em seu ciclo de vida, o parasita possui três estágios de vida livre (náuplios) e cinco estágios de copepoditos, que são estágios parasitários (PIZZOLATTI, 2000). O macho é livre nadante e a fêmea, depois que

sofre a metamorfose, é fixa. O macho morre após a fecundação (AZOPA, 1999). As fêmeas, após serem fecundadas, sofrem metamorfose, dando início às atividades parasitárias (PAVANELLI *et al.*, 2008), quando necessitam de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida. O ciclo de vida da *lernea* é baseado na temperatura da água, podendo variar de sete dias (em temperatura ótima de 28°C) até a 100 dias (em temperatura de 14°C) (PIZZOLATTI, 2000). A *lernea* pode se fixar na superfície corporal ou nas brânquias dos peixes, causando necrose e rupturas no epitélio (AZOPA, 1999). Onde ela se fixa, fica uma lesão em aberto, um ponto hemorrágico que pode servir de porta de entrada para infecções secundárias por bactérias oportunistas.

Na literatura, as indicações de tratamento para *lernea* incluem o uso de formalina, sal de cozinha e permanganato de potássio, entretanto com sucesso apenas relativo no controle do parasita (BOEGER, 1999; PAVANELLI *et al.*, 2008). Muitos piscicultores têm utilizado compostos organofosforados e outros produtos químicos não destinados para uso na piscicultura, que podem trazer consequências ainda mais graves ao processo produtivo, meio ambiente e saúde dos seres humanos que forem consumir o peixe ou manipular esses produtos durante o tratamento. (BOEGER, 1999). O triclorfon, na concentração de 0,15 a 0,20 ml/m³ de água, com intervalo de 7 dias entre cada aplicação, é recomendado contra a *lernea*, mas a eficácia é parcial (MARTINS, 2004; MANAL; KORNI, 2018). Outra alternativa é a utilização de Doramectin, administrado via alimentação a 1 mg/ kg (HEMAPRASANTH *et al.*, 2008). Outro produto que está sendo bastante utilizado é o Diflubenzuron com a aplicação no tanque, em uma concentração de 0,5 a 80 g/m³ (LUVIZOTTO-SANTOS *et al.*, 2018).

No Brasil não há legislação específica para o uso de drogas na aquicultura (MAXIMINIANO *et al.*, 2005). O único parasiticida autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na piscicultura é o Triclorfon® (MAXIMINIANO *et al.*, 2005).

Assim, a falta de fiscalização adequada e de produtos regulamentados contra os principais parasitas que afetam a aquicultura, incentiva o abuso e a dosagem incorreta, chegando até ao ponto de produtores utilizarem quimioterápicos ilegais na tentativa de controlar a parasitose (BENBROOK, 2002).

2.2. Utilização de extratos vegetais para controle de parasitas

O uso de quimioterápicos está se tornando cada vez mais restrito, pois apresentam diversos efeitos colaterais ao meio ambiente e à segurança da saúde. O uso frequente de

antibióticos tem resultado no desenvolvimento de cepas de bactérias resistentes ou na presença de antibióticos residuais no músculo de peixes comercializados e, portanto, tem potenciais consequências para a saúde humana (REVERTER *et al.*, 2014). Segundo Botelho *et al.* (2012, p.48):

“(...) quando aplicadas na água, essas substâncias são disseminadas por todo o curso hídrico, entrando em contato com outros organismos. Os ambientes marinhos e os rios, onde a aquicultura é praticada, são ambientes abertos com a presença de outros animais, além daqueles da criação de interesse. Em muitos casos, os produtos são aplicados intensivamente, ou seja, em um curto período de tempo, causando assim danos à comunidade aquática, inclusive podendo este produto ser biomagnificado (aumento da concentração do produto a cada nível da cadeia alimentar). O problema ainda pode ser maior quando os ambientes onde são cultivados os organismos se encontram próximos a rios e riachos, pois, dependendo do regime de chuvas, pode ocorrer transbordamento disseminando, assim, os agentes controladores de doenças.”

Foi relatado que extratos de plantas favorecem várias atividades fisiológicas dos peixes, como redução do estresse pelo manejo, promoção do crescimento, estimulação do apetite, aumento da tonicidade e imunoestimulação, maturação das espécies de cultura, além de ação antiparasitária na aquicultura, devido aos princípios ativos alcalóides, terpenóides, taninos, saponinas, glicosídeos, flavonóides, fenólicos, esteróides ou essenciais óleos (REVERTER *et al.*, 2014). A ação antiparasitária é baseada em um conjunto de mecanismos, que incluem toxicidade, efeitos antimitóticos, atividade antialimentar, regulação do crescimento, supressão da fecundidade, esterilização, repelência à oviposição, além de efeitos nocivos sobre o sistema endócrino e danos na cutícula das larvas, impedindo a ecdise (MULLA; SU, 1999).

Vários estudos já foram realizados mostrando a ação efetiva de medicamentos naturais contra vários patógenos. Os extratos de *Mucuna pruriens* e *Carica papaya* tiveram efeitos promissores em banhos contra o protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* (EKANEM *et al.*, 2004). A amêndoa indiana (*Terminalia catappa*) e o alho (*Allium sativum*) têm sido citados como uma alternativa aos produtos químicos sendo aplicados na água no tratamento contra a infestação por *Trichodina* sp. em alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (PANDEY *et al.*, 2012).

Um desses compostos naturais que já foram testados é o extrato do Pinus (*Pinus sp.*), que se mostrou eficaz contra vários tipos de bactérias que atingem de modo habitual o ser humano, e que já são resistentes à maioria dos antibióticos (LEANDRO *et al.*, 2014). O *Pinus sp.*, popularmente conhecido como Pinus ou pinheiro americano, pertence à família Pinaceae,

com sua origem no sudoeste dos Estados Unidos. Devido à produção de resina e a utilização da sua madeira, se tornou extensivamente produzida em locais como Brasil, China e Índia (BERNARDES, 2014). No Brasil o *Pinus sp.* foi implementado no Sudoeste, por volta da década de 50, com o objetivo de realizar o reflorestamento e a produção de celulose (BERNARDES, 2014).

O óleo/resina que a árvore produz, serve como forma de autodefesa contra insetos e fungos fitopatogênicos (BERNARDES, 2014). *Pinus sp.* contém vários compostos bioativos constituídos principalmente por terpenos, terpenóides e alguns outros constituintes aromáticos e alifáticos. (LEANDRO *et al.*, 2014). É através da fração volátil da resina de *Pinus* que se é produzido o óleo de pinho, que possui várias atividades antimicrobianas, e suas características olfativas, sendo utilizadas na formulação de desinfetantes com ação biocida (BERNARDES, 2014). Sendo assim, a resina de *Pinus sp.* se mostra eficiente como antibacteriano, antifúngico, servindo também para realizar o combate de alguns parasitas, microrganismos e vírus (BERNARDES, 2014).

Os extratos da resina de *Pinus sp.* (extrato do óleo da resina em clorofórmio, resina crua, óleo da resina cozido no vapor e compostos puros e β -pinenes) foram testados contra a *lernea in vitro* e se mostraram eficazes (TÓRO *et al.*, 2003). O extrato aquoso de *Pinus sp.* para o tratamento de peixes infestados por *Lernaea spp.* não altera os parâmetros hematológicos e de crescimento de jundiás (FARIAS *et al.*, 2003). CASACA *et al.* (2005) descrevem também um tratamento contra *lernea* utilizando o extrato aquoso de acículas de *Pinus sp.*, da seguinte forma: em 1 hectare utiliza-se 150 kg de acículas verdes maceradas com um picador de forragem, após deixá-las de molho em um tonel em 200 L de água por 24 a 48 horas, com a aplicação direta no viveiro, espalhando por toda a superfície, repetindo-o por quatro vezes com intervalo de cinco dias. Segundo relatos empíricos, este tratamento tem se mostrado eficaz, solucionando os casos de *lerneose* na região Oeste de Santa Catarina.

2.3. Compostos bioativos em extratos de plantas

Compostos bioativos são substâncias que podem ser encontradas em vários tipos de alimentos, plantas, folhas, e que trazem benefícios para a saúde humana ou animal. Os compostos bioativos podem ser divididos em três categorias principais: terpenos, terpenóides e alcalóides. Cada composto possui as suas características estruturais particulares, decorrentes da forma como são sintetizados naturalmente (biossíntese) (LUÍS, 2014). Os principais compostos bioativos encontrados em tipos de folhagem são os compostos fenólicos, flavonoides, antioxidantes e clorofila (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos de plantas encontram-se em uma gama de categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, lignanas, taninos condensados e hidrolisáveis, sendo conhecidos por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase (SOUSA *et al.*, 2007). Isso se deve ao fato de suas propriedades redutoras e estrutura química, que desempenham um importante papel realizando a neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo na etapa de iniciação e na etapa de propagação do processo oxidativo (SOUSA *et al.*, 2007).

Os flavonóides fazem parte da classe de produtos naturais dos micronutrientes. Encontram-se amplamente presentes em vegetais e frutas, que são a principal fonte conhecida dessa substância. Os flavonoides possuem estrutura ideal para realizar o sequestro de radicais e podendo ser um antioxidante mais efetivo que vitaminas como a C e E (ALVES *et al.*, 2007). Nos flavonoides a atividade antioxidante depende principalmente da sua estrutura, sendo determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavanol formado reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas (ALVES *et al.*, 2007). Sendo assim, quanto maior a quantidade de hidroxilas, maior será a atividade como agente doador de hidrogênio e de elétrons (ALVES *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são substâncias produzidas pelo próprio organismo com o propósito de combater radicais livres, e impedindo a oxidação de outras moléculas, protegendo assim o sistema biológico contra o efeito nocivos de processos ou reações que possam vir a ocorrer (KRINSKY, 1994). Os antioxidantes são obtidos por meio da ingestão de produtos de origem sintética ou natural (SILVEIRA *et al.*, 2018).

Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006). Estes compostos bioativos exibem vários modos de ação, como inibidor de apetite, regulação do crescimento, supressão da fecundidade e esterilização, repelência da oviposição, alterações na aptidão biológica e bloqueio do desenvolvimento de vetores patógenos (MULLA; SU, 1999). No trabalho realizado por Budni *et al.* (2012), o uso de antioxidantes mostrou que um aumento no estresse oxidativo no nível mitocondrial é associada à progressão da doença de Chagas e que a intervenção com antioxidantes para redução dos níveis de radicais livres pode ser eficaz na atenuação da persistência do parasita. Outros mecanismos de ação parecem estar associados à interferência no tráfego de proteínas e lipídios nas membranas do parasita, danificando-o irreversivelmente, ou ainda pela inibição da glicolisação de proteínas (ANTHONY, FYFE;

SMITH, 2005)

Com os avanços nas tecnologias, desenvolveu-se vários métodos para mensurar a capacidade antioxidante de substâncias presentes nas mais diferentes matrizes. A técnica mais utilizada para realizar essa mensuração é a de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), devido a sua capacidade de analisar antioxidantes solúveis em meios orgânicos e amplamente aplicado à análise desta atividade em frutas (SILVEIRA *et al.*, 2018). Outra técnica muito utilizada para mensurar a capacidade antioxidante de substâncias é a técnica do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro). A técnica FRAP tem como objetivo determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros (RUFINO *et al.*, 2006).

As propriedades benéficas e a eficácia dos produtos vegetais na saúde de peixes cultivados dependem da parte da planta, do método de extração e da concentração do extrato (REVERTER *et al.*, 2014). As técnicas de extração e a natureza do solvente extrator afetam diretamente nos rendimentos extrativos e no teor de metabólitos presentes, podendo interferir em atividades biológicas e farmacológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A extração é um dos processos comumente utilizados para obtenção de compostos bioativos, onde um solvente age sobre a estrutura celular do vegetal, retirando os compostos que são de interesse (MEREGALLI, 2017). O método de extração pode influenciar na concentração dos compostos bioativos e nos tipos de compostos que serão retirados. A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, eles são encontrados na forma de ésteres ou heterosídeos, sendo assim solúveis em água e em solventes orgânicos polares como o etanol (CARVALHO *et al.*, 2012). No trabalho desenvolvido por KIM *et al.* 2010, obteve-se uma diferença significativa no teor de compostos polifenólicos e proantocianidinas que foram obtidos realizando o extrato etanólicos de acículas de *Pinus densiflora* em comparação ao extrato aquoso e a outros tipos de extratos testados.

2.4. Avaliação da atividade tóxica de extratos vegetais em *Artemia franciscana*

A artêmia (*Artemia franciscana*) tem sido utilizada como parâmetro de toxicidade de compostos bioativos, podendo assim ser utilizada como um teste preliminar rápido e simples durante o isolamento de produtos naturais. Existem diversos trabalhos que mostram uma correlação positiva entre ensaios toxicológicos utilizando artêmias e distintas atividades biológicas, como as antifúngicas, antivirais, antimicrobianas, parasiticidas, antitumoral, tripanossomicida, entre outras (LUNA *et al.*, 2005).

Artemia franciscana é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em água marinha e é muito utilizada na alimentação na fase larval de peixes e camarões (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Essa espécie produz cistos com diâmetro médio de 250 µm, dos quais eclodem náuplios com aproximadamente 450 µm de comprimento. As artêmias adultas possuem corpo alongado, medindo cerca de 10 mm de comprimento. (MOREIRA, 2013).

O primeiro estágio larval da *Artemia franciscana* é sua fase de náuplio, fase em que a artêmia é utilizada para alimentação de peixes, devido ao seu tamanho (45 µm) (VINATEA, 1994). Logo após, os náuplios entram na fase de metanáuplios, onde acontece a formação de todos os seus apêndices locomotores. A próxima fase consiste na fase do pré-adulto, que é onde acontece o dimorfismo sexual e a formação das estruturas gonadais. Por fim, a última fase que é a fase adulta, que tem como característica a capacidade de reprodução. Esse ciclo leva em torno de 12 dias para se completar (VINATEA, 1994).

Utilizando a análises de toxicidade com artêmias, pode-se determinar o tempo e a concentração do extrato analisado que seja potencialmente prejudicial para a lerneia. O tempo e a concentração estão diretamente relacionados, uma vez que o extrato em contato com a artêmia pode não produzir um efeito adverso caso a concentração do extrato for baixa, ou caso a artêmia não tenha sido exposta por tempo suficiente (MOREIRA, 2013).

No trabalho realizado por BEVILACQUA *et al.* (2008), em avaliação toxicológica utilizando *Artemia* sp., comparando a preparação comercial e o óleo puro de neem (*Azadirachta indica*), os autores observaram que o produto comercial é bem mais prejudicial para a vida aquática do que o óleo puro. No produto comercial não foi possível realizar o cálculo do CL50, pois a menor dose empregada (40ul/ml) produziu 100% de morte dos animais após 48 horas de exposição, já utilizando o óleo puro o resultado da CL-50 foi de 1,59 ml/ml.

No trabalho de NASCIMENTO *et al.* (2008), foram testados extratos etanólicos de *Phyllanthus amarus* coletados de diversos locais. Na avaliação toxicológica realizada com a *Artemia salina* concluiu-se que o extrato etanólico se mostrou atóxico ou com baixa toxicidade dependendo do local onde foram realizados a coleta. LIMA *et al.* (2009) avaliaram extratos de *Sonchus oleraceus*, planta comumente utilizada na alimentação humana, e realizou o teste de toxicidade em *Artemia salina*, obtendo resultado de baixa toxicidade.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar métodos de obtenção do extrato de acículas de *Pinus* sp. e avaliar a ação antiparasitária destes extratos frente o modelo de *Artemia franciscana*.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar diferentes métodos de extração de acículas de *Pinus* sp. em relação à concentração de compostos bioativos.
- Determinar a concentração letal (CL-50) dos extratos de *Pinus* sobre a *Artemia franciscana*.
- Definir o melhor extrato de acícula de *Pinus* sp. para uso como antiparasitário em piscicultura.

4 METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal do Pampa - campus Uruguaiiana, em duas etapas: a primeira etapa consistiu em determinar o melhor método de extração das acículas de Pinus (*Pinus sp.*) por meio da análise dos compostos bioativos; a segunda etapa foi a avaliação da toxicidade do extrato frente a artêmia (*Artemia franciscana*).

4.1.Preparo e análises dos extratos

As acículas foram coletadas em área periurbana do município de Uruguaiiana, de duas formas: as acículas secas foram recolhidas do chão (desde que não estivessem em decomposição), e as acículas verdes foram coletadas diretamente dos galhos.

As acículas foram limpas e trituradas manualmente, com o auxílio de uma tesoura. Foram avaliados dois métodos de extração: extração em água fria (CASACA *et al.*, 2005) e extração em etanol a 80°C (KIM *et al.*, 2010). A extração em água foi realizada utilizando uma proporção de 75g de acícula para 100 ml de água destilada (CASACA *et al.*, 2005). Para obter o extrato em etanol, foi utilizado a proporção de 75g de acícula de Pinus para 100 ml de etanol 99%, previamente aquecida a temperatura de 80°C (KIM *et al.*, 2010). Todas as amostras permaneceram em repouso em recipientes cobertos, com agitação a cada 6 horas, durante 24 horas. Cada meio de extração foi avaliado em triplicata.

Depois do período de 24 horas, as amostras foram filtradas para remoção de partículas sólidas, e os líquidos foram armazenados em ambiente protegido da luz até o momento das análises.

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo procedimento de FolinCiocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959). O teste de Folin-Ciocalteu é baseado nos compostos fenólicos reagir com o reagente Folin-Ciocalteu, a pH básico, resultando em uma coloração azul capaz de ser determinada espectrofotometricamente em 765 nm. Este reagente contém uma mistura de tungstênio e molibdato de sódio em ácido fosfórico e reage com os compostos fenólicos presentes na amostra (GARCÍA MARTÍNEZ *et al.*, 2015). Foram testados o extrato bruto e duas diluições (10 e 50 vezes), sendo cada concentração testada em triplicata.

O conteúdo total de flavonóides foi mensurado utilizando 500 µl de amostra de extrato, 2 ml de água destilada e 150 µl de Nitrito de sódio 5% (NaNO₂). Aguarda-se 5 minutos. Logo em seguida adicionou-se 150 µl de Cloreto de alumínio 10% (AlCl₃) e aguarda-se seis minutos.

Após esse tempo adiciona-se 1 ml de Hidróxido de sódio (NaOH), adicionando logo em seguida mais 1,2 ml de água destilada. Realiza-se a agitação e a leitura em espectrofotômetro a 510 nm (MARINOVA *et al.*, 2005). Nos extratos de acículas verdes foram feitas as diluições de extrato bruto em 10 e 50 vezes, enquanto no extrato de acículas secas foram feitas somente a diluição em 10 vezes

A concentração da curva foi realizada utilizando o padrão de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-etrametilchroman-2-ácido carboxílico), nas concentrações de 50 µM a 1.000 µM, e o álcool etílico sendo utilizado como o branco. Já as análises das amostras foram realizadas utilizando 150 µL de cada extrato (em triplicata) e adicionando 5,85 ml de DPPH, sendo posteriormente homogeneizada. Foram feitas as leituras após 30 minutos de espera, com o espectrofotômetro programado para 515 nm (SILVERA *et al.*, 2018)

Foram testados extratos de hexano em sua concentração bruta. O extrato em etanol foi testado na concentração bruta e em diluição em 50 partes. E a extração em água foi testada em uma diluição de 10 partes e em sua concentração bruta

A solução do reagente FRAP foi realizada a partir da combinação de 25 ml de tampão acetato 0,3 M, 2,5 ml de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 ml de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM (RUFINO *et al.*, 2006). A curva padrão foi obtida a partir das diluições de sulfato ferroso 2 mM em água destilada para obter as concentrações de 500 µM a 1500 µM. A técnica consiste em transferir o volume de 90 µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio (em triplicata), adicionar 270 µL de água destilada e 2,7 ml do reagente FRAP, homogeneizar e manter em banho-maria a 37° C por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando o reagente FRAP como o branco (RUFINO *et al.*, 2006). Os extratos de acículas verdes foram diluídos em 10, 20 e 50 vezes, enquanto os extratos de acículas secas foram diluídos em 10 e 50 vezes.

4.2. Análise toxicológica em *Artemia franciscana*

A avaliação da atividade antiparasitária foi avaliada pela análise de toxicidade na fase de náuplio de artêmia, por meio do cálculo da concentração letal (CL50) após 24 horas de exposição.

O protocolo de eclosão dos cistos de artêmia foi feito de acordo com o fabricante (Maramar Pet[®], Arraial do Cabo, Brasil). Foi utilizada água salina artificial (33% de salinidade), preparada com água de poço artesiano e cloreto de sódio (sal de cozinha). A temperatura da água foi mantida a 28°C e a aeração foi realizada de forma constante com o

auxílio de aerador e pedra porosa. A iluminação foi mantida durante todo o período de incubação, que durou 24 horas.

A análise foi feita em quadruplicata para cada tratamento, e em concentrações diferentes. Na análise de extrato aquoso foram testadas nas concentrações de 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100 ppm. Já no extrato em etanol foram testadas as concentrações de 0, 0,5, 1, 2, 5 e 10 ppm. Além das concentrações teste, foi avaliado um frasco controle (somente água salina) e um controle etanol. Foram adicionadas 10 artêmias por frasco contendo 10 ml da solução. A mortalidade foi observada a cada 6 horas, durante 24 horas, sendo consideradas mortas as artêmias que não apresentassem nenhum movimento após leve agitação do frasco.

4.3. Análise estatística

Os resultados de composição e atividade antioxidante dos extratos foram analisados utilizando o pacote estatístico SAS ® Studio v. 3.8 (Enterprise Edition). Os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk e submetidos a análise de variância (ANOVA) de duas vias, avaliando o efeito do tipo de solvente e do tipo de acícula. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e nível de probabilidade de 5% ($P > 0,05$).

A concentração letal mediana (CL-50) do experimento de avaliação toxicológica foi calculada a dos dados usando a função PROBIT, conforme descrito por Finney (1971), e analisado pelo software SAS ® Studio v. 3.8 (Enterprise Edition) com limites de confiança de 95%. Os dados de mortalidade foram corrigidos pela equação de Abbot (1925): $Ma = (MtMc)/(100-Mc) \times 100$, onde Ma = mortalidade corrigida; Mt = mortalidade observada no grupo teste; e Mc = mortalidade observada no grupo controle (dose 0).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Avaliação da composição química dos extratos

O protocolo de análises que foi seguido foi o descrito por KIM *et al.*, 2010, onde foi avaliado os fenólicos totais, flavonoides e medido a atividade antioxidante tanto por análise de DPPH quanto por análise de FRAP.

A concentração de compostos fenólicos totais diferiu significativamente entre os tipos de solvente e os tipos de acículas avaliadas (Tabela 1). O extrato de acículas verdes apresentou maior concentração em comparação ao extrato de acículas secas, e o extrato etanólico resultou em maior concentração de compostos fenólicos totais em comparação ao extrato aquoso. Resultado semelhante foi observado por Vizzotto e Pereira (2011), que verificaram que a água pura como solvente extrator não foi tão eficiente quando os demais solventes testados. Os autores justificam que, embora tenha polaridade próxima à dos compostos fenólicos, o uso da água pura resulta em extratos com alta impureza (ácidos orgânicos, açúcares, proteínas solúveis), podendo interferir na quantificação destes compostos.

Tabela 1 – Concentração de compostos fenólicos totais (μg de equivalentes de ácido gálico/ml) dos extratos de acículas de *Pinus* sp.

Solvente	Acículas verdes	Acículas secas
Água	1294,71 \pm 75,07 ^{aB}	156,86 \pm 33,63 ^{bB}
Etanol	3218,28 \pm 248,33 ^{aA}	551,18 \pm 59,82 ^{bA}

Médias seguidas de letras minúsculas indicam diferença significativa entre o tipo de acícula, no mesmo tipo de solvente (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Médias seguidas de letras MAIÚSCULAS indicam diferença significativa entre o tipo de solvente, no mesmo tipo de acícula (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Os extratos de acículas verdes apresentaram maior concentração de flavonoides do que aqueles de acículas secas, sendo o extrato etanólico de acículas verdes o que obteve a maior concentração de flavonoides em sua composição (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração de flavonóides ($\mu\text{g/g}$ amostra) dos extratos de acículas de *Pinus* sp.

Solvente	Acículas verdes	Acículas secas
Água	908,22 \pm 152,17 ^{aB}	59,82 \pm 8,82 ^{bB}
Etanol	2787,34 \pm 217,35 ^{aA}	1109,77 \pm 74,48 ^{bA}

Médias seguidas de letras minúsculas indicam diferença significativa entre o tipo de acícula, no mesmo tipo de solvente (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Médias seguidas de letras MAIÚSCULAS indicam diferença significativa entre o tipo de solvente, no mesmo tipo de acícula (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

O teste utilizando o radical estável DPPH mede a capacidade que as substâncias testadas possuem para doar hidrogênio radicalar a este radical, sendo assim, quanto maior o número de hidroxilas presente no extrato, maior será sua atividade antioxidante (ALVES *et al.*, 2007). Essa análise foi modificada por SÁNCHEZ-MORENO *et al.* (1998) para medir os parâmetros cinéticos. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (RUFINO *et al.*, 2007). Os extratos de acículas verdes possuem uma maior capacidade antioxidante do que os das acículas secas, sendo o extrato aquoso de acículas verdes que obteve o maior poder antioxidante (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração de DPPH (g acículas/g DPPH) dos extratos de acículas de *Pinus* sp.

Solvente	Acículas verdes	Acículas secas
Água	65,67 \pm 3,45 ^{aA}	6,91 \pm 0,44 ^{bB}
Etanol	38,29 \pm 5,70 ^{aB}	44,82 \pm 5,51 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas indicam diferença significativa entre o tipo de acícula, no mesmo tipo de solvente (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Médias seguidas de letras MAIÚSCULAS indicam diferença significativa entre o tipo de solvente, no mesmo tipo de acícula (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Em relação ao poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), a maior capacidade antioxidante foi observada nos extratos de acículas verdes em comparação com as acículas secas, já os extratos etanólicos apresentaram maior poder antioxidante que os extratos aquosos (Tabela 4).

O método do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) foi desenvolvido como uma alternativa com o objetivo de determinar a redução do ferro tanto em fluidos biológicos como em extratos de compostos puros (RUFINO *et al.*, 2006).

Tabela 4 – Concentração de FRAP (μmol sulfato ferroso/g de acícula) dos extratos de acículas de *Pinus* sp.

Solvente	Acículas verdes	Acículas secas
Água	6181,60 \pm 370,07 ^{aB}	1622,01 \pm 273,97 ^{bA}
Etanol	20776,73 \pm 757,77 ^{aA}	2529,80 \pm 358,07 ^{bA}

Médias seguidas de letras minúsculas indicam diferença significativa entre o tipo de acícula, no mesmo tipo de solvente (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Médias seguidas de letras MAIÚSCULAS indicam diferença significativa entre o tipo de solvente, no mesmo tipo de acícula (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Como observado em todas as análises, os extratos utilizando acículas verdes se mostraram com melhores resultados. Isso se deve ao fato que ao longo do tempo as acículas vão perdendo seus compostos bioativos, devido à oxidação das acículas secas que já não estão mais conectadas as árvores (TAIZ *et al.*, 2017). Alguns bioativos como flavonoides e fenólicos estão diretamente relacionados a fatores estressantes no ambiente, como temperatura, parasitos, quantidade de água disponível, etc. (BEREZINA *et al.*, 2017). Esses bioativos tendem a aumentar quando se passa por um fator estressante, com o propósito de aumentar a imunidade da árvore perante o fator estressante (BEREZINA *et al.*, 2017). Existe também uma relação entre a coloração de acícula e sua capacidade antioxidante. Quanto mais verde a acícula for, maior a sua propriedade oxidante (EMERENCIANO *et al.*, 2015). Veber *et al.* (2015) avaliaram o efeito de extração aquosa a quente e a frio e quatro diferentes proporções de água:etanol em folhas e frutos de *Syzygium cumini* em diferentes estágios de maturação, concluindo que a maior concentração de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante são obtidos com as folhas verdes.

No trabalho realizado por SARTOR *et al.* (2009), foi avaliada a interação entre os estágios de acícula de *Pinus taeda* e sua relação com a germinação de sementes de *Avena strigosa*. Foi observado que a germinação, no extrato aquoso de acícula verde foi afetada consideravelmente em comparação ao extrato aquoso de acículas secas e decompostas e moderadamente decompostas. Isso se deve ao efeito alelopático inibitório pronunciado nas sementes de aveia submetidas a concentrações de extrato de acícula verde de *Pinus taeda*. A alelopatia é descrita como a capacidade das plantas produzirem substâncias químicas, com ação

direta ou indireta (podendo ser estimuladora ou inibidora), que realiza uma influência sobre o desenvolvimento da comunidade de plantas ou dos microrganismos devido às substâncias químicas que são liberadas no ambiente (FRITZ *et al.*, 2007). Essas substâncias estão em diferentes categorias de compostos, como os fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos e peptídeos (SARTOR *et al.*, 2009).

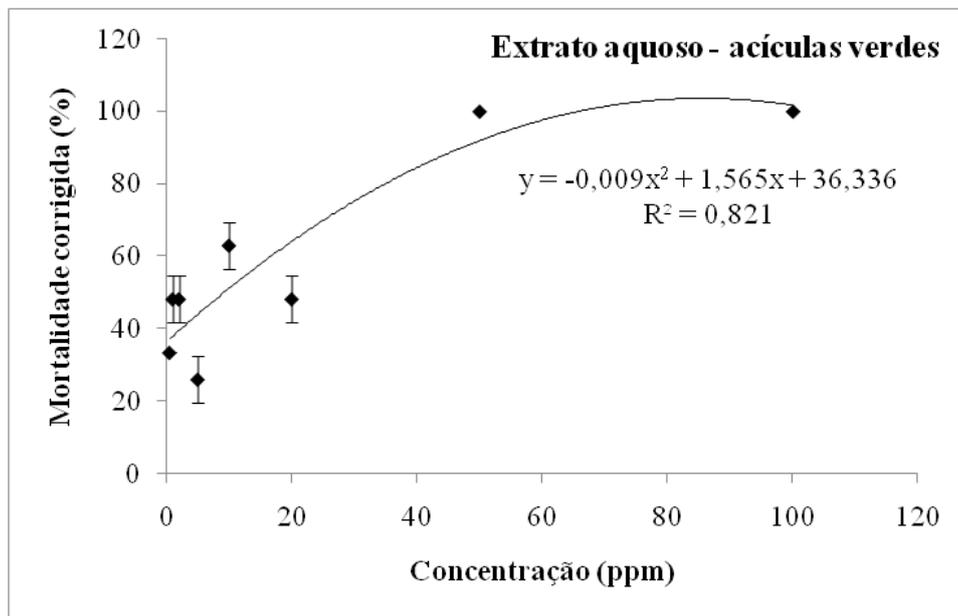
Scherer e Godoy (2014), avaliaram métodos de extração de *Xanthium strumarium* e quantificaram o conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante e composição dos compostos fenólicos, observando que o extrato etanólico foi tão eficiente quanto o extrato utilizando metanol. No trabalho desenvolvido por KIM *et al.* (2010), foi avaliado o conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante, e composição dos compostos fenólicos de acículas de *Pinus desiflora* em diferentes métodos de extração (extrato aquoso, etanólico, hexano, água + hexano e água + etanol). O melhor resultado na concentração de fenólicos foi obtido com o extrato etanólico, seguido da mistura de água + etanol. Dziejzinski *et al.*, (2021) determinaram a concentração de fenólicos e a atividade antioxidante de extratos de acículas, sementes e casca de diversas espécies de *Pinus*, em diversos tipos de solventes diferentes (extrato aquoso, hidroetanólico, etanólico e água + metanol), onde o extrato etanólico apresentou resultados promissores na concentração de fenólicos e na atividade antioxidante, equivalendo-se aos resultados obtidos com água + metanol.

O metanol é amplamente utilizado para extração de compostos bioativos de plantas, devido a sua polaridade próxima à dos compostos fenólicos, além da capacidade de extração de antocianinas (VIZZOTTO; PEREIRA, 2011). Entretanto, no presente estudo optamos por não utilizá-lo, considerando se tratar de um produto de venda controlada pela polícia federal, além dos potenciais efeitos tóxicos, tanto para humanos quanto para os ecossistemas aquáticos (VERQUÍMICA, 2021).

5.2. Avaliação toxicológica dos extratos sobre *Artemia franciscana*

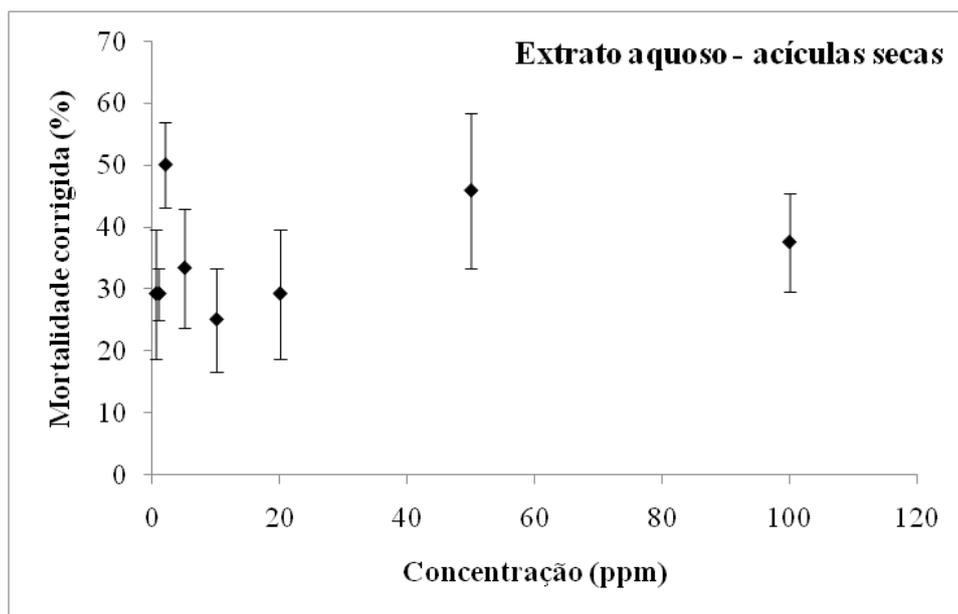
Os resultados do ensaio toxicológico se mostraram promissores, obtendo valores de CL50 de 3,27 ppm para o extrato aquoso de acículas verdes (Figura 1), 2,89 ppm para o extrato etanólico de acículas verdes (Figura 3) e 2,12 ppm para o extrato etanólico de acículas secas (Figura 4). No extrato aquoso de acículas secas, não foi possível determinar o valor de CL-50, uma vez que não foi atingido 50% de mortalidade em nenhuma das concentrações testadas (Figura 2).

Figura 1 – Mortalidade de *Artemia franciscana* após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de extrato aquoso de acículas verdes



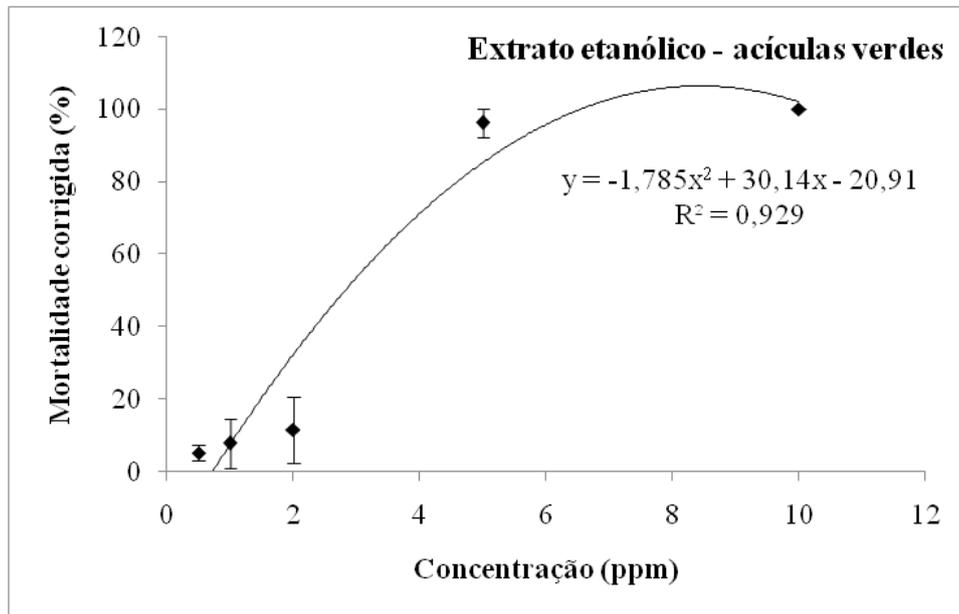
Fonte: Autoria própria

Figura 2 – Mortalidade de *Artemia franciscana* após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de extrato aquoso de acículas secas



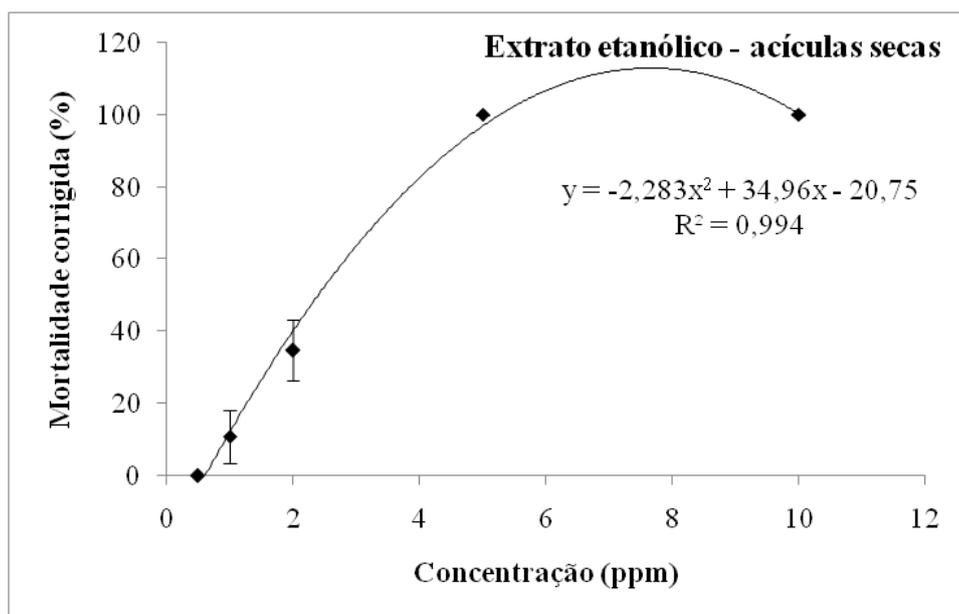
Fonte: Autoria própria

Figura 3 – Mortalidade de *Artemia franciscana* após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de extrato etanólico de acículas verdes



Fonte: Autoria própria

Figura 4 – Mortalidade de *Artemia franciscana* após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de extrato etanólico de acículas secas



Fonte: Autoria própria

De acordo com Amarante *et al.* (2011) e Nguta *et al.* (2011), os extratos brutos com valores de CL50 menores do que 100 ppm são considerados altamente tóxicos, aqueles com valores entre 100 e 500 ppm podem ser considerados moderadamente tóxicos, os extratos com valores de CL50 entre 500 e 1000 ppm, levemente tóxicos e aqueles com valores acima de 1000 ppm são considerados não tóxicos. Desta forma, os extratos avaliados neste estudo podem ser considerados altamente tóxicos para *Artemia salina*, indicando seu potencial de uso como produto para o controle de crustáceos parasitas em peixes. Resultados semelhantes foram observados por Bevilacqua *et al.* (2008) avaliando o extrato de óleo puro de neem (*Azadirachta indica*), onde observou-se 100% de mortalidade das artêmias em 24 horas com a concentração de 2,5 µl/ml.

No trabalho realizado por KARCHESY *et al.* (2016) foi testada a toxicidade de duas espécies de Pinus, comparado diferentes partes da árvore (acículas, casca, e parte interna do tronco) frente à artêmia. Para a espécie *Pinus monticola*, a casca se mostrou não tóxica (CL50 >1000 ppm) e a suas acículas foram consideradas levemente tóxicas (CL50 504 ppm), já para a espécie *Pinus ponderosa*, a casca, acícula e alburno são consideradas não tóxicas, mas o cerne da árvore foi considerado moderadamente tóxico (CL50 107 ppm).

No trabalho realizado por SENIGALIA *et al.*, (2020), avaliando a toxicidade do extrato aquoso de casca de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em artêmias, a CL-50 foi de 1380,76 µg/ml, sendo considerado atóxico. Já no trabalho de CARDOSO *et al.*, (2020), as sementes de copaíba se mostraram com melhor eficácia do que a casca.

Quando avaliado, cada parte de uma árvore possui concentrações de compostos bioativos diferentes. Isso se deve ao fato de que como cascas e folhas consistem em órgãos externos das plantas, estando assim mais susceptíveis aos danos foto-oxidativos devido à radiação UV. Devido a isso, partes da árvore como suas cascas, folhas e sementes, possuem um teor mais alto de compostos fenólicos e flavonoides, já que são esses compostos bioativos que são responsáveis pela proteção dos tecidos das plantas contra danos de radiação.

O uso de extratos de plantas para o controle de parasitas vem sendo avaliado em diversas espécies animais, com resultados divergentes, dependendo do tipo de planta, tipo de parasita, método de obtenção do extrato e concentração de compostos bioativos. No trabalho de MACIEL *et al.* (2021) foi determinada a atividade antiparasitária de plantas medicinais frente a parasitas gastrointestinais como *Entamoeba sp.* e *Giardia sp.*, utilizando a artêmia como parâmetro de toxicidade. Foram testados extratos brutos secos e hidroalcoólicos das folhas de plantas picão- preto (*Bidens pilosa*), jerimum (*Cucurbita sp.*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), hortelã de folha miúda (*Mentha piperita L*), manjeriço (*Ocimum gratissimum*), salsaínia

(*Petroselinum crispum*), coentro (*Coriandrum sativum*), mastruz (*Dysphania ambrosioides*), romã (*Punica granatum*) e o bulbo do alho (*Allium sativum*) e observou-se que a salsa foi o extrato mais tóxico, com CL-50 de 284,19 µg/ml, e o extrato de romã sendo o menos tóxico com CL-50 de 2.762,97 µg/ml. O extrato de eucalipto, mesmo sendo considerado um extrato moderadamente tóxico, obteve o melhor resultado frente aos cistos de *Giardia sp.* com alterações morfológicas em 100% dos protozoários observados.

Trabalhos como o de CASTRO *et al.* (2009) avaliaram a eficácia *in vitro* do extrato do pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*) no controle de carrapatos (*Rhipicephalus microplus*) em bovinos. Foram testados extratos etanólicos em 15% e 30%, e obteve-se eficácia parcial no extrato etanólico em 30%. RICARDO *et al.* (2015) descrevem vários trabalhos onde compostos bioativos foram utilizados para o controle de carrapatos (*Rhipicephalus microplus*) em bovinos. Os melhores resultados foram observados com *Stylosanthes scabra* e *Stylosanthes viscosa*, que provocaram a imobilização e morte de 100% das larvas de carrapato após 24 horas de contato. O óleo do capim-gordura (*Melinis minutiflora*) causou também letalidade de 100% das larvas de carrapatos após 10 minutos de contato. Já contra as fêmeas ingurgitadas, foi obtida 100% de mortalidade pelo óleo de *Eucalyptus citriodora*, na concentração de 25% e dissolvida em metanol. Sobre a atividade reprodutiva do carrapato, da ovipostura, eclosão dos ovos e das larvas foram testados com 100% de eficácia os extratos aquosos e etanólicos do pau-paraíba (*Tabebuia cassinoides*).

No trabalho descrito por CARDOSO *et al.* (2020) foi avaliado a eficácia de produtos quimioterápicos e fitoterápicos, no controle de *Argulus sp.* Os produtos fitoterápicos que foram testados foram semente de mamão, gengibre, mastruz, alho, babosa, neem, cravo e copaíba, onde o extrato de neem e de copaíba tiveram 100% e 80% de eficácia aos 180 minutos de análise.

No trabalho realizado por CHITMANAT *et al.* (2005) utilizando extrato aquoso de folhas de amendoeira (*Terminalia catappa*) foi observado a redução de infecção por fungos em ovos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em uma concentração de 200 ppm, e em uma concentração de 800 ppm foi observado a eliminação total do protozoário *Trichodina spp.* de juvenis de tilápia do Nilo logo após 2 dias de tratamento.

Já no trabalho feito por CHANSUE e TANGTRONGPIROS (2005), constatou-se que o extrato de folhas de amendoeira (*Terminalia catappa*) também possui atividade inibitória sobre a bactéria *Aeromonas hydrophila* na concentração de 0,5 mg/ml-1 de água. Onde também foi mostrado sua eficácia no controle dos ectoparasitas *Gyrodactylus spp.* e *Dactylogyrus spp.* em

kinguios (*Carassius auratus*), eliminando todos os parasitas em 2 semanas de tratamento em uma concentração de 3,104 g em 1,8 L de água.

No trabalho realizado por LIU *et al.* (2010) foi observado que extrato metanolico (10 mg/L) e o extrato aquoso (12 mg/L) da castanha da índia (*Semen aesculi*) se mostrou com 100% de eficácia contra o parasito *Dactylogyrus intermedius* em kinguios (*Carassius auratus*) aplicados na água por um período de 48 horas.

No trabalho realizado por Ekanem e Brisibe (2010), o extrato etanólico de *Artemisia annua* na concentração de 200 mg/L aplicado na água, durante 1 hora, obteve o resultado de 85% de mortalidade dos parasitas da Monogenea.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados observados, pode-se concluir que os extratos aquosos e etanólico de acículas verdes e o extrato etanólico de acículas secas possuem efeito tóxico sobre as artêmias. Sendo assim, podem ser um recurso promissor para o controle de parasitas em pisciculturas e uma possível alternativa natural contra a *lernea* e outros ectoparasitas.

Devido ao número limitado de estudos disponíveis sobre o assunto, novas pesquisas devem ser realizadas nas três fases de desenvolvimento da *lernea* (náuplios, copepoditos e adultos), devendo-se verificar a eficiência no controle do parasita. Além de estudos *in vitro* com a *lernea*, devem ser realizados estudos *in vivo* em peixes parasitados, avaliando o efeito toxicológico dos extratos em peixes saudáveis e infestados, a fim de garantir a segurança de uso do produto e verificar possíveis impactos no crescimento e parâmetros fisiológicos de peixes. Deve-se realizar uma análise sensorial no peixe logo após do uso para verificar seus efeitos sobre o peixe, e avaliar o tempo de carência pré-abate que seria necessário ter após a utilização desses extratos nos peixes. E por último avaliar o impacto que esses extratos teriam no ambiente onde o peixe habita, avaliando seus efeitos sobre a água e sobre a produtividade primária.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.

ALVES, C. Q. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007. Disponível em: < https://www.researchgate.net/profile/Juceni-David/publication/267203680_AVALIACAO_DA_ATIVIDADE_ANTIOXIDANTE_DE_FLAVONOIDEOS/links/554eab0f08ae12808b365241/AVALIACAO-DA-ATIVIDADEANTIOXIDANTE-DE-FLAVONOIDEOS.pdf> Acesso em: 10 de março de 2022.

AMARANTE, C. B. *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300015>> Acesso em: 10 de março de 2022.

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components—a resource for antiparasitic agents?. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 10, p. 462-468, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.004>> Acesso em: 24 de março de 2022.

AVENANT-OLDEWAGE, A. *Lernaea cyprinacia* and Related Species. In: WOO, Patrick.; BUCHMAN K. **Fish Parasites, Pathobiology and Protection**. Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada. 400p. 2011.

AZOPA - ASSOCIAÇÃO DOS ZOOTECNISTAS DO PARANÁ. **Patologia de peixes, genética e melhoramento de peixes**. Maringá: Coopergraf Artes Gráficas, 1999. 58p., p.16-19.

BENBROOK, C.M. **Antibiotic drug use in U.S. aquaculture**. IATP Report. Sandpoint, Idaho: The Northwest Science and Environmental Policy Center, 2002. Disponível em: <<http://www.iatp.org>> Acesso em: 14 de novembro de 2021.

BEREZINA, E. V.; BRILKINA, A. A.; VESELOV, A. P. Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia). **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 139-146, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.01.020>> Acesso em: 10 de março de 2022

BERNARDES, C. T. V. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Pinus elliottii* Engelm.** 2014. Tese (Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. Disponível em: <doi:10.11606/T.60.2014.tde-17042015-103523>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2022.

BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss.(*Meliaceae*), em *Artemia sp*: comparação da preparação comercial e do óleo puro Neem *Azadirachta indica* A. Juss.(*Meliaceae*) toxicity in *Artemia sp*: comparison of a commercial preparation and the pure oil. **Revista do Instituto de Ciência da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 157-60, 2008.

BOEGER, W. A. Lerneae: Biologia e prevenção. Paraná: **Panorama da aquicultura**, v. 56, p.32- 36, 1999. Disponível em <https://panoramadaaquicultura.com.br/lernea-biologia-eprevencao/>. Acesso em: 10 de março de 2022

BOTELHO, Rafael Grossi et al. Prós e contras da aplicação de pesticidas na aquicultura. **Aquicultura**, p. 48, 2012. Disponível em: <<https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va11-meio-ambiente03.pdf>> Acesso em: 10 de março de 2022.

BUDNI.P., *et al.* Carvedilol atenúa el estrés oxidativo en la cardiopatía chgásica crónica. **En: Arq Bras Cardiol** Vol. 98 No. 3, p 218-224, 2012.

CARDOSO, S. U. *et al.* Avaliação in vitro de quimioterápicos e fitoterápicos no controle de

Argulus sp. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 5797-5808, 2020. Disponível em: <<https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/6657>> Acesso em: 10 de março de 2022.

CARVALHO, M. L. *et al.* Estudo comparativo entre a quantidade de fenólicos totais presentes em folhas e cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. In: **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012. Disponível em: <<https://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/3748/3028>> Acesso em: 10 de março de 2022.

CASACA, J. M.; TOMAZELLI JUNIOR, O.; WARKEN, J. A. **Policultivos de peixes integrados: o modelo do oeste de Santa Catarina**. Chapecó, SC: Mercur, 2005. Acesso em: 10 de março de 2022.

CASTRO, K. N. C. *et al.* Avaliação *in vitro* do extrato do pinheiro brasileiro para controle do carrapato dos bovinos. **Cadernos de Agroecologia**, v. 4, n. 1, 2009. Disponível em: <<https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/view/4321>> Acesso em: 10 de março de 2022.

CHANSUE, N.; TANGTRONGPIROS, J. Effect of dried Indian almond leaf (*Terminalia catappa*) on monogenean parasite of gold fish (*Carassius auratus*). **Wetchasan Sattawaphaet**, 2005. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=TH2005000587>> Acesso em: 22 de março de 2022.

CHITMANAT, C. *et al.* Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a Terminalia catappa solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. In: **III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-Volume 4: Targeted Screening of Medicinal and Aromatic Plants, Economics 678**. 2003. p. 179-182. Disponível em: <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.678.25>> Acesso em: 22 de março de 2022.

DZIEDZIŃSKI, M.; KOBUS-CISOWSKA, J.; STACHOWIAK, B. Pinus Species as Prospective Reserves of Bioactive Compounds with Potential Use in Functional Food—Current State of Knowledge. **Plants**, v. 10, n. 7, p. 1306, 2021. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.3390/plants10071306>> Acesso em: 10 de março de 2022.

EKANEM, A. P.; BRISIBE, E. A. Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranhus longifilis*. **Parasitology Research**, v. 106, n. 5, p. 1135-1139, 2010. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-010-1787-0>> Acesso em: 22 de março de 2022.

EKANEM, A. P.; *et al.* Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology Research**, v. 92, n. 5, p. 361–366, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-003-1038-8>> Acesso em: 10 de março de 2022.

EMERENCIANO, D. P. *et al.* Determinação da Propriedade Antioxidante e Teores de Minerais Presentes nas Folhas de *Azadirachta Indica* A. Juss. **Revista Fitos**, v. 8, n. 2, 2015. Disponível em: <<https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/182>> Acesso em: 10 de março de 2022.

FARIAS, A. *et al.* Aspectos do efeito tóxico subletal de extrato de acícula de pinos, **VI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica**. v. 1, n. 2000, p. 3–6, 2003. Disponível em: <<https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/4701>> Acesso em: 10 de março de 2022.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 246 p

FRITZ, D. *et al.* Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthum* extracts on *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.44-48, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100010>> Acesso em: 10 de março de 2022.

FURTADO, W. E. *et al.* Antiparasitic potential of alternative treatments against larval stages of *Lernaea cyprinacea*. **Journal of Parasitic Diseases**, p. 1-10, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-250156/v1>> Acesso em: 10 de março de 2022.

GABRIELLI, M. A.; ORSI, M. L. Dispersão de *Lernaea cyprinacea* (Linnaeus) (Crustácea, Copepoda) na região norte do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** v. 17, n. 2, p. 395–399, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S010181752000000200010>> Acesso em: 10 de março de 2022.

GARCÍA MARTÍNEZ, EM.; FERNÁNDEZ SEGOVIA, I.; FUENTES LÓPEZ, A. **Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu**. Valencia: Universitat Politecnica de Valencia, 2015. 9 p. Disponível em <http://hdl.handle.net/10251/52056>. Acesso em 10 março 2022.

HEMAPRASANTH, K. P. *et al.* Efficacy of doramectin against natural and experimental infections of *Lernaea cyprinacea* in carps. **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 3–4, p. 261–269, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.005>> Acesso em: 10 de março de 2022.

HIROTA, B. C. K. *et al.* Avaliação de toxicidade *in vitro*: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente á *Artemia salina*. **Visão Acadêmica**, v. 13, n. 2, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/acd.v13i2.27834>> Acesso em: 10 de março de 2022.

KARCHESY, Y. M. *et al.* Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40064-016-2145-1>> Acesso em: 10 de março de 2022.

KIM N.Y., *et al.* Comparison of methods for proanthocyanidin extraction from pine (*Pinus densiflora*) needles and biological activities of the extracts. **Nutrition Research Practice**. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.4162/nrp.2010.4.1.16>> Acesso em: 10 de março de 2022.

KRINSKY, I. N. The Biological Properties Of Carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1351/pac199466051003>> Acesso em: 10 de março de 2022.

LEANDRO, L. F. *et al.* Antibacterial activity of *Pinus elliottii* and its major compound, dehydroabietic acid, against multidrug-resistant strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 1649–1653, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/jmm.0.081711-0>> Acesso em: 10 de março de 2022.

LIMA, J. M. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, v. 27, p. 7-11, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000100002>> Acesso em: 10 de março de 2022.

LUÍS, Â. F. S. **Pesquisa e Identificação de Compostos Bioativos em Plantas Florestais**. 2014. Tese (Graduação em Bioquímica). Universidade da Beira Interior (Portugal). Disponível em: < <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/3341> > Acesso em: 09 de março de 2022.

LUNA, J. S. *et al.* A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.004>> Acesso em: 10 de março de 2022.

LUVIZOTTO-SANTOS, Ricardo *et al.* O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 343-358, 2018. Disponível em: < https://www.pesca.agricultura.sp.gov.br/35_3_343-358.pdf > Acesso em: 21 de março de 2022.

MACIEL, K. C. *et al.* Determinação da atividade antiparasitária de plantas medicinais frente a parasitas gastrointestinais: Determination of antiparasitic activity of medicinal plants Against gastrointestinal parasites. **Archives of Health**, v. 2, n. 5, p. 1405-1415, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.46919/archv2n5-002>> Acesso em: 10 de março de 2022.

MANAL, A. A.; KORNI, F. M.M. Safety and Effectiveness of Trichlorfon in Prevention of Lernaecosis and Its Comparison with Plant Extracts in Lernaecosis Control. **Aquatic Sciences and Engineering**, v. 33, n. 2, p. 32-38, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.18864/ASE201806>> Acesso em: 10 de março de 2022.

MARINOVA, D. *et al.* Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the university of chemical technology and metallurgy**, v. 40, n. 3, p. 255-260, 2005. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/258769164_Total_phenolics_and_flavonoids_in_Bulgarian_fruits_and_vegetables> Acesso em: 10 de março de 2022.

MARTINS, M. L. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aqüicultura brasileira. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. DE LOS A.P. (Eds). **Sanidade de Organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, p. 355368, 2004. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/272785238_Cuidados_Basicos_e_Alternativas_no_Tratamento_de_Enfremidades_de_Peixes_na_Aquicultura_Brasileira> Acesso em: 10 de março de 2022.

MAXIMINIANO, A. *et al.* Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciência e Saúde Coletiva**, 2005, v. 10, 483-491p. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1590/S1413-81232005000200026>> Acesso em: 10 de março de 2022.

MEREGALLI, M. M. **Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos da casca do araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)**. 2017. Tese (Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Disponível em:
<https://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/3425.pdf> Acesso em: 09 de março de 2022.

MOREIRA, L. A. O. **Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* Leach. ee extratos de duas espécies da família Melastomataceae**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Licenciatura em Química). Instituto Federal de Educação Ciências e Tecnologias do Goiás campus Anápolis. Disponível em:
<<https://www.ifg.edu.br/attachments/article/1704/TCC%20%20Layssa%20Aparecida%20de%20Oliveira%20Moreira.pdf>> Acesso em: 10 de março de 2022.

MULLA, M.S.; SU, T. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. **Journal of American Mosquitos Control Association**, v. 15, p. 133-152, 1999. Disponível em https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V15_N2_P133-152.pdf. Acesso em 23 de março de 2022.

NASCIMENTO, J. E. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, 2008. Disponível em: <<https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/481>> Acesso em: 10 de março de 2022.

NASCIMENTO, R.; MACHADO, L.; ROSA, G. Determinação e comparação de compostos bioativos presentes nas folhas e frutos de *Olea europaea*. In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 6., 2014, Bagé. **Anais [...]**, v. 6, n. 2, 2014. Disponível em: <<https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/67892>>. Acesso em 10 março 2022.

NGUTA, J. M. *et al.* Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L.(Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v.2, p.458-78, 2011. Disponível em: <<http://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/13906> > Acesso em: 10 de março de 2022.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (Presl.). Hook, Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 230–239, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_106> Acesso em: 10 de março de 2022.

PANDEY, G.; MADHURI, S.; MANDLOI, A. K. Medicinal plants useful in fish diseases. **Plant Archives**, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/270173104_Medicinal_plants_useful_in_fish_diseases > Acesso em: 10 de março de 2022.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; Takemot, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3rd. edn. Eduem, Maringá. Universidade Estadual de Maringá. 2008.

PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário 2022**

Peixe BR da Piscicultura. São Paulo: PEIXE BR, 2022. 79 p. Disponível em:

<<https://www.peixebr.com.br>> Acesso em: 03 março 2022.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food research international**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.003>> Acesso em: 03 março 2022

PIZZOLATTI, I. A. **Lernea cyprinacea - controle e prevenção em pisciculturas de águas interiores**. 2000. Monografia (Especialização em Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 2000. 48 p. Disponível em

http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/08/LERNAE_CONTROLEPREVENCAO-irae.pdf. Acesso em 10 março 2022.

REVERTER, M. *et al.* Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50–61, 2014.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>> Acesso em: 10 de março de 2022.

ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces**. Madrid: MundiPrensa, 1981. 370p. P.171, 317, 328, 329. Disponível em:

<https://books.google.com.ec/books/about/Patolog%C3%ADa_de_los_peces.html?hl=es&id=aup-AAAACAAJ> Acesso em: 10 de março de 2022.

RODRIGUES, C. F. C. et al. Compostos bioativos e o controle de carrapatos em bovinos. **Pubvet**, v. 9, p. 287-347, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v9n7.298302>> Acesso em: 10 de março de 2022.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11964/1/cot-125.pdf> > Acesso em: 10 de março de 2022.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf > Acesso em: 10 de março de 2022.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199802\)76:2%3C270::AIDJSFA945%3E3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2%3C270::AIDJSFA945%3E3.0.CO;2-9)> Acesso em: 10 de março de 2022.

SARTOR, L. R. *et al.* Alelopatia de acículas de *Pinus taeda* na germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Avena strigosa*. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1653-1659, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000600004>> Acesso em: 10 de março de 2022.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S151605722014000100006> > Acesso em: 10 de março de 2022.

SENIGALIA, R. L. C. *et al.* Toxicidade de extratos vegetais de plantas do cerrado de uso medicinal. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55308-55317, 2020. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/14570>> Acesso em: 10 de março de 2022.

SILVEIRA, A. C. da *et al.* Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/188244/1/CT-421-1642-final.pdf>> Acesso em: 10 de março de 2022.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, p. 351-355, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S010040422007000200021>> Acesso em: 10 de março de 2022.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Pinus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.19, p. 63-68, 1959.

TÓRO, R. M. *et al.* Activity of the *Pinus elliottii* resin compounds against *Lernaea cyprinacea* in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 1–2, p. 143–149, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.08.008>> Acesso em: 10 de março de 2022.

TAÍZ, L.*et al.* (Org.). **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

VEBER, J. *et al.* Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 17, p. 267-273, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983084X/12_181> Acesso em: 10 de março de 2022.

VERQUÍMICA INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS QUÍMICOS. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ**. Metanol. 2021. 10 p. Disponível em <https://verquimica.com.br/wp-content/uploads/2021/09/FISPQ_Metanol.pdf.> Acesso em: 23 de fevereiro de 2022

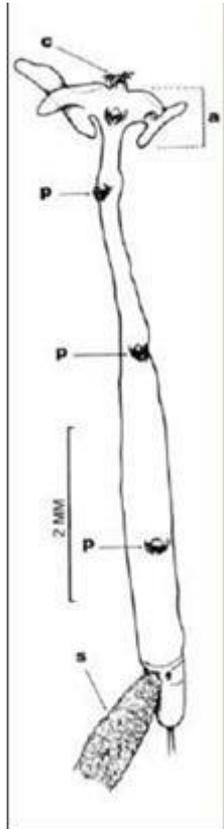
VINATEA, J. E. Artemia: um ser vivo excepcional. **Panorama da Aquicultura**, v. 4, n.25, p.8-9, 1994. Disponível em <https://panoramadaaquicultura.com.br/artemia-um-ser-vivoexcepcional/>. Acesso em: 10 de março de 2022.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M.C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011. Disponível em <https://www.scielo.br/j/rbf/a/xj4r6qZNgYTnMsbB6RCt6Lq/>. Acesso em 23 de março de 2022.

WORMS. World Register of Marine Species, **WoRMS Taxon list**. 2019. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxlist>> Acesso em: 27 de novembro de 2019.

APÊNDICES

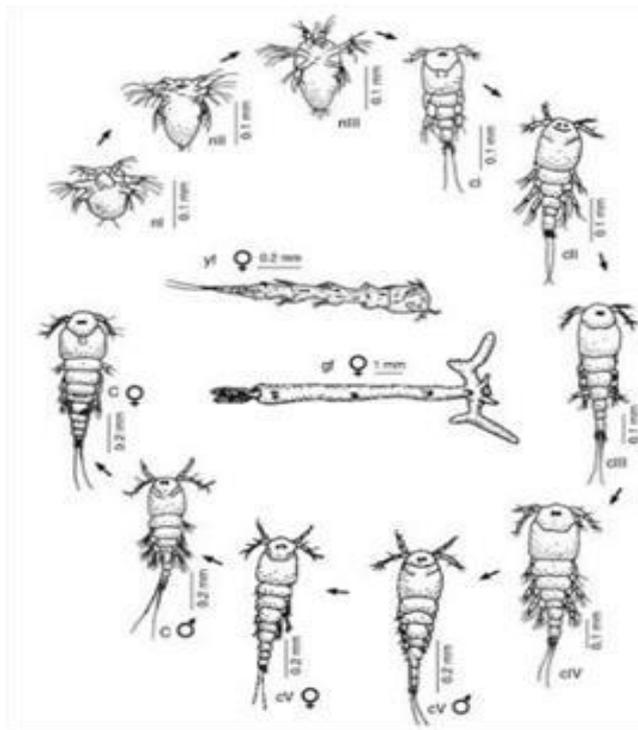
Figura 1 – *Lerneia cyprinacea* fêmea



Fonte: BOEGER (1999)

C: cabeça; A: âncoras; P: pernas; S: saco de ovos

Figura 2 Ciclo de vida da *Lernea cyprinacea*



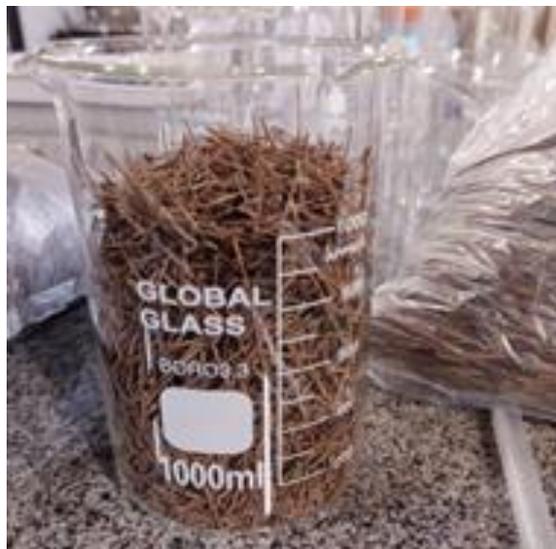
Fonte: Avenant-Oldewage (2011).

Figura 3 – Separação manual das acículas de *Pinus sp.*



Fonte: A autoria própria

Figura 4 Acículas secas devidamente pesadas e cortadas dentro do becker de 1 L



Fonte: Autoria própria

Figura 5 – Acículas verdes pesadas e cortadas dentro do becker de 1 L



Fonte: Autoria própria

Figura 6 Acículas de Pinus em imersão nos solventes etanólicos e aquosos



Fonte: Autoria própria

Figura 7 – Acículas de *Pinus sp* após 24 horas de imersão nos solventes etanólicos e aquoso



Fonte: Autoria própria

Figura 8 Realização da filtragem dos extratos verdes etanólicos e aquosos de *Pinus sp.*



Fonte: Autoria própria

Figura 9 – Realização da filtragem dos extratos secos etanólicos e aquosos de acículas de *Pinus sp.*



Fonte: Autoria própria

Figura 10 – Análise FRAP dos extratos de acículas de *Pinus sp.*



Fonte: Autoria própria

Figura 11 – Análise de DPPH dos extratos de acículas de *Pinus sp.*



Fonte: Autoria própria

Figura 12 – Análise de flavonoides dos extratos de acículas de *Pinus sp.*



Fonte: Autoria própria

Figura 13 – Análise de Fenólicos totais nos extratos de acícula de *Pinus sp*



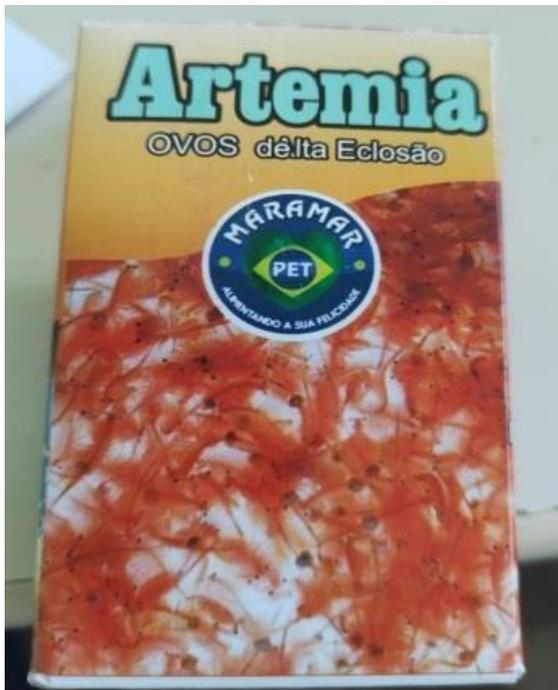
Fonte: Autoria própria

Figura 14 – Artêmias incubadas em garrafa pet



Fonte: Autoria própria

Figura 15 – Artêmias adquiridas da MARAMAR



Fonte: Autoria própria

Figura 16 – Realização da contagem das Artêmias



Fonte: Autoria própria

Figura 17 – Realização da análise de toxicidade frente a Artêmia



Fonte: Autoria própria