



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**O USO DO ÁCIDO ACÉTICO COMO ANTIPARASITÁRIO NA AQUICULTURA: EFETIVIDADE E
HISTOPATOLOGIA CAUSADA EM *MUGIL LIZA* VALENCIENNES, 1836**



MÁRIO ROBERTO CASTRO MEIRA FILHO

RIO GRANDE – RS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**O USO DO ÁCIDO ACÉTICO COMO ANTIPARASITÁRIO NA AQUICULTURA: EFETIVIDADE E
HISTOPATOLOGIA CAUSADA EM *MUGIL LIZA VALENCIENNES*, 1836**

MÁRIO ROBERTO CASTRO MEIRA FILHO

ORIENTADOR: JOABER PEREIRA JÚNIOR

CO-ORIENTADOR: ROGÉRIO TUBINO VIANNA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em Aquicultura no programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

RIO GRANDE – RS

MAIO DE 2017

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO GERAL.....	v
GENERAL ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO GERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPÍTULO 1: Toxicity and parasitocidal in vivo and in vitro evaluation of acetic acid on metazoan ectoparasites in juvenile <i>Mugil liza</i>	25
CAPÍTULO 2: Efficacy of glacial acetic acid in the control of <i>Trichodina</i> sp. and <i>Apiosoma</i> sp. associated with <i>Mugil liza</i>	46
CAPÍTULO 3: Alterações histopatológicas em brânquias e fígado de juvenis de <i>Mugil liza</i> expostos ao ácido acético.....	63
CONCLUSÕES GERAIS.....	85
RECOMENDAÇÕES.....	86

Dedico esta tese ao meu pai

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo apoio por mais essa etapa, pelo amor e inspiração, essenciais para que eu pudesse realizar essa tese, e ao meu pai por me mostrar, da maneira mais difícil, o que verdadeiramente importa;

Às minhas irmãs Carla, Roberta e Mariane e meus cunhados José Carlos, André e Nico, pelo apoio e pelo exemplo de boas pessoas, que tento seguir;

Aos meus sobrinhos Serena, Bernardo, Tomás, Flora e Félix, minhas fontes de alegria;

À minha noiva Mariane, pelo apoio, amizade, parceria, amor, carinho e paciência durante esses últimos anos;

À minha segunda família, Sr. Riva, Dona Neide, Marina, Júnior, Vinícius e Murilo, pelo apoio e por me acolherem como parte da família.

Ao professor Joaber, pela oportunidade de desenvolver este estudo, pela confiança, pela paciência, pelo exemplo de profissional, pela essencial contribuição para minha formação e pelas conversas sempre descontraídas, e sempre motivadoras e inspiradoras, e também à Dona Clélia por me receberem em sua casa, onde os principais entraves da tese puderam ser resolvidos;

Ao professor Rogério, pela orientação, pela paciência, pelas conversas descontraídas, pelo exemplo de profissional e por toda ajuda na minha tese;

Aos professores membros da banca pelas valiosas contribuições e por aceitarem participar da defesa da minha tese;

Aos meus amigos do LABIPOA, pela parceria, e em especial ao Robert e a Sabrina pelo auxílio na montagem, preparação e identificação dos parasitos;

Aos meus amigos do LAC por toda amizade durante esses quatro anos;

Aos meus amigos do LIPOA por toda ajuda, em especial à Virgínia e ao Prof. Romano,

Aos meus amigos da EMA pela amizade e em especial ao Victor e ao Rafa pelo auxílio na realização dos experimentos da minha tese;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese,

Muito obrigado!

RESUMO GERAL

Nesta tese foram estudadas a atividade antiparasitária do ácido acético glacial em metazoários e protozoários ectoparasitos da tainha *Mugil liza*, a toxicidade (CL₅₀-1h) do ácido acético glacial e as alterações histológicas de fígado e brânquias de juvenis de *M. liza*, causadas pelo banho terapêutico deste ácido. No primeiro capítulo, a CL₅₀-1 h para juvenis de *M. liza* foi estimada em 1402,62 mg L⁻¹. As espécies de parasitos estudadas foram os copépodos *Ergasilus lizae* e *E. versicolor*, e os monogenóideos *Solostamenides* cf. *platyorchis* e *Ligophorus* spp. A concentração efetiva mediana (CE₅₀-1h) de ácido acético foi determinada por meio de testes de toxicidade in vitro para cada espécie de parasito. Com os dados da CL₅₀-1 h e CE₅₀-1 h foram estabelecidos os índices terapêuticos para cada espécie de parasito em relação ao hospedeiro, que foram de 16,82 para *E. lizae*, 15,59 para *E. versicolor*, 9,69 para *S. cf platyorchis* e 5,53 para *Ligophorus* spp. Para avaliação in vivo foram utilizadas as concentrações equivalentes à 0%, 25%, 50% e 75% da CL₅₀-1 h, que corresponderam às concentrações de 0 mg L⁻¹ (controle), 350,65 mg L⁻¹, 701,31 mg L⁻¹ e 1051,96 mg L⁻¹, respectivamente. Parte dos peixes utilizados na avaliação in vivo foram analisados para parasitologia e parte para histopatologia, cujos dados são apresentados no terceiro capítulo. Devido à alta mortalidade dos hospedeiros nas concentrações mais elevadas, os peixes sobreviventes à exposição ao ácido acético nas concentrações de 701,31 mg L⁻¹ e 1051,96 mg L⁻¹ foram examinados apenas para histopatologia. Os dados parasitológicos foram apresentados utilizando os índices parasitários de prevalência (P%), intensidade média de infestação (IMI) e abundância média (AM). Os valores de AM foram utilizados para determinar a eficácia da concentração de 350,65 mg L⁻¹ para cada taxa parasito encontrado, que foram 100% para *S. cf platyorchis*, 91,47% para *Ligophorus* spp. e 73,57% para *E. lizae*. Na avaliação in vivo não foram encontrados espécimes de *E. versicolor*. Embora *E. lizae* tenha sido o taxon no qual o ácido acético glacial apresentou o maior índice terapêutico, foi também o taxon onde esta droga apresentou a menor eficácia, provavelmente pela forte adesão nas brânquias pelas suas antenas modificadas, mesmo após a morte do parasito. Com o primeiro capítulo-foi constatado que o ácido acético na concentração de 350,65 mg L⁻¹ foi eficaz contra os metazoários ectoparasitos de *M. liza*. No segundo capítulo foi avaliada a eficácia do ácido acético no controle dos ciliados *Trichodina* sp. e *Apiosoma* sp. em juvenis de *M. liza*. Para isso, os peixes foram submetidos às concentrações de 0, 238, 476, e 715 mg L⁻¹ de ácido acético, que são equivalentes à 0, 33,3, 66,6 e 100% do valor do CL₀₁-1h, obtidos a partir dos dados do teste de toxicidade do primeiro capítulo. Os peixes após o

tratamento tiveram duas horas de recuperação. Após esse período foram realizadas as raspagens do tegumento e das brânquias dos lados direito e esquerdo do hospedeiro. Após a preparação das lâminas, os ciliados foram contados. Observou-se que o ácido acético na concentração de 238 mg L⁻¹ foi eficaz contra *Apiosoma* sp. e na concentração de 476 mg L⁻¹ foi eficaz contra *Trichodina* sp. O terceiro capítulo-consiste da avaliação das alterações histológicas do fígado e brânquias de juvenis de *M. liza* expostos ao ácido acético glacial. Foram realizados banhos de 1 h com ácido acético nas concentrações de 0, 350,65, 701,31 e 1051,96 mg L⁻¹. Após o banho, os peixes foram mantidos em água limpa por 24 h para recuperação. Devido à mortalidade nas concentrações maiores, foram analisados oito peixes das concentrações de 0 e 350,65 mg L⁻¹, e quatro das concentrações de 701,31 e 1051,96 mg L⁻¹. A análise do fígado foi feita por quantificação da área total do corte histológico e da área com cada tipo de lesão. Para garantir uma amostragem uniforme da distribuição das alterações patológicas nas brânquias, um arco branquial de cada hospedeiro foi examinado. Cada arco foi dividido em três campos: os cinco primeiros filamentos, os cinco medianos e os cinco últimos foram examinados. Para cada filamento foram contados (presença/ausência) cada tipo de alteração histológica encontrada. Em uma segunda análise, uma nova amostragem foi realizada. Nesta avaliação, a lamela primária central em cada um dos campos foi examinada para determinar o número de lamelas secundárias com cada tipo de patologia. Com estes dados, foi determinada a ocorrência de lesão para cada tipo de lesão. Houve forte correlação positiva entre a porcentagem de área do fígado com necrose focal e com infiltrados inflamatórios, com as concentrações utilizadas. Em todos os tratamentos, inclusive no controle, foram observadas lesões lamelares caracterizadas por hiperplasia, fusão das lamelas secundárias, desprendimento do epitélio lamelar e perda do epitélio lamelar. Não houve diferença da frequência de hiperplasia, fusão lamelar e desprendimento do epitélio lamelar entre os tratamentos. No entanto, o uso do ácido acético, mesmo na menor concentração testada (350,65 mg L⁻¹), causou significativo aumento na porcentagem de perda de epitélio das lamelas secundárias.

Palavras-chave: Ácido etanoico; tainhas; aquicultura; parasitos, lesões

GENERAL ABSTRACT

In this thesis the antiparasitic activity of glacial acetic acid was studied in metazoan and protozoan ectoparasites of the lebranche mullet, *Mugil liza*, the toxicity (LC₅₀-1 h) of glacial acetic acid and the histological changes of liver and gills of *M. liza* juveniles, caused by therapeutic bath of this acid. In the first chapter, the LC₅₀-1 h for *M. liza* juveniles was estimated at 1402.62 mg L⁻¹. The species of parasites studied were the copepods *Ergasilus lizae* and *E. versicolor*, and the monogenoids *Solostamenides* cf. *platyorchis* and *Ligophorus* spp. The median effective concentration (EC₅₀-1h) of acetic acid were determined trough in vitro toxicity tests for each parasite species. With data from CL₅₀-1 h and CE₅₀-1 h the therapeutic indices for each host species were established, which were 16.82 for *E. lizae*, 15.59 for *E. versicolor*, 9.69 for *S. cf platyorchis* and 5.53 for *Ligophorus* spp. For in vivo evaluation, concentrations equivalent to 0%, 25%, 50% and 75% of LC₅₀-1h were used, which corresponded to concentrations of 0 mg L⁻¹ (control), 350.65 mg L⁻¹, 701.31 mg L⁻¹ and 1051.96 mg L⁻¹, respectively. Part of the fish sample used in the in vivo evaluation were analyzed for parasitology and part for histopathology, whose data are presented in the third chapter. Due to the high mortality of hosts at the highest concentrations, fish surviving to acetic acid exposure at the concentrations of 701.31 mg L⁻¹ and 1051.96 mg L⁻¹ were examined only for histopathology. The parasitological data were presented using the parasitic index of prevalence (P%), mean infestation intensity (MII) and mean abundance (MA). The MA values were used to determine the efficacy of T1 concentration (350.65 mg L⁻¹) for each parasite taxa found, which were 100% for *S. cf platyorchis*, 91.47% for *Ligophorus* spp. and 73.57% for *E. lizae*. In the in vivo evaluation no specimens of *E. versicolor* were found. Although *E. lizae* had been the taxon which the acetic acid presented the highest therapeutic index, it was also the taxon that this drug showed the least efficacy, probably due to the strong adhesion in the gills by its modified antennas, even after the death of the parasite. With the first chapter it was verified that acetic acid in the concentration of 350.65 mg L⁻¹ was effective against the metazoan ectoparasites of *M. liza*. In the second chapter the efficacy of acetic acid in the control of the ciliates *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp. in *M. liza* juveniles. In the second article the efficacy of acetic acid in the control of the protozoa *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp. in *M. liza* juveniles were evaluated. For this, the fish were submitted to concentrations of 0, 238, 476, and 715 mg L⁻¹ of glacial acetic acid, which are equivalent to 0, 33.3, 66.6 and 100% of the value of LC₀₁-1 h, obtained from the toxicity test data of the first chapter. The fish after treatment had two

hours of recovery. After this period the scrapes of the integument and gills on the right and left sides of the host were performed. After the slides were prepared, they were analyzed, and the ciliates were counted. It was observed that acetic acid at the concentration of 238 mg L⁻¹ was effective against *Apiosoma* sp. And at the concentration of 476 mg L⁻¹ was effective against *Trichodina* sp. The third article consists of the evaluation of the histological alterations of liver and gills of juveniles of *M. liza* exposed to glacial acetic acid. Acetic acid baths were performed at concentrations of 0, 350.65, 701.31 and 1051.96. After bathing, the fish were kept in clean water for 24 h for recovery. Due to the mortality at the higher concentrations, eight fish of 0 and 350.65 mg L⁻¹ treatments, and four of 701.31 and 1051.96 mg L⁻¹ treatments were analyzed. Liver analysis was done by quantifying the total area of the histological section and the area with each type of lesion. To ensure uniform sampling of the distribution of pathological changes in the gills, a branchial arch of each host was examined. Each arch was divided into three fields: the first five filaments, the five medians and the last five were examined. For each filament were counted (presence / absence) each type of histological alteration found. In a second analysis, a new sampling was performed. In this evaluation, the central primary lamella in each field was examined to determine the number of secondary lamellae with each type of pathology. With these data, the occurrence of injury was determined for each type of lesion. There was a strong positive correlation between the percentage of liver area with focal necrosis and inflammatory infiltrates, with the concentrations used. Lamellar lesions characterized by hyperplasia, secondary lamellae fusion, lamellar epithelial lifting and loss of lamellar epithelium were observed in all treatments, including in control. There was no difference in the frequency of hyperplasia, lamellar fusion and lifting of the lamellar epithelium between treatments. However, the use of acetic acid, even at the lowest concentration tested (350.65 mg L⁻¹), caused a significant increase in the percentage of epithelial loss of the secondary lamellae.

Keywords: Ethanoic acid; mullets; aquaculture; parasites; lesions.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Aquicultura

A população humana mundial vem crescendo em uma taxa anual de 1,6% nas últimas décadas, e o suprimento de alimentos é um grande desafio no qual a aquicultura apresenta potencial para solucionar. O pescado vem ganhando mais aceitação de mercado, que é refletido no aumento anual do consumo médio per capita (FAO, 2016).

Atualmente a produção de pescado é essencial para o suprimento de proteínas para a população humana, representando em 2013, 6,7% do total de proteína consumida no mundo e 17 % da proteína de origem animal (FAO, 2016).

A aquicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce mundialmente, e é a principal responsável pelo crescimento anual de 3,2% da produção mundial de pescado, uma vez que a produção pela pesca se encontra praticamente estagnada nas últimas décadas. Em 2014 a produção total do pescado atingiu a marca de 177,2 milhões de toneladas, das quais, 73,8 milhões de toneladas (U\$ 160,2 bilhões) foram produzidos pela aquicultura (FAO, 2016). É esperado que até 2030 a produção anual pela aquicultura seja de 93,6 milhões de toneladas (World Bank, 2013). Dos 73,8 milhões de toneladas produzidos em 2014 pela aquicultura, 49,8 milhões de toneladas (67,5%) são de peixes, com o valor da produção estimado em U\$ 99,2 bilhões (FAO, 2016).

No Brasil, a produção total de pescado em 2014 foi de aproximadamente 1,3 milhões de toneladas, das quais 42,3% foram produzidos pela aquicultura (FAO, 2017). Cerca de 84,3% da produção brasileira pela aquicultura são de peixes de água doce, 11,6% são de crustáceos e 3,9% são de moluscos.

Apesar da maior parte da produção brasileira pela aquicultura ser de espécies exóticas (tilápias e carpas), o cultivo de espécies nativas vem ganhando espaço no Brasil (Pincinato e Asche, 2016; Saint-Paul, 2017). Mesmo com as grandes áreas costeiras e estuarinas ao longo da costa do Brasil, o cultivo de espécies de peixes marinhos e estuarinos ainda não é explorado. No entanto, pesquisas vêm sendo feitas para o desenvolvimento de pacotes tecnológicos para o cultivo das espécies de interesse comercial (Sampaio et al., 2010).

1.2. A tainha *Mugil liza*

Mugilidae, conhecidos popularmente como tainhas, é uma das famílias de teleósteos mais amplamente difundidas nas águas tropicais e subtropicais do mundo, principalmente em regiões costeiras estuarinas, (Croseti e Blaber, 2016; Menezes, 1983). Muitas espécies dessa

família representam grande importância, tanto ecológica quanto econômica, em diversas regiões do mundo (Croseti, 2016).

Os mugilídeos podem dominar o ambiente onde ocorrem, ocupando uma baixa posição na teia trófica devido seu hábito detritívoro (Croseti e Blaber, 2016). O modo especializado de alimentação das tainhas restringe a maioria das espécies a ecossistemas onde os sedimentos são ricos em matérias orgânicas, como regiões costeiras e estuários (Cardona, 2016).

As tainhas são um grupo de grande importância econômica, tanto para pesca, quanto para aquicultura (Croseti, 2016). De acordo com a FAO (2016), em 2014, a produção total de tainhas foi de 728.546 t, das quais, 140.187 t (19,24%) foram produzidas pela aquicultura. A produção mundial de mugilídeos pela aquicultura em 2013 foi de 124.937 t de tainhas *nei* (espécies não identificadas), 12.245 t de *Mugil cephalus*, 954 t de *Liza haemotocheila* e 7 t de *M. liza* (Croseti, 2016). Em 2014 a produção de *M. liza* pela aquicultura foi de 42 t, com o valor estimado em US\$ 91.000 (FAO, 2017).

O cultivo de tainhas é realizado em ambiente de água doce, ambiente marinho, e predominantemente (74% da produção) em ambiente estuarino (Crosetti, 2016). Atualmente o Egito é o principal produtor de tainhas pela aquicultura, com uma produção anual média de 145.883 t entre os anos de 2003 a 2012 (Sadek, 2016). No Egito são utilizados quatro tipos diferentes de sistemas de produção de tainhas: sistemas intensivos (0,4%), em arrozais (3,4%), em gaiolas (24,5%) e em viveiros escavados em sistema semi-intensivo (71,7%) (Sadek, 2016).

A tainha *M. liza* é uma das espécies de Mugilidae mais importantes para a atividade pesqueira nas regiões sudeste e sul do Brasil (Silva e Araújo, 2000; Menezes, 1983; Seckendorff e Azevedo, 2007), podendo atingir até 1 m de comprimento e pesar até 8 kg (Menezes, 1983). *Mugil liza* é amplamente distribuída na costa oeste do Oceano Atlântico, do sul da Flórida até a Argentina (Barleta e Dantas, 2016). É uma espécie detritívora, alimentando-se de diatomáceas, crustáceos e moluscos (Vasconcelos Filho, 2009). *Mugil liza* é considerada estuarina-dependente, encontrada em grandes números em regiões estuarinas durante certos períodos de seu ciclo de vida (Garcia et al., 2003). A desova de *M. liza* ocorre no ambiente marinho (Albieri e Araújo, 2010, Lemos et al., 2014). Após a eclosão dos ovos no mar, as larvas ficam à deriva na zona de rebentação até atingir 20 mm, quando se tornam recém-juvenis, migrando para o fundo e iniciando a alimentação detritívora, e com o aumento de tamanho, migram para as regiões estuarinas (Vieira, 1991).

Atualmente, mesmo apresentando a produção pela aquicultura relativamente baixa (Croseti, 2016; FAO, 2017), *M. liza* vêm se destacando como uma espécie promissora para o

cultivo, por ser euritérmica (Okamoto et al., 2006), eurihalina (Fonseca-Neto e Spach, (1999); Lisboa et al., 2015a; Lisboa et al. 2015b) de fácil manejo reprodutivo (Alvarez-Lajonchere et al., 1988; Godinho et al. 1993; Nomura, 1980; Monteiro-Ribas e Bonecker, 2001), com alta tolerância ao nitrato (Poersch et al., 2007), e tem a tolerância à amônia e ao nitrito aumentadas com o aumento da salinidade (Sampaio et al., 2002). Além disso, no ambiente é considerada uma espécie com taxa de crescimento de moderada para rápida (González-Castro et al., 2009).

1.3. Parasitismo na aquicultura

Atrelado ao crescimento da aquicultura ocorre sua intensificação, com o aumento da produtividade sem a necessidade de maior uso de área (Naylor et al., 2000). As elevadas densidades nas quais os animais são cultivados em sistemas intensivos favorecem a disseminação de doenças infecciosas (Abd El-Galil e Aboelhadid, 2002; Krkosek, 2010; Leung e Bates, 2013; Menerrat et al., 2010; Naylor et al., 2000) podendo causar consideráveis prejuízos econômicos (Shinn et al., 2014).

De acordo com Shinn et al. (2015), a perda econômica anual causada por parasitos em teleósteos cultivados no mundo está entre US\$1,05 e 9,58 bilhões. Quando comparadas a estimativa econômica dada pela FAO (2016) com a de Shinn et al. (2015), é possível estimar que anualmente é perdido de 0,6 % a 6,0% do total financeiro que poderia ser arrecadado caso não houvessem perdas pelo parasitismo. Shinn et al. (2015) apontam o parasitismo como responsável direto ou indireto (facilitando infecções secundárias) pela perda de 20% dos animais em fase de larvicultura e de 1 a 10% dos peixes em tamanho de abate. No entanto, esta estimativa considera apenas as perdas por mortalidade, não levando em conta os gastos com tratamento dos animais parasitados, e, tampouco, a perda econômica causada pelos parasitos na diminuição do desempenho zootécnico dos peixes cultivados. Além disso, Lafferty (2008), estudando peixes de ambiente estuarino, constatou que a biomassa de parasitos nos peixes compreendia de 0,74 a 1,56% da biomassa dos peixes analisados. Dessa forma, apesar de ainda não existirem estudos que estimem a biomassa de parasitos nos peixes cultivados, é provável que os dados de prejuízo causado pelos parasitos apresentados por Shinn et al. (2015) possam estar ainda subestimados, embora já sejam importantes.

1.4. Parasitos da tainha *Mugil liza*

Apesar do potencial para aquicultura, em ambientes naturais *M. liza* apresenta fauna parasitária diversa, composta tanto por endoparasitos quanto por ectoparasitos (Abdallah et al., 2009; Alarcos e Etchegoin, 2010; Amado e Rocha, 1995; Azevedo et al., 2010; Azevedo et al., 2011; Carnevia e Speranza, 2003; Conroy et al., 1985; Espinoza, 2014; Farias et al., 1995; Farias e Cohen, 2005; Fonseca et al., 2000; Knoff e Boeger, 1994; Knoff et al., 1994, 1997; Kohn et al., 1994; Marchiori et al., 2015; Marcotegui e Martorelli, 2009; Martorelli et al., 2012; Mentz et al., 2016; Oliveira et al., 1988; Oliveira et al., 2007; Pahor-Filho et al., 2012; Paperna e Overstreet, 1981; Plaul et al., 2013; Ranzani-Paiva et al., 1997; Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004; Simões et al., 2010; Siquier, 2012; Siquier e Núñez, 2009), o que pode representar uma ameaça para seu cultivo.

Um importante grupo de ectoparasitos são os protozoários, que apresentam ampla diversidade, com aproximadamente duas mil espécies parasitas de peixes (Eiras, 1994). Dentre os protozoários, os ciliados (Ciliophora) são provavelmente o grupo que apresentam maior número de espécies (Lom, 2005). Alguns Ciliophora são ectocomensais de tegumento e brânquias de peixes, sem que sejam observados prejuízos ao hospedeiro (Eiras, 1994). No entanto, quando a intensidade de infestação é elevada, os ciliados são responsáveis por muitas perdas econômicas em sistemas de cultivos, se tornando então, de interesse para aquicultura (Martins et al., 2015; Shinn et al., 2014).

Trichodinidae é um importante grupo de Ciliophora, que apresenta espécies distribuídas globalmente, das quais *Trichodina* spp. são as mais comumente encontradas, infestando principalmente tegumento e brânquias de peixes (Xu et al., 2015). Geralmente as infestações por *Trichodina* spp. não causam danos aparentes em peixes selvagens não estressados, pois alimentam-se apenas de rejeitos celulares e bactérias (Lom, 2005). No entanto, quando em peixes cultivados, a ocorrência desses organismos pode se tornar intensa, gerando danos aos tecidos epiteliais (Lom, 2005), sendo consideradas, portanto, como ectoparasitos facultativos (Yokoyama et al., 2015).

Elevadas intensidades de infestação por *Trichodina* spp. podem causar danos nas células epiteliais ou da epiderme (Ovcharenko, 2015), e outras lesões como descamação do epitélio celular, degeneração vacuolar, hipertrofia (Abdel-Baki et al., 2011), além de levar à diminuição no crescimento (Barker et al., 2002; Yokoyama et al., 2015), ou nos casos mais graves, à morte (Abd El-Galil e Aboelhadid, 2002; Khan, 2004; Xu et al., 2015).

Outro grupo de Ciliophora com importância para aquicultura é formado pelas espécies de *Apiosoma*, que são caracterizadas como ectocomensais de brânquias e tegumento de organismos aquáticos, principalmente de peixes (Eiras, 1994; Li et al., 2008). Apesar de *Apiosoma* spp. não causarem lesões diretas, em altas intensidades esses organismos podem reduzir a superfície respiratória do epitélio branquial do hospedeiro (Martins et al., 2015), causando irritação das brânquias e aumento na produção de muco (Eiras, 1994), o que pode afetar as trocas gasosas (Abowei et al., 2011, Reda, 2011). Por outro lado, Moyses et al. (2015) consideram *Apiosoma* spp. como parasitos obrigatórios e, relacionam a infestação por esse grupo à destruição massiva do epitélio branquial e do tegumento.

Além dos protozoários, os metazoários ectoparasitos também são de grande importância para aquicultura, sendo um grupo bastante diverso, que podem incluir monogenóides, crustáceos, moluscos e hirudíneos (Simková e Rohde, 2013).

Monogenoidea é composto predominantemente por ectoparasitos de brânquias e do tegumento de peixes (Whittington, 1998). Esses parasitos são comumente encontrados em peixes cultivados, e seu controle é normalmente considerado difícil (Pironet e Jones, 2000). Devido seu ciclo de vida direto, os monogenóides são capazes de realizar rápida disseminação em sistemas de cultivo, podendo ser transmitidos diretamente pelo contato entre hospedeiros ou pelo estágio infectante do oncomiracídio (Dobson et al., 2008).

Os monogenóides são frequentemente associados a danos histológicos de brânquias (Fujimoto et al., 2014; Jalali e Barzegar, 2005, Paperna, 1964) e a altas taxas de mortalidades e perdas econômicas (Paperna, 1975; Shinn et al., 2014). São divididos em duas subclasses: Monopisthocotylea e Polyopisthocotylea. Além das lesões causadas pela alimentação direta, as estruturas de adesão ao hospedeiro dos monogenóides de ambas as subclasses também podem causar danos (Arafa et al., 2009; Wong e Gorb, 2013).

Os Polyopisthocotylea são mais frequentemente encontrados em brânquias e cavidade oral. Apresentam como estrutura de adesão múltiplas pinças no háptor (Hayward, 2005). Apesar destes parasitos se alimentarem principalmente de sangue (Eiras, 1994), na natureza são considerados benignos (Hayward, 2005). No entanto, em sistemas de cultivo onde os organismos cultivados podem estar em condições estressantes, a resistência dos peixes pode diminuir, ocasionando rápido crescimento populacional (Hayward, 2005). Indivíduos intensamente parasitados por Polyopisthocotylea tendem a apresentar anemia (Hayward, 2005).

Dentre os Polyopisthocotylea, *Solostamenides* spp. parecem estar frequentemente associados a mugilídeos (Jianyin e Tingbao, 2001; Kritsky e Öktener, 2015; Öztürk, 2013,

Williams, 1991). No Brasil, *Solostamenides platyorchis* foi encontrada parasitando brânquias de juvenis de *M. liza* (Pahor-Filho et al., 2012; Ramos et al., 2014). Essa espécie foi descrita em *Mugil cephalus* capturados na China (Jianyin e Tingbao, 2001).

Monopisthocotylea apresentam espécies com ampla diversidade na forma, função e estrutura do háptor, e dos órgãos de adesão ao hospedeiro (Whittington, 2005), que estão adaptados para os diversos sítios de infestação no qual ocorrem, como o tegumento, nadadeiras, brânquias, cavidade oral, córnea, tecido nasal, e sistema urogenital (Hayward, 2005). Monopisthocotylea são geralmente ovíparos, mas algumas espécies podem ser vivíparas, sem a fase de oncomiracídio, sendo a disseminação nesse último caso por meio do contato entre os hospedeiros (Whittington, 2005).

Espécies de Monopisthocotylea alimentam-se predominantemente de células epiteliais que estão disponíveis em todos os sítios de infestação (Eiras, 1994). No ambiente natural, o parasitismo por Monopisthocotylea é considerado como de baixo ou nenhum impacto ao hospedeiro (Whittington, 2005). No entanto, peixes em ambientes confinados podem favorecer o crescimento exponencial destes parasitos, o que pode ser ainda mais potencializado caso os peixes estejam estressados. Quando intensamente infestados, os peixes podem ter as regiões epiteliais danificadas, o que pode gerar perda de escamas, hemorragias, úlceras, problemas osmóticos, abrir portas para infecções secundárias e levar à morte (Whittington, 2005).

Um grupo de Monopisthocotylea que parasita exclusivamente mugilídeos são *Ligophorus* spp. (Mariniello et al., 2004). Até o momento, seis espécies de *Ligophorus* foram descritas para *M. liza*, são elas: *L. brasiliensis*, *L. guanduensis*, *L. lizae*, *L. tainhae*, *L. saladensis* e *L. uruguayense*, e todas com registro de ocorrência no Brasil (Abdallah et al., 2009; Marchiori et al., 2015).

Dentre os metazoários parasitos, os crustáceos são o grupo mais diverso e amplamente distribuído (Rohde, 2005), e dentro desse grupo, os copépodos se destacam por apresentar o maior número de espécies (Eiras, 1994).

Os copépodos parasitos apresentam grande variabilidade morfológica e vários tipos de ciclo de vida (Eiras, 1994). Esses parasitos geralmente se alimentam de muco, tecidos, e sangue do hospedeiro (Johnson et al., 2014). O parasitismo por copépodos pode induzir a severas alterações patológicas no tecido dos peixes onde infesta, principalmente nas brânquias (Aladetohun et al., 2014; Molnár e Székely, 2004), não só devido a alimentação do parasito, mas também pelas lesões causadas pelas estruturas de adesão ao hospedeiro, podendo em ambos os casos abrir portas para infecções secundárias (Johnson et al., 2004).

Os ergasilídeos são copépodos cuja fase de vida parasitária é mais frequentemente encontrada parasitando brânquias de peixes (Eiras, 1994). Esses parasitos estão associados à elevadas mortalidades quando infestam peixes em sistemas de cultivo (Hogans, 1989; Paperna, 1975; Johnson et al., 2004). Dessa família, *Ergasilus* é o gênero mais frequente, apresentando distribuição mundial. Nas espécies desse gênero, tanto os machos quanto as fêmeas são de vida livre antes da cópula. Após a cópula, o macho morre e a fêmea torna-se parasita (Eiras, 1994).

Poucos são os relatos dos efeitos do parasitismo por ergasilídeos em mugilídeos. Paperna (1975) relata que elevadas infestações de *Ergasilus lizae* foram responsáveis por causar mortalidades em *Mugil cephalus* cultivados e gerar consideráveis perdas econômicas. Essa espécie pode parasitar tanto hospedeiros marinhos quanto de água doce (Eiras, 1994).

1.5. Drogas antiparasitárias

Drogas vêm sendo estudadas para remoção dos parasitos que infestam/infectam os peixes cultivados (Balta et al., 2008; Chagas et al., 2016; Pahor-Filho et al., 2012; Schmahl et al., 1989a). No entanto, o uso de drogas deve ser realizado com cautela, uma vez que até mesmo as drogas mais usuais na aquicultura, quando em concentrações não adequadas, podem causar efeitos indesejáveis aos hospedeiros (Führ et al., 2012; Guimarães et al., 2007; Pahor-Filho et al., 2014; Velmurugan et al., 2009), além de impactos para saúde humana e para o meio ambiente (Cabello, 2006; Rico et al., 2012; Erondu e Anyanwu, 2005).

Apesar de vários estudos já terem sido realizados com sucessos variáveis para remoção de *Trichodina* spp. e *Apiosoma* spp., (Abd El-Galil e Aboelhadid, 2012; Balta, 2008; Chitmanat et al., 2005; Davis, 1946; Diggles, 2000; Ikefuti et al., 2015; Madsen et al., 2000; Mehlhorn et al., 1988; Noga, 2010; Schmahl et al., 1989a; Schmahl et al., 1989a; Schmahl et al., 1989b; Yao et al., 2011) é importante que sejam ampliadas as opções de drogas, para que possam ser escolhidas as que mais se adequem ao hospedeiro e às condições do ambiente em que serão utilizadas.

Pahor-Filho et al. (2012) demonstraram a eficácia do formaldeído no controle dos monogenóideos *L. uruguayense*, e *S. cf. platyorchis* em juvenis de *M. liza*. No entanto, o uso de novas drogas pode ser vantajoso, pois alguns parasitos podem ser tolerantes às drogas mais usuais, além do que, o uso de formaldeído pode resultar em danos relativamente severos às brânquias de juvenis de tainha (Pahor-Filho et al. 2014; Ramos et al., 2014).

1.6. Ácido acético

Os ectoparasitos, assim como os hospedeiros, estão em contato direto com o meio, e podem apresentar níveis diferentes de tolerância quando comparados ao hospedeiro, tanto em relação aos parâmetros de qualidade da água quanto às substâncias eventualmente dissolvidas na água. Barker e Cone (2000) constataram que espécimes de *Anguilla rostrata* em ambientes mais ácidos apresentaram menores índices parasitários do que em ambientes neutros, e sugeriram a aplicação dessas observações no controle de parasitos por meio do manejo do pH. Djian et al. (1991) observaram a atividade nematotóxica do ácido acético oriundo de filtrados de dois fungos hifomicetos, o que resultou na morte de nematóides parasitos de plantas terrestres, e atualmente, produtos onde o ácido acético aparece como componente têm sido desenvolvidos, com relativo sucesso, para o controle de algumas doenças parasitárias em peixes (Németh et al., 2013).

O ácido acético ($C_2H_4O_2$), também conhecido como ácido etanoico, é um produto orgânico, que pode ser produzido de maneira biológica (Djian et al., 1991; Partin e Heise, 1993; Yamada, 2016) ou de maneira sintética, pela oxidação de acetaldeído ou de hidrocarbonetos curtos (Lück e Jager, 1997). Por ser facilmente biodegradado, não bioacumula e nem persiste no ambiente (HSDB, 2017). Lück e Jager (1997) afirmam que a possibilidade do ácido acético ser genotóxico ou carcinogênico pode ser desconsiderada.

Uma das principais agências reguladoras do uso de drogas para aquicultura é a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), do Departamento de saúde e serviços humanos dos EUA. Para a FDA (2011), o uso de drogas não aprovadas, ou a utilização da maneira incorreta das drogas aprovadas, pode ser perigoso à saúde humana.

A FDA (2011) reconhece o uso de ácido acético como antiparasitário, porém o considera como uma droga de “baixa prioridade para regulação”. Isso significa que seu uso é permitido desde que sejam seguidas algumas condições. Primeiro, de que seja usado apenas para as indicações e níveis definidos. Que seu uso esteja de acordo com as boas práticas de gestão, e que seja utilizada a concentração apropriada para animais e alimentos. Por fim, que não resulte em efeitos adversos ao ambiente. O uso condicional do ácido acético, de acordo com a FDA é de que seja usado apenas como parasiticida de peixes, em concentrações entre 1.000 a 2.000 ppm, em banhos de 1 a 10 minutos. No entanto, não há qualquer explicação por parte da FDA (2011), de como foi determinado este intervalo de concentração e tempo de exposição. Isso ganha relevância se considerarmos que vários estudos sobre o uso de quimioterápicos como antiparasitários podem ter sua eficácia variando conforme a qualidade da água (Hirazawa et al., 2001), tempo de exposição (Harms, 1996), e espécie de parasito (Pahor-Filho et al., 2012).

Snieszko (1978) lista os fatores que devem ser considerados no momento de decidir sobre o tratamento a ser aplicado em doenças de peixes e inclui entre as drogas a serem utilizadas o ácido acético.

Estudos já mostraram a eficácia do ácido acético contra ectoparasitos de peixes (Davis, 1946; Harms, 1996; Singhal et al., 1986; Snieszko, 1978; Stoskopf, 1988). No entanto, seu uso não é frequente, o que pode estar relacionado aos estudos até agora realizados, que são relativamente antigos, com resultados controversos, e pouca informação é apresentada a respeito dos métodos de aplicação e avaliação dos resultados, dificultando seu uso.

1.7. Avaliações parasitológicas e o estudo de drogas antiparasitárias

1.7.1. Índices parasitários

Os índices parasitários são importantes para quantificar o parasitismo em amostras de hospedeiros. Geralmente, os índices parasitários são determinados por táxon de parasito, e quanto menor for o nível taxonômico, mais preciso é o entendimento da relação parasito-hospedeiro-ambiente. Para uma análise mais refinada, os índices podem ser determinados por sítios de infestação/infecção, onde de uma maneira mais grosseira poderá, eventualmente, ser extrapolado para o hospedeiro como um todo. Os índices mais frequentemente utilizados são prevalência (P%), abundância média (AM) e intensidade média de infestação/infecção (IMI). A P% é caracterizada pela porcentagem de hospedeiros parasitados em relação aos hospedeiros analisados. A AM avalia o quão abundante é o táxon parasito em relação ao táxon hospedeiro, e é dada pelo número médio de parasitos em relação ao número total de hospedeiros analisados. Por fim, a IMI determina a intensidade do parasitismo, considerados apenas os hospedeiros parasitados, e é dada pelo número médio de parasitos em relação ao número total de hospedeiros parasitados por aquele determinado táxon parasito (Bush, 1997).

1.7.2. Testes de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda são utilizados como base para classificação da periculosidade de produtos químicos em curtos períodos de tempo (Rispin et al., 2002). Um dos resultados mais utilizados a partir dos testes de toxicidade é a concentração letal mediana, (CL₅₀). A CL₅₀ é a concentração letal para 50% dos organismos testados em um dado período de tempo (Rice et al., 2012). A partir deste mesmo princípio, porém sem necessariamente utilizar dados de mortalidade, pode ser calculado o CE₅₀, que é a concentração efetiva mediana, caracterizada pela resposta esperada efetiva em 50% dos organismos testados. No caso dos

parasitos, um teste de toxicidade aguda *in vitro* para alguma droga pode ser considerada como uma determinação de resposta específica para aquela droga, sendo, portanto, uma CE₅₀ (Fajera-Ávila et al., 2003).

Por meio de estudos de toxicidade, já foi possível determinar a toxicidade da amônia em diferentes salinidades (Sampaio et al., 2002), o efeito agudo do nitrato (Poersch et al., 2007), e a toxicidade do formaldeído (Pahor-Filho et al., 2012) para *M. liza*.

1.7.3. Índice terapêutico

Geralmente a tolerância de organismos aquáticos às substâncias químicas não são iguais entre organismos de espécies diferentes, e entre organismos de mesma espécie em estágios de vida diferentes (Rice et al., 2012). Quando se compara a concentração necessária para uma droga produzir um efeito letal em um organismo (CL₅₀), com a concentração da mesma droga para provocar uma resposta terapêutica desejada (CE₅₀), se tem a segurança da droga, que é dada pelo índice terapêutico (Eaton e Gilbert, 2008). O índice terapêutico é dado pela razão entre CL₅₀ e CE₅₀ (Zhu et al. 2014). Dessa forma, quanto maior o índice terapêutico, maior a segurança para utilizar a droga.

1.7.4. Eficácia da droga

Quando estudos são realizados para determinação da eficácia de drogas antiparasitárias, é esperado que antes do período experimental os hospedeiros utilizados apresentem abundância de parasitos homogêneas entre os tratamentos. Porém, como as técnicas para quantificação de determinados parasitos só podem ser feitas após a eutanásia do hospedeiro, geralmente não é possível conhecer os valores de abundância parasitária antes do período experimental. Para isso, o valor da abundância média do grupo controle (sem utilização de drogas) é utilizado para comparação do efeito causado pelos tratamentos nos parasitos. Dessa forma, a eficácia de uma droga é caracterizada pela porcentagem de parasitos que foram teoricamente removidos dos hospedeiros devido a um determinado tratamento quando comparados com o grupo controle, e é dada pelo cálculo: $EF\% = (100 (NMPC - NMPT)) NMPC^{-1}$, onde NMPC é o número médio de parasitos do grupo controle e NMPT é o número médio de parasitos de um dado tratamento (Dotta et al., 2015).

1.8. Histopatologia

Nos peixes, o fígado exerce funções vitais como secreção de bile, reserva de nutrientes e metabolismo de macronutrientes (Rodrigues e Fanta, 1998; Velkova-Jordanoska et al., 2012). Além disso, o fígado apresenta papel fundamental na absorção, biotransformação e detoxificação de substâncias (Cengiz e Unlu, 2006; Neelima et al., 2015), sendo um dos principais órgãos afetados por contaminantes presentes na água (Camargo e Martinez, 2007).

O uso de químicos como drogas antiparasitárias podem provocar alterações degenerativas no fígado, com repostas defensivas inflamatórias (Velkova-Jordanoska et al., 2012). As drogas ou seus metabólitos podem afetar funções críticas do fígado, o que sensibilizaria as células inflamatórias ou provoca uma resposta do sistema imune (Kaplowitz, 2013). Além disso, alterações na morfologia do fígado podem causar efeitos secundários, como o comprometimento da capacidade metabólica (Camargo e Martinez, 2007), ou até mesmo levar à morte do organismo (Rodrigues e Fanta, 1998).

Os infiltrados inflamatórios são decorrentes de alterações degenerativas (Hibiya, 1982) e são comumente relacionados a peixes de ambientes poluídos (Castro et al., 2014, Mohamed, 2009) ou podem ser atribuídos ao efeito direto de substâncias tóxicas nos hepatócitos (Neelima et al., 2015).

Velmurugan et al. (2009) determinaram os efeitos do antiparasitário diclorvos no fígado de *Cirrhinus mrigala* e observaram a ocorrência de necrose focal em ambas concentrações testadas. A ocorrência de necrose focal no fígado pode ser atribuída ao efeito direto do tóxico nos hepatócitos ou à excessiva atividade exercida pelo fígado para detoxificação (Neelima et al., 2015). A necrose das células hepáticas pode ser caracterizada como uma resposta não específica ao estresse (Belicheva e Sharova, 2011) e os danos causados por esse tipo de lesão no fígado podem ser irreversíveis (Camargo e Martinez, 2007).

Nos peixes, as brânquias desempenham diversas funções, como trocas gasosas, regulação iônica e osmótica e está relacionada com o equilíbrio ácido-base e com a excreção de nitrogênio (Evans et al., 2005). As brânquias são o primeiro órgão a ser impactado por substâncias tóxicas na água devido sua ampla área superficial em contato direto com o meio (Evans et al., 1988; Bernet et al., 1999).

A exposição de peixes às drogas antiparasitárias mais usuais pode gerar diversas respostas histopatológicas em brânquias. Peixes expostos à trichloron podem apresentar nas brânquias edema lamelar, fusão lamelar, hipertrofia e proliferação celular (Guimarães et al., 2007). Quando expostos à diclorvos, as lesões observadas em brânquias de peixes são hiperplasia, fusão lamelar, necrose epitelial, desprendimento lamelar, colapso da lamela

secundária e dobramento da lamela secundária (Velmurugan et al., 2009). Hiperplasia, fusão lamelar, telangiectasia, ruptura das células pilares e metaplasia escamosa são relatadas em brânquias de peixes tratados com mebendazol (Führ et al. 2012). Por fim, o uso do formaldeído como antiparasitário pode levar às alterações branquiais de hiperplasia, desprendimento do epitélio lamelar e necrose (Pahor-Filho et al. 2012).

Exposições subletais de peixes à ambientes ácidos também podem favorecer o surgimento de diversas histopatologias, como hiperplasia (Evans et al., 1988; Rodrigues et al., 2013), desprendimento do epitélio lamelar (Daye e Garside, 1976; Freda et al., 1991) e telangiectasia (Rodrigues et al., 2013).

De uma maneira geral, as alterações histológicas de hiperplasia, fusão lamelar e desprendimento do epitélio lamelar podem ser interpretadas como uma estratégia adaptativa de defesa não específica, uma vez que tanto a hiperplasia quanto a fusão lamelar diminuem a superfície de contato vulnerável ao poluente, enquanto que o desprendimento do epitélio lamelar aumenta a distância de difusão que o agente estressor precisará atravessar para chegar até a corrente sanguínea (Alazemi et al., 1996; Cengiz, 2006; Flores-Lopes e Thomaz, 2011; Mallat, 1985; Monteiro et al., 2008; Nascimento et al., 2012). No entanto, estas respostas branquiais afetam as trocas gasosas, podendo causar asfixia (Alazemi et al., 1996; Rodrigues et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial antiparasitário e as implicações patológicas do uso do ácido acético em juvenis da tainha *Mugil liza*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração letal mediana do ácido acético em juvenis de *M. liza*;
- Determinar *in vitro* a concentração efetiva mediana do ácido acético para os parasitos mais abundantes de juvenis de *M. liza* capturados no litoral sul do Rio Grande do Sul;
- Avaliar *in vivo* a eficácia do ácido acético contra metazoários ectoparasitos de juvenis de *M. liza*;
- Avaliar *in vivo* a eficácia do ácido acético contra ciliados peritríquios associados à juvenis de *M. liza*;
- Verificar as possíveis alterações histopatológicas em brânquias e fígado de juvenis de *M. liza* expostas à diferentes concentrações de ácido acético.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-Galil, M.A.A., Aboelhadid, S.M., 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Vet. Parasitol.* 185, 57–63.
- Abdallah, V.D., Azevedo, R.K., Luque, J.L., 2009. Four new species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on *Mugil liza* (Actinopterygii: Mugilidae) from Guandu river, southeastern Brazil. *J. Parasitol.* 95 (4), 855–864.
- Abdel-Baki, A.S., Sakran, T., Fayed, H., Zayed, E., 2011. *Trichodina fahaka* (Ciliophora: Peritrichia) in *Tetradon fahaka* from Nile River, Egypt: Seasonality and histopathology. *Sci. Res. Essays* 6 (7), 1583–1587.
- Abowei, J.F.N., Briyai, O.F., Bassey, S.E., 2011. A Review of Some Basic Parasite Diseases in Culture Fisheries Flagellids, Dinoflagellides and Ichthyophthiasis, Ichtyobodiasis, Coccidiosis Trichodiniasis, Heminthiasis, Hirudinea Infestation, Crustacean Parasite and Ciliates. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* 2 (5), 213–226.
- Aladetohun, N. F., Sakiti, N. G., Babatunde, E. E., 2014. Histopathological changes induced by copepoda parasites infections on the gills of economically important fish mugilidae (*Liza falcipinnis* and *Mugil cephalus*) from Ganvie area of Lac Nokue, Republic of Benin. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 8 (2), 143–147.
- Alarcos, A.J., Etchegoin, J.A., 2010. Parasite assemblages os estuarine-dependent marine fishes form Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires Province, Argentina). *Parasitol. Res.* 107, 1083–1091.
- Alazemi, B. M., Lewis, J. W., Andrews, E. B., 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: An ultrastructural study. *Environ Technol.* 17, 225–238.
- Albieri, R. J., Araújo, F. G., 2010. Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in a tropical Brazilian bay. *Zoologia* 27 (3), 331–340.
- Alvarez-Lajonchere, L., Arritola, J. B., Averhoff, O. L., Bellido, S. D., 1988. Positive results of induced spawning and larval rearing experiments with *Mugil liza* Val., a grey mullet from Cuban water. *Aquaculture* 73, 349–355.
- Amado, M. A. P. M., Rocha, C. E. F., 1995. Três novas espécies de copépodes parasitas do gênero *Ergasilus* (Poecilostomatoida, Ergasilidae) coletados em filamentos branquiais de peixes mugilídeos do Brasil. *Nauplios* 3, 33–48.
- Arafa, S. Z., El-Naggar, M. M., El-Abbassy, S. A., 2009. Mode of attachment and histopathological effects of *Macrogryodactylus clarii*, a monogenean gill parasite of the catfish *Clarias gariepinus*, with a report on host response. *Acta Parasitol.* 54 (2), 103–112.
- Azevedo, R.K., Abdallah, V.D., Luque, J.L., 2010. Acanthocephala, Annelida, Arthropoda, Myxozoa, Nematoda and Platyhelminthes parasites of fishes from the Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Check List* 6, 659–667.
- Azevedo, R.K., Abdallah, V.D., Luque, J.L., 2011. Biodiversity of fish parasites from Gandu River, southeastern Brazil: an ecological approach. *Neotrop. Helminthol.* 5 (2), 185–199.
- Balta, F., Kayis, S., Altinok, I., 2008. External protozoan parasites in three trout species in the Eastern Black Sea region of the Turkey: Intensity, seasonality, and their treatments. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 28 (4), 157–162.

- Barker, D.E., Cone, D.K., 2000. Occurrence of *Ergasilus celestis* (Copepoda) and *Pseudodactylogyrus anguillae* (Monogenea) among wild eels (*Anguilla rostrata*) in relation to stream flow, pH and temperature and recommendations for controlling their transmission among captive eels. *Aquaculture* 187, 261–274.
- Barker, D.E., Cone, D.K., Burt, M.D.B., 2002. *Trichodina murmanica* (Ciliophora) and *Gyrodactylus pleuronecti* (Monogenea) parasitizing hatchery-reared winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): Effects on host growth and assessment of parasite interaction. *J. Fish Dis.* 25, 81–89.
- Barleta, M., Dantas, D. V., 2016. Biogeography and Distribution of Mugilidae in the Americas. In: Crosetti, D., Blaber, S. (Eds.), *Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (Mugilidae)*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., pp. 42–62.
- Belicheva, L. A., Sharova, J. N., 2011. Assessment of fish health status under long-term water pollution: Vygozero Reservoir, North-West Russia. *Environ. Technol. Res.* 11, 368–373.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.* 22, 25–34.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Allen, W.S., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583.
- Cabello, F. C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8 (7), 1137–1144.
- Camargo, M. M. P., Martinez, C. B. R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in a urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5, 327–336.
- Cardona, L., 2016. Food and Feeding of Mugilidae. In: Crosetti, D., Blaber, S. (Eds.), *Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (Mugilidae)*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., pp. 165–195.
- Carnevia, D., Speranza, G., 2003. Seasonal variations in parasites found in mullet (*Mugil platanus* Günther, 1880) juveniles captured on the Uruguayan coast of the River Plate. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 23 (5), 245–249.
- Castro, J. S., Silva, J. S., Freitas, L. C., Carvalho-Neta, R. N. F., 2014. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66, 1687–1694.
- Cengiz, E. I., 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environ. Toxicol. Phar.* 22, 200–204.
- Cengiz, E. I., Unlu, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environ. Toxicol. Phar.* 21, 246–256.
- Chagas, E. C., Araújo, L. D., Martins, M. L., Gomes, L. C., Malta, J. C. O., Varella, A. B., Jerônimo, G. T., 2016. Mebendazole dietary supplement controls Monogenoidea (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* 464, 185–189.
- Chitmanat, C., Tongdonmuan., K., Nunsong, W., 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27, 359–364.

- Conroy, G., Conroy, D. A., Santacana, J. A., Perdomo, F., 1985. Diplostomatosis in cultured venezuelan grey mullets. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 5 (1), 14–16.
- Crosetti, D., 2016. Current State of Grey Mullet Fisheries and Culture. In: Crosetti, D., Blaber, S. (Eds.), *Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (Mugilidae)*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., pp. 398–450.
- Crosetti, D., Blaber, S. (Eds.), 2016. *Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (Mugilidae)*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. (529 pp.).
- Davis, H. S., 1946. *Care and Diseases of Trout*. US Department of Interior Research Report, No. 12. US Government Printing Office, Washington, DC, USA. (98 pp.).
- Daye, P. G., Garside, E. T., 1976. Histopathologic changes in surficial tissues of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), exposed to acute and chronic levels of pH. *Can. J. Zool.* 54, 2140–2155.
- Diggles, B.K., 2000. Chemotherapy of the ciliate *Trichodina* sp. on juvenile turbot (*Colistium nudipinnis*) with notes on the susceptibility of fish with abnormal pigmentation. *New Zeal. J. Mar. Fresh.* 34, 645–652.
- Djian, C., Pijarowski, L., Ponchet, M., Arpin, N., Favre-Bonvin, J., 1991. Acetic acid: a selective nematocidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. *Nematologica* 37, 101–112.
- Dobson, A., Lafferty, K. D., Kuris, A. M., Hechinger, R. F., Jetz, W., 2008. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts?. *PNAS* 105, 11482–11489.
- Dotta, G., Brum, A., Jeronimo, G.T., Maraschim, M., Martins, M.L., 2015. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extract on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24 (1), 66–71.
- Eaton, L.D., Gilbert, S.G., 2008. Principles of toxicology. In: Klassen, C.D. (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, seventh ed. McGraw-Hill, New York, pp. 11–44.
- Eiras, J. C., 1994. *Elementos de Ictioparasitologia*. Fundação Eng. Antônio de Almeida, Porto. (339p.).
- Erondu, E. S., Anyanwu, P. E., 2005. Potential hazards and risks associated with the aquaculture industry. *Afr. J. Biotechnol.* 4 (13), 1622–1627.
- Espinoza, H. B., 2014. Prevalence of parasitism by *Anisakis* in a sample of fish caught in coastline of the Golfete of Coro, Venezuela. *SJPH* 2 (6), 513–515.
- Evans, R. E., Brown, S. B., Hara, T. J., 1988. The effects of aluminium and acid on the gill morphology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environ. Biol. Fish* 22 (4), 299–311.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177.
- Fájer-Ávila, E.J., Parra, I.A., Aguilar-Zarate, G., Contreras-Arce, R., Zaldívar-Ramírez, J., Betancourt-Lozano, M., 2003. Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture* 223, 41–50.

- Farias, M. F. D. B., Cohen, S. C., 2005. Ultrastructural studies of the Mehlis' gland in *Metamicrocotyla macracantha* (Monogenea, Microcotylidae) parasite of *Mugil liza* (Teleostei). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 42 (5), 367–371.
- Farias, M. F. D. B., Kohn, A., Barth, O. M., 1995. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in *Metamicrocotyla macracantha* (Alexander, 1954) Koratha, 1955 (Monogenea; Microcotylidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90 (5), 597–604.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. (200 pp.)
- FAO, 2017. Global Aquaculture Production. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>. Acessado em 06/03/17.
- FDA, 2011. Aquaculture drugs. In: FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, fourth edition. pp. 183–208.
- Flores-Lopes, F., Thomaz, A. T., 2011. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Braz. J. Biol.* 71 (1), 179–188.
- Fonsêca, F. T. B., Paranaguá, M. N., Amado, M. A. M. 2000. Copepoda parasitas de peixes Mugilidae em cultivo estuarino – Itamaracá – Pernambuco – Brasil. *Trab. Oceanogr. Univ. Federal de PE* 28 (2), 157–172.
- Fonseca Neto, J.C., Spach, H.L., 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca* 25, 13–17.
- Freda, J., Sanchez, D. A., Bergman, H. L., 1991. Shortening of branchial tight junctions in acid-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 2028–2033.
- Führ, F., Pereira Jr, J., Romano, L. A., Almeida, F., 2012. Gill injury after treatment with mebendazole on mullets *Mugil liza*. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 32 (5), 151–158.
- Fujimoto, R. Y., Neves, M. S., Santos, R. F. B., Cruz, C., Diniz, D. G., Eiras, J. C., 2014. *Acta Sci. Biol. Sci.* 36 (3), 349–355.
- Garcia, A. M., Vieira, J. P., Winemiller, K. O., 2003. Effects of 1997-1998 El Niño on the dynamics of the shallow-water fish assemblage of the Patos Lagoon Estuary (Brazil). *Estuar. Coast. Shelf S.* 57, 489–500.
- Godinho, H.M., Kavamoto, E.T., Andrade Talmelli, E.F., Serralheiro, P.C.S., Paiva, P., Ferraz, E.M., 1993. Induced spawning of the Mullet *Mugil platanus* Günther, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. *Bol. Inst. Pesca* 20, 59–66.
- González Castro, M., Abachian, V., Perrota, R. G., 2009. Age and growth of the stripped mullet, *Mugil platanus* (Actinopterygii, Mugilidae), in a southwestern Atlantic coastal lagoon (37°32'S–57°19'W): a proposal for a life-history model. *J. Appl. Ichthyol.* 25, 61–66.
- Guimarães, A. T. B., Silva de Assis, H. C., Boeger, W., 2007. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 68, 57–62.
- Harms, C.A., 1996. Treatments for parasitic diseases of aquarium and ornamental fish. *Semin. Avian. Exot. Pet.* 5 (2), 54–63.
- Hayward, C., 2005. Monogenea Polyopisthocotylea (ectoparasitic flukes). In: Rohde, K., *Marine parasitology*. CSIRO Publishing, Australia. pp. 55–62.

- Hibiya, T., 1982. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Stuttgart/New York: Gustav Fisher Verlag 1982 (for Japan: Tokyo: Kodansha Ltd.) (147 pp.).
- Hirazawa, N., Oshima, S., Mitsuboshi, T., Hata, K., 2001. The anthelmintic effect of medium-chain fatty acids against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*: evaluation of doses of caprylic acid at different water temperatures. *Aquaculture* 195, 211–223.
- Hogans, W. E., 1989. Mortality of cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr caused by an infection of *Ergasilus labracis* (Copepoda: Poecilostomatoida) in the lower Saint John River, New Brunswick, Canada. *J. Fish Dis.* 12, 529–531.
- HSDB, 2017. <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>. Accessed in February 11, 2017.
- Ikefuti, C.V., Carraschi, S.P., Barbuio, R., da Cruz, C., de Pádua, S.B., Onaka, E.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2015. Teflubenzuron as a tool for control of trichodinids in freshwater fish: Acute toxicity and *in vivo* efficacy. *Exp. Parasitol.* 154, 108–112.
- Jalali, B., Barzegar, M., 2005. Dactylogyrids (Dactylogyridae: Monogenea) on common carp (*Cyprinus carpio* L.) in freshwaters of Iran and description of the pathogenicity of *D. sahuensis*. *J. Agric. Sci. Technol.* 7, 9–16.
- Jianyin, Z., Tingbao, Y., 2001. Monogenea of Chinese marine fishes. XIV. Two new species of Microcotylidae from fishes of the South China Sea. *Syst. Parasitol.* 48, 67–73.
- Johnson, S. C., Treasurer, J. W., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., 2004. A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool. Stud.* 43 (2), 229–243.
- Kaplowitz, N., 2013. Drug-Induced Liver Injury: Introduction and Overview. In: Kaplowitz, N., DeLeve, L. D. (Eds), *Drug-Induced Liver Disease* 3rd edition, Elsevier, Academic Press, pp. 3–14.
- Khan, R.A., 2004. Disease outbreaks and mass mortality in cultured Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with *Trichodina murmanica* (Ciliophora). *J. Fish Dis.* 27, 181–184.
- Knoff, M., Boeger, W. A., 1994. Expanded description of the female of *Lernaeenicus longiventris* Wilson, 1917, (Copepoda, Siphonostomatoida, Pennellidae) based on specimens from *Mugil platanus* Günther, 1880 (Perciformes, Mugilidae) of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89 (3), 313–317.
- Knoff, M., Luque, J. L., Amato, J. F. R., 1997. Community ecology of the metazoan parasites of grey mullets, *Mugil platanus* (Osteichthyes: Mugilidae) from the littoral of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Brasil. Biol.* 57 (3), 441–454.
- Knoff, M., Luquer, J. L., Takemoto, R., 1994. Parasitic copepods on *Mugil platanus* Günther (Osteichthyes: Mugilidae) from the coast of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 3 (1), 45–56.
- Kohn, A., Cohen, S. C., Baptista-Farias, M. F. D., 1994. A redescription of the morphology of *Metamicrocotyla macracantha* (Alexander, 1954) Koratha, 1955 (Monogenea, Microcotylidae) from *Mugil liza* in Brazil. *Syst. Parasitol.* 27, 127–132.
- Kritsky, D. C., Öktener, A., 2015. *Solostamenides paucitesticulatus* n. sp. (Monogenoidea: Mazocraeidea: Microcotylidae) from the freshwater mullet *Liza abu* (Heckel) (Mugiliformes: Mugilidae) from Atatürk reservoir on the Euphrates river in southern Turkey. *Syst. Parasitol.* 91, 139–145.

- Krkosek, M., 2010. Host density thresholds and disease control for fisheries and aquaculture. *Aquacult. Environ. Interact.* 1, 21–32.
- Lafferty, K. D., 2008. Ecosystem consequences of fish parasites. *J. Fish Biol.* 73, 2083–2093.
- Lemos, V. M., Varela Jr., A. S., Schwingel, P. R., Muelbert, J. H., Vieira, J. P., 2014. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. *J. Fish Biol.* 85, 671–687.
- Leung, T.L.F., Bates, A.E., 2013. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. *J. Appl. Ecol.* 50, 215–222.
- Li, M., Wang, J., Zhu, D., Gu, Z., Zhang, J., Gong, X., 2008. Study of *Apiosoma piscicola* (Blanchard 1885) occurring on fry of freshwater fishes in Hongze, China with consideration of the genus *Apiosoma*. *Parasitol. Res.* 102, 931–937.
- Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015a. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). *Neotrop. Ichthyol.* 13 (2), 447–452.
- Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015b. Acclimation of juvenile *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Mugiliformes: Mugilidae) to different environmental salinities. *Neotrop. Ichthyol.* 13 (3), 591–598.
- Lom, J., 2005. Ciliophora (ciliates). In: Rohde, K., *Marine parasitology*. CSIRO Publishing, Australia. pp.37–40.
- Lück, E., Jager, M. 1997. *Antimicrobial food additives: Characteristics – Uses – Effects*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH (260p.).
- Madsen, H.C.K., Buchmann, K., Møllgaard, S., 2000. Treatment of trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark: alternatives to formaldehyde. *Aquaculture* 186, 221–231.
- Mallat, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 630–648.
- Marchiori, N.C., Pariselle, A., Pereira Jr., J., Agnès, J.F., Durand, J.D., Vanhove, M.P.M., 2015. A comparative study of *Ligophorus uruguayense* and *L. saladensis* (Monogenea: Mugilidae) in southern Brazil. *Folia Parasitol.* 62, 1–10.
- Marcotegui, P.S., Martorelli, S.R., 2009. Trichodinids (Ciliophora: Peritrichida) of *Mugil platanus* (Mugiliformes: Mugilidae) and *Micropogonias furnieri* (Perciformes: Sciaenidae) from Samborombón Bay, Argentina, with the description of a new species. *Folia Parasit.* 56 (3), 167–172.
- Mariniello, L., Ortis, M., D'Amelio, S., Petrarca, V., 2004. Morphometric variability between and within species of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae) in the Mediterranean Sea. *Syst. Parasitol.* 57, 183–190.
- Martins, M.L., Cardoso, L., Marchiori, N., de Pádua, S. B., 2015. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24 (1), 1–20.
- Martorelli, S. R., Marcotegui, A. L. P., Montes, M. M., Alda, P., Penei, C. J., 2012. Morphological and molecular identification of the fish-borne metacercaria of *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920 in *Mugil liza* from Argentina. *Vet. Parasitol.* 190, 599–603.

- Mehlhorn, H., Schmahl, G., Haberkorn, A., 1988. Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. *Parasitol. Res.* 75, 64–66.
- Menerrrat, A., Nilsen, F., Ebert, D., Skorping, A., 2010. Intensive Farming: Evolutionary Implications for Parasites and Pathogens. *Evol. Biol.* 37, 59–67.
- Menezes, N. A., 1983. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral brasileiro. *Rev. Bras. Zool.* 2 (1), 1–12.
- Mentz, M. B., Lanner, M., Fagundes, N., Sauter, I. P., Marques, L. S., 2016. Ectoparasites on *Mugil liza* (Osteichthyes: Mugilidae) from the Tramandai-Armazém lagoon system, Southern Brazil. *Pan-Am. J. Aquat. Sci.* 11 (2), 130–134.
- Mohamed, F. A. S., 2009. Histopathological Studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *World J. Fish & Marine Sci.* 1, 29–39.
- Mólnar, K., Székely, Cs., 2004. Occurrence and pathology of *Sinergasilus lienii* (Copepoda: Ergasilidae), a parasite of the silver carp and bighead, in Hungarian ponds. *Acta Vet. Hung.* 52 (1), 51–60.
- Monteiro, S. M., Rocha, E., Fontainhas-Fernandes, A., Sousa, M., 2008. Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure. *J. Fish Biol.* 73, 1376–1392.
- Monteiro-Ribas, W. M., Bonecker, A. C. T., 2001. Artificial fertilization and development in laboratory of *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) (Osteichthyes, Mugilidae). *Bull. Mar. Sci.* 68 (3), 427–433.
- Moyses, C.R.S., Spadacci-Morena, D.D., Xavier, J.G., Antonucci, A.M., Lallo, M.A., 2015. Ectocommensal and ectoparasites in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) in farmed in the State of São Paulo. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24 (3), 283–289.
- Nascimento, A. A., Araújo, F. G., Gomes, I. D., Mendes, R. M. M., Sales, A., 2012. Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in South-Eastern Brazil. *Anat. Histol. Embryol.* 41, 209–216.
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.
- Neelima, P., Kumar, C. L. A., Rao, J. C. S., Rao, N. G., 2015. Histopathological alterations in gill, liver and kidneys of *Cyprinus carpio* (Linn.) exposed to Cypermethrin (25%EC). *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2, 34–40.
- Németh, S., Horváth, Z., Felföldi, Z., Beliczky, G., Demeter, K., 2013. The use of permitted ectoparasite disinfection methods on young pike-perch (*Sander lucioperca*) after transition from over-wintering lake to RAS. *AAACL Bioflux* 6 (1), 1–11.
- Noga, E.J., 2010. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, second ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA (519 pp.).
- Nomura, H., 1980. Considerações sobre a criação de peixes estuarinos em viveiros. *Bolm. Inst. Oceanogr.* 29 (2), 271–273.
- Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., Maçada, A.P., 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica* 28 (1), 61–66.

- Oliveira, E. F., Amato, J. F. R., Knoff, M., 1988. A new species of *Hysterolecitha* (Trematoda: Hemiuridae) from the mullet, *Mugil liza*, in the state of Rio de Janeiro, Brasil. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 55 (1), 58–61.
- Oliveira, S. A., Blazquez, F. J. H., Antunes, S. A., Maia, A. A. M., 2007. Metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920 (Digenea: Heterophyidae), em *Mugil platanus*, no estuário de Cananéia, SP, Brasil. Cienc. Rural 37 (4), 1056–1059.
- Ovcharenko, M., 2015. Microparasites of worldwide mullets. Ann. Parasitol. 61 (4), 229–239.
- Öztürk, T., 2013. Parasites of juvenile Golden grey mullet *Liza aurata* Risso, 1810 in Sarikum Lagoon lake at Sinop, Turkey. 58 (4), 531–540.
- Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K.C., Pereira Jr., J., 2012. Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and hosts. Aquaculture 354–355, 111–116.
- Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K.C., Klosterhoff, M., Romano, L.A., Pereira Jr., J., 2014. Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes). Aquaculture Research. 1–6.
- Paperna, I., 1964. Competitive exclusion of *Dactylogyrus extensus* by *Dactylogyrus vastator* (Trematoda, Monogenea) on the gills of reared carp. J. Parasitol. 50 (1), 94–98.
- Paperna, I., 1975. Parasites and diseases of the grey mullet (Mugilidae) with special reference to the seas of the near east. Aquaculture 5, 65–80.
- Paperna, I., Overstreet, R. M., 1981. Parasites and diseases of Mulletts (Mugilidae). In: Oren, O. H. (Ed.), Aquaculture of Grey Mulletts. International Biological Programme 26. Cambridge University Press (pp. 411–493).
- Partin, L. R., Heise, W. H., 1993. Bioderived acetic acid. In: Agreda, V. H., Zoeller, J. R. Acetic acid and its derivates. CRC Press, New York, (451 pp.).
- Pincinato, R. B. M., Asche, F., 2016. The development of Brazilian aquaculture: introduced and native species. Aquac. Econ. Manag. 20 (3), 312–323.
- Pironet, F. N., Jones, J. B., 2000. Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian dhufish. Aquaculture 8, 349–361.
- Paul, S. E., Montes, M. M., Barbeito, C. G., Martorelli, S. R., 2013. Morphological aspects and histological effects of the attachment organ of *Parabrachiella* sp. (Copepoda: Lernaepodidae) on the grey mullet, *Mugil liza* Valenciennes.
- Poersch, L. H., Santos, M. H. S., Miranda Filho, K., Wasielesky Jr., W., 2007. Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae). B. Inst. Pesca 33 (2), 247–252.
- Ramos, T., Romano, L.A., Pereira Jr., J., 2014. Evolução histopatológica em brânquias de tainhas *Mugil liza* expostas à banhos terapêuticos com formalina. Rev. Bras. Eng. Pesca 7 (1), 45–59.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Campos, B. E., Eiras, A. C., 1997. Haematological characteristics associated with parasitismo in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. Revta. Bras. Zool. 14 (2), 329–339.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Silva-Souza, A.T., 2004. Co-infestation of gill by different parasite groups in the mullet, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthys, Mugilidae): Effects on relative condition factor. Braz. J. Biol. 64, 677–682.

- Reda, E.S.A., 2011. A Review of some Ecto-and Endo Protozoan Parasites Infecting *Sarotherodon galilaeus* and *Tilapia zillii* from Damietta Branch of River Nile, Egypt. J. Am. Sci. 7 (3), 362–373.
- Rohde, K. (Ed.), 2005. Marine parasitology. CSIRO Publishing, Australia (565 pp.).
- Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M. M., Min, J., Nguyen, P. T., Telfer, T. C., van den Brink, P. J., 2012. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. Rev Aquacult 4, 75–93.
- Rispin, A., Farrar, D., Margosches, E., Gupta, K., Stitzel, K., Carr, G., Greene, M., Meyer, W., McCall, D., 2002. Alternative methods for the medial lethal dose (LD50) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity. ILAR Journal 43 (4), 233–243.
- Rodrigues, E. L., Fanta, E., 1998. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. Revta bras. Zool. 15, 441–450.
- Rodrigues, R. V., Pedron, J. S., Romano, L. A., Tesser, M. B., Sampaio, L. A., 2013. Acute responses of juvenile cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766) to acid stress. Aquac. Res. 1–7. doi: 10.1111/are.12282.
- Rodrigues, R. V., Schwarz, M. H., Delbos, B. C., Carvalho, E. L., Romano, L. A., Sampaio, L. A., 2011. Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. Aquaculture 322–323, 223–226.
- Sadek, S., 2016. Culture of Mugilidae in Egypt. In: Crosetti, D., Blaber, S. (Eds.), Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (Mugilidae), CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., pp. 501–513.
- Saint-Paul, U., 2017. Native fish boosting Brazilian's aquaculture development. Acta Fish. Aquat. Res. 5 (1), 1–9.
- Sampaio, L. A., Wasielesky, W., Miranda-Filho, K.C., 2002. Effects of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. B. Environ. Contam. Tox. 68, 668–674.
- Sampaio, L. A., Tesser, M. B., Wasielesky, W., 2010. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. R. Bras. Zootec. 39, 102–111.
- Schmahl, G., Mehlhorn, H., Taraschewski, H., 1989a. Treatment of Fish Parasites. 5. The Effects of sym. Triazinone (Toltrazuril) on Fish parasitic Ciliophora (*Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, *Apiosoma amoebae* Grenfell, 1884, *Trichodina* sp. Ehrenberg, 1831). Europ. J. Protistol. 24, 152–161.
- Schmahl, G., Taraschewski, H., Mehlhorn, H., 1989b. Chemotherapy of fish parasites. Parasitol. Res. 75, 503–511.
- Seckendorff, R. W., Azevedo, V. G., 2007. Abordagem histórica da pesca da tainha *Mugil platanus* e parati *Mugil curema* (Perciformes: Mugilidae) no litoral norte do estado de São Paulo. Sér. Relat. Téc. 28, 1–8.
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Bron, J.E., Paladini, G., Brooker, E.E., Brooker, A.J., 2014. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. Parasitology 142, 196–270.

- Shinn, A., Pratoomyot, J., Bron, J., Paladini, G., Brooker, E., Brooker, A., 2015. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. *Global Aquaculture Advocate* 82–84.
- Silva, M. A., Araújo, F. G., 2000. Distribuição e abundância de tainhas e paratis (Osteichthyes, Mugilidae) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revta. Bras. Zool.* 17 (2), 473–480.
- Simkova, A., Rohde, K. Community stability and instability in ectoparasites of marine and freshwater fish. In: Rohde, K (ed.). *The balance of nature and human impact*. Cambridge University Press. 2013. pp.75-88.
- Simões, S. B. E., Barbosa, H. S., Santos, C. P., 2010. The life cycle of *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Digenea: Heterophyidae), a causative agente of fish-borne trematodosis. *Acta Trop.* 113, 226–233.
- Singhal, R.N., Jeet, S., Davies, R.W., 1986. Chemotherapy of six ectoparasitic diseases of cultured fish. *Aquaculture* 54, 165–171.
- Siquier, G.F., 2012. Spatial distribution and microhabitat selection of copepods (Copepoda, Ergasilidae), gill parasites of *Mugil platanus* (Pisces, Mugilidae) from Laguna de Rocha, Uruguay. *Bol. Soc. Zool. Uruguay* 21, 39–49.
- Siquier, G.F., Núñez, M.O., 2009. *Ligophorus uruguayense* sp. nov. (Monogenea, Ancyrocephalidae), a gill parasite from *Mugil platanus* (Mugiliformes, Mugilidae) in Uruguay. *Acta Parasitol.* 54 (2), 95–102.
- Snieszko, S.F., 1978. Control of fish diseases. *Mar. Fish. Rev.* 40 (3), 65–69.
- Stoskopf, M.K., 1988. Fish chemotherapeutics. *Vet. Clin. N. Am-Small.* 18 (2), 331–348.
- Vasconcelos Filho, A. L., Neumann-Leitão, S., Eskinazi-Leça, E., Oliveira, A., Porto-Neto, F. F., 2009. Hábitos alimentares de consumidores primários da ictiofauna do sistema estuarino de Itamaracá (Pernambuco – Brasil). *Rev. Bras. Enga. Pesca* 4 (1), 21–31.
- Velkova-Jordanoska, L., Stojanovski, S., Lokoska, L., Veljanoska-Sarafiloska, E., Kostoski, G., 2012. Histopathological analysis of liver in fish population of reservoir “Tikves”. *Acta zool. bulg.* 4, 223–227.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E. I., Unlu, E., 2009. Histopathological changes in the gill and liver tissues of freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* Exposed to Dichlorvos. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52 (5), 1291–1296.
- Vieira, J. P., 1991. Juvenile mullets (Pisces: Mugilidae) in the Estuary of Lagoa dos Patos, RS, Brazil. *Copeia* 1991 (2), 409–418.
- Whittington, I. D., 2005. Monogenea Monopisthocotylea (ectoparasitic flukes). In: Rohde, K., *Marine parasitology*. CSIRO Publishing, Australia. pp. 63–71.
- Whittington, I. D., 1998. Diversity “down under”: monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean diversity worldwide. 28, 1481–1493.
- Williams, A., 1991. Monogeneans of the family Microcotylidae Taschenberg, 1879 and Heteraxinidae Price, 1962 from Western Australia, including the description of *Polylabris sandarsae* n. sp. (Microcotylidae). *Syst. Parasitol.* 18, 17–43.
- Wong, W., Gorb, S. N., 2013. Attachment ability of a clamp-bearing fish parasite, *Diplozoon paradoxum* (Monogenea), on gills of the common bream, *Abramis brama*. *J. Exp. Biol.* 216, 3008–3014.

World Bank. 2013. Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture. Agriculture and environmental services discussion paper; no. 3. Washington, DC. © World Bank. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/17579> License: CC BY 3.0 IGO.

Xu, D., Shoemaker, C.A., Zhang, D., 2015. Treatment of *Trichodina* sp. reduced load of *Flavobacterium columnare* and improved survival of hybrid tilapia. *Aquaculture Reports* 2, 126–31.

Yamada, Y., 2016. Systematics of acetic acid bacteria. In: Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuna, A. (Eds.) *Acetic acid bacteria: Ecology and Physiology*. Springer, Tokyo, Japan, (350 pp.).

Yao, J., Li, X., Shen, J., Pan, X., Hao, G., Xu, Y., Ying, W., Ru, H., Liu, X., 2011. Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus* L. with activity against *Trichodina* sp. *Aquaculture* 318, 235–238.

Yokoyama, H., Itoh, N., Ogawa, K. Fish and Shellfish Diseases Caused by Marine Protists. In Ohtsuka, S., Suzaki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N., Not, F. (Eds). *Marine Protists - Diversity and Dynamics*. Springer Japan 2015.

Zhu, S., Ling, F., Zhang, Q., Liu, G., Tu, X., Jiang, C., Wang, G., 2014. Anthelmintic activity of saikosapoinins a and d from *Radix bupleuri* against *Dactylogyrus* spp. infecting goldfish. *Dis. Aquat. Organ.* 111, 177–182.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PPG AQUICULTURA

**O USO DO ÁCIDO ACÉTICO COMO ANTIPARASITÁRIO NA AQUICULTURA: EFETIVIDADE E
HISTOPATOLOGIA CAUSADA EM *MUGIL LIZA* VALENCIENNES, 1836**

CAPÍTULO 1: Toxicity and parasiticial in vivo and in vitro evaluation of acetic acid on
metazoan ectoparasites in juvenile *Mugil liza*

REVISTA: AQUACULTURE

SITUAÇÃO: PUBLICADO

DOI: 10.1016/J.AQUACULTURE.2017.04.009

MÁRIO ROBERTO CASTRO MEIRA FILHO

RIO GRANDE, 2017.

Toxicity and parasitocidal in vivo and in vitro evaluation of acetic acid on metazoan ectoparasites in juvenile *Mugil liza*

Mário Roberto Castro Meira-Filho^{a,b,*}, Victor Torres Rosas^a, Rogério Tubino Vianna^c, Joaber Pereira Júnior^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel, nº2, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96210-030;

^bCentro de Biotecnologia e Doenças de Animais Aquáticos, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel, 02, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96210-030; ^cLaboratório de Biologia de Parasitos de Organismos Aquáticos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália, Km 08, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96201-900.

*Corresponding author: E-mail address: mariorcmf@hotmail.com. Tel: +55 (19) 98106-6499.

Abstract

In this study, the anti-parasitic activity of acetic acid was evaluated in vivo and in vitro in juveniles of *Mugil liza*. The parasites studied were the copepods *Ergasilus lizae* and *E. versicolor* and the monogenoideans *Solostamenides* cf. *platyorchis* and *Ligophorus* spp. To determine concentrations for use in the in vivo evaluation, and to determine the therapeutic index, a toxicity test (LC₅₀-1h) was carried out using juveniles of *M. liza*. The LC₅₀-1h was estimated at 1402.62 mg L⁻¹. Glacial acetic acid concentrations were determined for in vivo evaluation from the values of 0%, 25%, 50% and 75% of LC₅₀-1h, which corresponded to concentrations of 0 mg L⁻¹ (control), 350.65 mg L⁻¹, 701.31 mg L⁻¹ and 1051.96 mg L⁻¹, respectively. Due to high mortality, fish exposed to 701.31 mg L⁻¹ and 1051.96 mg L⁻¹ concentrations were not examined in the in vivo evaluation. The results of the in vivo evaluation were presented in parasitic indexes of prevalence (P%), mean infestation intensity (MII) and mean abundance (MA). The MA values were used to determine the efficacy of the 350.65 mg L⁻¹ concentration for each parasite found, which was 100% for *S. cf. platyorchis*, 91.47% for *Ligophorus* spp. and 73.57% for *E. lizae*. No specimens of *E. versicolor* were found in the in vivo evaluation. The in vitro evaluation comprised toxicity tests (EC₅₀-1h) for each parasite taxa. The EC₅₀-1h values were 83.38 mg L⁻¹ for *E. lizae*, 89.97 mg L⁻¹ for *E. versicolor*, 144.79 mg L⁻¹ for *S. cf. platyorchis* and 289.58 mg L⁻¹ for *Ligophorus* spp. With the values of LC₅₀-1h of *M. liza* and EC₅₀-1h values of each parasite taxa, the therapeutic indices were calculated, ranging from 16.82 for *E. lizae*, 15.59 for *E. versicolor*, 9.69 for *S. cf. platyorchis* and 5.53 for *Ligophorus* spp. It is possible that the presence of parasites affected the survival of the fish during in vivo evaluation. Although *E. lizae* presented the highest therapeutic index, it was the taxon that presented the lowest efficacy, probably due to the strong adhesion in the gills by its

modified antennas, even after the death of the parasite. It has been found that glacial acetic acid at a concentration of 350.65 mg L⁻¹ is an effective drug against *M. liza* parasites.

Keywords: Aquaculture; Fish; Drugs; Anti-parasitic; Mullet.

1. Introduction

The mugilids, known as mullets, are a group of great economic importance, both for fishing and aquaculture (Croseti, 2016). In 2014, the total production of mullets was 728,546 t, of which 140,187 t (19.24%) were produced by aquaculture (FAO, 2016). The lebranche mullet (*Mugil liza* Valenciennes, 1836) is widely distributed on the Atlantic coast of South America, occurring from Venezuela to Argentina (Menezes et al., 2010). Studies cultivating *M. liza* demonstrate that this is a promising species for aquaculture, as it is eurythermic (Okamoto et al., 2006), eurihaline (Lisboa et al., 2015a; Lisboa et al., 2015b), and reproduction is easy to manage (Godinho et al., 1993; Nomura, 1980).

However, parasites associated with cultivated species are substantial obstacles in aquaculture. Shinn et al. (2015) estimated that losses caused by parasitism in aquaculture fish production are between \$1.05 billion and \$ 9.58 billion. Studies have shown that wild specimens of *M. liza* are parasitized by several species of metazoan ectoparasites, mainly Copepoda and Monogenoidea. (Abdallah et al., 2009; Alarcos and Etchegoin, 2010; Azevedo et al., 2010; Marchiori et al., 2015; Pahor-Filho et al., 2012; Ranzani-Paiva and Silva-Souza, 2004; Siquier, 2012; Siquier and Núñez, 2009).

Parasitic copepods have been responsible for outbreaks of diseases, becoming important in the production of farmed fish (Johnson et al., 2004). Large losses in the production of mullets cultivated in brackish water ponds are related to infestations of *Ergasilus lizae* (Paperna, 1975).

Monogenoidea is an important group of parasites that mainly infest the gills and skin of fish (Whittington, 1998). Such parasites are often associated with histological lesions of fish gills and high mortalities in farmed fish (Paperna, 1975; Shinn et al., 2014).

Pahor-Filho et al. (2012) have demonstrated the efficacy of formaldehyde for controlling the monogenoideans *Ligophorus uruguayense*, and *Solostamenides cf. platyorchis* in juveniles of *M. liza*. However, the use of new chemicals may be advantageous, as some parasites may be tolerant to frequently-used chemicals. In addition, the use of formaldehyde may result in relatively severe damage of the gills of juvenile mullets (Pahor-Filho et al. 2014; Ramos et al., 2014).

The United States Food and Drug Administration (FDA) (2011) recognizes the use of acetic acid as a parasiticide, but considers it a "low regulatory priority aquaculture drug". This means that its use is not prohibited as long as certain characteristics are fulfilled: its use respects the indications and defined levels; its use follows good management practices; it is appropriate for human consumption; and is environmental friendly. The use of acetic acid, according to the FDA is conditioned only as a fish parasiticide, at concentrations of 1,000–2,000 mg L⁻¹ in baths of 1–10 min. However, there is no explanation by the FDA (2011) of how the concentration interval and exposure time were determined. This is important because several studies on the use of chemotherapeutic agents, such as parasiticides, have shown that efficacy can be modified depending on water quality (Hirazawa et al., 2001), exposure time (Harms, 1996), and parasite species (Pahor-Filho et al., 2012). Snieszko (1978) lists the factors that should be considered when deciding the appropriate treatment for fish diseases, and includes acetic acid among the drugs that can be used.

Barker and Cone (2000) found that eels in more acidic environments had lower parasitic indexes than in more neutral environments, and suggested the application of these findings in parasite control by pH management. Acetic acid is an organic product, which can be produced biologically (Djian et al., 1991) or synthetically, and is biodegradable, does not bioaccumulate and does not persist in the environment (HSDB, 2017). Djian et al. (1991) observed that nematotoxic activity of acetic acid from two fungus hyphomycete strains resulted in the death of parasitic nematodes of terrestrial plants. Currently, some parasitocidal drugs for fishes that are being developed use acetic acid as a component (Németh et al., 2013).

Considering that acetic acid is a low-impact chemotherapeutic agent for the host and the environment, as determined by the FDA (2011), it is rarely used as a parasiticide. Current assay evaluates the parasitocidal capacity of glacial acetic acid against metazoan ectoparasites of juvenile mullets ensuring its most efficacious performance.

2. Material and methods

All experimental procedures that involved animals were approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of Rio Grande (CEUA n° Pq029/2016).

2.1. Fish collection and maintenance

Fish from all experiments at the period of acclimatization, were fed twice daily (9:00 AM and 5:00 PM) with commercial feed of 38% crude protein, and were fasted in the 24 h preceding the experiments. A 12L:12D photoperiod was established, and 50% of the water was

renewed daily. Oxygen and temperature parameters were evaluated using an oximeter (YSI Pro-20), pH was measured with a bench pH meter, and alkalinity was measured by titulometry. The pH for each acetic acid concentration used in the toxicity test and the in vivo and in vitro evaluations was measured *a posteriori* by simulating the experimental abiotic parameters.

The parameters of water quality during the pre-experimental period of all experiments were maintained according to those described as acceptable for *M. liza* juveniles (Fonseca Neto and Spach, 1999; Lisboa et al., 2015a; Okamoto et al., 2006).

Specimens of *M. liza* used in the toxicity test (LC50-1h) and in the in vitro and in vivo evaluations were collected by trawling (1.5m x 8.0m, 5mm mesh) and using a casting net (4 m in diameter, 0.8 mm mesh) at Cassino beach (32° 12' 16" S; 52° 9' 93" W, 32° 11' 55.58" S; 52° 10' 13.90" W and 32° 10' 55.17" S; 52° 8' 49.49" W), Rio Grande, South Brazil, South America, Neotropical Region.

For the toxicity test, fish were transferred to a recirculation system composed by three 250 L tanks, with biofilter and mechanical filter, where they were kept for seven months. During the pre-experimental period, were submitted to water quality conditions as follows: salinity (11 ppt), temperature ($21.04 \pm 0.71^{\circ}\text{C}$), dissolved O₂ ($11.07 \pm 0.93 \text{ mg L}^{-1}$), pH (7.69 ± 0.127), and alkalinity ($120.71 \pm 20.09 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$).

Fish were acclimated for 10 days in recirculation system composed by one 500 L tank, with biofilter and mechanical filter. The water quality conditions of the host system during the pre-experimental period of the in vivo and in vitro evaluations were as follows: salinity (11 ppt), temperature ($20.9 \pm 0.71^{\circ}\text{C}$), dissolved O₂ ($9.49 \pm 0.91 \text{ mg L}^{-1}$), pH (7.41 ± 0.14), and alkalinity ($117.86 \pm 23.78 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$).

2.2. Parasitological analysis

The parasites were collected, fixed and conserved according to the protocol for each group (Eiras et al., 2006). The identifications were made using specific literature (Jianyin and Tingbao, 2001; Marchiori et al., 2015; Wilson, 1911). For each identified taxon, the parasitological indexes of prevalence (P%), average abundance (AM), and mean infestation intensity (IMI) were calculated according to Bush et al. (1997).

2.3. Toxicity of acetic acid in *Mugil liza*

For determining the LC₅₀-1h, first, the "up-and-down" technique (Rispin et al., 2002) was adapted for the way of drug administration and exposure period and was used to determine

close values of this median lethal concentration, with the objective of decreasing the number of animals used. Then, the toxicity of acetic acid in juvenile mullets was evaluated within one hour. For this, 36 mullets, weighing 8.51 ± 1.05 g and with a standard length of 10.36 ± 1.29 cm were used.

The experiment was carried out using 36 beakers (1 L), with one fish per beaker. To each beaker, water from the maintenance tank, and with the exception of the control, the amount of glacial acetic acid (Synth®) required to reach the determined concentrations were added. In the 24 h before the experiment, the fish were fasted. A fish was randomly selected and placed in the beaker with the treatment, and the experiment begun when the fish into contact with the treatment water.

Fish mortality was assessed after one hour of exposure to acetic acid. Those who did not exhibit any type of movement for 30 s after removal from acetic acid were considered dead. After the experimental period, the surviving fish were transferred to clean water, anesthetized with eugenol (150 mg L^{-1}), and euthanized by medullary section, and then the biometry was performed. Calculation of $\text{LC}_{50-1\text{h}}$ was performed using Trimmed Spearman Karber Method software (Hamilton, 1977).

2.4. In vitro evaluation of acetic acid in metazoan ectoparasites from *Mugil liza*, $\text{EC}_{50-1\text{h}}$ and $\text{pH}_{50-1\text{h}}$

In this study, "in vitro evaluation" was considered the process in which the chemotherapeutic effect of acetic acid was tested directly on individual parasites in Petri dishes, without the presence of the host.

In order to collect live parasites individually, the fish were randomly removed from the recirculation system, euthanized by medullary section, and the host biometry was obtained. These fish were examined for parasite presence, first in the integument and then in the gills. In this experiment, 25 mullets were used, with a weight of $18.82 \text{ g} \pm 12.08$ and standard length of $10.35 \text{ cm} \pm 2.58$.

In order to avoid over-manipulation, the parasites were kept attached to the gill arches, which were removed from the fish. The parasites found were submerged in water from the acclimation tank in Petri dishes. In this evaluation, only the most abundant parasites in the sampled fish were used. Of these parasites, only those specimens with appreciable motility were selected.

For each parasite taxon, treatments were established, which were defined adapting the way of drug administration and the period of exposure of the "up-and-down" technique (Risipin et al., 2002). The water used in the control and in the treatments was removed from the acclimation tank. The collected parasites were transferred to individual Petri dishes (60 x 15 mm) with 10 mL of each treatment solution. Mortality was assessed after one hour of submersion in the treatment. The parasites that did not exhibit any type of movement for 30 s after the time of exposure to acetic acid ended were considered dead.

Calculations of pH_{50-1h} and EC_{50-1h} were performed using the Trimmed Spearman Karber Method software (Hamilton, 1977). EC_{50} is the half maximal effective concentration for producing a given effect (Blumenthal and Garrison, 2011) and, in this study, the EC_{50-1h} was considered as the effective concentration to eliminate 50% of the parasites studied. The pH related to 50% of mortality is referred as pH_{50} (Li et al., 2013), and pH_{50-1h} was the acid pH value required to eliminate 50% of the studied parasites.

The Pearson correlation coefficient (r) was used to calculate both the correlation between mortality with the acetic acid concentration and mortality with pH. Linear correlations of ± 0.1 were considered as weak, ± 0.3 as medium, and ± 0.5 to 1.0 as strong, according to Russo (2003).

The EC_{50-1h} and pH_{50-1h} comparisons of the different parasite taxa analyzed were performed using the median and confidence interval data. Normality of the data was assessed by the Shapiro-Wilk W test and the homoscedasticity was given by Bartlett's test. If the data were normal and homoscedastic, a one-way ANOVA was performed, and in case of a significant difference, the Newman-Keuls *post hoc* test was used. If the data were not normal and/or homoscedastic, the Kruskal-Wallis test was performed and in case of a significant difference, Dunn's *post hoc* test was used.

2.5. In vivo evaluation of acetic acid in metazoan ectoparasites of *Mugil liza*

In vivo evaluation was defined as the process in which the effect of the chemical on the parasite is tested, while is still infesting the host. For this test, were used 120 juveniles of *M. liza* (weight 13.04 ± 9.16 g and standard length 9.84 ± 2.43 cm) that were assumed to be parasitized by previously parasitological analysis .

The concentrations used in the in vivo evaluation were 0% (control), 25%, 50% and 75% of the LC_{50-1h} value for *M. liza*, as was previously obtained. For this, twelve tanks were used in a static system (three replicates per treatment), with water volume of 45 L, where each

tank initially contained 10 fish. In all treatments, the fish were submitted to the therapeutic bath for 1 h. After this period, mullets were returned to the maintenance tanks. Five fish from each tank were removed after 24 h of recovery for the parasitological analysis and three fish were used for histopathological analysis (results not included in this study).

For parasitological analysis, only surviving fish from the treatments with acetic acid exposure were used.

2.6. Efficacy of acetic acid and therapeutic index

With the results obtained from the *in vivo* evaluation of the parasitocidal activity of acetic acid in juveniles of *M. liza*, the efficacy of acetic acid was determined for each group of parasites analyzed. The efficacy index evaluates the percentage of parasites that were theoretically removed from hosts in each treatment when compared to the control group (Dotta et al., 2015).

The therapeutic indexes of acetic acid concentrations were determined for the evaluated parasites using the results obtained from the *in vitro* evaluation and the toxicity test for *M. liza*.

The therapeutic index was given by the ratio of the LC₅₀ to EC₅₀, according to Zhu et al. (2014). The efficacy of acetic acid for each parasite was obtained by the formula of Dotta et al. (2015): $EF (\%) = ((MNPC - MNPT) \times 100) / MNPC$, where: EF (%) = efficacy; MNPC = median number of parasites from fish control; MNPT = median number of parasites from fish for each treatment.

3. Results

3.1. Parasites identified

In this study, several parasites were found: *Solostamenides cf. platyorchis* and *Ligophorus* spp. (Platyhelminthes, Monogenoidea), *Ergasilus lizae* and *E. cf. versicolor* (Copepoda, Ergasilidae), Argulidae (Branchiura), and unidentified Hirudinea.

In the *in vitro* evaluation, only specimens with appreciable motility of *S. cf. platyorchis*, *Ligophorus* spp., *E. lizae*, and *E. cf. versicolor* were used, and these taxa were the most abundant. In the *in vivo* evaluation, all metazoan parasites found in the gills were considered; however, only *E. lizae*, *S. cf. platyorchis* and *Ligophorus* spp. were found.

Due to the impossibility of identifying and differentiating specimens of *Ligophorus* spp. at the species level, these parasites were classified as belonging to the *Ligophorus* spp. complex,

which comprises *L. uruguayense* and *L. saladensis*. These species occur in *M. liza* on the coast of Rio Grande do Sul, according to Marchiori et al. (2015).

3.2. Toxicity of acetic acid in *Mugil liza*

With the use of the "up-and-down" method, several concentrations were determined: the upper concentration, in which all the tested mullet died, was 2000 mg L⁻¹; the lowest concentration, where no mullet died, was 400 mg L⁻¹; and at 1200, 1600 and 2000 mg L⁻¹, at least one mullet died and at least one survived. The pH measurements for the toxicity test treatments were 7.79, 4.42, 3.80, 3.69 and 3.62 for the acetic acid concentrations of 0 (control), 400, 1200, 1600 and 2000 mg L⁻¹, respectively. There were strong correlations between mortality and acetic acid concentration ($r = 0.92$), and between mortality and pH ($r = -0.60$).

During the one-hour toxicity test, all mullets survived at 0 (control) and 400 mg L⁻¹. At concentrations of 1200, 1600 and 2000 mg L⁻¹, mortality rates were 16.67%, 50% and 100%, respectively.

The LC₅₀-1h of acetic acid in juveniles of *M. liza* was 1402.62 mg L⁻¹, with a confidence interval between 1108.56 and 1774.70 mg L⁻¹. The pH₅₀-1h value was 3.77, with a confidence interval between 3.64 and 3.89.

3.3. In vitro evaluation of acetic acid in metazoan ectoparasites from *Mugil liza*, EC₅₀-1h

Ergasilus lizae, *E. cf. versicolor*, *S. cf. platyorchis*, and *Ligophorus* spp. presented greater abundance and were used for the in vitro toxicity test (EC₅₀-1h). The EC₅₀-1h of Argulidae and Hirudinea could not be performed due to the low number of specimens found.

The concentrations used were: 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹ for *E. lizae*, *E. cf. versicolor* and *S. cf. platyorchis*, and 100, 200, 300 and 400 mg L⁻¹ for *Ligophorus* spp. The pH values obtained *a posteriori* were 7.41, 6.37, 5.58, 5.05, 4.71, 4.47 and 4.27, at the concentrations of 0, (control), 50, 100, 150, 200, 300 and 400, respectively.

Data for the EC₅₀-1h of acetic acid concentration were normal ($p = 0.10$), and the variances were homoscedastic ($p = 0.41$). Thus, the ANOVA analysis showed a significant difference among the treatments ($p = 0.00$). The subsequent Newman-Keuls *post hoc* test showed that the acetic acid concentrations needed to eliminate 50% of the specimens of *E. lizae*, *E. cf. versicolor* and *S. cf. platyorchis* were the same, whereas for *Ligophorus* spp., the required concentration was higher. The pH values were also normal ($p = 0.86$) and the variances were homoscedastic ($p = 0.26$). The ANOVA test for these values showed a significant difference (p

= 0.01). The *post hoc* test Newman-Keuls test demonstrated that pH values to eliminate 50% of *E. lizae*, *E. cf. versicolor* and *S. cf. platyorchis* showed no significant differences among them. However, unlike the evaluation that compared EC₅₀-1h using acetic acid concentration data for the monogenoideans species, there was no difference between the pH values to eliminate 50% of the *Ligophorus* spp. and *S. cf. platyorchis* (Table 1).

Table 1. Values of EC₅₀-1h and pH₅₀-1h for metazoan ectoparasites of *Mugil liza* juvenile mullets exposed to acetic acid in the in vitro evaluation. EC₅₀-1h = effective median concentration (mg L⁻¹); pH₅₀-1h = median lethal pH; and CI = confidence interval (mg L⁻¹).

Parasite taxa	Acetic acid	pH
	EC ₅₀ -1h (CI)	pH ₅₀ -1h (CI)
<i>Ergasilus lizae</i>	83.38 (71.11–97.77) ^a	5.85 (5.65–6.02) ^a
<i>Ergasilus cf. versicolor</i>	89.97 (55.14–146.79) ^a	5.75 (5.0–6.27) ^a
<i>Solostamenides cf. platyorchis</i>	144.79 (122.85–170.65) ^a	5.17 (4.9–5.42) ^{ab}
<i>Ligophorus</i> spp.	289.58 (245.71–341.30) ^b	4.56 (4.37 – 4.73) ^b

The same letters in the same column indicate no significant difference in means.

There was a strong positive correlation between parasite mortality and acetic acid concentrations, and a strong negative correlation between parasite mortality and pH (Table 2).

Table 2. Pearson's linear correlation coefficient (r) of the mortality of each parasite taxon by the concentration of acetic acid and by the acid pH.

Parasite taxa	Acetic acid	pH
<i>Ergasilus lizae</i>	0.93	-0.93
<i>Ergasilus cf. versicolor</i>	1.00	-0.98
<i>Solostamenides cf. platyorchis</i>	0.84	-0.73
<i>Ligophorus</i> spp.	0.84	-0.61

3.4. In vivo evaluation of acetic acid in metazoan ectoparasites of *Mugil liza*.

The treatments for the concentrations of acetic acid used were 0 mg L⁻¹ for the control, 350.65 mg L⁻¹, 701.31 mg L⁻¹ and 1051.96 mg L⁻¹, pH values were estimated at 7.41, 4.42, 4.02 and 3.81, respectively.

No fish deaths were observed in the treatments with 0 and 350.65 mg L⁻¹ during the bath with acetic acid, while fish exposed to 701,31 mg L⁻¹ and 1051,96 mg L⁻¹ had 15 (50.00%) and 23 (76.67%) deaths, respectively.

The mortality reported during the recovery period (24 h after bathing) for all the concentrations of acetic acid were: five for the 350,65 mg L⁻¹, nine for 701,31 mg L⁻¹ and two for 1051,96 mg L⁻¹. Thus, total mortality after both, exposure period and 24 h recovery for all the treatments were 0% (Control), 16.67% (350,65 mg L⁻¹), 80% (701,31 mg L⁻¹) and 83.33% (1051,96 mg L⁻¹). For the parasitological analysis, only the control and the 350,65 mg L⁻¹ concentration were used. The parasitological index obtained with these data is shown in Table 3.

Table 3. Prevalence [P%], mean infestation intensity (MII) and mean abundance (MA) of the metazoan ectoparasites of *Mugil liza* gills treated with 0 mg L⁻¹ (Control) and 350.65 mg L⁻¹. Ni = number of parasitized hosts, N = number of hosts analyzed, sd = standard deviation.

Taxon	Treatment	P% (ni/N)	MII ± sd (min–max)	MA ± sd (min–max)
<i>Ligophorus</i> spp.	Control	93.3 (14/15)	54.4 ± 82.0 (3–293)	50.8 ± 80.3 (0–293)
	350.65 mg L ⁻¹	66.7 (10/15)	6.5 ± 7.4 (1–26)	4.3 ± 6.7 (0–26)
<i>Solostamenides</i> cf. <i>platyorchis</i>	Control	20.0 (3/15)	3.7 ± 3.8 (1–8)	0.7 ± 2.1 (0–8)
	350.65 mg L ⁻¹	0.0 (0/15)	-	-
<i>Ergasilus lizae</i>	Control	46.7 (7/15)	4.9 ± 5.8 (1–17)	2.3 ± 4.5 (0–17)
	350.65 mg L ⁻¹	13.3 (2/15)	4.5 ± 4.9 (1–8)	0.6 ± 2.1 (0–8)

The monogenoideans, which comprise the complex *Ligophorus* spp., occurred in 93.3% of the fish sampled for the control, and in 66.7% for the 350.65 mg L⁻¹ treatment. In both treatments, it was the taxon with the highest P%, MII and MA.

The other species of Monogenoidea, *S. cf. platyorchis*, showed the lowest P%, MII and MA indexes in the control. No specimens were found in fish after 24 h of recovery at one hour exposure to acetic acid at 350.65 mg L⁻¹.

Ergasilus lizae occurred in the control and in the 350.65 mg L⁻¹ treatment, whereas *E. cf. versicolor* was not found in the in vivo evaluation in either treatment.

3.5. Efficacy of acetic acid and therapeutic index.

The highest values of acetic acid efficacy were observed for *S. cf. platyorchis* (100%) and *Ligophorus* spp. (91.47%). As for copepods, the efficacy was 73.57% for *E. lizae*; however, no specimens of *E. cf. versicolor* were found in the in vivo evaluation, so it was not possible to calculate the efficacy of acetic acid for this taxon.

The highest values of therapeutic indices were obtained for the copepods *E. lizae* and *E. cf. versicolor*, followed by the monogenoideans *S. cf. platyorchis* and *Ligophorus* spp. (Table 4).

Table 4. Therapeutic index (LC50-1h/EC50-1h) and efficacy (EF (%)) of acetic acid per metazoan ectoparasite taxa of juveniles of *Mugil liza*.

Parasite taxa	Therapeutic index	Efficacy (%)
<i>Ergasilus lizae</i>	16.82	73.57
<i>Ergasilus cf. versicolor</i>	15.59	- *
<i>Solostamenides cf. platyorchis</i>	9.69	100.00
<i>Ligophorus</i> spp.	5.53	91.47

* Parasitic taxa not found in the control, nor in 350.65 mg L⁻¹ treatment of the in vivo evaluation.

4. Discussion

Although acetic acid is considered primarily as a chemotherapeutic rather than a pH reducer in this study, the toxicity outcome for the pH data also generates relevant information on the tolerance of *M. liza* to acidic conditions. This is the first study of LC₅₀-1h for acetic acid and the first on pH₅₀-1h in *M. liza*. However, it is likely that the values reported in this study would be different for different sizes and/or species of fish, as suggested by Servizi and Martens (1991) and Sprague (1970).

The low survival observed in the in vivo evaluation regarding to that expected by the toxicity test, can be explained by the origin and time that the fish were kept in captivity before the experiments and the high concentration used. For the toxicity test, the fish were collected as fingerlings and kept in the recirculation system for about seven months, and were completely free of metazoan ectoparasites. The fish used for the in vivo evaluation were collected a few weeks before the experiment and were generally parasitized. There are few studies that relate the health condition (condition factor) with the presence of parasites in fish (Bayoumy et al.,

2012; Velloso and Pereira Jr. 2010). However, much evidence shows that different types of stressors can affect fish survival and performance (Wendelaar Bonga, 1997). Thus, considering parasite infestation as a stressor agent, it is possible that the presence of these organisms could be affected the survival during drug exposure, since, tests are generally performed on healthy organisms, thus overestimating the resistance of parasitized fish. Furthermore, all concentrations used in the in vivo study were higher than considered safety by Sprague (1971), who uses the LC₅₀ value multiplied by the “application factor” 0.1 (10%).

The monogenoideans found in the present study were similar to those reported by Pahor-Filho et al. (2012), who evaluated the effect of formaldehyde as an anti-parasitic in *L. uruguayense* and *S. cf. platyorchis*, and found that this to be effective against these parasites. However, the crustacean species evaluated in this study were *E. lizae* and *E. cf. versicolor*, which were not reported by Pahor-Filho et al. (2012). This probably occurred because fish used in the present study were much larger than those used by Pahor-Filho et al. (2012), and both size and age are, generally, related to the occurrence and number of parasitic copepods (Johnson et al., 2004). For those copepods found in present study no anti-parasitic drugs have been previously tested.

Barker and Cone (2000) studied the average abundance and prevalence of *Ergasilus celestes* (Copepoda) and *Pseudodactylogyrus anguillae* (Monogenoidea), parasites of the eel *Anguilla rostrata*, in different natural environments and found that the values of these indices correlated with the pH of where the eels were captured. The authors observed that where the pH was lower (more acidic), the parasitological indexes had the lowest values. In this study, parasite mortality was also strongly correlated both positively with acetic acid concentration and negatively with pH value. The lowest pH value found by Barker and Cone (2000) was 4.75, where the fish were free of the studied parasites. The pH value reported by Barker and Cone (2000) is different from the pH_{50-1h} for the *E. cf. lizae*, *E. cf. versicolor* and *S. cf. platyorchis* specimens in this study (5.85, 5.75 and 5.17 respectively). On the other hand, the value needed to kill 50% of *Ligophorus* spp. was 4.56. However, it is worth noting that the values of the present study represent acute exposure of one hour, while Barker and Cone (2000) evaluated fish from the environment, and were therefore subject to a longer exposure.

Singhal et al. (1986) reported glacial acetic acid as a chemical with therapeutic potential against fish ectoparasites. They developed treatment protocols using various chemicals, including acetic acid, which, according to the authors, is effective against *Trichodina indica* (Protozoa) at a concentration of 0.001 mg L⁻¹ for 10 min, against *Argulus indicus* (Crustacea)

at a concentration of 0.01 mg L⁻¹ for 5 min, and against *Hemiclepsis marginata* (Hirudinoidea) in a solution of 0.001 mg L⁻¹ added to 10 mg L⁻¹ of potassium permanganate for 5 min. Although the authors studied different species, the concentrations and times used in anti-parasitic treatments are much lower than those found in this study. It is likely that there were differences in the methodological procedure or in the evaluation criteria in the work by Singhal et al. (1986), where other factors may have been responsible for the high parasiticidal effect observed by them.

Harms (1996) established protocols for treatment of fish using acetic acid parasiticides, where a bath with 500 mg L⁻¹ for 30 s is recommended for the elimination of protozoa and crustaceans, and with 2000 mg L⁻¹ is recommended for trematode removal. In addition, the author recommended baths with 1000 to 2000 mg L⁻¹ for 1 to 10 min without informing to which parasite group this applies. The author also considers the use of acetic acid to remove hirudineans, but does not inform of the concentration or the time of exposure. On the other hand, Stoskopf (1988) cites acetic acid as effective against protozoa, hirudineans, external nematodes and crustaceans in baths with 500 mg L⁻¹ for 30 s and against Trematoda ectoparasites (=Monogenoidea) at a concentration of 2000 mg L⁻¹ for 30 s. Finally, Snieszko (1978) refers to acetic acid as one of the most frequently used chemicals for controlling infectious fish diseases, recommending 2000 mg L⁻¹ baths for 30 to 60 s, and 500 mg L⁻¹ baths for 30 min. However, as in most studies, this author does not inform which parasite was treated.

Acetic acid use in parasite control by previously reported studies generally do not consider the species of parasites or hosts, or any biological differences of the groups involved. In some studies, it is not detailed for which group (even at a higher taxonomic level) the use of acetic acid is recommended. This is problematic for practical applications, as was demonstrated in the present study, where, for example, the monogenoidean *S. cf. playorchis* presented a different value for LC_{50-1h} compared to the monogenoidean *Ligophorus* spp., but was not different when compared to the copepods *E. lizae* and *E. cf. versicolor*.

As for the treatment of any disease, treatment for parasites cannot be indiscriminate in culture systems. It is necessary to know details about the parasite, such as the species level – when possible – the host, and the water quality, so that the best elimination method may be determined for any parasite in the system.

Comparing the use of several drugs in relation to the same parasites and hosts allows the choice of the safest possible chemical for the elimination of a specific parasite. Therapeutic indexes are decisive for the choice of drug to be used, since it determines the safety level of the

drug in relation to the desired result, where the higher the index, the more safe the drug will be when compared to a lower index (Akhila et al., 2007; Muller and Milton, 2012). This was illustrated in the study by Fajer-Ávila et al. (2003), which evaluated the anti-parasitic activity of formalin and determined the therapeutic index for *Heterobothrium equadori* (Monogenoidea) to be 11 in relation to its host *Sphoeroides annulatus*.

In the present study, the therapeutic index for *E. lizae* and *E. cf. versicolor* were 16.82 and 15.59, respectively, while those of the monogenoideans *S. cf. platyorchis* and *Ligophorus* spp. were 9.69 and 5.53, respectively. However, to date, no studies have evaluated the therapeutic indexes of other drugs for the *M. liza* parasites studied here. Therefore, considering that the higher the therapeutic index, the greater the safety in the use of the drug, studies with other drugs should be performed to find or confirm effective data for this fish and these parasites.

In the present study, the efficacy of acetic acid at 350.65 mg L⁻¹ in monogenoideans was determined to be 100% for *S. cf. platyorchis*, and 91.47% for *Ligophorus* spp. These values are relatively high when compared to most studies evaluating several anti-parasitic drugs for monogenoideans, which show a variety of different efficacy values, such as Albendazole (68.3% at 500 mg L⁻¹), Praziquantel (56.9% at 50 and 500 mg L⁻¹) (Onaka et al., 2003), *Lippia sidoides* (1.96% at 20 mg L⁻¹), *Mentha piperita* (33.3% at 40 mg L⁻¹) (Hashimoto et al., 2016), and *Bixa orellana* (100% at 125 and 250 mg L⁻¹) (Andrade et al., 2016). Thus, acetic acid may become an option as a parasiticide for Monogenoidea.

The efficacy of 1 h acetic acid bath at 350.65 mg L⁻¹ for *E. lizae* was 73.57%. Some studies have evaluated the efficacy of other drugs for parasite copepods (Bravo et al., 2010; Treasurer and Grant, 1997), but no studies have evaluated the efficacy of drugs for Ergasilidae. Wijeyaratne and Gunawardene (1988) are among the few studies that report the use of drugs for Ergasilidae, such as formalin, gammexane (10% 1-6-hexachlorocyclohexane), potassium permanganate, 3,4 DPA (35% 3,4 Dichloropropyoanil) and Fenitrothione [0,0-dimethyl-3-methyl-4-nitrophenyl thiophosphate], where only potassium permanganate and 3,4 DPA showed success as an Ergasilidae parasiticide. However, further studies are needed to evaluate the efficacy of novel Ergasilidae drugs.

In the present study, *E. lizae* was the species most sensitive to acetic acid in the in vitro evaluation (EC₅₀-1h = 83.38 mg L⁻¹); thus, this was the species in which acetic acid showed the least efficacy in the in vivo evaluation. This contradiction may have happened due to insufficient time for total detachment of all dead parasites from the host. Moreover, in the in

vivo evaluation, fish gills were examined only after they had been fixed, which made it impossible to determine whether the parasites found were alive or dead but still adhered to fish gills. For future studies, longer recovery time for hosts is recommended.

In the present study, the application of acetic acid was performed in a static system, with 100% water renewal after drug exposure. New studies are needed to verify the applicability of the acetic acid and the better management to farming systems. Considering that acetic acid does not bioaccumulate and also does not persist in the environment, this drug can be an ecological alternative, since the effluent of this drug supposedly causes low environmental impact (HSDB, 2017).

5. Conclusions

Glacial acetic acid, at a concentration of 350.65 mg L⁻¹, was shown to be an effective drug against *M. liza* ectoparasites. However, further studies are needed to determine whether the anti-parasitic effect is due to the acid itself, or to a decrease in pH. Although it is an effective drug against the studied parasites, further studies are needed to assess safety at other stages of development of *M. liza* and other hosts.

Acknowledgements

The authors thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for doctoral scholarship to M.R.C. Meira-Filho (P. Parasitologia Básica Proc. 1272/2011) and V.T. Rosas.

References

- Abdallah, V.D., Azevedo, R.K., Luque, J.L., 2009. Four new species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on *Mugil liza* (Actinopterygii: Mugilidae) from Guandu river, southeastern Brazil. *J. Parasitol.* 95 (4), 855–864.
- Akhila, J.S., Deepa, S. Alwar, M.C., 2007. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Curr. Sci. India* 93 (7), 917–920.
- Alarcos, A.J., Etchegoin, J.A., 2010. Parasite assemblages on estuarine-dependent marine fishes from Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires Province, Argentina). *Parasitol. Res.* 107, 1083–1091.
- Andrade, J.I.A., Jerônimo, G.T., Brasil, E.M., Nunez, C.V., Gonçalves, E.L.T., Ruiz, M.L., Martins, M.L., 2016. Efficacy of seed extract of *Bixa orellana* against monogenean gill parasites and physiological aspects of *Colossoma macropomum* after bath treatment. *Aquaculture* 462, 40–46.

- Azevedo, R.K., Abdallah, V.D., Luque, J.L., 2010. Acanthocephala, Annelida, Arthropoda, Myxozoa, Nematoda and Platyhelminthes parasites of fishes from the Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. Check List 6, 659–667.
- Barker, D.E., Cone, D.K., 2000. Occurrence of *Ergasilus celestis* (Copepoda) and *Pseudodactylogyrus anguillae* (Monogenea) among wild eels (*Anguilla rostrata*) in relation to stream flow, pH and temperature and recommendations for controlling their transmission among captive eels. Aquaculture 187, 261–274.
- Bayoumy, E.M., Abu-Tawell, G.M., Alzahaby, M.A., 2012. Metazoan parasites of some Arabian Gulf fish, off Damman, Saudi Arabia: 1- external and internal parasite-host associations. Glob. Vet. 9 (5), 600–605.
- Blumenthal, D.K., Garrison, J.C., 2011. Pharmacodynamics: Molecular mechanisms of drug action, in: Brunton, L., Chabner, B., Knollman, B. (Eds.), Goodman & Gilman's – The pharmacological basis of therapeutics 12th ed. The McGraw-Hill Companies, pp. 41–72.
- Bravo, S., Treasurer, J., Sepulveda, M., Lagos, C., 2010. Effectiveness of hydrogen peroxide in the control of *Caligus rogercresseyi* in Chile and implications for sea louse management. Aquaculture 303, 22–27.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Allen, W.S., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J. Parasitol. 83, 575–583.
- Crosetti, D., 2016. Current State of Grey Mullet Fisheries and Culture. In.: Crosetti, D., Blaber, S. (Eds.), Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (Mugilidae), CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., pp. 398–450.
- Djian, C., Pijarowski, L., Ponchet, M., Arpin, N., Favre-Bonvin, J., 1991. Acetic acid: a selective nematocidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. Nematologica 37, 101–112.
- Dotta, G., Brum, A., Jeronimo, G.T., Maraschim, M., Martins, M.L., 2015. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extract on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. Braz. J. Vet. Parasitol. 24 (1), 66–71.
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., 2006. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes, second ed. Eduem, Maringá (199 p.).
- Fájer-Ávila, E.J., Parra, I.A., Aguilar-Zarate, G., Contreras-Arce, R., Zaldívar-Ramírez, J., Betancourt-Lozano, M., 2003. Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. Aquaculture 223, 41–50.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. (200 pp.)
- FDA, 2011. Aquaculture drugs. In: FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, fourth edition. pp. 183–208.
- Fonseca Neto, J.C., Spach, H.L., 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. Bol. Inst. Pesca 25, 13–17.
- Godinho, H.M., Kavamoto, E.T., Andrade Talmelli, E.F., Serralheiro, P.C.S., Paiva, P., Ferraz, E.M., 1993. Induced spawning of the Mullet *Mugil platanus* Günther, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. Bol. Inst. Pesca 20, 59–66.

- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11 (7), 714–719.
- Harms, C.A., 1996. Treatments for parasitic diseases of aquarium and ornamental fish. *Semin. Avian. Exot. Pet.* 5 (2), 54–63.
- Hashimoto, G.S.O., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Acchile, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 450, 182–186.
- Hirazawa, N., Oshima, S., Mitsuboshi, T., Hata, K., 2001. The anthelmintic effect of medium-chain fatty acids against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*: evaluation of doses of caprylic acid at different water temperatures. *Aquaculture* 195, 211–223.
- HSDB, 2017. <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>. Accessed in February 11, 2017.
- Jiayin, Z., Tingbao, Y., 2001. Monogenea of Chinese marine fishes. XIV. Two new species of Microcotylidae from fishes of the South China Sea. *Syst. Parasitol.* 48, 67–73.
- Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., 2004. A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool. Stud.* 43 (2), 229–243.
- Li, Y., Gao, S., Jing, H., Qi, L., Ning, J., Tan, Z., Yang, K., Zhao, C., Ma, L., Li, G., 2013. Correlation of chemical acute toxicity between the nematode and the rodent. *Toxicol. Res.* 2, 403–412.
- Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015a. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranche mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). *Neotrop. Ichthyol.* 13 (2), 447–452.
- Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015b. Acclimation of juvenile *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Mugiliformes: Mugilidae) to different environmental salinities. *Neotrop. Ichthyol.* 13 (3), 591–598.
- Marchiori, N.C., Pariselle, A., Pereira Jr., J., Agnèse, J.F., Durand, J.D., Vanhove, M.P.M., 2015. A comparative study of *Ligophorus uruguayense* and *L. saladensis* (Monogenea: Mugilidae) in southern Brazil. *Folia Parasitol.* 62, 1–10.
- Menezes, N.A., Oliveira, C., Nirchio, M., 2010. An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa* 2519, 59–68.
- Muller, P.Y., Milton, M.N., 2012. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11, 751–761.
- Németh, S., Horváth, Z., Felföldi, Z., Beliczky, G., Demeter, K., 2013. The use of permitted ectoparasite disinfection methods on young pike-perch (*Sander lucioperca*) after transition from over-wintering lake to RAS. *AAFL Bioflux* 6 (1), 1–11.
- Nomura, H., 1980. Considerações sobre a criação de peixes estuarinos em viveiros. *Bolm. Inst. Oceanogr.* 29 (2), 271–273.
- Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., Maçada, A.P., 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica* 28 (1), 61–66.

- Onaka, E.M., Martins, M.L., Moraes, F. R., 2003. Eficácia do albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatu*s (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Chacaracidae). I. Banhos terapêuticos. B. Inst. Pesca 29 (2), 101–107.
- Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K.C., Pereira Jr., J., 2012. Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and hosts. Aquaculture 354–355, 111–116.
- Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K.C., Klosterhoff, M., Romano, L.A., Pereira Jr., J., 2014. Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes). Aquac. Res. 1–6.
- Paperna, I., 1975. Parasites and diseases of the grey mullet (Mugilidae) with special reference to the seas of the near east. Aquaculture 5, 65–80.
- Ramos, T., Romano, L.A., Pereira Jr., J., 2014. Evolução histopatológica em brânquias de tainhas *Mugil liza* expostas à banhos terapêuticos com formalina. Rev. Bras. Eng. Pesca 7 (1), 45–59.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T., 2004. Co-infestation of gill by different parasite groups in the mullet, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthys, Mugilidae): Effects on relative condition factor. Braz. J. Biol. 64, 677–682.
- Rispin, A., Farrar, D., Margosches, E., Gupta, K., Stitzel, K., Carr, G., Greene, M., Meyer, W., McCall, D., 2002. Alternative methods for the medial lethal dose (LD50) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity. ILAR Journal 43 (4), 233–243.
- Russo, R., 2003. Statistical for the Behavioural Sciences. An Introduction. East Sussex, UK: Psychology Press (242 pp.).
- Servizi, J.A., Martens, D.W., 1991. Effect of temperature, season, and fish size on acute lethality of suspended sediments to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 493–497.
- Shinn, A., Pratoomyot, J., Bron, J., Paladini, G., Brooker, E., Brooker, A., 2015. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. Global Aquaculture Advocate 82–84.
- Singhal, R.N., Jeet, S., Davies, R.W., 1986. Chemotherapy of six ectoparasitic diseases of cultured fish. Aquaculture 54, 165–171.
- Siquier, G.F., 2012. Spatial distribution and microhabitat selection of copepods (Copepoda, Ergasilidae), gill parasites of *Mugil platanus* (Pisces, Mugilidae) from Laguna de Rocha, Uruguay. Bol. Soc. Zool. Uruguay 21, 39–49.
- Siquier, G.F., Núñez, M.O., 2009. *Ligophorus uruguayense* sp. nov. (Monogenea, Ancyrocephalidae), a gill parasite from *Mugil platanus* (Mugiliformes, Mugilidae) in Uruguay. Acta Parasitol. 54 (2), 95–102.
- Snieszko, S.F., 1978. Control of fish diseases. Mar. Fish. Rev. 40 (3), 65–69.
- Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. Water Res. 4, 3–32.
- Sprague, J.B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sublethal effects and “safe” concentrations. Water Res. 5, 245–266.
- Stoskopf, M.K., 1988. Fish chemotherapeutics. Vet. Clin. N. Am-Small. 18 (2), 331–348.

- Treasurer, J.W., Grant, A., 1997. The efficacy of hydrogen peroxide for the treatment of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. infested with sea lice (Copepoda:Caligidae). *Aquaculture* 148, 265–275.
- Velloso, A.L., Pereira Jr., J., 2010. Influence of ectoparasitism on the welfare of *Micropogonias furnieri*. *Aquaculture* 310, 43–46.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77 (3), 591–625.
- Whittington, I.D., 1998. Diversity “down under”: monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean diversity worldwide. 28, 1481–1493.
- Wijeyaratne, M.J.S., Gunawardene, R.S., 1988. Chemotherapy of ectoparasite, *Ergasilus ceylonensis* of Asian cichlid, *Etropus suratensis*. *J. Appl. Ichthyol.* 4, 97–100.
- Wilson, C.B., 2011. North American parasitic copepods belonging to the family Ergasilidae. *Proc. USNM* 39 (1788), 263–439.
- Zhu, S., Ling, F., Zhang, Q., Liu, G., Tu, X., Jiang, C., Wang, G., 2014. Anthelmintic activity of saikosapoinins a and d from radix bupleuri against *Dactylogyrus* spp. Infecting goldfish. *Dis. Aquat. Organ.* 111, 177–182.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PPG AQUICULTURA

**O USO DO ÁCIDO ACÉTICO COMO ANTIPARASITÁRIO NA AQUICULTURA: EFETIVIDADE E
HISTOPATOLOGIA CAUSADA EM *MUGIL LIZA VALENCIENNES*, 1836**

CAPÍTULO 2: Efficacy of glacial acetic acid in the control of *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp.
associated with *Mugil liza*

REVISTA: AQUACULTURE

SITUAÇÃO: PUBLICADO

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.05.014

MÁRIO ROBERTO CASTRO MEIRA FILHO

RIO GRANDE, 2017.

Efficacy of glacial acetic acid in the control of *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp. associated with *Mugil liza*

Mário Roberto Castro Meira-Filho^{a,b,*}, Juan Rafael Buitrago Ramirez^a, Rogério Tubino Vianna^c, Joaber Pereira Júnior^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel, nº2, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96210-030;

^bCentro de Biotecnologia e Doenças de Animais Aquáticos, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel, 02, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96210-030; ^cLaboratório de Biologia de Parasitos de Organismos Aquáticos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália, Km 08, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96201-900.

*Corresponding author: E-mail address: mariorcmf@hotmail.com. Phone number +55 (19) 98106-6499.

Abstract

This study evaluated whether glacial acetic acid can control ciliate infestation of *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp. on juveniles of *Mugil liza*. A total of 84 juvenile mullets (11.52 ± 1.23 g, 8.72 ± 0.94 cm) kept in twelve 80 L tanks (useful volume of 45 L each) were used. The acetic acid concentrations tested were 0 (T0), 238 (T1), 476 (T2), and 715 (T3) mg L⁻¹, with three replicates of seven fish each. The experimental procedure consisted of 1 h of parasitocidal bath, followed by 2 h of recovery. Following the recovery period, the fish were individually euthanized, and the left and right sides of the body were scraped in the anteroposterior direction. Biometry followed the scraping of the first branchial arch (both left and right sides). The scrapes were set on slides and either stained with silver nitrate or fixed with methanol and stained with Giemsa. *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp. were found infesting 100% of the gills and integument of the T0 fish. The efficacy of acetic acid to control *Trichodina* sp. was high in all treatments (in gills, 71.43% [T1], 95.51% [T2], and 99.20% [T3]; for integument, 64.39% [T1], 99.75% [T2], and 99.97% [T3]). The efficacy of acetic acid to control *Apiosoma* sp. was also high (in gills, 99.43% [T1], 98.04% [T2], and 99.52% [T3]; for integument, 95.83% [T1], 98.9% [T2], and 99.12% [T3]). Based on our findings, glacial acetic acid concentration of 238 mg L⁻¹ is effective against *Apiosoma* sp. and concentration of 476 mg L⁻¹ is effective against *Trichodina* sp.

Keywords: Aquaculture; anti-parasitic; ciliophora; ethanoic acid; fish; mullet.

1. Introduction

Worldwide fish production has grown to 167.2 million tons in 2014, of which 44.14% was produced by aquaculture (FAO, 2016). The growth of aquaculture has been accompanied by its intensification; increasing production without increasing the area used (Naylor et al., 2000). In intensive fish farming, the animals are stocked at high densities, increasing the chance of dissemination of infectious diseases (Abd El-Galil and Aboelhadid, 2012, Leung and Bates, 2013, Menerrat et al., 2010, Naylor et al., 2000), especially when it involves pathogens with monoxene life cycles with horizontal transmissions, such as *Trichodina* spp. (Martins et al., 2015).

Ciliophora are protozoans of interest to aquaculture since they are responsible for large economic losses in commercial farms (Martins et al., 2015; Shinn et al., 2014). Trichodinidae is an important globally distributed group of Ciliophora, of which *Trichodina* spp. is most commonly found. *Trichodina* spp. is associated with the integument and gills of fish (Xu et al., 2015), being considered as facultative ectoparasites (Yokoyama et al., 2015). Fish intensely infested by *Trichodina* spp. might present damage on the epithelial or epidermal cells (Ovcharenko, 2015), desquamation of the cellular epithelium, vacuolar degeneration, hypertrophy (Abdel-Baki et al., 2011), hyperplasia of the gill filaments with subepithelial oedema of secondary lamellae (Valladão et al., 2014) and growth decrease (Barker et al., 2002; Yokoyama et al., 2015), and can even die (Abd El-Galil and Aboelhadid, 2012; Khan, 2004; Valladão et al., 2014; Xu et al., 2015).

Another Ciliophora group of importance to aquaculture is the *Apiosoma* spp., which is characterized as ectocomensals of gills and integument of aquatic organisms, mainly fishes (Li et al., 2008). *Apiosoma* spp. do not cause direct lesions in the host, but at high intensities can reduce the respiratory surface of the host's gill epithelium (Martins et al., 2015), affecting gas exchange (Abowei et al., 2011, Reda, 2011). However, Moyses et al. (2015) consider *Apiosoma* spp. as an obligatory parasite and relate the infestation by this group to the massive destruction of fishes gill epithelium and integument. Due to these host-damaging aspects, here we focus on *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp., which we consider parasites.

Although many studies have already been carried out on the removal of *Trichodina* spp. and *Apiosoma* spp. in fish (Abd El-Galil and Aboelhadid, 2012; Chitmanat et al., 2005; Ikefuti et al., 2015; Noga, 2010; Valladão et al., 2016; Yao et al., 2011), it remains important to expand drug options for these parasites. Although glacial acetic acid (GAA) use is considered effective (Davis, 1946; Harms, 1996; Singhal et al., 1986; Sniezko, 1978; Stoskopf, 1988), it is not

frequently used as a parasiticide. This lack of uptake of GAA as a treatment might be due to the nature of the studies describing its effectiveness (e.g., relatively old, with controversial results, and little information regarding its application) (Davis, 1946; Singhal et al., 1986; Sniezko, 1978; Stoskopf, 1988).

The mugilids are an important fishing resource, and some species have been farmed in aquaculture systems (Crosetti, 2016). Among these species, *Mugil liza* Valenciennes, 1836 has been highlighted as a promising species for aquaculture, as it is eurythermic (Okamoto et al., 2006), euryhaline (Lisboa et al., 2015a; Lisboa et al., 2015b; Sampaio et al., 2002), and its reproduction is easily managed (Godinho et al., 1993; Nomura et al., 1980). Despite the potential for aquaculture, in natural environments, *M. liza* can be parasitized by protozoa, mainly by species of *Trichodina* (Carnevia and Speranza, 2003; Marcotegui and Martorelli, 2009; Ranzani-Paiva et al., 1997; Ranzani-Paiva and Silva-Souza, 2004), which may represent a threat to their farming.

Meira-Filho et al. (2017) demonstrate that GAA is effective in the control of metazoan ectoparasites of *M. liza* (*Ergasilus lizae*, *Solostamenides* cf. *platyorchis* and *Ligophorus* spp.). However, studies have not yet been performed to remove ciliates associated with this host species. Thus, here we test the efficacy of GAA in the removal of parasitic peritrichids ciliates from reared juvenile mullets.

2. Material and methods

2.1. Fish collection and maintenance

The specimens of *M. liza* used in the present study were collected in streams of the Cassino beach (32° 11' 55.58" S; 52° 10' 13.90" W and 32° 10' 55.17" S; 52° 8' 49.49" W), using a casting net (4 m in diameter, 0.8 mm mesh). Following collection, the fish were transported to the Marine Aquaculture Station of the Federal University of Rio Grande, where they were acclimated and maintained for 18 days in a recirculation system composed of one 500 L tank with a biofilter and mechanical filter.

During the acclimation period, fish were fed twice daily (9:00 AM and 5:00 PM) with commercial feed Guabi® (38% crude protein) and were fasted in the 24 h preceding the experiment. A 12 h light-dark cycle and an 11 ppt of water salinity were used. Dissolved oxygen and temperature parameters were evaluated daily using an oximeter (YSI Pro-20). The pH was measured using a bench-top pH meter, and alkalinity was measured by titulometry.

The water quality parameters were maintained as follows: temperature ($24.77 \pm 0.86^{\circ}\text{C}$), dissolved oxygen ($5.52 \pm 0.60 \text{ mg L}^{-1}$), pH (7.29 ± 0.06), alkalinity ($111.67 \pm 13.21 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$). These parameters are considered acceptable for juveniles of *M. liza* (Fonseca Neto and Spach, 1999, Lisboa et al., 2015a, Okamoto et al., 2006).

2.2. Experimental design

In this study, 84 juveniles of *M. liza* with a mean length of $8.72 \pm 0.94 \text{ cm}$ and weight of $11.52 \pm 1.23 \text{ g}$ were used. The fish were divided into twelve tanks of 80 L with 45 L of useful volume, with filtered water and constant aeration in a static system. Each treatment was composed of three tanks (replicas), with seven fish each.

The synthetic glacial acetic acid (Synth®) concentrations used were 0 (T0), 238 (T1), 476 (T2), and 715 mg L^{-1} (T3), corresponding to 0, 33.3, 66.6 and 100% of the lethal concentration to eliminate 1% of *M. liza* individuals tested at 1 h of exposure ($\text{CL}_{01-1\text{h}}$) (Meira-Filho et al., 2017).

After the 1 h GAA bath, fish from each replica of all treatments were transferred to tanks of the same volume, with clean water, for 2 h recovery and the detachment of the killed ciliates. After this period, the fish were euthanized by medullary section, and then scrapes from the left and right sides of fish integument were performed by microscope slides in the anteroposterior direction. Next, biometry was performed, and the opercula were removed for scraping the first branchial arch, also on both the left and right sides of the fish.

2.3. Water quality

The water quality parameters (temperature, pH, alkalinity and total ammonia) were evaluated in the period immediately before the bath (BB) and after the bath (AB) of GAA, and before recovery (BR) and after recovery (AR). To avoid exposing the oximeter sensor to acid conditions, the dissolved oxygen parameter was evaluated only in the BR and AR periods. The water quality data of the BR tanks were grouped since these tanks shared the same reservoir and are treated here as W0.

2.4. Parasitological analysis

The scrapes of the gills and integument of each of the hosts, of all replicates, were set on slides. After scraping and prior to staining, the slides were dried in the laboratory at room temperature. After drying, the slides were impregnated with silver nitrate and were dried in the

sunlight (Klein, 1958) or were fixed with methanol and stained with Giemsa (Bittencourt et al., 2014).

Ciliates were counted by a complete analysis of the slides under an optical microscope. The parasitological indexes proposed by Bush et al. (1997) were used, including prevalence (P%), mean abundance (MA), and mean intensity of infestation (MII) for each condition at each infestation site. The sum of the number of ciliates of the integument and gills in the host specimens was used to calculate the P% of each parasite taxon per treatment. MA values were used to calculate the efficacy of each treatment in the gills and integument. In this study, efficacy is defined as the percentage of parasites that were theoretically removed from hosts in each treatment when compared to the control group (Dotta et al., 2015).

2.5. Data analysis

With the exception of the P% data, all comparative analyses in this study were made using Past software 3.14 (Hammer et al., 2001). Prior to all comparisons, the assumptions for parametric tests, Shapiro-Wilk normality, and Levene homoscedasticity were verified. Comparisons between two treatments were performed using the Tukey test (parametric) or the non-parametric Dunn test. For comparisons between three or more treatments, when the data were homoscedastic and had a normal distribution, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, and in the case of significant difference, the Tukey *post hoc* test was used. If the data were not normal and/or homoscedastic, the Kruskal-Wallis test was performed, and in the case of significant difference, Dunn's *post hoc* test was used ($p < 0.05$).

The effect of treatments on water quality in the BB, AB, and AR periods was evaluated. The effect of fish on water quality was also evaluated by comparing the water quality data before and after the presence of fish in both bath (BB and AB) and recovery (BR and RA).

The comparison of the parasitic indexes of MA and MII of the infestation sites (gills and integument) was performed between treatments. The data of P% in gills, integument, and total were compared between treatments by Fisher's exact test, using the Quantitative Parasitology 3.0 software (Rózsa et al., 2000).

MA values were used to determine the efficacy of the different treatments using the formula: $EF\% = 100 (MNPT0 - MNPT) MNPT0^{-1}$, where EF% is efficacy, MNPT0 is the mean number of parasites of T0 and MNPT is the mean number of parasites in the treatment (Dotta et al., 2015).

3. Results

During the acetic acid exposure period, there was no mortality of the hosts. However, during the recovery period, one T2 and two T3 specimens died (Table 1).

Table 1. Survival of *Mugil liza* juveniles during a 1 h glacial acetic acid bath at 0 (T0), 238 (T1), 476 (T2), and 715 mg L⁻¹ (T3), and during the 2 h recovery period.

Treatment	Survival (%)	
	Bath period	Recovery period
C	100.00	100.00
T1	100.00	100.00
T2	100.00	95.24
T3	100.00	90.48

During the experimental period, there was no difference in temperature between the BB and AB periods (Table 2). However, there was a gradual decrease of pH and alkalinity as the concentration of GAA in the treatments was increased (Table 2). Ammonia levels were not different when compared between treatments, both in the BB and AB periods, but there was a significant increase in total ammonia in all treatments in the AB periods compared to their respective BB periods (Table 2).

Table 2. Water quality parameters for the glacial acetic acid bath. T = treatments, EP = experimental period, Temp = temperature (°C), Alk = Alkalinity (mg CaCO₃ L⁻¹), TAN = total ammonia (N-NH₄⁺ + NH₃) (mg L⁻¹), BB = before bath with acetic acid, AB = after bath with acetic acid.

T	EP	Temp	pH	Alk	TAN
T0	BB	22.33 ± 0.58 ^a	7.67 ± 0.10 ^a	86.67 ± 2.89 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	AB	22.00 ± 1.00 ^a	7.73 ± 0.02 ^a	88.33 ± 2.89 ^a	0.37 ± 0.02 ^{a*}
T1	BB	22.00 ± 0.00 ^a	5.14 ± 0.61 ^{ab}	65.00 ± 18.03 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	AB	21.67 ± 0.58 ^a	4.74 ± 0.04 ^b	61.67 ± 2.89 ^{ab}	0.37 ± 0.03 ^{a*}
T2	BB	22.00 ± 0.00 ^a	4.97 ± 0.81 ^{ab}	30.00 ± 0.00 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^a
	AB	22.33 ± 0.58 ^a	4.37 ± 0.02 ^b	33.30 ± 2.89 ^b	0.34 ± 0.02 ^{a*}
T3	BB	22.00 ± 0.00 ^a	4.20 ± 0.10 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a
	AB	22.00 ± 0.00 ^a	4.17 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.24 ± 0.01 ^{a*}

Superscripted and distinct lower letters mean significant differences in water quality parameters between treatments in the same period ($p < 0.05$). * = Significant difference in the quality parameter between the BB and AB periods in the same treatment ($p < 0.05$).

There was no significant difference in water quality parameters between treatments after the fish recovery period (Table 3). However, there was a significant increase in total ammonia and a significant decrease in pH in all studied treatments when compared to W0.

Table 3. Water quality parameters for the glacial acetic acid bath recovery. T = treatments, EP = experimental period, Temp = temperature (°C), DO = dissolved oxygen (mg L⁻¹), Alk = Alkalinity (mg CaCO₃ L⁻¹) TAN = total ammonia (N-NH₄⁺ + NH₃) (mg L⁻¹), W0 = mean water quality parameters of recovery tanks before the presence of fish. BR = before bath with acetic acid recovery, AR = after bath with acetic acid recovery.

T	EP	Temp	DO	pH	Alk	TAN
W0	BR	22.08 ± 0.29	7.82 ± 0.27	7.87 ± 0.03	81.25 ± 2.50	0.00 ± 0.00
C	AR	22.67 ± 0.58 ^a	7.10 ± 0.05 ^a	7.71 ± 0.02 ^a	86.67 ± 2.89 ^a	0.16 ± 0.02 ^{a*}
T1	AR	22.67 ± 0.58 ^a	6.94 ± 0.12 ^a	7.62 ± 0.01 ^a	86.67 ± 2.89 ^a	0.15 ± 0.02 ^{a*}
T2	AR	22.33 ± 0.58 ^a	7.12 ± 0.14 ^a	7.64 ± 0.02 ^a	83.33 ± 2.89 ^a	0.12 ± 0.05 ^{a*}
T3	AR	22.33 ± 0.58 ^a	7.14 ± 0.15 ^a	7.69 ± 0.11 ^a	86.67 ± 2.89 ^a	0.10 ± 0.02 ^{a*}

Superscripted and distinct lower letters mean significant differences in water quality parameters between treatments in the AR period (p < 0.05). * = Significant difference in the quality parameter between the BR and AR periods in the same treatment (p < 0.05).

All T0 fish were infested by *Trichodina* sp. (Table 4) and *Apiosoma* sp. (Table 5), both in the gills and in the integument.

The prevalence of *Trichodina* sp. in the gills of T2 and T3 fish was lower than in T0 and T1 fish. In the integument, the prevalence of *Trichodina* sp. in all GAA treatments was lower than in T0 fish (Table 4).

Table 4. Prevalence (P%), mean abundance (MA), and mean infestation intensity (MII) of *Trichodina* sp. on *Mugil liza* treated with 0 (T0), 238 (T1), 476 (T2) or 715 mg L⁻¹ (T3) of glacial acetic acid. ni = number of parasitized hosts, N = number of hosts analyzed.

Index	Infestation site	T0	T1	T2	T3
P%	Gills	100.00 ^a	100.00 ^a	30.00 ^b	10.53 ^b
	(ni/N)	(21/21)	(21/21)	(6/20)	(2/19)
	Integument	100.00 ^a	76.19 ^b	30.00 ^c	15.79 ^c
		(21/21)	(16/21)	(6/20)	(3/19)
	Total	100.00 ^a	100.00 ^a	55.20 ^b	26.32 ^b
		(21/21)	(21/21)	(11/20)	(5/19)
MA	Gills	319.14 ± 948.30 ^a	91.19 ± 148.23 ^a	0.80 ± 1.51 ^b	0.10 ± 0.32 ^b
		(11.00 – 4367.00)	(3.00 – 590.00)	(0.00 – 5.00)	(0.00 – 1.00)
	Integument	20.05 ± 17.45 ^a	7.14 ± 13.32 ^b	0.90 ± 1.77 ^c	0.16 ± 0.38 ^c
		(1.00 – 63.00)	(0.00 – 60.00)	(0.00 – 6.00)	(0.00 – 1.00)
MII	Gills	319.14 ± 948.30 ^a	91.19 ± 148.23 ^a	2.67 ± 1.63 ^b	1.00 ± 0.00 ^c
		(11.00 – 4367.00)	(3.00 – 590.00)	(1.00 – 5.00)	(1.00 – 1.00)
	Integument	20.05 ± 17.45 ^a	9.38 ± 14.64 ^b	3.00 ± 2.10 ^{bc}	1.00 ± 0.00 ^c
		(1.00 – 63.00)	(1.00 – 60.00)	(1.00 – 6.00)	(1.00 – 1.00)

Different superscripted lower letters on the same line indicate significant differences (p < 0.05).

The parasitological indexes of P%, MA, and MII for *Apiosoma* sp. were significantly lower in all treatments when compared to T0 (Table 5).

Table 5. Prevalence (P%), mean abundance (MA) and mean infestation intensity (MII) of *Apiosoma* sp. on *Mugil liza* treated with 0 (T0), 238 (T1), 476 (T2) or 715 mg L⁻¹ (T3) of glacial acetic acid. ni = number of parasitized hosts, N=number of hosts analyzed.

Index	Infestation site	T0	T1	T2	T3
P%	Gills	100.00 ^a	42.86 ^b	15.00 ^{bc}	10.53 ^c
	(ni/N)	(21/21)	(9/21)	(3/20)	(2/19)
	Integument	100.00 ^a	19.05 ^b	15.00 ^b	10.53 ^b
		(21/21)	(4/21)	(3/20)	(2/19)
	Total	100.00 ^a	57.14 ^b	30.00 ^{bc}	21.05 ^c
		(21/21)	(12/21)	(6/20)	(4/19)
MA	Gills	18.24 ± 17.44 ^a	0.76 ± 1.09 ^b	0.20 ± 0.52 ^c	0.16 ± 0.50 ^c
		(1.00 – 56.00)	(0.00 – 3.00)	(0.00 – 2.00)	(0.00 – 2.00)
	Integument	33.14 ± 35.82 ^a	0.19 ± 0.40 ^b	0.65 ± 0.25 ^b	0.16 ± 0.50 ^b
		(2.00 – 167.00)	(0.00 – 1.00)	(0.00 – 10.00)	(0.00 – 2.00)
MII	Gills	18.24 ± 17.44 ^a	1.78 ± 0.97 ^b	1.33 ± 0.58 ^b	1.50 ± 0.71 ^b
		(1.00 – 56.00)	(1.00 – 3.00)	(1.00 – 2.00)	(1.00 – 2.00)
	Integument	33.14 ± 35.82 ^a	1.00 ± 0.00 ^b	4.33 ± 4.93 ^b	1.50 ± 0.71 ^b
		(2.00 – 167.00)	(1.00 – 1.00)	(1.00 – 10.00)	(1.00 – 2.00)

Different superscripted lower letters on the same line indicate significant differences (p <0.05).

With the exception of T1 values for *Trichodina* sp., all efficacy values were numerically greater than 95% (Figure 1).

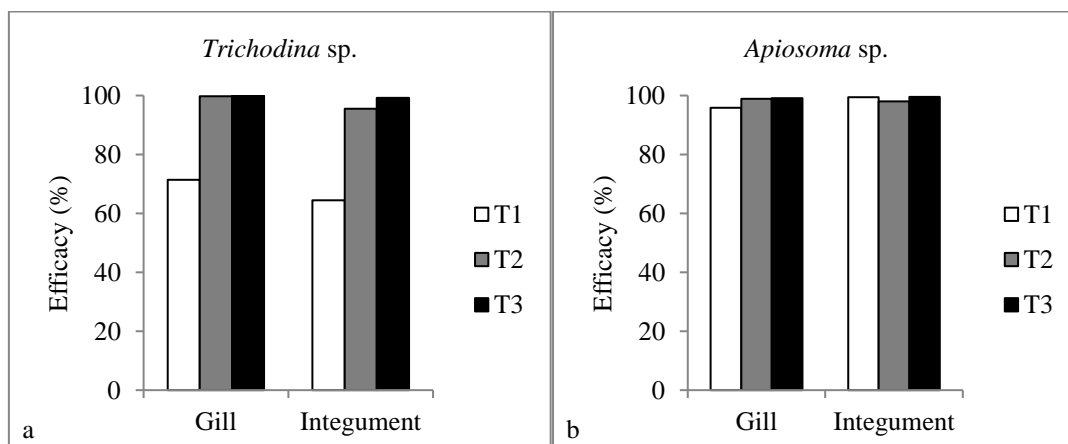


Fig. 1. Efficacy (%) of acetic acid in the control of ciliates associated with reared *Mugil liza* juvenies. a. Efficacy in the control of *Trichodina* sp. b. Efficacy in the control of *Apiosoma* sp. T1 = 238 mg L⁻¹; T2 = 476 mg L⁻¹; T3 = 715 mg L⁻¹.

4. Discussion

Although the GAA concentrations used in the present study were equal to or less than the CL_{01-1h} value determined by the toxicity data from Meira-Filho et al. (2017), there were deaths following the treatments (one at 66.6% and two at 100% of CL_{01-1h}). This can be explained by the fact that parasitism can affect the dose-response curve of a particular chemical or stressor (Marcogliese and Pietrock, 2011). Intensely parasitized animals may present less resistance to stressful environmental conditions, including drug treatments (Pascoe and Cram, 1977). Thus, the tolerance of the mullet to the acid used in this study may have been affected by the large amount of ciliates on the fish, as suggested by the values observed in the T0 fish. If the infestation intensity was higher, it is possible that the mortality among the treatments would have been higher, even in T0.

In the evaluation of the water quality of the GAA baths, the only parameters that showed differences between the treatments were pH and alkalinity, which decreased in the higher GAA concentration treatments. There was an increase in total ammonia in all treatments in the AB period compared to the BB period. In the recovery, there was no difference in the parameters in relation to the treatments. However, the total ammonia levels of all treatments in the AR period were higher when compared to the period before recovery (BR). Stressful factors may result in increased rates of ammonia excretion by fish (Randall and Tsui, 2002). Although total ammonia levels in all treatments did not differ after the bath and recovery periods, suggesting that acetic acid did not change the rate of ammonia excretion during these periods, it is unlikely that the higher concentrations of acetic acid did not cause stress to the fish, since its presence was related to one death in T2 and two deaths in T3.

All T0 fish were infested by *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp. in the gills and in the integument, suggesting that initially all fish of all treatments were infested by these parasites. In natural environments, the prevalence of *Trichodina* spp. in *M. liza* can vary according to the species of the parasite, the locality, and the season. Ranzani-Paiva et al. (1997) reported a prevalence of 91.62% for Trichodinidae in *M. liza* (total length of 41.85 ± 1.41 cm and weight of 801.00 ± 75.00 g) in the Cananéia estuary region, Brazil. Carnevia and Speranza (2003) found that *Trichodina* sp. on *M. liza* captured in the estuary of Rio de la Plata, Uruguay, presented different prevalence values throughout the seasons, with values of 82.7% for spring, 89.4% for summer, 69.2% for autumn, and 100.0% for winter. Marcotegui and Martorelli (2009) investigated the prevalence of trichodinids of *M. liza* captured on Samborón Bay, Argentina, and reported values of 26% for *T. puytoraci*, *T. lepsii* and *T. jandranica* and 2% for

T. scalensis. The prevalence values of *Trichodina* sp. in *M. liza* observed in this study are apparently higher than those observed by these authors in mugilids off the coast of São Paulo (Brazil), Uruguay and Argentina. The present study is the first to report the presence of *Apiosoma* sp. infesting the integument and gills of *M. liza*.

The differences in the parasitological index values between T0, and T1, T2 and T3 (for *Apiosoma* sp.) and T2 and T3 (for *Trichodina* sp.) suggest that the presence of GAA affects these organisms. How GAA affects protozoa is not yet known. However, it is suggested that pH may play an important role in eliminating these ciliates. Halmetoja et al. (2000) evaluated the presence of protozoa in *Perca fluviatilis* under several environments with different pH values and detected differences in prevalence (for *Trichodina* spp. these were 48.6% [pH 6.4], 24.5% [pH 5.9], and 0% [pH 5.3]; for *Apiosoma* spp. these were 75.5% [pH 6.4], 79.2% [pH 5.9], and 8.1% [pH 5.3]). Here, we found 100% prevalence for both ciliates studied in T0 fish (initial mean pH of 7.67). The T1 (initial pH of 5.14), T2 (initial pH of 4.97), and T3 (initial pH of 4.20) fish had prevalences of 100% [T1], 30% [T2] and 10.53% [T3] for *Trichodina* sp. and 42.86% [T1], 15.00% [T2] and 10.53% [T3] for *Apiosoma* sp. It is difficult to compare our findings with those of Halmetoja et al. (2000) when considering the effect of pH because our fish experienced an acute pH exposure, whereas the Halmetoja et al. (2000) fish experienced had chronic exposure.

We did not directly compare the infestation presences for the gills and integument because of differences in the collection methods. To address this, future studies might aim to standardize the scraping methods.

In the present study, high efficacies of GAA were observed for the control of *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp. However, the efficacy did not reach 100% under any of the tested conditions for either parasite. It is possible that the 2 h recovery time was insufficient for the detachment of all dead ciliates, which might have continued to adhere to the mucous produced by the fish and, therefore, were counted and considered alive.

Studies using GAA as an anti-parasitic drug have used different therapeutic protocols (concentrations and bath times). Sniezko (1978), for example, recommends anti-parasitic baths at the concentration of 2,000 mg L⁻¹ for 30–60 s or 500 mg L⁻¹ for 30 min. However, this author does not report for which parasite taxa these concentrations are adequate. Singhal et al. (1986) state that 10 min baths of acetic acid at a concentration of 0.001 mg L⁻¹ has 97% efficacy against *T. indica*, whereas Stoskopf (1988) and Harms (1996) recommend baths of 30 s at 500 mg L⁻¹ for removal of protozoa. Clearly, the acetic acid concentrations and bath times attributed to the

disinfestation of *Trichodina* spp. of these authors differ from those of the present study. However, direct comparisons between studies are difficult because of incomplete reporting of methodologies. Also, the *Trichodina* species studied by these authors are possibly different from the one found in the present study.

5. Conclusions

This study showed that GAA concentration of 238 mg L⁻¹ are effective against *Apiosoma* sp. and that concentration of 476 mg L⁻¹ are effective against *Trichodina* sp. However, it is also necessary to consider the tolerance of the host to GAA, as well their state of debilitation, since more debilitated animals may have less tolerance to stress resulting from the prophylactic baths. Further studies are recommended to determine whether the anti-parasitic effect is due to the acetic acid itself, or to a decrease in pH. The tolerance of this drug in other species of farmed fish, and in other species of parasites of aquaculture importance should also be evaluated.

Acknowledgments

The authors thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for a doctoral scholarship to M.R.C. Meira-Filho (P. Parasitologia Básica Proc. 1272/2011) and master scholarship to J.R.B. Ramirez.

References

- Abd El-Galil, M.A.A., Aboelhadid, S.M., 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Vet. Parasitol.* 185, 57–63.
- Abdel-Baki, A.S., Sakran, T., Fayed, H., Zayed, E., 2011. *Trichodina fahaka* (Ciliophora: Peritrichia) in *Tetradon fahaka* from Nile River, Egypt: Seasonality and histopathology. *Sci. Res. Essays* 6, 1583–1587.
- Abowei, J.F.N., Briyai, O.F., Basse, S.E., 2011. A review of some basic parasite diseases in culture fisheries Flagellids, Dinoflagellides and Ichthyophthiriasis, Ichtyobodiasis, Coccidiosis Trichodiniasis, Heminthiasis, Hirudinea Infestation, Crustacean Parasite and Ciliates. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* 2, 213–226.
- Barker, D.E., Cone, D.K., Burt, M.D.B., 2002. *Trichodina murmanica* (Ciliophora) and *Gyrodactylus pleuronecti* (Monogenea) parasitizing hatchery-reared winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): effects on host growth and assessment of parasite interaction. *J. Fish Dis.* 25, 81–89.

- Bittencourt, L.U., Pinheiro, D.A., Cárdenas, M.Q., Fernandes, B.M., Tavares-Dias, M., 2014. Parasites of native Cichlidae populations and invasive *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in tributary of Amazonas River (Brazil). *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23, 44–54.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Allen, W.S., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583.
- Carnevia, D., Speranza, G., 2003. Seasonal variations in parasites found in mullet (*Mugil platanus* Günther, 1880) juveniles captured on the Uruguayan coast of the River Plate. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 23, 245–249.
- Chitmanat, C., Tongdonmuan., K., Nunsong, W., 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27, 359–364.
- Crosetti, D., 2016. Current State of Grey Mullet Fisheries and Culture. In.: Crosetti, D., Blaber, S. (Eds.), *Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (Mugilidae)*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., pp. 398–450.
- Davis, H. S., 1946. Care and Diseases of Trout. US Department of Interior Research Report, No. 12. US Government Printing Office, Washington, DC, USA. (98 pp.).
- Dotta, G., Brum, A., Jeronimo, G.T., Maraschim, M., Martins, M.L., 2015. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extract on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24, 66–71.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. (200 pp.)
- Fonseca Neto, J.C., Spach, H.L., 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca* 25, 13–17.
- Godinho, H.M., Kavamoto, E.T., Andrade Talmelli, E.F., Serralheiro, P.C.S., Paiva, P., Ferraz, E.M., 1993. Induced spawning of the Mullet *Mugil platanus* Günther, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. *Bol. Inst. Pesca* 20, 59–66.
- Halmetoja, A., Valtonen, E.T., Koskenniemi, E., 2000. Perch (*Perca fluviatilis* L.) parasites reflect ecosystem conditions: a comparison of a natural lake and two acidic reservoirs in Finland. *Int. J. Parasitol.* 30, 1437–1444.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica* 4, 1–9.
- Harms, C.A., 1996. Treatments for Parasitic Diseases of Aquarium and Ornamental Fish. *Semin. Avian. Exot. Pet.* 5, 54–63.
- Ikefuti, C.V., Carraschi, S.P., Barbuio, R., da Cruz, C., de Pádua, S.B., Onaka, E.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2015. Teflubenzuron as a tool for control of trichodinids in freshwater fish: Acute toxicity and *in vivo* efficacy. *Exp. Parasitol.* 154, 108–112.
- Khan, R.A., 2004. Disease outbreaks and mass mortality in cultured Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with *Trichodina murmanica* (Ciliophora). *J. Fish Dis.* 27, 181–184.
- Klein, B.M., 1958. The “Dry” Silver Method and Its Proper Use. *J. Protozool.* 5, 99–103.
- Leung, T.L.F., Bates, A.E., 2013. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. *J. Appl. Ecol.* 50, 215–222.

- Li, M., Wang, J., Zhu, D., Gu, Z., Zhang, J., Gong, X., 2008. Study of *Apiosoma piscicola* (Blanchard 1885) occurring on fry freshwater fishes in Hongze, China with consideration of the genus *Apiosoma*. *Parasitol. Res.* 102, 931–937.
- Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015a. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). *Neotrop. Ichthyol.* 13, 447–452.
- Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015b. Acclimation of juvenile *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Mugiliformes: Mugilidae) to different environmental salinities. *Neotrop. Ichthyol.* 13, 591–598.
- Marcogliese, D.J., Pietrock, M., 2011. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. *Trends Parasitol.* 27, 123–130.
- Marcotegui, P.S., Martorelli, S.R., 2009. Trichodinids (Ciliophora: Peritrichida) of *Mugil platanus* (Mugiliformes: Mugilidae) and *Micropogonias furnieri* (Perciformes: Sciaenidae) from Samborombón Bay, Argentina, with the description of a new species. *Folia Parasitol.* 56, 167–172.
- Martins, M.L., Cardoso, L., Marchiori, N., de Pádua, S. B., 2015. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24, 1–20.
- Meira-Filho, M.R.C., Rosas, V.T., Vianna, R.T., Pereira Jr., J., 2017. Toxicity and parasitocidal evaluation *in vivo* and *in vitro* of acetic acid on metazoan ectoparasites in juvenile *Mugil liza* Valenciennes, 1836. *Aquaculture* 476, 1–7.
- Menerrat, A., Nilsen, F., Ebert, D., Skorpung, A., 2010. Intensive Farming: Evolutionary Implications for Parasites and Pathogens. *Evol. Biol.* 37, 59–67.
- Moyses, C.R.S., Spadacci-Morena, D.D., Xavier, J.G., Antonucci, A.M., Lallo, M.A., 2015. Ectocommensal and ectoparasites in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) in farmed in the State of São Paulo. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24, 283–289.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.
- Noga, E.J., 2010. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, second ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA (519 pp.).
- Nomura, H., 1980. Considerações sobre a criação de peixes estuarinos em viveiros. *Bolm. Inst. Oceanogr.* 29, 271–273.
- Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., Maçada, A.P., 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica* 28, 61–66.
- Ovcharenko, M., 2015. Microparasites of worldwide mullets. *Ann. Parasitol.* 61, 229–239.
- Pascoe, D., Cram, P., 1977. The effect of parasitism on the toxicity of cadmium to the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *J. Fish Biol.* 10, 467–472.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17–23.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Ishikawa, C.M., Campos, B.E., Eiras, A.C., 1997. Haematological characteristics associated with parasitismo in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. *Revta. Bras. Zool.* 14, 329–339.

- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T., 2004. Co-infestation of gill by different parasite groups in the mullet, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthys, Mugilidae): Effects on relative condition factor. *Braz. J. Biol.* 64, 677–682.
- Reda, E.S.A., 2011. A Review of some Ecto-and Endo Protozoan Parasites Infecting *Sarotherodon galilaeus* and *Tilapia zillii* from Damietta Branch of River Nile, Egypt. *J. Am. Sci.* 7, 362–373.
- Rózsa, L., Reiczigel, J., Majoros, G., 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *J. Parasitol.* 86, 228–232.
- Sampaio, L.A., Wasielesky, W.F.B., Miranda-Filho, K.C., 2002. Effects of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *B. Environ. Contam. Tox.* 68, 668–674.
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Bron, J.E., Paladini, G., Brooker, E.E., Brooker, A.J., 2014. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology* 142, 196–270.
- Singhal, R.N., Jeet, S., Davies, R.W., 1986. Chemotherapy of six ectoparasitic diseases of cultured fish. *Aquaculture* 54, 165–171.
- Snieszko, S.F., 1978. Control of fish diseases. *Mar. Fish. Rev.* 40, 65–69.
- Stoskopf, M.K., 1988. Fish Chemotherapeutics. *Vet. Clin. N. Am-Small.* 18, 331–348.
- Valladão, G.M.R., Alves, L.O., Pilarski, F., 2016. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: Diagnosis, parasite:host-stage relationship and treatment. *Aquaculture* 451, 444–450.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pádua, S.B., Martins, M.L., Pilarski, F., 2014. *Trichodina heterodontata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study. *Parasitology* 141, 662–669.
- Xu, D., Shoemaker, C.A., Zhang, D., 2015. Treatment of *Trichodina* sp. reduced load of *Flavobacterium columnare* and improved survival of hybrid tilapia. *Aquac. Rep.* 2, 126–31.
- Yao, J., Li, X., Shen, J., Pan, X., Hao, G., Xu, Y., Ying, W., Ru, H., Liu, X., 2011. Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus* L. with activity against *Trichodina* sp. *Aquaculture* 318, 235–238.
- Yokoyama, H., Itoh, N., Ogawa, K. Fish and Shellfish Diseases Caused by Marine Protists. In Ohtsuka, S., Suzaki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N., Not, F. (Eds). *Marine Protists - Diversity and Dynamics*. Springer Japan 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PPG AQUICULTURA

**O USO DO ÁCIDO ACÉTICO COMO ANTIPARASITÁRIO NA AQUICULTURA: EFETIVIDADE E
HISTOPATOLOGIA CAUSADA EM *MUGIL LIZA VALENCIENNES*, 1836**

**CAPÍTULO 3: Efeitos histopatológicos em brânquias e fígado de juvenis de *Mugil liza*
expostos à diferentes concentrações de ácido acético**

REVISTA: AQUACULTURE

SITUAÇÃO: NÃO SUBMETIDO

MÁRIO ROBERTO CASTRO MEIRA FILHO

RIO GRANDE, 2017.

Alterações histopatológicas em brânquias e fígado de juvenis de *Mugil liza* expostos ao ácido acético

Mário Roberto Castro Meira-Filho^{a,b,*}, Victor Torres Rosas^a, Virgínia Fonseca Pedrosa^{a,b,c}, Luis Alberto Romano^{a,b,c}, Rogério Tubino Vianna^d, Joaber Pereira Júnior^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel, nº2, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96210-030;

^bCentro de Biotecnologia e Doenças de Animais Aquáticos (CBD), Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel, 02, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96210-030; ^cLaboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Rio Grande. Rua do Hotel, nº2, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96210-030; ^dLaboratório de Biologia de Parasitos de Organismos Aquáticos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália, Km 08, Rio Grande, RS, Brazil. PO Box 474, CEP: 96201-900.

*Corresponding author: E-mail address: mariorcmf@hotmail.com. Phone number +55 (19) 98106-6499.

Resumo

Apesar do reconhecimento da atividade antiparasitária do ácido acético em peixes, estudos sobre os efeitos causados por essa droga nos tecidos dos hospedeiros são escassos. Neste estudo foram avaliadas as alterações histológicas do fígado e brânquias de juvenis de *Mugil liza* expostos ao ácido acético glacial. Foram realizados banhos de 1 h com ácido acético nas concentrações de 0 (T0), 350,65 (T1), 701,31 (T2) e 1051,96 mg L⁻¹ (T3). Após o banho, os peixes foram mantidos em água limpa por 24 h para recuperação. Foram analisados oito peixes das concentrações de 0 e 350,65 mg L⁻¹, e apenas quatro das concentrações de 701,31 e 1051,96 mg L⁻¹ devido à mortalidade. A análise do fígado foi feita por quantificação da área total do corte histológico e da área com cada tipo de lesão. Para garantir uma amostragem uniforme da distribuição das alterações patológicas nas brânquias, um arco branquial de cada hospedeiro foi examinado. Cada arco foi dividido em três campos: os cinco primeiros filamentos, os cinco medianos e os cinco últimos. Para cada filamento foi determinada a frequência de lesão (F%) pela contagem (presença/ausência) de cada tipo de alteração histológica encontrada. Em uma segunda análise, uma nova amostragem foi realizada. Nesta

avaliação, a lamela primária central em cada um dos campos foi examinada para determinar a porcentagem de lamelas secundárias com cada tipo de patologia em relação às analisadas em cada arco (SLL%). Com estes dados, foi determinada a ocorrência de lesão (OL%) para cada tipo de lesão. Foram determinados os valores de correlação linear de Pearson (r) entre cada tipo de lesão com a concentração de ácido acético e com o pH. Em todos os tratamentos foram observadas lesões lamelares caracterizadas por hiperplasia, fusão das lamelas secundárias, desprendimento do epitélio lamelar e perda do epitélio lamelar. Não houve diferença na frequência de hiperplasia, fusão lamelar e desprendimento do epitélio lamelar entre os tratamentos. No entanto, o uso do ácido acético mesmo na menor concentração testada causa significativo aumento na porcentagem de perda de epitélio das lamelas secundárias.

Palavras-chave: Drogas, aquicultura, peixes, pH, lesões

1. Introdução

A aquicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce mundialmente, e em 2014 produziu 73,8 milhões de toneladas de proteína animal (FAO, 2016). É esperado que até 2030 a produção anual seja de 93,6 milhões de toneladas (World Bank, 2013). No entanto, com o aumento da produção pela aquicultura ocorre também sua intensificação, o que favorece a disseminação de doenças parasitárias (Menerrat et al., 2010) que podem causar consideráveis prejuízos econômicos e estão entre os principais fatores que afetam o crescimento da aquicultura (Bondad-Reantaso et al., 2005; Shinn et al., 2014).

Drogas vêm sendo estudadas para remoção dos parasitos que infestam/infectam os peixes cultivados (Balta et al., 2008; Chagas et al., 2016; Pahor-Filho et al., 2012; Schmahl et al., 1989). No entanto, o uso de drogas deve ser realizado com cautela, uma vez que algumas drogas em concentrações não adequadas podem causar danos aos hospedeiros (Führ et al., 2012; Guimarães et al., 2007; Pahor-Filho et al., 2014; Velmurugan et al., 2009), além de eventuais riscos para saúde humana e para o meio ambiente (Cabello, 2006; Rico et al., 2012; Erondú e Anyanwu, 2005).

O fígado é o principal órgão associado à remoção de substâncias tóxicas (Cengiz e Unlu, 2006). O fígado exerce funções vitais como secreção de bile, reserva de nutrientes e metabolismo de macronutrientes (Rodrigues e Fanta, 1998; Velkova-Jordanoska et al., 2012). Por outro lado, alterações em sua morfologia podem causar efeitos secundários, como o comprometimento da capacidade metabólica (Camargo e Martinez, 2007), ou até mesmo levar

à morte do organismo (Rodrigues e Fanta, 1998). Essas alterações podem ainda ser utilizadas como marcadores, como um resultado de exposição prévia a ambientes estressantes (Boran et al., 2012; Velmurugan et al., 2007).

Outro órgão de grande importância para os peixes são as brânquias, que desempenham diversas funções, como trocas gasosas, regulação iônica e osmótica e está relacionada com o equilíbrio ácido-base e com a excreção de nitrogênio (Evans et al., 2005). As brânquias são o primeiro órgão a ser impactado por substâncias tóxicas na água devido sua ampla área superficial em contato direto com o meio (Evans et al., 1988; Bernet et al., 1999).

Drogas usuais na aquicultura, como parasiticidas, podem apresentar efeitos negativos no hospedeiro, principalmente nas brânquias (Führ et al., 2012; Guimarães et al., 2007; Pahor-Filho et al., 2014), no entanto, muitas drogas que são utilizadas pela aquicultura ainda não apresentam estudos adequados que avaliem seu efeito na saúde do hospedeiro.

O ácido acético ($C_2H_4O_2$) é uma droga antiparasitária, sobre a qual estudos relativamente antigos (Davis, 1946; Harms, 1996; Singhal et al., 1986; Snieszko, 1978; Stoskopf, 1988) relataram sua eficácia contra ectoparasitos de peixes. Mais recentemente, Meira-Filho et al. (2017) também constataram sua eficácia contra metazoários ectoparasitos de juvenis da tainha *Mugil liza*. No entanto são desconhecidos os efeitos do ácido acético em brânquias e fígado de peixes. No presente estudo foram determinadas e quantificadas as lesões causadas por diferentes concentrações de ácido acético em brânquias e fígado de juvenis de *Mugil liza*.

2. Material e métodos

Todos os procedimentos experimentais que envolveram animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande (CEUA nº PQ029/2016).

Os procedimentos de coleta de peixes, aclimação, manutenção e delineamento experimental deste estudo seguiram os descritos por Meira-Filho et al. (2017).

2.1. Coleta dos peixes, aclimação e manutenção

As tainhas utilizadas neste estudo foram capturadas nos arroios do Gelo (32° 11' 55.58" S; 52° 10' 13.90" O) e da Querência (32° 10' 55,17" S; 52° 8' 49.49" O), situados no balneário do Cassino, Rio Grande (sul do Brasil), utilizando tarrafa (4 m de diâmetro, malha 0,8 cm). Embora não existam estudos sobre estes arroios, há fortes evidências de que ambos apresentam

poluentes próprios de atividades antrópicas, com presença de lixo urbano e desague de esgoto. Os peixes foram aclimatados por dez dias às condições de cativeiro, em sistema de recirculação. Durante o período de aclimação os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 e 17:00), com ração comercial de 38% de proteína bruta, e mantidos em jejum nas 24 h que antecederam os experimentos. Foi estabelecido fotoperíodo (12L:12D) e diariamente, 50% do volume da água foi renovado, e foram avaliados os parâmetros de qualidade de água, de temperatura e oxigênio, com auxílio de oxímetro (YSI Pro-20), pH com auxílio de pHmetro de bancada, e alcalinidade, por titulometria. Os parâmetros da qualidade da água do sistema dos peixes durante o período pré-experimental foram de 11 ppt de salinidade, $20,9 \pm 0,71^{\circ}\text{C}$ para temperatura, $9,49 \pm 0,91$ ppm de O_2 dissolvido, pH de $7,41 \pm 0,14$ e $117,86 \pm 23,78$ mg CaCO_3 L^{-1} de alcalinidade. Os parâmetros de qualidade de água no qual os peixes foram aclimatados são descritos como aceitáveis para juvenis de *M. liza* (Fonseca Neto e Spach, 1999; Lisboa et al., 2015a; Okamoto et al. 2006).

2.2. Delineamento experimental

Neste estudo foram utilizados 120 juvenis de *M. liza* (peso $13,04 \pm 9,16$ g e comprimento padrão de $9,84 \pm 2,43$ cm). As concentrações de ácido acético testadas foram de 0 (T0), 350,65 (T1), 701,31 (T2) e 1051,96 mg L^{-1} (T3) obtidas a partir dos valores de 0%, 25% 50% e 75% da concentração letal mediana de 1 hora ($\text{CL}_{50-1\text{h}}$) para a tainha *M. liza* (Meira Filho et al., 2017). Para isso, foram utilizadas doze caixas de 80L em sistema estático (três réplicas por tratamento), com volume útil de 45L com uma densidade inicial de 10 peixes por caixa. Em todos os tratamentos os peixes foram submetidos ao banho terapêutico de 1 hora. Após esse período, os peixes foram transferidos e mantidos em caixas de recuperação por 24 horas. Após a recuperação, entre os sobreviventes, três peixes por caixa foram removidos para análise histológica. Os valores de pH para cada concentração de ácido acético utilizada foram determinados *a posteriori* por simulação das condições experimentais.

Os peixes foram anestesiados com eugenol (150 ppm) e eutanasiados por secção medular, para então serem realizadas as biometrias. O fígado e as brânquias foram removidos e fixados em formol tamponado 10%, submetidos a processamento histológico clássico (Wolf et al., 2015) e posteriormente incluídos em Paraplast® (Sigma-Brazil). Secções histológicas de 5 μm foram realizadas com micrótomo - LEICA RM 2245 e coradas com hematoxilina e eosina (Humason, 1979).

2.3. Análise quantitativa de alterações histológicas de fígado

Foram obtidas imagens digitais das secções histológicas do fígado utilizando câmera AxioCam ERc-5s, acoplada ao microscópio ZEISS Primo Star, em aumento de 100 x para a área total da secção e de 400 x para a área da lesão. As áreas foram calculadas com auxílio do software ImageJ 1.50i (National Institute of Health, USA).

Para quantificar as alterações histológicas encontradas no fígado, foram determinadas as porcentagens de área de cada lesão pelo cálculo: $L\% = 100 (LLSA LSA^{-1})$, onde L% é a porcentagem de área da secção ocupada por uma determinada lesão, LLSA é a área total de uma determinada lesão na secção do fígado analisado e LSA é a área total da secção do fígado analisada.

2.4. Análise histopatológica quantitativa de brânquias

Para garantir uma amostragem uniforme da distribuição das alterações patológicas nas brânquias, um arco branquial de cada hospedeiro foi examinado. Cada arco foi dividido em três campos: o Campo I foi denominado para os primeiros cinco filamentos, os cinco medianos de Campo II e os cinco últimos de Campo III (Figura 1a). Após esse procedimento foram observadas as frequências de ocorrência das histopatologias em cada um dos filamentos (presença/ausência). Para cortes histológicos que não apresentaram pelo menos 15 filamentos branquiais (cinco para cada campo), foi estabelecido que se o número de filamentos for par, o campo II ficaria com um filamento a menos. Caso o número de filamentos fosse ímpar e não múltiplo de três, o campo II ficaria com um filamento a mais, e caso fosse múltiplo de três, os três campos ficam com o mesmo número de filamentos branquiais. Com esses dados, foram determinadas as frequências de lesões lamelares (F%) de cada alteração histológica para cada peixe: $F\% = 100 (LFL AFL^{-1})$, onde: LFL = número de filamentos com uma ou mais lamelas secundárias lesionadas; AF = número de filamentos analisados.

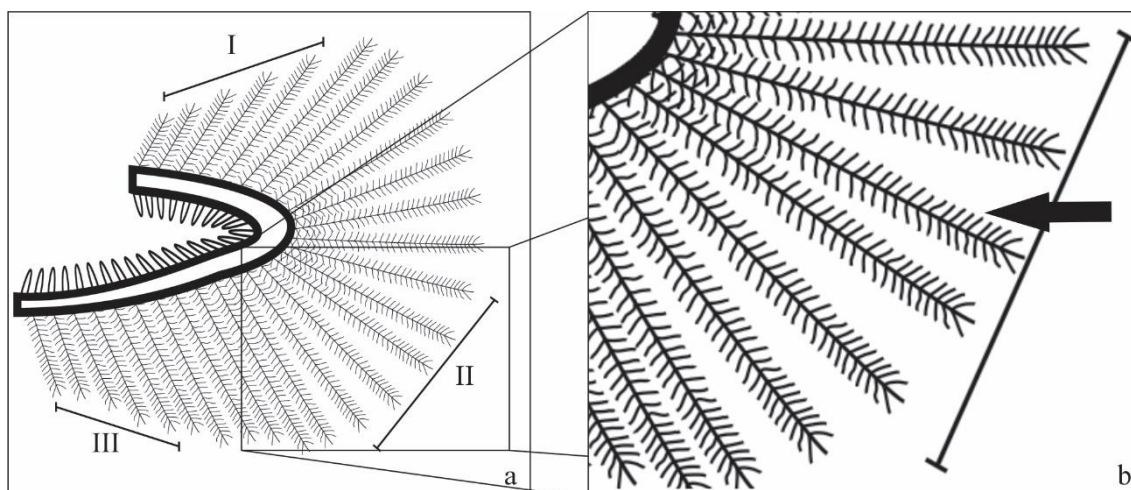


Figura 1. Método de avaliação quantitativa de histopatologia de brânquias. **a.** Delimitação dos cinco filamentos branquiais dos campos I, II e III. **b.** Determinação do filamento branquial mediano (seta) de cada campo.

Em uma segunda análise, para uma quantificação refinada, uma nova amostragem foi realizada. Nesta avaliação, a lamela primária central em cada um dos campos (I, II e III) foi inteiramente avaliada para cada lesão (Figura 1b). Foram contadas sequencialmente o número de lamelas com e sem lesão. Com esses dados, foram calculados a porcentagem de lamelas secundárias lesionadas (SLL%) para cada tipo de lesão em cada filamento branquial pelo cálculo: $SLL\% = 100 (NSLL \text{ NASL}^{-1})$, onde: NSLL = número de lamelas secundárias lesionadas; NASL = número total de lamelas secundárias analisadas.

Por fim, com os dados de F% e SLL%, foi determinada a ocorrência de lesão (OL%) de cada tipo de lesão para cada tratamento: $OL\% = 100 (LF \text{ AF}^{-1})$, onde: LF = número de peixes com ocorrência de uma determinada lesão nas brânquias; AF = número de peixes que tiveram as brânquias analisadas.

Quando a hiperplasia da lamela branquial primária ocorreu, o número de células da camada maior foi contado para determinação do nível de severidade, conforme Führ et al. (2012). Assim, foram consideradas hiperplasia leve a ocorrência de 2 a 4 camadas de células; hiperplasia moderada de 5 a 10 camadas celulares; e hiperplasia severa, aquelas com 11 ou mais camadas celulares. Com esses dados, a porcentagem média da severidade de hiperplasia do filamento branquial primário (H%) pode ser determinada para cada tratamento pelo cálculo: $H\% = 100 (NHS \text{ NHA}^{-1})$, onde: NHS = é o número de hiperplasias registradas com o determinado grau de severidade (leve, moderado ou severo) e NHO = é o número de hiperplasias analisadas.

2.5. Análises dos dados

Os dados de F%, SLL%, OL% e H% foram transformados em arcoseno (x100) e comparados estatisticamente.

Todos os dados foram testados para os pressupostos de teste paramétrico, com o teste de Shapiro-Wilk para normalidade e o teste de Levene para homocedasticidade. Quando atendidos aos pressupostos, uma anova de uma via foi realizada e caso apresentasse diferença significativa, utilizava-se o teste post-hoc de Tukey. Quando os dados não atendiam aos pressupostos, era realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e quando apresentava diferença significativa, utilizava-se o teste de Mann-Whitney. Em todos os testes $p < 0,05$ foi considerado significativo.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado para calcular as correlações da concentração do ácido acético e do pH avaliado *a posteriori* com os valores de frequência de lesão de cada tipo de histopatologia, com a frequência de lamelas primárias com lesões nas lamelas secundárias, com o número médio de lamelas secundárias lesionadas e com a severidade de hiperplasia. Correlações lineares até 0,3 foram consideradas fracas, acima de 0,3 e menores que 0,5 como intermediárias, e igual ou superior a 0,5 como fortes, conforme Russo (2003).

3. Resultados

Após o experimento, a mortalidade foi de 0,00%, 16,67%, 80,00% e 83,33%, para T0, T1, T2 e T3, respectivamente. Após o período de recuperação, foram analisados para histologia nove peixes de T0 e T1 e quatro peixes de T2 e T3.

Os dados de pH determinados para cada concentração de ácido acético foram de 7,41, 4,42, 4,02 e 3,81 para T0, T1, T2 e T3, respectivamente, conforme Meira-Filho et al. (2017).

As alterações histológicas encontradas no fígado dos peixes estudados foram infiltrados inflamatórios (Figura 2a) e necrose focal (Figura 2b).

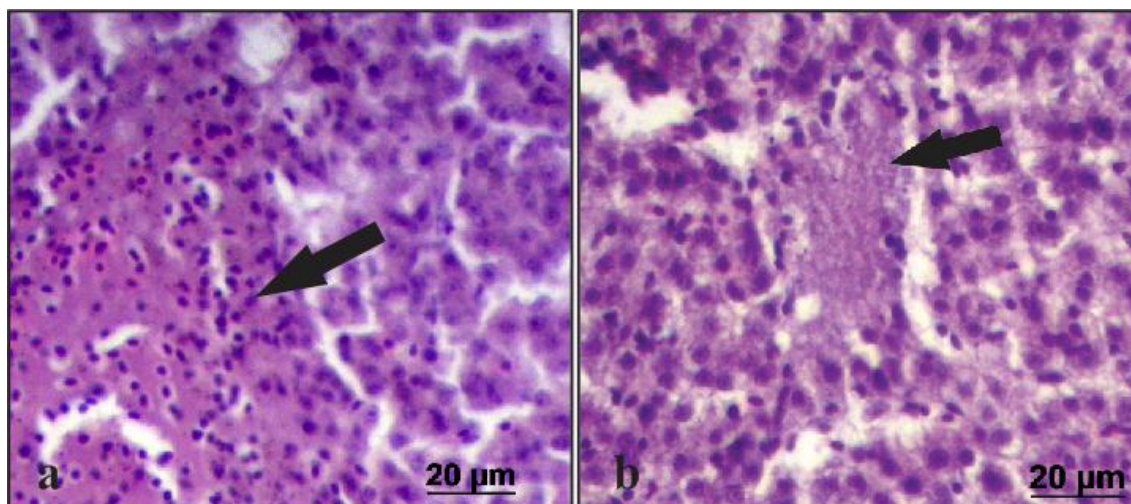


Figura 2. Lesões de fígado de juvenis de *Mugil liza* submetidos a banho de 1 h de ácido acético nas concentrações de 0 ppm, 350,65 ppm, 701,31 ppm e 1051,96 ppm. a. Infiltrados inflamatórios (seta). b. Necrose focal (seta).

Foram observadas fortes correlações entre a concentração do ácido acético e a área do fígado com necrose e com a presença de infiltrados inflamatórios (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem média de área lesionada da secção da lâmina do fígado de juvenis de *Mugil liza* submetidos a banho de 1h de ácido acético nas concentrações de 0 mg L⁻¹ (T0), 350,65 mg L⁻¹ (T1), 701,31 mg L⁻¹ (T2) e 1051,96 mg L⁻¹ (T3) e correlação entre a porcentagem de lesões e a concentração de ácido acético e o pH.

Histopatologias	Tratamentos				Correlação (r)	
	T0	T1	T2	T3	Ácido acético	pH
Necrose focal	0,2 ± 0,2 ^a (0,0 – 0,7)	0,2 ± 0,2 ^a (0,0 ± 0,4)	0,6 ± 0,4 ^{ab} (0,0 ± 1,0)	1,8 ± 1,9 ^b (0,2 – 4,7)	0,57**	-0,33*
Infiltrados inflamatórios	0,0 ± 0,0 ^a (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0 ^a (0,0 – 0,0)	0,0 ± 0,0 ^a (0,0 – 0,0)	0,1 ± 0,1 ^b (0,0 – 0,2)	0,61**	-0,32*

Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas.*=correlação linear intermediária, **= correlação linear forte.

As brânquias das tainhas testadas no estudo apresentaram lesões lamelares caracterizadas por desprendimento do epitélio lamelar (Figura 3a), fusão das lamelas secundárias (Figura 3b), hiperplasia de lamelas primárias (Figura 3c) e perda do epitélio da lamelar (Figura 3d).

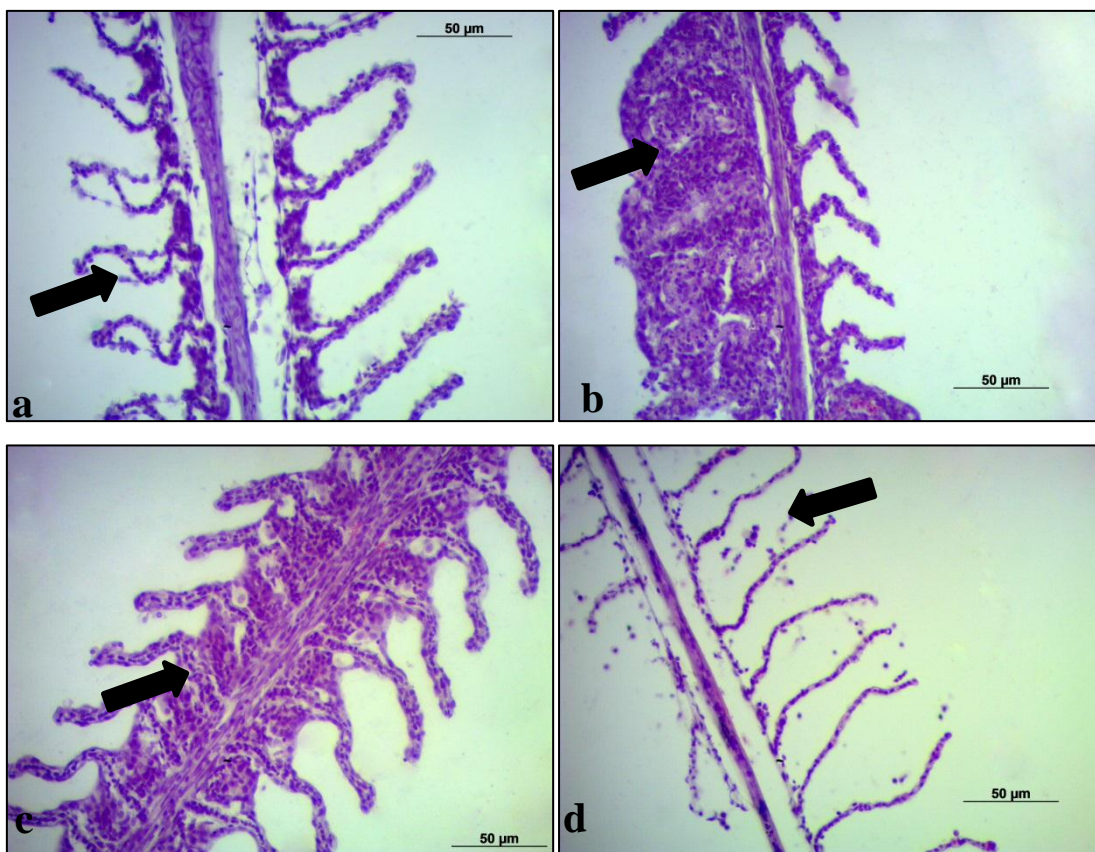


Figura 3. Lesões de brânquias de *Mugil liza* juvenis submetidos a banho de 1 h de ácido acético nas concentrações de 0 mg L⁻¹, 350,65 mg L⁻¹, 701,31 mg L⁻¹ e 1051,96 mg L⁻¹. a. Desprendimento do epitélio das lamelas secundárias (seta). b. Fusão das lamelas secundárias (seta). c. Hiperplasia (seta). d. Perda do epitélio da lamela secundária (seta).

Hiperplasia e o desprendimento do epitélio lamelar foram encontrados nas brânquias de todos os peixes analisados e a perda do epitélio da lamela secundária foi menor que 100% somente no T0 (Tabela 2). A ocorrência de lesão de perda de epitélio lamelar apresentou forte correlação positiva com a concentração de ácido acético e forte correlação negativa com o pH (Tabela 2).

Tabela 2. Ocorrência de lesão (OL%) de alterações histológicas de brânquias em juvenis de *Mugil liza* submetidos à banho de 1h de ácido acético nas concentrações de 0 mg L⁻¹ (T0), 350,65 mg L⁻¹ (T1), 701,31 mg L⁻¹ (T2) e 1051,96 mg L⁻¹ (T3). LF=número de peixes com presença de lesão; AF=número de peixes analisados.

Histopatologia	Tratamentos P% (LF/AF)				Correlação (r)	
	T0	T1	T2	T3	Ácido acético	pH
Hiperplasia da lamela primária	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	100,0 (4/4)	100,0 (4/4)	0	0
Fusão de lamelas secundárias	87,5 (7/8)	62,5 (6/8)	100,0 (1/4)	75,0 (3/4)	0	0,18
Desprendimento do epitélio de lamela secundária	100,0 (7/8)	100,0 (7/8)	100,0 (4/4)	100,0 (4/4)	0	0
Perda do epitélio da lamela secundária	87,5 (7/8)	100,0 (7/8)	100,0 (4/4)	100,0 (4/4)	0,77**	-0,98**

*=correlação linear intermediária, **=forte correlação linear.

Não houve diferença na frequência de hiperplasia da lamela primária, fusão da lamela secundária e desprendimento do epitélio da lamela secundária entre os tratamentos (Tabela 3). No entanto, os peixes de T1, T2 e T3 apresentaram maior frequência de perda de epitélio da lamela secundária quando comparados ao T0. A perda do epitélio lamelar apresentou forte correlação linear positiva com a concentração de ácido acético e forte correlação linear negativa com o pH (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência média de lamelas branquiais com alterações histológicas em juvenis de *Mugil liza* submetidos a banho de 1h de ácido acético nas concentrações de 0 mg L⁻¹ (T0), 350,65 mg L⁻¹ (T1), 701,31 mg L⁻¹ (T2) e 1051,96 mg L⁻¹ (T3).

Histopatologia	Tratamentos				Correlação (r)	
	T0	T1	T2	T3	Ácido acético	pH
Hiperplasia da lamela primária	96,7 ± 7,1 ^a (80,0 – 100,0)	100,0 ± 0,0 ^a (100,0 – 100,0)	100,0 ± 0,0 ^a (100,0 – 100,0)	100,0 ± 0,0 ^a (100,0 – 100,0)	0,32*	-0,41*
Fusão de lamelas secundárias	40,8 ± 34,1 ^a (0,0 – 80,0)	17,5 ± 20,8 ^a (0,0 – 53,3)	50,0 ± 20,7 ^a (33,3 – 80,0)	26,7 ± 30,3 ^a (0,0 – 66,7)	-0,07	0,20
Desprendimento do epitélio de lamela secundária	65,8 ± 27,5 ^a (26,7 – 100,0)	63,3 ± 15,1 ^a (33,3 – 86,7)	73,3 ± 14,4 ^a (53,3 – 86,7)	78,3 ± 28,5 ^a (40,0 – 100,0)	0,25	-0,07
Perda do epitélio de lamela secundária	20,8 ± 23,5 ^a (0,0 – 60,0)	80,0 ± 11,8 ^b (60,0 – 93,3)	78,3 ± 22,0 ^b (53,3 – 100,0)	76,7 ± 27,5 ^b (46,7 – 100,0)	0,64**	-0,76**

*=correlação linear intermediária, **=forte correlação linear. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais não são significativamente diferentes entre as concentrações.

A porcentagem de lamelas secundárias sem apresentar qualquer tipo de lesão foi maior em T0 quando comparado à T1, T2 e T3 (Tabela 4). Não houve diferença na porcentagem de lamelas secundárias com fusão lamelar e com desprendimento do epitélio lamelar, porém, a porcentagem de lamelas secundárias com perda do epitélio lamelar estava fortemente correlacionada, de maneira positiva, com a concentração do ácido acético e negativa com o pH (Tabela 4). De maneira oposta, a porcentagem de lamelas secundárias sem apresentar lesão obteve correlação negativa forte com as concentrações de ácido acético utilizadas, e positiva forte com os valores de pH (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de lamelas secundárias lesionadas (SLL%) de brânquias de *Mugil liza* juvenis submetidos a banho de 1h de ácido acético nas concentrações de 0 ppm (T0), 350,65 ppm (T1), 701,31 ppm (T2) e 1051,96 ppm (T3).

Patologia	Tratamentos				Correlação (r)	
	T0	T1	T2	T3	Ácido acético	pH
Sem lesão	71,8 ± 17,2 ^a (44,0 – 94,8)	25,1 ± 11,0 ^b (12,2 – 41,6)	39,1 ± 11,6 ^b (28,3 – 54,2)	31,6 ± 5,6 ^b (24,5 – 37,3)	-0,67**	0,83**
Fusão da lamela secundária	2,4 ± 3,4 ^a (0,0 – 9,9)	4,0 ± 7,6 ^a (0,0 – 22,2)	9,9 ± 10,5 ^a (1,7 – 23,8)	4,4 ± 6,2 ^a (0,0 – 13,2)	0,22	-0,24
Desprendimento do epitélio da lamela secundária	23,1 ± 14,8 ^a (5,0 – 48,0)	14,5 ± 5,6 ^a (7,1 – 22,9)	16,1 ± 9,4 ^a (7,0 – 27,4)	22,5 ± 14,7 ^a (5,11 – 41,0)	-0,06	0,23
Perda do epitélio da lamela secundária	2,6 ± 4,1 ^a (0,0 – 12,3)	56,5 ± 12,6 ^b (35,7 – 75,3)	46,4 ± 23,1 ^b (22,4 – 75,1)	51,9 ± 28,3 ^b (33,7 – 93,5)	0,59**	-0,78**

*=correlação linear intermediária, **=forte correlação linear. Valores seguidos de letras sobscritas iguais não são significativamente diferentes entre as concentrações.

Apesar de haver uma correlação linear intermediária positiva entre o grau de severidade leve de hiperplasia e a concentração do ácido acético, não houve diferença significativa entre os tratamentos nos diferentes níveis de severidade (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem média de severidade de hiperplasia do filamento branquial primário (H%) nos diferentes níveis de severidade, em brânquias de *Mugil liza* juvenis submetidos a banho de 1h de ácido acético nas concentrações de 0 ppm (T0), 350,65 ppm (T1), 701,31 ppm (T2) e 1051,96 ppm (T3).

Severidade da hiperplasia	Tratamentos				Correlação (r)	
	T0	T1	T2	T3	Ácido acético	pH
Leve	6,2 ± 8,6 ^a (0,0 – 16,7)	18,8 ± 20,8 ^a (0,0 – 50,0)	0,0 ± 0,0 ^a (0,0 – 0,0)	33,3 ± 30,4 ^a (0,0 – 66,7)	0,35*	-0,30
Moderada	77,1 ± 25,1 ^a (33,3 – 100,0)	70,9 ± 17,2 ^a (50,0 – 100,0)	83,3 ± 19,2 ^a (66,6 – 100,0)	62,5 ± 28,5 ^a (33,3 – 100,0)	-0,13	0,12
Severa	16,7 ± 19,9 ^a (0,0 – 50,0)	10,4 ± 15,3 ^a (0,0 – 33,3)	16,7 ± 19,2 ^a (0,0 – 33,3)	4,2 ± 8,3 ^a (0,0 – 16,7)	-0,26	0,20

*=correlação linear intermediária, **=forte correlação linear. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais não são significativamente diferentes entre as concentrações.

4. Discussão

O fígado apresenta papel fundamental na absorção, biotransformação e detoxificação de compostos alóctones ao organismo (Cengiz e Unlu, 2006; Neelima et al., 2015), e é um dos principais órgãos afetados por contaminantes presentes na água (Camargo e Martinez, 2007). O uso de químicos, como drogas antiparasitárias, podem provocar alterações degenerativas no fígado, com repostas defensivas inflamatórias (Velkova-Jordanoska et al., 2012).

Neste estudo foram encontradas necroses focais no fígado de peixes de todos os tratamentos. A ocorrência desse tipo de lesão, no grupo controle (0 mg L⁻¹), pode estar relacionada ao aparente ambiente poluído no qual os peixes foram coletados (Camargo e Martinez, 2007; Castro et al., 2014; Mohamed, 2009). Por outro lado, o aumento médio da porcentagem de área lesionada, conforme foi aumentada a concentração do ácido acético, sugere a existência do efeito direto do ácido acético nos hepatócitos.

Poucos estudos foram realizados para avaliação do efeito de drogas antiparasitárias no fígado de peixes. Velmurugan et al. (2009) determinaram os efeitos do antiparasitário dichlorvos no fígado de *Cirrhinus mrigala* e também observaram a ocorrência de necrose focal nas concentrações testadas.

A necrose das células hepáticas pode ser caracterizada como uma resposta não específica ao estresse (Belicheva e Sharova, 2011) e os danos causados por esse tipo de lesão no fígado podem ser irreversíveis (Camargo e Martinez, 2007). Considerando as diversas funções vitais do fígado, lesões como a necrose estão relacionadas a efeitos secundários prejudiciais ao organismo (Rodrigues e Fanta, 1998). Desta forma, a ocorrência de necrose focal no fígado pode ser atribuída ao efeito direto do tóxico nos hepatócitos ou ao aumento da atividade exercida pelo fígado para detoxificação (Neelima et al., 2015). As drogas ou seus metabólitos podem afetar funções essenciais do fígado, o que sensibilizaria as células inflamatórias ou provocaria uma resposta do sistema imune (Kaplowitz, 2013). Os infiltrados inflamatórios são decorrentes de alterações degenerativas (Hibiya, 1982) e são comumente relacionados a peixes de ambientes poluídos (Castro et al., 2014, Mohamed, 2009) ou podem ser atribuídos ao efeito direto de substâncias tóxicas nos hepatócitos (Neelima et al., 2015). Neste estudo foram observados infiltrados inflamatórios apenas em fígado de peixes expostos à maior concentração de ácido acético ($1051,96 \text{ mg L}^{-1}$), que é a concentração onde as maiores áreas de necrose também foram observadas, sugerindo que a ocorrência desses infiltrados pode estar relacionada tanto com a presença da necrose, quanto com o efeito direto da droga.

Em peixes, as brânquias são fundamentais para a respiração, osmorregulação e excreção (Cengiz, 2006). O déficit iônico no sangue é a principal causa de mortalidade de peixes de água doce quando submetidos à acidificação aguda (Wendelaar Bonga e Dederen, 1986), pois ocorre a perda de íons pelas brânquias, pelo aumento do efluxo passivo de Na^+ e Cl^- e inibição do influxo ativo destes mesmos íons (Brown et al., 1990; Freda et al., 1991). No entanto quando as concentrações de íons no sangue do peixe são semelhantes às do meio, a acidificação não afeta os valores osmóticos do sangue (Wendelaar Bonga e Dederen, 1986). Neste estudo a salinidade utilizada foi de 11 ppt, enquanto que o ponto isosmótico determinado para *Mugil liza* é próximo de 12 ppt (Lisboa et al. 2015b), o que sugere que as perdas iônicas não devem ter sido o principal motivo da mortalidade e das alterações histológicas encontradas nas brânquias dos peixes.

Não foram encontrados estudos disponíveis sobre a ação do ácido acético em peixes, embora seja considerada como droga antiparasitária pelo FDA (2011). Outros ácidos têm sido usados em estudos com peixes (Daye e Garside, 1975; 1976; Evans, 1988; Freda et al., 1991; Jagor e Haines, 1983; Rodrigues et al., 2013). Utilizando o ácido sulfúrico, Jagoe e Haines (1983) estudaram o efeito do estresse ácido agudo no epitélio branquial de trutas *Salvelinus alpinus* e constatam 100% de mortalidade nos espécimes submetidos a pH 3 dentro de 4 h. Em

pH 3.5, os peixes sobreviveram de 16,5 a 19 h. Em pH 4, três de sete peixes sobreviveram por 96 h. Estes autores não observaram mortalidade nos peixes em pH de 4,5, 5,0 e controle (6,8-6,9) em 96 h. A sobrevivência das trutas ao pH baixo foi muito superior ao observado para as tainhas do presente estudo, tanto em valores de pH quanto ao tempo de exposição, o que pode estar relacionado tanto com a espécie estudada quanto ao tipo de ácido utilizado.

Neste estudo, hiperplasia da lamela primária, fusão lamelar, desprendimento de epitélio lamelar e perda de epitélio lamelar foram observados nas brânquias das tainhas em todos os tratamentos. Outros estudos apresentaram resultados semelhantes com o pH ácido. Evans et al. (1988) observaram hiperplasia da lamela primária nas brânquias de *Salmo gairdneri* expostos por duas semanas em tratamentos com ácido sulfúrico com pH de 4,7 e 5,2, e concluíram que de uma maneira geral, a exposição a ácidos induz à hiperplasia nas brânquias de peixes.

Rodrigues et al. (2013) utilizaram ácido clorídrico e observaram aumento de danos histológicos em brânquias de juvenis de *Rachycentron canadum* com a diminuição do pH. Os valores de pH utilizados foram de 7,9 (controle), 6,5, 6,0, 5,5 e foram encontradas hiperplasia das lamelas primárias e fusão das lamelas secundárias nas brânquias de todos os tratamentos, exceto no controle. Neste estudo, hiperplasia e fusão das lamelas secundárias também foram encontradas, porém sem apresentar diferença entre os tratamentos com ácido acético e o controle, sugerindo que as concentrações utilizadas não tenham sido as responsáveis pela ocorrência dessas lesões. Por outro lado, sugere que o ambiente poluído no qual as tainhas estudadas foram coletadas pode ter tido papel fundamental para ocorrência das lesões observadas no grupo controle. Hiperplasia, fusão lamelar e desprendimento do epitélio lamelar já foram registrados em peixes capturados em ambientes poluídos (Nascimento et al., 2012; Santos et al., 2014). Além dessas lesões, Rodrigues et al. (2013) também observaram telangiectasia em peixes expostos a pH 6,0 e 5,5. Essa lesão não foi encontrada nos peixes neste estudo.

Daye e Garside (1976) utilizando ácido sulfúrico encontraram desprendimento de epitélio lamelar em alevinos de *Salvelinus fontinalis* submetidos a valores de pH de 5,2 a 2,2 por 10000 min. Também utilizando ácido sulfúrico, Freda et al. (1991) expuseram alevinos de *Oncorhynchus mykiss* a pH 4.0 por 1 h, e constataram desprendimento de epitélio lamelar em 80% dos peixes analisados. No presente estudo 100% dos peixes de T2 e T3 apresentaram essa alteração histológica, fortemente correlacionada com a concentração do ácido acético.

As alterações histológicas de hiperplasia, fusão lamelar e desprendimento do epitélio lamelar podem ser interpretadas como uma estratégia adaptativa de defesa não específica, uma

vez tanto a hiperplasia quanto a fusão lamelar diminuem a superfície de contato vulnerável ao poluente e o desprendimento do epitélio lamelar aumentando a distância de difusão que o agente estressor precisará atravessar para chegar até a corrente sanguínea (Alazemi et al., 1996; Cengiz, 2006; Flores-Lopes e Thomaz, 2011; Mallat, 1985; Monteiro et al., 2008; Nascimento et al., 2012). No entanto, estas respostas branquiais afetam as trocas gasosas, podendo causar asfixia (Alazemi et al., 1996; Rodrigues et al., 2011).

Sugere-se que as fortes correlações positivas entre a concentração do ácido acético, tanto com a frequência de ocorrência de perda de epitélio como com a porcentagem de lamelas secundárias com perda de epitélio, podem ser respostas diretas à elevada concentração do ácido acético. É possível que as diferenças na ocorrência das diferentes lesões deste estudo com os outros estudos com pH baixo citados acima, possam estar relacionadas tanto com a capacidade de resposta da espécie estudada, quanto ao tipo de ácido utilizado, uma vez que nenhum desses estudos utilizou ácido acético para redução de pH.

Outros estudos sobre os efeitos histopatológicos de drogas antiparasitárias em brânquias de peixes também foram realizados. Guimarães et al. (2007) expuseram alevinos de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* a 0,25 mg L⁻¹ de trichlorfon por 96 h, e observaram que a partir de 4 h de exposição, os peixes apresentaram edema nas lamelas secundárias, fusão lamelar, hipertrofia e proliferação celular. Velmurugan et al. (2009) determinaram os efeitos histopatológicos do antiparasitário dichlorvos nas brânquias de *Cirrhinus mrigala* e observaram hiperplasia, fusão lamelar, necrose epitelial, desprendimento lamelar, colapso da lamela secundária e dobramento da lamela secundária em todos os tratamentos com a presença dessa droga. Führ et al. (2012) avaliaram os efeitos de mebendazol em brânquias de juvenis de *Mugil liza* e constataram que em concentrações superiores a 10 mg L⁻¹ por 48 h, as tainhas apresentaram hiperplasia e fusão lamelar e nas concentrações mais elevadas foram constatadas também telangiectasia, ruptura das células pilares e metaplasia escamosa. Embora algumas das lesões relatadas no uso de outras drogas sejam similares às encontradas no presente estudo, outras parecem ser mais específicas, o que pode estar relacionada ao modo de atuação da droga no organismo do peixe, e da capacidade de resposta da espécie avaliada.

Pahor-Filho et al. (2012) determinaram que a concentração ideal de formaldeído para remoção de ectoparasitos de *M. liza* é de 135 mg L⁻¹. No entanto, Pahor-Filho et al. (2014) observaram que a partir da concentração de 67,5 mg L⁻¹ as tainhas já apresentam hiperplasia e desprendimento do epitélio lamelar, e que com o aumento das concentrações ocorre também aumento na severidade dessas lesões e a ocorrência de necrose. Apesar de neste estudo não ter

sido observada diferença significativa entre a porcentagem de ocorrência de hiperplasia nos diferentes níveis de severidade, e a frequência de ocorrência de hiperplasia, fusão lamelar e desprendimento do epitélio lamelar entre todos os tratamentos, os tratamentos com presença de ácido acético apresentaram maior frequência de ocorrência de perda do epitélio lamelar quando comparados ao controle. Esse mesmo padrão foi observado quando avaliadas a porcentagem de lamelas secundárias lesionadas.

Embora no presente estudo as mesmas lesões observadas por Pahor-Filho et al. (2014) não tenham sido aparentemente afetadas pelas concentrações de ácido acético utilizadas, o aumento observado da porcentagem de lamelas secundárias com perda de epitélio sugere que mesmo na concentração de 350,65 mg L⁻¹, considerada eficaz contra metazoários ectoparasitos de *M. liza* por Meira-Filho et al. (2017), o ácido acético pode ser prejudicial aos peixes. Além disso, é possível que o ácido acético nos tecidos dos hospedeiros pode ter tido o seu efeito tóxico ampliado pelas lesões previamente encontradas nos peixes coletados no meio ambiente, observados em T0.

5. Conclusões

O ácido acético em todas concentrações testadas não causou aumento significativo no número de camadas de hiperplasia, no número de lamelas fundidas e com desprendimento de epitélio. No entanto, como em todas as concentrações testadas apresentaram aumento significativo da perda do epitélio das lamelas secundárias, o uso do ácido acético deve ser realizado com cautela. É possível que peixes de outros tamanhos ou de espécies diferentes apresentem respostas distintas às obtidas no presente estudo. É possível também que outros tipos de ácidos possam apresentar efeitos distintos ao encontrado no presente estudo. Sugere-se então que novos estudos sejam conduzidos, em peixes de diferentes tamanhos e espécies, utilizando o ácido acético e outros ácidos, para determinar os diferentes efeitos tanto nos parasitos quanto no hospedeiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pela bolsa de doutorado de M. R. C. Meira-Filho (P. Parasitologia Básica Proc. 1272/2011) e V. T. Rosas. Os autores agradem à cuidadosa revisão desse manuscrito pelos doutores Maurício Laterça Martins, Ricardo Vieira Rodrigues, Ricardo Barteux Robaldo e Ana Luísa Valente.

Referências

- Alazemi, B. M., Lewis, J. W., Andrews, E. B., 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environ Technol.* 17, 225-238.
- Balta, F., Kayis, S., Altinok, I., 2008. External protozoan parasites in three trout species in the Eastern Black Sea region of the Turkey: intensity, seasonality, and their treatments. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 28 (4), 157–162.
- Belicheva, L. A., Sharova, J. N., 2011. Assessment of fish health status under long-term water pollution: Vygozero Reservoir, North-West Russia. *Environ. Technol. Res.* 11, 368–373.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.* 22, 25–34.
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabu, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M., 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet Parasitol.* 132, 249–272.
- Boran, H., Capkin, E., Altinok, I., Terzi, E., 2012. Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 175–179.
- Brown, S. B., Evans, R. E., Majewski, H. S., Sangalang, G. B., Klaverkamp, J. F., 1990. Responses of plasma electrolytes, thyroid hormones, and gill histology in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) to acid and limed river waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2431–2440.
- Cabello, F. C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8 (7), 1137–1144.
- Camargo, M. M. P., Martinez, C. B. R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in a urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5, 327–336.
- Castro, J. S., Silva, J. S., Freitas, L. C., Carvalho-Neta, R. N. F., 2014. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66, 1687–1694.
- Cengiz, E. I., 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environ. Toxicol. Phar.* 22, 200–204.
- Cengiz, E. I., Unlu, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environ. Toxicol. Phar.* 21, 246–256.
- Chagas, E. C., Araújo, L. D., Martins, M. L., Gomes, L. C., Malta, J. C. O., Varella, A. B., Jerônimo, G. T., 2016. Mebendazole dietary supplementation controls Monogenoidea

- (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* 464, 185–189.
- Davis, H. S., 1946. Care and Diseases of Trout. US Department of Interior Research Report, No. 12. US Government Printing Office, Washington, DC, USA. (98 pp.).
- Daye, P. G., Garside, E. T., 1975. Lethal levels of pH for brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Can. J. Zool.* 53, 639–641.
- Daye, P. G., Garside, E. T., 1976. Histopathologic changes in surficial tissues of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), exposed to acute and chronic levels of pH. *Can. J. Zool.* 54, 2140–2155.
- Erondu, E. S., Anyanwu, P. E., 2005. Potential hazards and risks associated with the aquaculture industry. *Afr. J. Biotechnol.* 4 (13), 1622–1627.
- Evans, R. E., Brown, S. B., Hara, T. J., 1988. The effects of aluminium and acid on the gill morphology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environ. Biol. Fish* 22 (4), 299–311.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. (200 pp.)
- FDA, 2011. Aquaculture drugs. In: FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, fourth edition. pp. 183–208.
- Freda, J., Sanchez, D. A., Bergman, H. L., 1991. Shortening of branchial tight junctions in acid-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 2028–2033.
- Flores-Lopes, F., Thomaz, A. T., 2011. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Braz. J. Biol.* 71 (1), 179–188.
- Fonseca Neto, J.C., Spach, H.L., 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca* 25, 13–17.
- Führ, F., Pereira Jr, J., Romano, L. A., Almeida, F., 2012. Gill injury after treatment with mebendazole on mullets *Mugil liza*. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 32 (5), 151–158.
- Guimarães, A. T. B., Silva de Assis, H. C., Boeger, W., 2007. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 68, 57–62.
- Harms, C.A., 1996. Treatments for Parasitic Diseases of Aquarium and Ornamental Fish. *Semin. Avian. Exot. Pet.* 5 (2), 54–63.
- Hibiya, T., 1982. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Stuttgart/New York: Gustav Fisher Verlag 1982 (for Japan: Tokyo: Kodansha Ltd.) (147 pp.).
- Humason, G. L., 1979. Animal Tissue Techniques. 4th edition. W.H. Freeman and Company, San Francisco, C.A, USA. 661 pp.
- Jagoe, C. H., Haines, T. A., 1983. Alterations in gill epithelial morphology of yearling Sunapee trout exposed to acute acid stress. *T. Am. Fish. Soc.* 112, 689–695.

- Kaplowitz, N., 2013. Drug-Induced Liver Injury: Introduction and Overview. In: Kaplowitz, N., DeLeve, L. D. (Eds), *Drug-Induced Liver Disease* 3rd edition, Elsevier, Academic Press, pp. 3–14.
- Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015a. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). *Neotrop. Ichthyol.* 13 (2), 447–452.
- Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015b. Acclimation of juvenile *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Mugiliformes: Mugilidae) to different environmental salinities. *Neotrop. Ichthyol.* 13 (3), 591–598.
- Mallat, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 630–648.
- Meira-Filho, M. R. C., Rosas, V. T., Vianna, R. T., Pereira Jr., J., 2017. Toxicity and parasiticidal in vivo and in vitro evaluation of acetic acid on metazoan ectoparasites in juvenile *Mugil liza*. *Aquaculture* 476, 1–7.
- Menerrat, A., Nilsen, F., Ebert, D., Skorping, A., 2010. Intensive farming: Evolutionary implications for parasites and pathogens. *Evol. Biol.* 37, 59–67.
- Mohamed, F. A. S., 2009. Histopathological Studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *World J. Fish & Marine Sci.* 1, 29–39.
- Monteiro, S. M., Rocha, E., Fontáinhas-Fernandes, A., Sousa, M., 2008. Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure. *J. Fish Biol.* 73, 1376–1392.
- Nascimento, A. A., Araújo, F. G., Gomes, I. D., Mendes, R. M. M., Sales, A., 2012. Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in South-Eastern Brazil. *Anat Histol Embryol* 41, 209–216.
- Neelima, P., Kumar, C. L. A., Rao, J. C. S., Rao, N. G., 2015. Histopathological alterations in gill, liver and kidneys of *Cyprinus carpio* (Linn.) exposed to Cypermethrin (25%EC). *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2, 34–40.
- Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., Maçada, A.P., 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica* 28 (1), 61–66.
- Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K.C., Pereira Jr., J., 2012. Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and hosts. *Aquaculture* 354–355, 111–116.
- Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K.C., Klosterhoff, M., Romano, L.A., Pereira Jr., J., 2014. Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes). *Aquac. Res.* 1–6.
- Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M. M., Min, J., Nguyen, P. T., Telfer, T. C., van den Brink, P. J., 2012. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Rev Aquacult* 4, 75–93.
- Rodrigues, E. L., Fanta, E., 1998. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. *Revta Bras. Zool.* 15, 441–450.

- Rodrigues, R. V., Pedron, J. S., Romano, L. A., Tesser, M. B., Sampaio, L. A., 2013. Acute responses of juvenile cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766) to acid stress. *Aquac. Res.* 1–7.
- Rodrigues, R. V., Schwarz, M. H., Delbos, B. C., Carvalho, E. L., Romano, L. A., Sampaio, L. A., 2011. Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. *Aquaculture* 322–323, 223–226.
- Russo, R., 2003. *Statistical for the Behavioural Sciences. An Introduction.* East Sussex, UK: Psychology Press (242 pp.).
- Santos, D. M. S., Melo, M. R. S., Mendes, D. C. S., Rocha, I. K. B. S., Silva, J. P. L., Cantanhêde, S. M., Melleti, P. C., 2014. Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 12927–12937.
- Schmahl, G., Taraschewski, H., Mehlhorn, H., 1989. Chemotherapy of fish parasites. *Parasitol. Res.* 75, 503–511.
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Bron, J.E., Paladini, G., Brooker, E.E., Brooker, A.J., 2014. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology* 142, 196–270.
- Singhal, R.N., Jeet, S., Davies, R.W., 1986. Chemotherapy of six ectoparasitic diseases of cultured fish. *Aquaculture* 54, 165–171.
- Snieszko, S.F., 1978. Control of fish diseases. *Mar. Fish. Rev.* 40 (3), 65–69.
- Stoskopf, M.K., 1988. Fish Chemotherapeutics. *Vet. Clin. N. Am–Small.* 18 (2), 331–348.
- Velkova-Jordanoska, L., Stojanovski, S., Lokoska, L., Veljanoska-Sarafiloska, E., Kostoski, G., 2012. Histopathological analysis of liver in fish population of reservoir “Tikves”. *Acta zool. bulg.* 4, 223–227.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., Unlu, E., 2007. The effects of fenvalerate on different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. *J. Environ. Sci. Heal. B.* 42, 157–163.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., Unlu, E., 2009. Histopathological changes in the gill and liver tissues of freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* Exposed to Dichlorvos. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52 (5), 1291–1296.
- Wendelaar Bonga, S. E., Dederen, L. H. T., 1986. Effects of acidified water on fish. *Endeavour* 10 (4), 182–202.
- Wolf, J.C., Baumgartner, W.A., Blazer, V.S., Camus, A.C., Engelhardt, J.A., Fournie, J.W., Frasca Jr., S., Groman, D.B., Kent, M.L., Khoo, L.H., Law, J.M., Lombardini, E.D., Ruehl-Fehlert, C., Segner, H.E., Smith, S.A., Spitsbergen, J.M., Weber, K., Wolfe, M.J., 2015. Nonlesions misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: A guide for investigators authors reviewers and readers. *Toxicol. Pathol.* 43, 297–325.
- World Bank. 2013. *Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture.* Agriculture and environmental services discussion paper; no. 3. Washington, DC. © World Bank. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/17579> License: CC BY 3.0 IGO.

CONCLUSÕES GERAIS

O ácido acético na concentração de 350,65 mg L⁻¹ por 1 h se mostrou uma droga eficaz contra *Ligophorus* spp., *Solostamenides* cf. *platyorchis*, e *Ergasilus* cf. *lizae*, e segura.

Banho único de ácido acético por uma hora foi eficaz para remoção de *Trichodina* sp. em concentrações de 476 mg L⁻¹ ou 715 mg L⁻¹, e de *Apiosoma* sp., nas concentrações de 238 mg L⁻¹, 476 mg L⁻¹ e 715 mg L⁻¹.

A exposição das tainhas juvenis ao ácido acético nas concentrações de 350,65, 701,31 e 1051,96 mg L⁻¹ não apresentaram diferenças no número de camadas de células hiperplásicas resultantes, na porcentagem de fusão lamelar e porcentagem de lamelas com desprendimento do epitélio em relação aos animais não tratados. No entanto, houve forte aumento na porcentagem de lamelas secundárias com perda do epitélio lamelar em todas os tratamentos com ácido acético.

RECOMENDAÇÕES

Considerando que tanto o ácido acético quanto o pH estavam correlacionados com a mortalidade dos metazoários parasitos, é recomendado que novos estudos com outras substâncias ácidas sejam realizados, para determinar se a atividade antiparasitária é devido ao próprio ácido acético, ou se é pela redução do pH;

Recomenda-se que os efeitos histopatológicos do ácido acético nas brânquias e fígado de peixes sejam avaliados nas concentrações menores, para determinar a concentração máxima em que o ácido acético possa ser utilizado sem causar aumento significativo dos vários tipos de lesão;

Considerando que os valores de índice terapêutico e eficácia da droga são específicos para cada táxon analisado, é recomendado que sejam realizados estudos similares aos apresentados nessa tese, utilizando outras drogas, e/ou espécies diferentes de hospedeiros e parasitos, para que possam ser determinadas comparativamente as drogas mais eficazes e seguras para cada parasito e hospedeiro;

Recomenda-se que estudos similares sejam realizados tanto em peixes de água doce, quanto marinhos, para avaliar a possibilidade do uso amplo do ácido acético na aquicultura;

Recomenda-se o estudo de possíveis impactos causados pelo ácido acético nas bactérias nitrificantes que compõem o biofiltro de sistemas de recirculação para avaliação da sua aplicabilidade;

Neste estudo não foram avaliados o efeito e o tempo de permanência dessa droga no ambiente, e apesar do ácido acético ser considerado uma droga ambientalmente segura, estudos são recomendados para avaliação dos possíveis impactos e a resiliência dessa droga no ambiente;

Recomenda-se o estudo de substâncias neutralizadoras do ácido acético e de estudos da toxicidade dos produtos gerados dessa reação para determinar a aplicabilidade dessa droga em diferentes sistemas de cultivo;

Apesar de o vinagre ter em sua composição o ácido acético, sua composição pode ser variável, portanto é prematuro neste estudo, no qual o vinagre não foi testado, comentar sobre a conveniência do seu uso. Pela facilidade de acesso e baixo custo, é recomendado que seu uso seja estudado.