



**FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y
ACUICULTURA**

CAPACIDAD ANTIHELMINTICA DE LA NANOEMULSIÓN DEL ACEITE
ESENCIAL DE "ROMERO" *Rosmarinus officinalis* (SCHLEID, 1852) CONTRA
MONOGENEOS BRANQUIALES DE JUVENILES DE "PACO" *Piaractus*
brachypomus (CUVIER, 1818)

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

Autor:

Quispe Ibañez, Christian Joan

Asesor:

Alvarez Verde, Claudio Abdon

ORCID: 0000-0001-9166-1426

Jurado:

Zambrano Cabanillas, Abel Walter

Figueroa Vargas-Machuca, Manuel Eduardo

Mogollón Ávila, Santos Valentín

Lima - Perú

2024



CAPACIDAD ANTIHELMINTICA DE LA NANOEMULSIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE "ROMERO" *Rosmarinus officinalis* (SCHLEID, 1852) CONTRA MONOGENEOS BRANQUIALES DE JUVENILES DE "PACO" *Piaractus brachypomus* (CUVIER,

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1 repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet 1%

2 repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet 1%

3 repositorio.unapiquitos.edu.pe Fuente de Internet 1%

4 www.alice.cnptia.embrapa.br Fuente de Internet 1%

5 revistas.iiap.gob.pe Fuente de Internet 1%

6 repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet 1%

7 hdl.handle.net Fuente de Internet <1%

8 repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet <1%



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS
ALIMENTARIAS Y ACUICULTURA

CAPACIDAD ANTIHELMINTICA DE LA NANOEMULSIÓN DEL ACEITE ESENCIAL
DE “ROMERO” *Rosmarinus officinalis* (SCHLEID, 1852) CONTRA MONOGENEOS
BRANQUIALES DE JUVENILES DE “PACO” *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1818)

Línea de Investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

Autor:

Quispe Ibañez, Christian Joan

Asesor:

Alvarez Verde, Claudio Abdon

(ORCID: 0000-0001-9166-1426)

Jurado:

Zambrano Cabanillas, Abel Walter

Figuroa Vargas-Machuca, Manuel Eduardo

Mogollón Ávila, Santos Valentín

Lima – Perú

2024

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a los dos grandes pilares de mi vida, mis padres, Marisol Ibañez y Julio Quispe, por su apoyo y amor incondicional en cada etapa de mi vida. Su dedicación y sacrificio han sido mi inspiración constante para perseguir el conocimiento y alcanzar mis metas. Este logro no solo es mío, sino también de ustedes, quienes han sido mi guía y sostén a lo largo de este camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Magíster Anaí Gonzales y al IIAP por creer en mí, brindarme su valioso tiempo, compromiso, paciencia y enseñanzas para poder presentar de manera exitosa este presente trabajo.

A mi asesor el Doctor Claudio Alvarez ya que desde el momento de conocerlo me incentivo para seguir este camino de realizar una tesis para así poder obtener el título profesional y estar presente desde el inicio de este trabajo.

A mis amigos y a Shely L. que me acompañaron en esta etapa de mi vida.

Agradezco también al apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec) a través de su unidad ejecutora, PROCENCIA, (Proyecto 073-2021-Fondecyt).

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESÚMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción y formulación del problema	4
1.2 Antecedentes	5
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo General.....	10
1.3.2 Objetivos Específicos	10
1.4 Justificación.....	11
1.5 Hipótesis.....	12
II. Marco Teórico	13
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	13
<i>Piaractus brachypomus</i>	13
<i>Parásitos monogeenos en Piaractus brachypomus</i>	14
<i>Rosmarinus officinalis</i>	15
Aceites esenciales	17
<i>Polisorbato 20</i>	17
<i>Nanoemulsión usado en la acuicultura</i>	18
III. Método.....	19
3.1. Tipo de investigación	19

3.2. Ámbito temporal espacial.....	19
3.3. Variables.....	20
3.3.1 Independientes.....	20
3.3.2 Dependientes.....	20
3.4. Población y muestra	20
3.4.1 Población	20
3.4.2 Muestra	20
3.5. Instrumentos.....	21
3.5.1 Equipos	21
3.5.2 Material biológico.....	21
3.5.3 Materiales de oficina.....	21
3.5.4 Materiales de laboratorio	21
3.5.5 Otros	22
3.6. Procedimientos	22
3.6.1.Obtención y caracterización del aceite esencial de “Romero” <i>Rosmarinus officinalis</i>	22
3.6.2.Elaboración de la nanoemulsión de aceite esencial de “Romero” <i>Rosmarinus officinalis</i>	22
3.6.3. Caracterización de la nanoemulsión de aceite esencial de “Romero” <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
3.6.4 Obtención y aclimatación de los peces	23
3.6.5 Medición de parámetros físicos y químicos del agua	24

3.6.6 Ensayo in vitro	24
3.6.7 Test de tolerancia	25
3.6.8 Baños terapéuticos (ensayo in vivo)	25
3.6.9. Evaluación de la eficacia antiparasitaria	25
3.7. Análisis de datos.....	27
IV. Resultados.....	28
4.1. Caracterización química del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> y características de la nanoemulsión	28
4.2. Eficacia antiparasitaria <i>in vitro</i>	28
4.3. Test de tolerancia	29
4.4. Índices antiparasitarios y eficacia antihelmíntica después de 3 y 6 días de baños terapéuticos con la nanoemulsión del aceite esencial de <i>R. officinalis</i>	31
V. Discusión de resultados	33
VI. Conclusiones	35
VII. Recomendaciones.....	36
VIII. Referencias.....	37
IX. Anexos	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros físicos y químicos del agua durante los seis días de experimento.....	24
Tabla 2. Composición química del aceite esencial de “Romero” <i>Rosmarinus officinalis</i>	28
Tabla 3. Mortalidad y Comportamiento de los peces sometidos a diferentes concentraciones por un intervalo de tiempo.....	30
Tabla 4. Prevalencia (P) y Abundancia media (AM) de monogéneos presentes en branquias de <i>P. brachypomus</i> después de 3 días de baños terapéuticos con nanoemulsión (NNMS) del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	32
Tabla 5. Prevalencia (P) y Abundancia media (AM) de monogéneos presentes en branquias de <i>P. brachypomus</i> después de 6 días de baños terapéuticos con nanoemulsión (NNMS) del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Laboratorio de Biología de Organismos Acuáticos.....19
- Figura 2. Eficacia antiparasitaria in vitro de diferentes concentraciones de nanoemulsión del aceite esencial de *Rosmarinus officianalis*.....29

RESÚMEN

El objetivo de esta investigación fue la elaboración y caracterización de la nanoemulsión del aceite esencial de Romero *Rosmarinus officinalis* para así poder determinar su eficacia a nivel *in vitro* e *in vivo* contra los parásitos monogeneos, que causan grandes pérdidas económicas a los piscicultores, presentes en las branquias de "Paco" *Piaractus brachypomus*. Para la prueba *in vitro* se evaluó el efecto de la nanoemulsión del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* a diferentes concentraciones (150, 300, 700, 1000, 1600 y 2300 mg/L) en las branquias parasitadas y se prosiguió con el test de tolerancia, sometiendo 50 juveniles de "Paco" a las concentraciones de 50, 100, 500, 1000, 2000 mg/L. La concentración no letal (50mg/L) fue determinada en un tiempo de 50 minutos. Basados en estos resultados con la concentración y tiempo ya definidos, se prosiguió con los baños terapéuticos, en donde a los 3 días presentó un 90% de eficacia y a los 6 días un 98% en comparación con 2 grupos control, uno de agua y el otro de agua+tween20. Con estos resultados se puede concluir que, la nanoemulsión de *Rosmarinus officinalis* es una opción que provee una alta eficacia para combatir monogeneos branquiales y siguiendo los parámetros establecidos en el estudio, resulta de gran ayuda para el problema que presenta los monogeneos en *Piaractus brachypomus*.

Palabras clave: Acuicultura, monogeneos, nanoemulsión, *Rosmarinus officinalis*, *Piaractus brachypomus*.

ABSTRACT

The objective of this research was the development and characterization of nanoemulsion of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil to determine its efficacy against monogenean parasites, which cause significant economic losses to fish farmers, present in the gills of "Paco" (*Piaractus brachypomus*) both in vitro and in vivo. For the in vitro test, the effect of Rosemary essential oil nanoemulsion at different concentrations (150, 300, 700, 1000, 1600, and 2300 mg/L) on parasitized gills was evaluated. Tolerance testing was carried out by exposing 50 juvenile "Paco" to concentrations of 50, 100, 500, 1000, and 2000 mg/L. The non-lethal concentration (50 mg/L) was determined within 50 minutes. Based on these results, therapeutic baths were conducted. After 3 days, it showed 90% efficacy, and after 6 days, it exhibited 98% efficacy compared to two control groups, one with water and the other with water + Tween20. These findings conclude that Rosemary essential oil nanoemulsion is an effective option for combating gill monogeneans. Following the parameters established in the study, it proves to be of great assistance in addressing the monogenean problem in *Piaractus brachypomus*.

Keywords: Aquaculture, monogeneans, nanoemulsion, *Rosmarinus officinalis*, *Piaractus brachypomus*.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la acuicultura continúa creciendo más que otros sectores productivos y la acuicultura continental está tomando un papel protagónico, ya que llega a producir 62,5% del aporte de producción mundial de pescado, superando así a la pesca para consumo humano y a la producida por la acuicultura marina (FAO, 2020).

La acuicultura en el Perú a nivel continental representa un 26% con especies introducidas de mayor importancia a nivel comercial como la “Tilapia” *Oreochromis niloticus* y la “Trucha Arco Iris” *Oncorhynchus mykiss* cultivadas en localidades altoandinas con fines de consumo local y exportación (Mendoza, 2013). Así mismo, se viene desarrollando a menor escala el cultivo de peces amazónicos como “Sábalo” *Brycon erythropterum*, “Boquichico” *Prochilodus nigricans*, “Lisa” *Mugil cephalus*, “Doncella” *Pseudoplatystoma fasciatum*, “Paiche” *Arapaima gigas*, “Gamitana” *Colossoma macropomun* y “Paco” *Piaractus brachypomus* en regiones como Madre de Dios, Ucayali, San Martín, Amazonas y Loreto. (DIREPRO, 2010). La región de Madre de Dios destaca por su excepcional diversidad biológica, resultado de sus condiciones topográficas, climáticas e hidrológicas propicias, esta combinación de factores ambientales ofrece un gran potencial para el desarrollo acuícola, siendo el “Paco” *Piaractus brachypomus* la especie más cultivada en la zona. (Tello, 2002).

El “Paco” *Piaractus brachypomus* es una especie nativa de la cuenca del Amazonas y del Orinoco, es de régimen alimenticio omnívoro (frutas, insectos, zooplacton y plantas), en el medio natural puede llegar a pesar 20 kg, medir 80 cm de longitud, puede permanecer preferentemente en aguas ligeramente ácidas con un pH entre 4,5 y 6,8 y puede crecer entre temperaturas de 23 a 28 °C (FAO, 2010). Es ampliamente reconocida por poseer un alto potencial productivo y comercial en la piscicultura de aguas cálidas continentales en América tropical, tanto en sistemas extensivos como semi-intensivos e intensivos, esta especie es altamente resistente al manejo en cautiverio, lo que la hace muy fácil de manejar y presenta

una alta docilidad y rusticidad. Además, es reconocida por su resistencia a enfermedades y su capacidad de adaptarse a condiciones limnológicas desfavorables por períodos cortos de tiempo (Mesa-Granda & Botero-Aguirre, 2007).

No obstante, en centros de cultivo, se han informado mortalidades atribuidas a factores adversos como la mala calidad del agua, altas densidades de peces, alimentación desequilibrada y manipulación inadecuada; estos factores pueden afectar el sistema inmunológico de los peces, volviéndolos más susceptibles a agentes patógenos, especialmente a los monogéneos, y provocar alteraciones patológicas en las branquias, como pérdida de lamelas, hiperplasia del epitelio interlamelar e inflamación del arco y filamentos branquiales (Verján et al., 2001). En el contexto de la investigación sobre la parasitología de *P. bachypomus*, se ha identificado la presencia de varios monogéneos, entre ellos *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium viatorum*, *Notozothecium janauachensis* y *Anacanthorus penilabiatus* (Negreiros & Tavares-Dias, 2019).

En ese sentido, para contrarrestar estas problemáticas los piscicultores hacen uso de sustancias químicas sintéticas, que son altamente tóxicas, se acumulan en el músculo de los peces y dejan residuos en los sistemas de aguas abiertas (Hoai, 2020). Para evitarlo, se están utilizando plantas medicinales en forma de aceites esenciales las cuales han ganado bastante notoriedad debido a sus compuestos bioactivos con gran potencial para tratar problemas parasitarios. El aceite de la planta *Lippia sidoides*, ha demostrado resultados prometedores en la lucha contra los parásitos monogéneos, una concentración de 320 mg/L de aceite esencial logró una eficacia del 100% contra especies como *Anacanthorus spatulatus*, *Notozothecium janauachensis* y *Mymarothecium boegeri* (Soares et al., 2017), no obstante, se ha observado que los aceites tienen baja solubilidad en baños terapéuticos y son altamente volátiles (Gonzales et al., 2020; Gonzales et al., 2022). Las nanoemulsiones son una forma eficaz de aplicar los aceites esenciales, gracias a su capacidad para disolverse en agua y proporcionar

protección contra la fotoinestabilidad, variación térmica y volatilización, estas emulsiones se crean mediante métodos de alta y baja energía, lo que les permite ser estables, transparentes y tener una reología ajustable, además de un tamaño de gota pequeño de alrededor de 100 nm (Bajerski et al., 2016), a diferencia de usar solo concentraciones de los aceites esenciales, las nanoemulsiones han presentado mejores resultados a nivel *in vitro* como en el caso de *Pterodon emarginatus* que en un lapso corto de tiempo presentó eficacia de 100% contra los monogeenos (Valentim et al., 2017). Resultando así que la aplicación de las nanoemulsiones de aceites esenciales son altamente efectivas ya que sus propiedades permiten la penetración de compuestos hidrofóbicos en células bacterianas y parasitarias, causando deformidades celulares y disfunciones organolépticas (Dawood et al., 2021).

El “Romero” *Rosmarinus officinalis* es una planta aromática que tiene un gran valor económico dentro de la familia Lamiaceae, tradicionalmente tiene capacidad contra enfermedades vinculadas a la inflamación, presenta propiedades inmunoestimulantes, antiparasitarias en peces, fumigante contra plagas en agricultura, conservadores naturales de alimentos e incluso para tratamientos de la caspa, todas estas bondades terapéuticas están relacionadas a sus metabolitos secundarios (Borges et al., 2019). El “Romero” *Rosmarinus officinalis* se ha consolidado como una importante alternativa en el tratamiento antiparasitario debido a la alta efectividad de sus metabolitos secundarios, tales como 1,8-Cineole, Camphor, α -Pinene, Camphene y β -Pinene, demostrando una significativa actividad contra monogeenos como *Dactylogyrus minutus*, estas propiedades terapéuticas lo convierten en una opción natural y prometedora para combatir las enfermedades parasitarias en peces, destacando su potencial como alternativa a los tratamientos químicos convencionales (Zoral et al., 2017), a nivel *in vitro* *Rosmarinus officinalis* ha sido probado con eficacia combatiendo monogeenos, logrando así resultados prometedores en *Piaractus brachypomus* (Gonzales et al., 2022).

Por lo expuesto, el presente estudio pretende evaluar la capacidad antihelmíntica de la nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* en juveniles de “Paco” *Piaractus brachypomus*.

1.1 Descripción y formulación del problema

La parasitosis en la acuicultura es un grave problema que puede limitar su crecimiento y rentabilidad. La presencia de parásitos en el cultivo de peces puede causar mortalidad, lo que afecta negativamente la productividad y rentabilidad del negocio. Por lo tanto, es importante implementar medidas efectivas para el control de parásitos en la acuicultura. (Crespo, 2003). El parasitismo se ve reflejado como un problema que ataca a los peces desde la incubación, siendo en la etapa juvenil donde los casos aumentan ya que causan la muerte entre 1 a 10% de los peces que van a ser cosechados, este problema se ve reflejado en pérdidas económicas que rondan los 1 050 a 9 580 millones de dólares (Shinn et al., 2015). En consecuencia, el control de las enfermedades presentes en la acuicultura es esencial siempre y cuando esta sea aplicada y expuesta a las dosis ideales, para evitar posibles repercusiones medioambientales, evitar toxicidad en los peces y resistencia de ciertos grupos de parásitos (Sibaja et al., 2019).

Los monogéneos identificados en *Piaractus brachypomus* son *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium viatorum*, *Notozothecium janauachensis* y *Anacanthorus penilabiatus* (Brito & Tavares Días, 2016). Sin embargo, también están presentes *Myxosporidios* sp, *Piscinoodinium* sp, *Trichodina* sp. e *Ichthyophthirius multifiliis*; las cuales en conjunto causan pérdidas de lamelas, hiperplasia del epitelio interlamelar, inflamación del arco y de filamentos branquiales (Verján et al., 2001). Investigaciones en especies de la familia Serrasalmidae indican que cuando la infestación parasitaria se agrava se puede visualizar la hiperplasia de las lamelas primarias, necrosis, edemas, desplazamiento del epitelio respiratorio, etc, comprometiendo la sobrevivencia de los peces (Verján et al., 2001; Valentim et al., 2018).

Para controlar las infecciones por monogéneos, en la acuicultura se ha venido usando tratamientos con productos químicos sintéticos con resultados variables y contraproducentes, pero al no tener la precaución necesaria, causan daños adversos en el pez, dejan residuos y son perjudiciales para el ser humano (Gomes et al., 2009). Entre los productos químicos más usados para el control de parásitos en la acuicultura se encuentran el cloruro de sodio, permanganato de potasio, sulfato de cobre, sulfamerazina, tetraciclina, cloramina-T, formalina, peróxido de hidrógeno, entre otros, estos productos químicos en su mayoría expuestos a diversos factores como concentración y temperatura pueden causar efectos irreversibles en el pez, salud humana y medio ambiente por ello su uso es controlado debido a su toxicidad (Schalch et al., 2009). En ese sentido, los aceites esenciales han ganado bastante notoriedad para tratar problemas por monogéneos (Soares et al., 2017; Gonzales et al., 2022), los aceites esenciales presentan eficacia contra los monogéneos sobre todo en el nivel *in vitro*, pero al llegar a la etapa de baños terapéuticos pierden rendimiento ya que son sustancias de naturaleza hidrofóbicas y son altamente volátiles como en el caso de *Cymbopogon citratus* (Gonzales et al., 2020). Es por ello que el presente estudio plantea evaluar el siguiente problema:

¿La nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* tiene capacidad antihelmíntica contra parásitos monogéneos de juveniles de “Paco” *Piaractus brachypomus*?

1.2 Antecedentes

Soares, et al. (2016), investigaron sobre el efecto antiparasitario del aceite esencial de *Lippia alba* sobre ectoparásitos de *Colossoma macropomum*, siendo aplicadas por medio de concentraciones, las cuales demostraron que el aceite esencial de *Lippia alba* tuvo un efecto antihelmíntico del 100% a las concentraciones de 160, 320, 640, 1280 y 2560 mg/L, a lo largo de las 3 primeras horas de exposición *in vitro*, siendo las concentraciones de 1280 y 2560 las que eliminaron a los ectoparásitos en sus primeros 20 min de acción. Estas concentraciones

proporcionan gran eficacia, pero lamentablemente no son toleradas por los peces, así que para el ensayo *in vivo* se aplicó concentraciones de 100 y 150 mg/L por 30 minutos de exposición, teniendo resultados de 40,7% y 50,3% contra *Ichthyophthirius multifiliis* y contra monogéneos solo una eficacia de 14% en la concentración de 100 mg/L. Estos resultados indican que se necesitaron mejores estrategias para poder aprovechar los beneficios del aceite esencial en tratamientos antiparasitarios; ya que la aplicación directa de estas concentraciones es tóxica para los huéspedes.

De Oliveira, et al. (2016), experimentaron con el uso del aceite esencial de *Lippia sidoides* y *Mentha piperita* contra monogéneos que afectan a *Oreochromis niloticus* y así evaluar el cambio hematológico que producen. En las pruebas *in vitro* las concentraciones de 160 mg/L para *Lippia sidoides* y 320 mg/L para *Mentha piperita* fueron las más eficientes ya que en el tiempo de 1 minuto con 58 segundos y 8 minutos con 11 segundos respectivamente lograron el 100% de mortalidad de los parásitos. Para el test de tolerancia evaluaron el efecto que tienen en el pez a las concentraciones de aceite esencial, en donde evidenciaron que dependiendo la concentración presentaron comportamiento anormal como agitación y nado errático, resultando que las concentraciones de 20 y 40 mg/L de *L. sidoides* y *M. piperita* respectivamente son las ideales para ser usadas en los baños terapéuticos; aunque ambos aceites esenciales presentaron eficacia contra los monogéneos *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* y *Scutogyrus longicornis*, recomendaron usar el aceite esencial de *M. piperita* ya que no causa alteraciones hematológicas significativas como fue el caso de *L. sidoides*.

Soares, et al. (2017), evaluaron las alteraciones sanguíneas e histológicas de la actividad antiparasitaria del aceite esencial de *Lippia sidoides* en *Colossoma macropomum* en contra de los monogéneos branquiales *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* y *Mymarothecium boegeri*. En el ensayo *in vitro* la concentración de 320 mg/L tuvo una eficacia

del 100% contra los monogeneos en 10 minutos de exposición, las concentraciones de 160 y 80 mg/L lograron la inmovilización de los parásitos pasado 1 y 3 horas respectivamente y las concentraciones más bajas pasando las 6 horas de exposición. Los ensayos *in vivo* usados en el experimento fueron de 10 y 20 mg/L en baños terapéuticos de 60 y 15 minutos respectivamente, presentaron un efecto anestésico pero no pudieron ser eficaces en contra de los monogeneos, resultando que no causaron cambios a nivel plasmático, glucosa y proteína, pero a nivel hematológico observaron disminución de eritrocitos y a nivel histológico presentaron lesiones branquiales irreversibles como hiperplasia y fusión del epitelio laminar, vasodilatación, desprendimiento del epitelio branquial, aneurisma laminar, rotura epitelial con hemorragia, congestión, edema y necrosis, proliferación de las células mucosas y de cloruro e hipertrofia laminar. Por lo tanto, concluyeron que el aceite esencial de *L. sidoides* presenta a nivel *in vitro* una alta eficacia para eliminar los monogeneos presentes en las branquias, pero al ser usado en baños terapéuticos presenta efectos tóxicos, por lo cual se requieren más investigaciones de su potencial bioactivo y una mejor forma de administración en baños terapéuticos.

Valentim, et al. (2018), experimentaron *in vitro* con la nanoemulsión de aceite esencial de *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) para combatir monogeneos (*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* y *Mymarothecium boegeri*) presentes en los arcos branquiales de *C. macropomum*. La eficacia helmíntica del 100% alcanzada en solo dos horas de acción con la nanoemulsión a concentraciones relativamente bajas demuestra su potencial como alternativa efectiva y natural a los tratamientos químicos convencionales. Estos resultados sugieren la necesidad de profundizar en la investigación y desarrollo de la nanoemulsión de aceite esencial de *Pterodon emarginatus* como una opción viable y sostenible para el control de monogeneos en la acuicultura.

Valentim, et al. (2018) también investigaron la actividad antiparasitaria de la nanoemulsión de oleoresina de *Copaifera officinalis* contra parásitos ubicados en las

branquias de *Colossoma macropomum*, aplicando concentraciones de 50, 100, 150 200 y 300 mg/L. Los tratamientos *in vitro* con la nanoemulsión a las concentraciones de 200 y 300 mg/L tuvieron eficacia del 100% a los 15 min de iniciado el tratamiento; alcanzando el 100% de efectividad de las demás concentraciones a los 90 minutos de exposición. Concluyeron que la nanoemulsión del aceite esencial de *Copaifera officinalis* tiene una alta actividad antiparasitaria contra los monogéneos *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium Janauachensis* y *Mymarothecium boegeri* ubicados en las branquias de *Colossoma macropomum*.

Malheiros, et al. (2020) investigaron la capacidad antihelmíntica de la oleorresina de *Copaifera reticulata* a concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/L en comparación a la nanoemulsión de la oleorresina a concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 mg/L contra monogéneos branquiales de *Colossoma macropomum*. Los resultados evidenciaron que la concentración mayor testada (250 mg/L) de nanoemulsión causó 100% de eficacia contra monogéneos branquiales en apenas 15 minutos de exposición, en comparación de la oleorresina que necesitaron hasta 1000 mg/L para causar 100% de eficacia en 15 minutos de exposición. Este estudio *in vitro* muestra como la nanoformulación puede mejorar la eficacia y sostenibilidad de los aceites esenciales para ser usados en tratamientos de parasitosis en peces de cultivo.

Barriga, et al. (2020) investigaron la efectividad del aceite esencial de *Lippia grata* contra monogéneos branquiales de *Colossoma macropomum*, los peces estaban parasitados con *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* y *Linguadactyloides brinkmanni*, para ello evaluaron a través de ensayos *in vitro* concentraciones de 100, 250, 350 y 700 mg/L. La concentración de 700 mg/L presentó una eficacia de inmovilización del 100% en 30 minutos de exposición, mientras que la concentración de 350 mg/L tuvo efecto en 2 horas; durante el test de tolerancia los peces reaccionaron a las concentraciones con síntomas como agitación y aceleración del latido opercular a los 5

minutos, efecto anestésico a 30 minutos de iniciado el test; ya que no hubo mortalidad optaron por usar la concentración de 700 mg/L en los baños terapéuticos, mostrando una eficacia antiparasitaria del 95.1%; también se produjo una disminución en la hemoglobina y a nivel histopatológico los peces presentaron una hiperplasia laminar de baja a moderada, lo que indica que es una concentración segura y eficaz para aplicarse en tratamientos contra monogéneos en *Colossoma macropomum*.

Alves, et al. (2021) evaluaron la eficacia *in vitro* del aceite esencial de *Piper callosum*, *Piper hispidum* y *Piper marginatum* contra monogéneos branquiales de *Colossoma macropomum*. En el ensayo *in vitro* testaron las concentraciones de 600, 800, 1000 y 2000 mg/L, las cuales tuvieron una eficacia del 100% en 5 minutos de exposición contra *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* y *Linguadactyloides brinkmanni*. En el caso de *P. hispidum* se logró el 100% de eficacia *in vitro* a concentraciones de 600 y 800 mg/L tras 20 minutos de exposición y con *P. marginatum* en una hora de exposición las concentraciones de 200, 300 y 400 mg/L alcanzaron el 100% de eficacia. En el test de tolerancia las concentraciones altas en su totalidad causaron agitación, movimiento acelerado del opérculo, nado errático y letargo y después de una hora causaron la mortalidad de los peces en su totalidad. Sin embargo, en *P. callosum* los peces aguantaron la concentración de 100 mg/L recuperándose a su totalidad en 20 minutos; en *P. hispidum* la concentración donde no hubo mortalidad fue de 250 mg/L donde la recuperación total se dio en 10 minutos y en *P. marginatum* la concentración de 100 mg/L permitió a los peces sobrevivir y recuperarse en 10 minutos; por lo tanto, estas últimas 3 concentraciones son las ideales para usarse en baños terapéuticos.

Gonzales, et al (2022), realizaron un estudio evaluando la eficacia de aceites esenciales de tres especies de la familia Lamiceae para controlar la carga parasitaria de monógenos en las branquias de *Piaractus brachypomus*. En este estudio, se determinaron las concentraciones

necesarias para lograr la eliminación de los parásitos y se observó que el tiempo de exposición y la concentración eran variables. Además, se evaluó la tolerancia de los peces a los aceites esenciales y se encontró que las concentraciones más altas eran letales para los peces. Los resultados sugieren que estos aceites esenciales pueden ser utilizados en baños terapéuticos para el control y tratamiento de monogeneos, pero se recomienda el uso de concentraciones y tiempos de exposición menores para evitar efectos negativos en los peces.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar la capacidad antihelmíntica de la nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* contra monogeneos branquiales de “Paco” *Piaractus brachypomus*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar y caracterizar la nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis*.
- Determinar la eficacia in vitro de la nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* contra monogeneos presentes en las branquias de “Paco” *Piaractus brachyomus*.
- Evaluar la capacidad antihelmíntica in vivo después de baños prolongados de “Paco” *Piaractus brachypomus* con la nanoemulsión de aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis*.

1.4 Justificación

El control de monogeneos en la piscicultura es un tema de gran importancia económica y ambiental, ya que las pérdidas suelen ser significativas, sin embargo, el uso indiscriminado de productos químicos sintéticos para su control puede tener efectos adversos en el medio ambiente y en la salud humana (Shah & Mraz, 2020), por lo tanto este proyecto tiene como objetivo presentar una alternativa natural para el control de monogeneos en la piscicultura, a través del uso de los metabolitos secundarios del “Romero” *Rosmarinus officinalis*, una planta aromática de gran valor económico y terapéutico. En la búsqueda de soluciones más amigables, diversas investigaciones vienen usando plantas medicinales como *Mintostachys mollis*, *Origanum vulgare*, *Salvia rosmarinus*, *Mentha piperita*, *Copaifera reticulata*, *Cymbopogon citratus*, *Ficus insípida*, *Lippia grata*, *Lippia alba*, *Lippia organoides*, *Alpinia zerumbet*, *Piper callosum*, *Piper hispidum*, *Piper marginatum*, etc (Malheiros et al., 2020; Gonzales et al., 2019; Gonzales et al., 2020; Barriga et al., 2020; Gonzales et al., 2022; Alves et al., 2021); en forma de látex, aceites esenciales, oleorresinas, extractos, entre otros, debido a la capacidad antihelmíntica de sus metabolitos secundarios presentes, las cuales demostraron buena eficacia en baños terapéuticos (Gonzales et al., 2019; Gonzales et al., 2020, 2022; Malheiros et al., 2020).

Los aceites esenciales, son alcoholes complejos volátiles que están compuestos por sustancias químicas, que posiblemente actúan sinérgicamente para causar mortalidades de parásitos en peces, aceites esenciales como *Mithostachys mollis*, *Origanum vulgare* y *Salvia rosmarinus* a nivel *in vitro* poseen la capacidad de eliminar los parásitos monogeneos a diferentes concentraciones (Gonzales et al., 2022), de igual forma el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* el cual como los anteriores posee la eficacia para combatir los monogeneos pero poseen poco rendimiento debido a su escasa solubilidad y sostenibilidad cuando son usados en baños terapéuticos (Gonzales et al., 2020), por lo que surge el interés

recientemente de mejorar este subproducto haciendo uso de la Nanotecnología. La cual permitiría aprovechar de manera óptima sus propiedades, uso de menor cantidad de producto, a su vez permitiría solucionar el problema de la alta volatilidad, descomposición y oxidación (Dawood et al., 2021). La nanoemulsión de la oleorresina de *Copaifera reticulata* fue usado para tratar parásitos monogeneos en gamitana *Colossoma macropomum*, y al ser comparado con la oleorresina sin nanoformulación presentó mayor eficacia cuando fue usado en apenas 250 mg/L de nanoemulsión (Malheiros et al., 2020). Así mismo, fueron usadas las nanoemulsiones del aceite esencial de *Pterodon emarginatus* y de la oleorresina *Copaifera officinalis* contra monogeneos de *Colossoma macropomum* donde obtuvieron resultados prometedores y que fácilmente podría ser considerado para usar en baños terapéuticos (Valentim 2018).

La planta *Rosmarinus officinalis* posee gran capacidad nutricional y propiedades terapéuticas, su aplicación en la acuicultura para tratar monogeneos es a través de su aceite esencial ya que entre los metabolitos secundarios que posee podemos encontrar a α -pineno, β -pineno y 1,8-cineol los cuales poseen actividad biológica antiparasitarias en peces (Flores-Villa et al., 2020), Por lo tanto, sería un buen candidato para ser usado a través de nanomulsiones como una alternativa al uso desmedido de productos químicos sintéticos.

1.5 Hipótesis

La nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* presenta capacidad antihelmíntica contra monogeneos branquiales de “Paco” *Piaractus brachypomus*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

Piaractus brachypomus

Comúnmente conocido en la Amazonía peruana como “Paco”, es un pez omnívoro que en su medio natural puede alcanzar 70 cm de longitud y 14 kg de peso, presenta un cuerpo alto y posee dientes grandes molariformes con los cuales tritura su alimento, preferentemente semillas e insectos; naturalmente vive en lagunas y áreas inundadas, cuando es época de vaciante se moviliza a ríos tributarios (FAO, 2010). Es de color plateado en toda la longitud de su cuerpo y tiene el pecho y aletas ventrales de color rojos, siendo de carácter dócil; es reproducido por inducción hormonal, ay que no se reproduce directamente en estanques; es considerado una especie rustica de crecimiento rápido ya que llega a su madurez sexual a los 5 años, es consumido en su mayoría localmente y es una especie que posee gran potencial productivo y comercial, su tasa de conversión alimenticia es de 1.8 a 1 (PRODUCE, 2014). El “Paco” *Piaractus brachypomus* cuenta con características que la hacen altamente valorada en la piscicultura de aguas cálidas continentales en América tropical, gracias a su elevado potencial productivo y comercial en sistemas extensivos, semi-intensivos e intensivos, su resistencia al manejo en cautiverio, así como su docilidad y rusticidad, facilitan su manejo y adicionalmente su capacidad de adaptarse a condiciones limnológicas desfavorables por cortos periodos de tiempo, y su reconocida resistencia a enfermedades, son ventajas significativas que favorecen su cultivo (Mesa-Granda & Botero-Aguirre, 2007).

Clasificación taxonómica de *Piaractus brachypomus* según Cuvier, 1818:

Clase: Actinopterygii

Orden: Characiformes

Familia: Characidae

Sub-familia: Serrasalminidae

Género: *Piaractus*

Especie: *brachypomus*

Parásitos monogeneos en Piaractus brachypomus

Los parásitos identificados en *Piaractus brachypomus* tanto en branquias, aletas y cuerpo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Especies de parásitos identificados en *Piaractus brachypomus*

Parásitos	Especies	Autores	Año
		Kritsky, Thatcher & Kayton	1979
	<i>Anacanthorus spathulatus</i>	Oliveira & Tavares-Dias	2016
		Negreiros & Tavares-Dias	2019
		Boeger, Piasecki & Sobecka	2002
		Oliveira & Tavares-Dias	2016
Monogenea	<i>Mymarothecium viatorum</i>	Negreiros & Tavares-Dias	2019
		Anshary et al.	2022
	<i>Notozothecium</i>	BelmontJégu, Domingues & Martins	2004
	<i>janauachensis</i>	Oliveira & Tavares-Dias	2016
	<i>Anacanthorus penilabiatus</i>	Negreiros & Tavares-Dias	2019
		Rudolphi	1819
	<i>Clinostomum marginatum</i>	Braun	1899
Digenea		Oliveira & Tavares-Dias	2016
		Diesing	1850
	<i>Dadaytrema oxycephalum</i>	Vaz	1932
Nemátoda	<i>Rondonia rondoni</i>	Cuadros et al.	2021

	<i>Spectatus spectatus</i>	Travassos	1923
	<i>larvas de Contracaecum sp.</i>	Railliet & Henry	1912
	<i>Argulus carteri</i>	Cunnington	1931
Crustáceos	<i>Ergasilus sp.</i>	von Nordmann	1832
		Oliveira y Tavares-Dias	2016
		Thatcher	2000
	<i>Heneguya brachypomus</i>	Capodifoglio et al.	2020
Mixobólidos	<i>Heneguya tapariensis</i>	Capodifoglio et al.	2020
	<i>Myxobolus pirapitingae</i>	Capodifoglio et al.	2020
	<i>Myxobolus arapaiuns</i>	Capodifoglio et al.	2020

Fuente: Elaboración propia

Rosmarinus officinalis

Es una planta que destaca por sus propiedades aromáticas que desde la antigüedad el ser humano la ha empleado culinariamente y también aplicado para prevención y tratamientos de enfermedades, ya que biológicamente posee propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitarias e incluso cancerígenas. (Flores-Villa et al., 2020). Teniendo como precedente estas características, el “Romero” *Rosmarinus officinalis* ha sido aplicado en forma de extracto como tratamiento antiparasitario, siendo altamente efectivo en la eliminación de monogeneos, convirtiéndolo así en una alternativa natural y prometedora para combatir enfermedades parasitarias en peces (Zoral et al., 2017).

Clasificación taxonómica del “Romero” *Rosmarinus officinalis* según Schleid., 1852:

Reino: Plantae

Sub-reino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub-clase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Rosmarinus L.*

Especie: *officinalis*

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son Extractos altamente concentrados de origen natural los cuales con extraídos por métodos como la destilación al vapor, enfleurage, extracción con solventes volátiles y fluidos super críticos, pudiendo así aprovechar de una manera más optima los beneficios de sus metabolitos secundario (Martínez, 2003), ya que sus compuestos bioactivos les permiten amplificar sus propiedades medicinales, aromáticas antisépticas, antibacterianas, antiparasitarias, entre otras; debido a ello pueden inhibir el crecimiento bacteriano ya que alteran su morfología (Nazzaro et al., 2013). Con el fin de aprovechar al máximo las propiedades antiparasitarias que tienen los aceites esenciales, en la acuicultura son aplicados en forma de concentraciones y recientemente en nanoemulsiones; al ser aplicadas en forma de concentraciones con alcohol, teniendo alta eficacia *in vitro*, pero en algunos casos en el ensayo *in vivo* pueden llegar a tener efectos tóxicos provocando daños irreversibles en el pez, es por ello que se busca otras formas de aplicación (Soares et al., 2016). Los aceites esenciales también han sido ampliamente aplicados en el ámbito acuícola como el uso del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* para investigar ámbitos inmunológicos en *huso huso* (Ebrahimi et al., 2020), así mismo este aceite esencial también ha sido aplicado en forma de extracto para combatir con monogeneos en evaluaciones *in vitro* obteniendo una eficacia del 100% (Gonzales et al., 2022).

Polisorbato 20

Su nombre es polyoxyethylene monolaurate sorbitan (20) comúnmente llamado Tween 20, el cual tiene como fórmula molecular $C_{58}H_{114}S_{26}$, está compuesto de sorbitol, óxido de etileno y ácido láurico, se caracteriza por ser de un color amarillo pálido y de textura viscosa. Es considerado un tensoactivo ya que funciona como un emulsionante y estabilizador

para aceites al poseer un equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB) de 16.7, actuando como un solubilizador penetrante (GoldAgent, s. f.).

Nanoemulsión usado en la acuicultura

Es un sistema isotrópico termodinámicamente estable con un tamaño de partícula que va desde 0,1 a 100 nm, permite la unión de dos líquidos inmiscibles, la cual es posible gracias a un tensoactivo que posibilita su fusión, es un medio por el cual permite la administración de agentes bioactivos; siendo formada por dos métodos, uno de alta energía que son aplicados en la industria cosmética y farmacéutica, y los métodos de baja energía que son más accesibles de obtener (Bajerski et al., 2016).

En la acuicultura se ha venido usando productos químicos como la formalina para combatir los problemas parasitarios por monogéneos, los cuales traen consigo efectos negativos que son perjudiciales para la especie, el ser humano y el medio ambiente (Hoai, 2020). En busca de emplear soluciones naturales, biodegradables y que a su vez posean eficacia antihelmíntica se está empleando estudios con la nanoemulsión de aceites esenciales y oleorresinas las cuales a sus resultados positivos están tomando relevancia como una alternativa para tratar los problemas con parásitos monogéneos, ya que la biodisponibilidad que ofrecen permite suministrar con efectividad las concentraciones requeridas; teniendo resultados exitosos y prometedores para ser aplicados en baños terapéuticos (Valentim et al., 2018; Malheiros et al., 2020).

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

La investigación fue de tipo experimental, en la cual se evaluó el efecto de la nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* como antihelmíntico para combatir monogéneos presentes en branquias de “Paco” *Piaractus brachypomus*.

3.2. Ámbito temporal espacial

La investigación fue realizada en el laboratorio de Biología de Organismos Acuáticos y en el Laboratorio de Reproducción de peces Amazónicos del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP), sede Madre de dios, Región Sur, Perú, ubicada en las coordenadas 12°39'02.8"S 69°19'16.8"W.



Figura 1. Laboratorio de Biología de Organismos Acuáticos

3.3. Variables

3.3.1. Independientes

- Concentraciones de la nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* (mg/L).
- Tiempo de exposición (minutos).

3.3.2. Dependientes

- Eficacia (%)
- Índices parasitarios
 - Abundancia media: Número total de parásitos dividido por el número total de peces examinados.
 - Prevalencia (%): Es el número de hospederos infectados con uno o más individuos de una especie particular de parásito (o grupo taxonómico) dividido por el número de hospederos examinados.

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

La población correspondiente al estudio fue de un lote de 3000 juveniles de la especie “Paco” *Piaractus brachypomus* mantenidos en un estanque de tierra de 1000 m² que fueron obtenidos por reproducción inducida en el Laboratorio de Reproducción del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP).

3.4.2. Muestra

La muestra fue de 132 juveniles de “Paco” *Piaractus brachypomus* que fueron obtenidos del lote de peces mantenidos en el estanque de tierra.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Equipos

- Estereomicroscopio binocular modelo Stemi 305 EDU
- Microscopio modelo Primostar 3-Fix K
- Balanza Analítica de capacidad de 220 g
- Multiparámetro de calidad de agua marca HANNA
- Analizador de potencial Zeta modelo Zetasizer Nano ZS

3.5.2. Material biológico

- 132 juveniles de *Piaractus brachypomus*

3.5.3. Materiales de oficina

- Papel bond
- Cuaderno de apuntes
- Lápiz portaminas
- Marcador indeleble punta fina
- Etiquetas
- Papel cansu de 80g
- Tablero A4
- Regla de metal de 30cm

3.5.4. Materiales de laboratorio

- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Guantes quirúrgicos
- Placas Petri medianas
- Placas Petri pequeñas

- Alcohol absoluto (70°)
- Algodón
- Gotero
- Kit de disección

3.5.5. Otros

- Cámara digital
- Productos de aseo y limpieza
- Reactivos químicos

3.6. Procedimientos

3.6.1. Obtención y caracterización del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis*

El aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* fue extraído por destilación al vapor usando un destilador semi industrial por la empresa “Q’api”, la cual es un proveedor certificado con registro sanitario para comercializar. Posteriormente, para conocer los compuestos químicos presente en el aceite esencial, una muestra fue sometida a análisis cualitativo y semicuantitativo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

3.6.2. Elaboración de la nanoemulsión de aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis*

La nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* fue elaborado en el Laboratorio de Nano Biomateriales de la Universidad Federal de Sao Paulo (UNIFESP). La nanoemulsion se preparó utilizando el método de baja energía, compuesta 5% por aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis*, 5% del Tensoactivo Tween-20 y 90% de agua destilada para la fase acuosa. Inicialmente, se pesó el aceite esencial y el tensoactivo para así

poder mezclarlos en el agitador de vórtice (Even, VX-38, Brasil) durante aproximadamente cinco minutos a 3000 RPM. La mezcla resultante presentó un color blanquecino homogéneo y se procedió a agregar el 90% de agua destilada gradualmente mientras se continuaba con el proceso de agitación por cinco minutos más. (Malheiros et al., 2020).

3.6.3. Caracterización de la nanoemulsión de aceite esencial de “Romero” Rosmarinus officinalis

Para caracterizar la nanoemulsión se realizó mediciones de potencial zeta en la distribución del tamaño de partícula utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido) equipado con un láser "rojo" de 10 mW ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$), y las muestras fueron medidas por tamaño con un ángulo de detección de dispersión de 90° . La nanoemulsión se diluyó en agua desionizada (1:10 g) y los análisis del tamaño de la gota y del índice de polidispersidad se realizaron por triplicado y se expresaron como media \pm desviación estándar. Los datos se procesaron con el software Zetasizer 6.20®, Malvern Instruments (Malheiros et al., 2020).

3.6.4. Obtención y aclimatación de los peces

Para el desarrollo de la investigación los peces fueron obtenidos por reproducción inducida en el Laboratorio de Reproducción de Peces Amazónicos del IIAP- Sede Madre de Dios. Los peces en estadio larval fueron mantenidos en un estanque de tierra para su crecimiento. Cuando los peces alcanzaron el tamaño considerado juvenil fueron aclimatados por un periodo de siete días en un tanque de concreto revestido de mayólica de capacidad de 1000 L, con flujo de agua constante y se alimentaron con una dieta comercial al 36% de proteína cruda con frecuencia de 2 veces al día (08:00 y 16:00 horas). Una vez aclimatados, los peces fueron usados para los ensayos correspondientes.

3.6.5. Medición de parámetros físicos y químicos del agua

Durante los días de aclimatación y experimentación se midieron los siguientes parámetros de calidad de agua: temperatura, oxígeno disuelto y pH, usando un medidor multiparamétrico portátil modelo HI98196, Hanna Instruments, USA (Tabla 1).

Tabla 1

Parámetros físicos y químicos del agua durante los seis días de experimento

Parámetros	Controles		Tratamiento
	Tanque 1000L	Agua	Agua + Tween 20 NNMS 50 mg/L
Temperatura (°C)	25.5 ± 0.8	26.7 ± 0.0	27.0 ± 0.4
Oxígeno Disuelto (ppm)	5.3 ± 0.5	5.7 ± 0.4	5.5 ± 0.4
pH	4.4 ± 0.1	6.7 ± 0.0	6.8 ± 0.0

Los valores se presentan como promedio ± Desviación estándar (DS). Los valores en la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia

3.6.6. Ensayo in vitro

Los peces que estaban infectados naturalmente por monogeneos fueron sacrificados a la altura de la región cefálica usando un estilete de punta fina. Posteriormente, sus branquias fueron individualizadas y distribuidas en placas Petri (5 cm) a razón de una branquia por placa, expuestas a siete diferentes concentraciones de nanoemulsión de aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* (150, 300, 700, 1000, 1600, 2000 y 2300 mg/L) y dos grupos control, los cuales fueron: agua del tanque de cultivo + Tween-20 y agua del tanque de cultivo libre de nanoemulsión, cada tratamiento presentaba tres repeticiones. Seguidamente, el número de monogeneos vivos y muertos fueron observados cada cinco minutos usando estereomicroscopio y se visualizaron con un campo de visión que contuvo al menos 20 monogeneos por branquia. Se consideraron parásitos muertos a aquellos que se desprendieron del tejido branquial y los que estaban anclados a las branquias, pero sin movimiento (Soares et al., 2016). La eficacia de cada tratamiento se calculó utilizando los métodos descritos y

modificados en Zhang et al. (2014), que consistió en calcular $AE/EE = [C-T] \times 100\%/C$, donde AE es la eficacia del aceite esencial, EE es la eficacia de la nanoemulsión, C es el número de parásitos vivos en el grupo control y T es el número de parásitos vivos en el grupo de tratamiento.

3.6.7. Test de tolerancia

Este proceso fue realizado tomando como precedente las nanoemulsiones que presentaron una mejor eficacia con relación a su concentración y tiempo de exposición en el ensayo *in vitro*. En este proceso se evaluó la tolerancia de los peces a las concentraciones de nanoemulsión para posteriormente ser usado en los baños terapéuticos. Se distribuyeron 10 peces por tanque de 60 litros, empleando las concentraciones de 50, 100, 500, 1000 y 2000 mg/L durante 50 minutos, donde se observó el cambio de comportamiento en los peces como capacidad anestésica de la nanoemulsión, natación errática, aceleración del movimiento opercular y mortalidad.

3.6.8. Baños terapéuticos (ensayo *in vivo*)

Para los baños terapéuticos, un total de 72 juveniles de “Paco” *Piaractus brachypomus* infectados naturalmente por monogeneos fueron distribuidos en 9 cajas de agua con capacidad de 60 L, a razón de 8 peces por caja. Se evaluaron tres tratamientos: uno conteniendo la concentración de 50 mg/L de nanoemulsión del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* y dos tratamientos considerados grupos controles: uno conteniendo solo agua del estanque y otro conteniendo agua del estanque + Tween-20, con tres repeticiones cada uno. La duración de los baños terapéuticos fue de 50 minutos por 6 días consecutivos.

3.6.9. Evaluación de la eficacia antiparasitaria

Después de tres días de que el experimento fue iniciado se seccionaron las branquias de tres peces por repetición y al finalizar los 6 días se seccionaron las branquias de 5 peces

más, obteniendo así 24 peces que fueron analizados por cada tratamiento. Las branquias que se seccionaron fueron fijadas en formalina al 5% para la cuantificación e identificación taxonómica de los monogéneos (Eiras et al., 2006), se calcularon los índices parasitarios como prevalencia, abundancia y abundancia media (Bush et al., 1997) y se determinó la eficacia de los baños terapéuticos utilizando los cálculos descritos en Zhang et al, (2014).

a. Prevalencia

La prevalencia fue determinada por el número de peces parasitados entre el número de peces analizados, usando la fórmula propuesta por Bush et al. (1997):

$$P = \left(\frac{NPP}{NPA} \right) \times 100$$

Donde:

- P: Prevalencia parasitaria
- NPP: Número de peces parasitados
- NPA: Número de peces analizados

b. Abundancia media

- La abundancia media fue determinada por la división entre el número de parásitos y el número de peces analizados según Bush et al. (1997)

$$AM = \frac{NP}{NPA}$$

Donde:

- AM: Abundancia media

- NP: Número de parásitos
- NPA: Número de peces analizados

c. Eficacia

• Para la eficacia fue necesaria la media total de parásitos del control Agua, la media total de parásitos del control que se desea determinar, usando la formula descrita por Zhang et al. (2014)

$$E = \frac{(B-T) \times 100}{B}$$

Donde:

- E: Eficacia de la nanoemulsión
- B: Media de monogéneos totales del control
- T: Media de monogéneos totales del tratamiento

3.7. Análisis de datos

Los resultados se expresaron en promedio y desviación estándar. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), cuando existió diferencias significativas entre los grupos se utilizó el test de Dunnett para comparar cada tratamiento con el control usando el software estadístico “Sigma Plot 11”.

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización química del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y características de la nanoemulsión

El aceite esencial de romero es de color transparente ligeramente amarillo. Los componentes que presentaron mayor área relativa en el aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis* son α -Pinoeno, Eucaliptol y Canfeno, los demás compuestos se muestran en la tabla 2. La nanoemulsión de romero presenta una característica líquida de color blanquecino, manteniendo el olor predominante propio del aceite esencial de romero. Se ha observado que el tamaño medio de gota fue de 210.1 ± 4.4 nm y el potencial zeta fue de 25.5 ± 7.9 mV respectivamente.

Tabla 2

Composición química del aceite esencial de “Romero” *Rosmarinus officinalis*

Componente	Área (%)	RT (Min)	Formula Molecular
α -Pinoeno	25.53	10.425	C ₁₀ H ₁₆
Eucaliptol	24.17	21.499	C ₁₀ H ₁₈ O
Canfeno	7.12	11.380	C ₁₀ H ₁₆
Alcanfor	6.41	38.799	C ₁₀ H ₁₆ O
Mirceno	3.92	16.153	C ₁₀ H ₁₆
β -Pinoeno	3.30	13.920	C ₁₀ H ₁₆
3-Octano	3.13	15.655	C ₈ H ₁₆ O
Borneol	3.07	40.731	C ₁₀ H ₁₈ O

Fuente: Elaboración propia.

4.2. Eficacia antiparasitaria *in vitro*

Todas las concentraciones testeadas en el ensayo *in vitro* dieron como resultado la mortalidad del 100% de los monogéneos, en donde la concentración más alta de 2300 mg/L en un tiempo de acción de 10 minutos alcanzó su 100% de eficacia, en contraste con la

concentración más baja que fue de 150 mg/L, que recién en 150 minutos de exposición, logró la eficacia deseada (Figura 2).

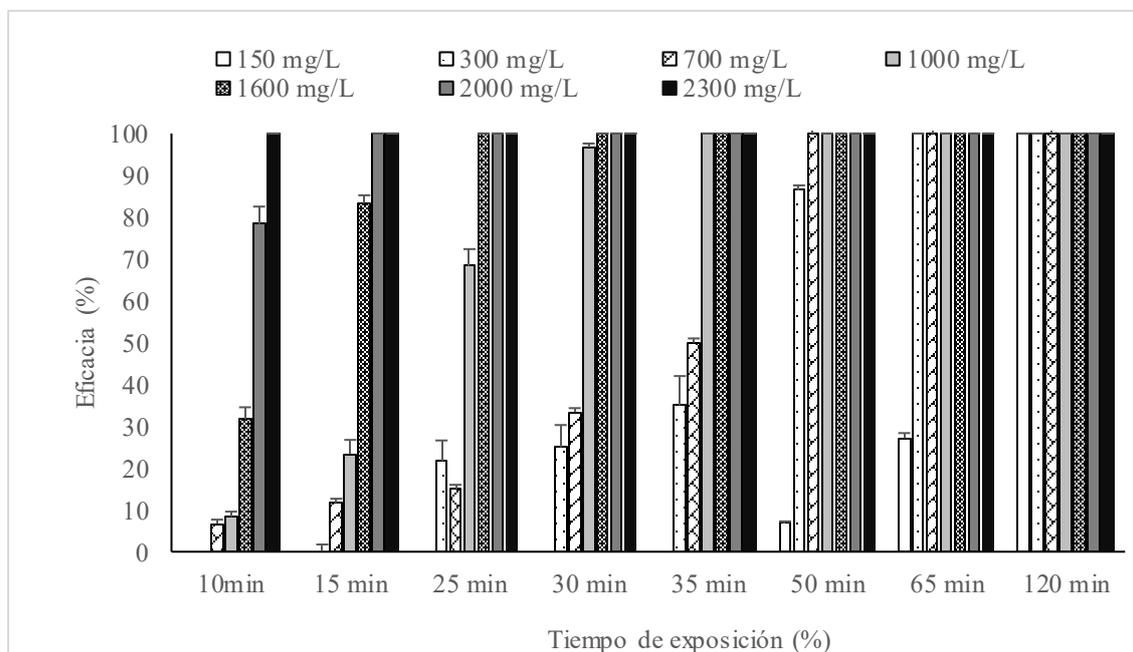


Figura 2. Eficacia antiparasitaria *in vitro* de diferentes concentraciones de nanoemulsi on del aceite esencial de *Rosmarinus officianalis*.

Fuente: Elaboración propia.

4.3. Test de tolerancia

En el test de tolerancia se evaluó la resistencia de los peces a cinco concentraciones 50, 100, 500, 1000 y 2000 mg/L, tomando como base los resultados del ensayo *in vitro*, resultando así que la concentración de 50 mg/L no presentó mortalidad en los peces en los 50 minutos de baños realizado, en comparación con las demás concentraciones que en el transcurso del test mostraron mortalidad, debido a la poca resistencia del pez al tratamiento. Durante los test de tolerancia los peces presentaron principalmente características como: agitación, natación de costado, letargo y muerte (Tabla 3).

Tabla 3

Mortalidad y Comportamiento de los peces sometidos a diferentes concentraciones por un intervalo de tiempo

Concentraciones (mg/L)	Mortalidad (%)	Tiempo (min)	Cambios de comportamientos de los peces
50	0	0h	Inicio de experimento (Todos los peces con comportamiento normal)
	0	5min	Natación de costado, evitan nadar en cardumen
	0	10min	Respiración acelerada
	0	20min	Dilatación de boca
	0	30min	Agitación, aceleración opercular
	0	50 min	Fin de experimento
100	0	0h	Inicio de experimento
	0	5min	Natación de costado, separación del cardumen
	0	10min	Natación de costado, agitación opercular
	0	20min	Letargo, pero responde a estímulo
	10	30min	Letargo, pero responde a estímulo, muerte
	30	50min	Letargo y muerte (Fin de experimento)
500	0	0h	Inicio de experimento
	0	5min	Movimiento acelerado
	0	10min	Agitación opercular
	0	20min	Agitación opercular, peces en superficie para captar oxígeno
	40	30min	Agitación opercular, saltos, peces en superficie para captar oxígeno, muerte
	100	50 min	Letargo y muerte (Fin de experimento)
1000	0	0h	Inicio de experimento
	0	5min	Movimiento acelerado
	0	10min	Agitación opercular
	10	20min	Agitación opercular, saltos, letargo
	70	30min	Letargo, muerte
	100	50 min	Letargo, muerte
2000	0	0h	Inicio de experimento
	0	5min	Movimiento acelerado

0	10min	Agitación opercular
10	20min	Agitación opercular, saltos, letargo, muerte
90	30min	Letargo, muerte
100	50 min	Letargo, muerte

Fuente: Elaboración propia.

4.4. Índices antiparasitarios y eficacia antihelmíntica después de 3 y 6 días de baños terapéuticos con la nanoemulsión del aceite esencial de *R. officinalis*

Después de tres días consecutivos de baños terapéuticos con la nanoemulsión del aceite esencial de *R. officinalis* a la concentración de 50 mg/L la abundancia media de *A. spathulatus* y *A. penilabiatus* disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en comparación a los grupos controles agua y agua + Tween 20 (Tabla 4). La prevalencia se mantuvo en un 100% para *A. spathulatus* en todos los tratamientos. La nanoemulsión a la concentración de 50 mg /L disminuyó significativamente ($P < 0.05$) la abundancia media de *A. spathulatus* y *A. penilabiatus* en comparación a los grupos controles después de seis días consecutivos de baños (Tabla 5), pero el monogeneo *M. viatorum* fue el menos abundante y prevalente en las branquias de *P. brachypomus* (Tabla 5). La eficacia del tratamiento con nanoemulsión a 50 mg/L después de tres días fue de 90% y después de seis días de baños consecutivos fue del 98%.

Tabla 4.

Prevalencia (P) y Abundancia media (AM) de monogeenos presentes en branquias de P. brachypomus después de 3 días de baños terapéuticos con nanoemulsión (NNMS) del aceite esencial de Rosmarinus officinalis

TRATAMIENTOS		AGUA		AGUA + TWEEN 20		NANOEMULSION	
ESPECIES DE PARÁSITOS	P (%)	MA	P (%)	MA	P (%)	MA	
<i>A. spathulathus</i>	100	359.5 ± 90.3a	100	140.6 ± 38.8c	100	34.3 ± 7.37b	
<i>A. pennilabiathus</i>	88.9	5.2 ± 4.9b	100	18.5 ± 12.4a	88.9	2.8 ± 1.7b	
<i>M. viatorum</i>	88.9	5.2 ± 4.9a	0	0.0 ± 0.0b	0	0.0 ± 0.0b	

Los valores se presentan como promedio ± Desviación estándar (DS). Los valores en la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5.

Prevalencia (P) y Abundancia media (AM) de monogeenos presentes en branquias de P. brachypomus después de 6 días de baños terapéuticos con nanoemulsión (NNMS) del aceite esencial de Rosmarinus officinalis

TRATAMIENTOS		AGUA		AGUA + TWEEN 20		NANOEMULSION	
ESPECIES DE PARÁSITOS	P (%)	MA	P (%)	MA	P (%)	MA	
<i>A. spathulathus</i>	100	376.4 ± 120.4a	100	111.5 ± 16.7c	100	6.0 ± 2.12b	
<i>A. pennilabiathus</i>	93.33333333	6.2 ± 5.5b	100	13.6 ± 5.4a	80	1.93 ± 1.48b	
<i>M. viatorum</i>	100	3.5 ± 2.7a	26.66666667	0.8 ± 1.5b	26.66666667	0.4 ± 0.7b	

Los valores se presentan como promedio ± Desviación estándar (DS). Los valores en la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las plantas aromáticas tienen la propiedad de generar aceites esenciales, en la presente investigación se trabajó con *Rosmarinus officinalis* la cual presentó como compuestos mayoritarios α -Pino, Eucaliptol, Canfeno y Alcanfor, difiriendo de los resultados obtenidos por Leporini et al. (2020) quien trabajó con el aceite esencial extraído de una región de Italia presentando como compuestos mayoritarios 1,8-Cineole, Alcanfor, α -Pino y β -Pino.

En lo que respecta a la eficacia antiparasitaria in vitro de la nanoemulsión del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, el estudio se centró en medir la eficacia en función del tiempo de exposición, siguiendo una metodología similar a la empleada por Soares et al. (2016). En este estudio se encontró algunas similitudes notables con Gonzales et al. (2022) quienes trabajaron con la concentración de 1000 mg/L, ya que la eficacia de 100% la consiguen en 20 minutos de exposición, mientras que en el trabajo presente se logra en 30 minutos. Es importante destacar que la diferencia clave radica en que nuestro estudio utilizó nanoemulsión, mientras que Gonzales trabajó con concentraciones del mismo aceite esencial en su forma no emulsionada. Estas discrepancias en los resultados pueden atribuirse a la influencia de la nanoemulsión en la velocidad de liberación y la biodisponibilidad del aceite esencial, lo que subraya la importancia de la formulación en la optimización de su acción antimonogénea (Valentim et al., 2018)

Los resultados del test de tolerancia, que involucraron un tiempo de exposición de 50 minutos a la nanoemulsión de *Rosmarinus officinalis* en *Piaractus brachipomus*, presentan una variación notable en comparación con el estudio de Malheiros et al. (2020), quienes trabajaron con *Colossoma macropomum* utilizando la nanoemulsión de la oleoresina de *Copaifera reticulata*, ambas especies pertenecientes a la subfamilia Serralmisidae. En particular, Malheiros y su equipo no registraron ninguna muerte en sus individuos en ninguna

de las concentraciones probadas, mientras que en nuestro estudio la mortalidad comenzó a manifestarse a partir de una concentración de 100 mg/L.

En los baños terapéuticos con nanoemulsión de *Rosmarinus officinalis*, se observó una eficacia del 98% en tan solo 6 días, lo que indica que este tratamiento resulta altamente efectivo en el control de los monogéneos, específicamente de las especies *A. spathulatus*, *A. penilabiatus* y *M. viatorum*. Estos resultados coinciden con los hallazgos previamente reportados por Negreiros y Tavares-Dias (2019) en *Piaractus brachypomus*. Estas similitudes en los resultados respaldan la efectividad consistente de la nanoemulsión de *Rosmarinus officinalis* como un agente terapéutico prometedor en el control de monogéneos en peces, lo que tiene implicaciones significativas para la salud y la gestión de poblaciones de peces en entornos acuáticos.

Es importante destacar el uso de los aceites esenciales nanoemulsionados en acuicultura proveen de mejores resultados que su uso puro, como en Gonzales et al. (2022) con el uso de *Rosmarinus officinalis*. Así mismo su uso permite trabajar con concentraciones terapéuticas más bajas, a la par que los metabolitos secundarios ejercen mejor sus propiedades antibacterianos, antihelmínticos, antiparasitarios (Anwer et al., 2014)

VI. CONCLUSIONES

6.1. En el presente estudio los análisis in vitro demostraron que a todas las concentraciones de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* nanoemulsionadas lograron un 100% de eficacia (Y) en función a diferentes tiempos de exposición (X).

6.2. Con respecto al Test de tolerancia se llegó a la conclusión que la óptima concentración y tiempo de exposición es de 50 mg/L a 50 minutos, ya que al mismo tiempo las otras concentraciones provocaban letargo y muerte en *Piaractus brachyomus*, lo cual no era el objetivo de este estudio.

6.3. En última instancia los resultados obtenidos en los baños terapéuticos nos dan la certeza de afirmar que la nanoemulsión del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* es una opción viable para combatir los monogeneos en *Piaractus brachyomus* en su etapa juvenil, debido a que en 3 días de baños se obtuvo un 90% de eficacia y en los 6 días expuestos se logró un 98% de eficacia contra los monogeneos branquiales.

6.4. Los resultados de este estudio respaldan la eficacia de la forma nanoemulsionada del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en potenciar las propiedades antiparasitarias de sus metabolitos secundarios, permitiendo su uso a concentraciones más bajas y su dilución en agua para el tratamiento. Esto representa una alternativa sostenible frente a los productos químicos tradicionales, que han causado daños significativos en el ecosistema acuático. La nanoemulsión de aceite esencial de "romero se posiciona como una estrategia efectiva para el control de parásitos en la acuicultura, promoviendo soluciones amigables con el medio ambiente.

VII. RECOMENDACIONES

7.1. Enfocar futuras investigaciones en el desarrollo y aplicación de nanoemulsiones, ya que estas ofrecen un potencial significativo para aprovechar de manera más efectiva los metabolitos esenciales presentes en las plantas aromáticas.

7.2. Utilizar diversos tipos de aceites esenciales que posean capacidad antihelmíntica contra monogeneos en *Piaractus brachypomus*.

7.3. Se recomienda encarecidamente el uso de nanoemulsiones como una forma altamente efectiva de diluir y aplicar aceites esenciales en medios acuáticos para combatir monogeneos.

7.4. Se recomienda la continua investigación y aplicación de las nuevas tecnologías emergentes en el campo acuícola nacional. Esto permitirá promover prácticas innovadoras y mejorar la gestión de enfermedades parasitarias en la acuicultura, contribuyendo así al desarrollo sostenible de la industria.

VIII. REFERENCIAS

- Alves, C. M. G., Nogueira, J. N., Luz, J. G. R., Chaves, F. C. M., & Tavares-Dias, M. (2021). Essential oil of *Piper callosum*, *Piper hispidum* and *Piper marginatum* (Piperaceae) possesses in vitro efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (tambaqui). *Aquaculture Research*, 52(12), 6107-6116. <https://doi.org/10.1111/are.15473>
- Anwer, M. K., Jamil, S., Ibnouf, E. O., & Shakeel, F. (2014). Enhanced Antibacterial Effects of Clove Essential Oil by Nanoemulsion. *Journal of Oleo Science*, 63(4), 347-354. <https://doi.org/10.5650/jos.ess13213>
- Bajerski, L., Michels, L. R., Colomé, L. M., Bender, E. A., Freddo, R. J., Bruxel, F., & Haas, S. E. (2016). The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: An update on preparation and biological applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 347-363. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502016000300001>
- Barriga, I., Gonzales Flores, A., Renato, A., Castro, K., & Tavares-Dias, M. (2020). Essential oil of *Lippia grata* (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in *Colossoma macropomum* gills, a large Serrasalmidae fish from Amazon. *Aquaculture Research*, 51. <https://doi.org/10.1111/are.14728>
- Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., & Carvalho, J. C. T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29-45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038>
- Brito, M. S., & Tavares-Dias, M. (2016). Comunidades de parasitos metazoários em *Piaractus brachypomus* (Pisces, Serrasalmidae) no baixo Rio Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25, 151-157. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016022>
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575-583. <https://www.jstor.org/stable/3284227>

- Crespo, J. F. (2003). Monogeneos, parásitos de peces en México: Estudio recapitulativo. Técnica Pecuaria en México, vol. 41, núm. 2, mayo-agosto, 2003, pp. 175-192 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Mérida, México
<https://www.redalyc.org/pdf/613/61341205.pdf>
- Dawood, M. A. O., El Basuini, M. F., Zaineldin, A. I., Yilmaz, S., Hasan, M. T., Ahmadifar, E., El Asely, A. M., Abdel-Latif, H. M. R., Alagawany, M., Abu-Elala, N. M., Van Doan, H., & Sewilam, H. (2021). Antiparasitic and Antibacterial Functionality of Essential Oils: An Alternative Approach for Sustainable Aquaculture. *Pathogens*, 10(2), 185.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10020185>
- De Oliveira Hashimoto, G. S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>
- DIREPRO. (2010). Proyecto “Fortalecimiento de capacidades para la producción piscícola en la región de Madre de Dios”. Libro de Catastro Acuícola de la Región de Madre de Dios.
<http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/Informe-Final-Catastro-Acuicola-Madre-de-Dios.pdf>
- Ebrahimi, E., Haghjou, M., Nematollahi, A., & Goudarzian, F. (2020). Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture*, 521, 734909. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734909>
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., 2006. Métodos de estudos e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Editora UEM, Maringá 173 pp.
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-402501>
- FAO (2010). Peces nativos de agua dulce de America del Sur de interes para la acuicultura: Una sintesis del estado de desarrollo tecnologico de su cultivo. Serie Acuicultura en Latinoamerica (FAO). <http://www.fao.org/docrep/014/i1773s/i1773s.pdf>

FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020.

<https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229es>

Flores-Villa, E., Sáenz-Galindo, A., Castañeda-Facio, A. O., & Narro-Céspedes, R. I. (2020). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): Su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 23.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>

GOLDAGENTS. (s.f.). Aditivo emulsionante Polisorbato 20 Poe Sorbitan Monolaurate Tween 20 Suministro de Planta CAS 9005-64-5 E432 con Kosher y Halal/ISO/ Rspo https://es.made-in-china.com/co_24032a4f311897b7/product_Emulsifier-Polysorbate-20-Tween-20-Poe-Sorbitan-Monolaurate-Made-From-Plant-CAS-9005-64-5-E432-with-Kosher-Halal-ISO-Rspo_uroooryoug.html

Gomes, W., Guidelli, G., & Portz, L. (2009). Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. Boletim do Instituto de Pesca, 35(2), 35 - 341.

<https://institutodepesca.org/index.php/bip/article/view/864/846>

Gonzales, A., Oba, E. T., Delgado, P., Mertins, O., Chaves, F. C. M., Videira, M. N., & Tavares-Dias, M. (2020). Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. *Aquaculture*, volumen 528, 735500.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735500>

Gonzales, A., Mamani, V., Pereyra, M., Aguilar, E., Delgado, P., Tavares-Dias, M. & Fernández-Méndez, C. (2022). In vitro efficacy and tolerance of the essential oils of three species of the Lamiaceae family against monogeneans from the gills of *Piaractus brachypomus* from the Peruvian Amazon. *Aquaculture International* 30, pages2245–2261.

<https://doi.org/10.1007/s10499-022-00900-z>

Gonzales, A., Santos, G. G., & Tavares-Dias, M. (2019). Anthelmintic potential of the *Ficus insipida* latex on monogeneans of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), a medicinal plant from the Amazon. *Acta Parasitologica*, 64(4), 927-931. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00094-0>

Hoai, T. D. (2020). Reproductive strategies of parasitic flatworms (Platyhelminthes, Monogenea): The impact on parasite management in aquaculture. *Aquaculture International*, 28(1), 421-447. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00471-6>

Leporini, M., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Passalacqua, N. G., & Tundis, R. (2020). The Essential Oil of *Salvia rosmarinus* Spenn. from Italy as a Source of Health-Promoting Compounds: Chemical Profile and Antioxidant and Cholinesterase Inhibitory Activity. *Plants*, 9(6), 798. <https://doi.org/10.3390/plants9060798>

Malheiros, D. F., Sarquis, I. R., Ferreira, I. M., Mathews, P. D., Mertins, O., & Tavares-Dias, M. (2020). Nanoemulsions with oleoresin of *Copaifera reticulata* (Leguminosae) improve anthelmintic efficacy in the control of monogenean parasites when compared to oleoresin without nanoformulation. *Journal of Fish Diseases*, 43(6), 687-695. <https://doi.org/10.1111/jfd.13168>

Martínez M. A.(2003), Aceites esenciales. https://medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf

Mendoza, D. (2013). Situación del extensionismo acuícola en el Perú, dirección de acuicultura, ministerio de la producción. Lima, Perú. 2013. 14p. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/36306735/Informe_Extensionismo_Peru-libre.pdf?1421525787=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DInforme_Extensionismo_Peru.pdf&Expires=1697083554&Signature=P0TnxwblnwsyruKA8a5EN0vyFMswc-Z3FVEqed1ZsMoMk8cABR~VC6z4dJe8JRBp5Y-

elnmyHEadeYcersJ~XEADonlasCefeKIrOcEebI0n-
DQEGUQKeGsVYWK7ffAGYDCzEpfXT8jWN38ERshl0Mcs9W-
SNt04nrdfTssxj1imFTXn7IHtlgNXXk0xfyQfkvZUuVFggOjdJ8sw7rw3R4XT74FOXRxile5
xsCdd0Bp-
eQLv5LHh0a~gKRyEsku0UJkBv0y6BgFzf6xzfL4kb0mx~0ncv15SCUfX8YysOIZJRW~vUv
3Y82~3418SyeCjRbjb80ry8IXUQUvUoknVVmQ &Key-Pair-
Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Mesa-Granda, M. N., & Botero-Aguirre, M. C. (2007). La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, vol. 20, núm. 1, marzo-junio, 2007, pp. 79-86 Universidad de Antioquia Medellín, Colombia. <https://www.redalyc.org/pdf/2950/295023036010.pdf>

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
<https://doi.org/10.3390/ph6121451>

Negreiros, L. P., & Tavares-Dias, M. (2019). Parasites in farmed *Piaractus brachypomus* (Serrasalmidae) in the state of Acre, western Brazilian Amazonia. *Acta Amazonica*, 49, 294-298. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201900491>

PRODUCE. (2014). Especies cultivadas en el Perú.
<http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/boletines/FICHAS%20PRINCIPALES%20ESPECIES.pdf>

Schalch, S. H. C., Tavares-Dias, M., & Onaka, M. (2009). Principais métodos terapêuticos para peixes em cultivo. In: *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo* Tavares-Dias, M. (Organizador). Embrapa Amapá, Macapá. ap. 22, p. 575-601.
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/353400>

Shah, B. R., & Mraz, J. (2020). Advances in nanotechnology for sustainable aquaculture and fisheries. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 925-942. <https://doi.org/10.1111/raq.12356>

- Shinn AJ, Pratoomyot J, Bron J, Paladini G, Brooker E, Brooker A. (2015). Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. *Global Aquaculture Advocate*.
<https://www.globalseafood.org/advocate/economic-impacts-of-aquatic-parasites-on-global-finfish-production/>
- Sibaja, A. I., Ramos, E., de Oliveira, J., & Fernandez, L. (2019). Trends in aquaculture sciences: From now to use of nanotechnology for disease control. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 119-132.
<https://doi.org/10.1111/raq.12229>
- Soares, B. V., Cardoso, A. C. F., Campos, R. R., Gonçalves, B. B., Santos, G. G., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., & Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 469, 72-78.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>
- Soares, B. V., Neves, L. R., Ferreira, D. O., Oliveira, M. S. B., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., Gonçalves, R. A., & Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Veterinary Parasitology*, volume 234, 49-56.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.012>
- Soares, B. V., Neves, L. R., Oliveira, M. S. B., Chaves, F. C. M., Dias, M. K. R., Chagas, E. C., & Tavares-Dias, M. (2016). Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, 452, 107-114.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>
- Tello Martín, S. (2002). Situación actual de la pesca y la acuicultura en Madre de Dios: Reporte de viaje. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.
<https://repositorio.iiap.gob.pe/handle/20.500.12921/199>

- Valentim, D. S. S., Duarte, J. L., Oliveira, A. E. M. F. M., Cruz, R. a. S., Carvalho, J. C. T., Conceição, E. C., Fernandes, C. P., & Tavares-Dias, M. (20187). Nanoemulsion from essential oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows in vitro efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalmidae). *Journal of Fish Diseases*, 41(3), 443-449. <https://doi.org/10.1111/jfd.12739>
- Valentim, D. S. S., Duarte, J. L., Oliveira, A. E. M. F. M., Cruz, R. a S., Carvalho, J. C. T., Solans, C., Fernandes, C. P., & Tavares-Dias, M. (2018). Effects of a nanoemulsion with *Copaifera officinalis* oleoresin against monogenean parasites of *Colossoma macropomum*: A Neotropical Serrasalmidae. *Journal of Fish Diseases*, 41(7), 1041-1048. <https://doi.org/10.1111/jfd.12793>
- Verján, N., Iregui, C. A., Rey, A. L., & Donado, P. (2001). Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: Algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente. *Revista AquaTIC*, nº 15. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1505/cachama.htm>
- Zhang, X. P., Li, W. X., Ai, T. S., Zou, H., Wu, S. G., & Wang, G. T. (2014). The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture*, 420-421, 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.022>
- Zoral, M. A., Futami, K., Endo, M., Maita, M., & Katagiri, T. (2017). Anthelmintic activity of *Rosmarinus officinalis* against *Dactylogyrus minutus* (Monogenea) infections in *Cyprinus carpio*. *Veterinary Parasitology*, 247, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.013>

IX. ANEXOS

ANEXO A. Recepción y aclimatación de “Pacos” *Piaractus brachypomus* en la estación del IIAP – Madre de Dios



ANEXO B.
officinalis

Elaboración de la nanoemulsión de “Romero” *Rosmarinus*



ANEXO C. Baños terapéuticos con nanoemulsión de *Rosmarinus officinalis*



ANEXO D. Disección y separación de branquias para parasitología

ANEXO E. Conteo parasitario en branquias de “paco” *Piaractus brachypomus*



**ANEXO F. Equipo de investigación de organismos acuáticos del IIAP –
Madre de Dios**

