

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Blend* DE TANINOS
COMERCIALCONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS PARA
PEIXES

Discente: Mariana de Oliveira Nascimento

Orientadora: Fabiana Pilarski

Coorientador: Daniel de Abreu Reis Ferreira

Jaboticabal-SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Blend* DE TANINOS
COMERCIAL CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS PARA
PEIXES

Mariana de Oliveira Nascimento

Orientadora: Fabiana Pilarski

Coorientador: Daniel de Abreu Reis Ferreira

Trabalho de Conclusão de Curso (Iniciação Científica)
apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para
graduação em Zootecnia.

Jaboticabal-SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

N244a	Nascimento, Mariana de Oliveira Atividade Antimicrobiana de Blend de Taninos Comercial Contra Bactérias Patogênicas Para Peixes / Mariana de Oliveira Nascimento. -- Jaboticabal, 2024 45 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Fabiana Pilarski Coorientador: Daniel de Abreu Reis Ferreira 1. Doenças dos Peixes. 2. Antimicrobiano. 3. Aditivos fitogênicos. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus Jaboticabal



MARIANA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

TÍTULO DO TRABALHO ACADÊMICO: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Blend*
DE TANINOS COMERCIAL CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS PARA PEIXES.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

Coorientador (se houver): Daniel de Abreu Reis Ferreira

Área de Concentração: Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos

Data da defesa: 16/09/2024

(X) Aprovado

() Reprovado

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANA PILARSKI
Data: 16/10/2024 09:00:45-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Profa. Dra. Fabiana Pilarski

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIA MAYUMI ISHIKAWA
Data: 11/10/2024 18:12:59-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Membro: Marcia Mayumi Ishikawa

Embrapa Meio Ambiente - Jaguariúna, SP

Documento assinado digitalmente
gov.br ELIELMA LIMA DE SOUSA
Data: 11/10/2024 16:40:16-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Membro: Elielma Lima de Sousa

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: / /

unesp

Assinado de forma digital
por Leonardo Susumu
Takahashi: 27303089896
Dados: 2024.10.16
12:56:04 -03'00'

Coordenador Executivo

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Seção Técnica de Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal/SP - Brasil
Tel (16) 3209 7106 e-mail: graduacao.fcav@unesp.br - www.fcav.unesp.br

EPÍGRAFE

“A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso! Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

(CHICO XAVIER, 1910 - 2002)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Alcides e Walkiria, aos meus avós Octaviano (*in memorian*) e Maria de Lourdes e a todas as pessoas que participaram do meu aprendizado e crescimento. Todos tiveram grande importância durante cada etapa trilhada até aqui.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus, que permitiu que eu chegasse até aqui, com saúde, força, resiliência e perseverança.

À Unesp – FCAV, por me dar a oportunidade de me tornar uma zootecnista, espero poder compartilhar todo meu conhecimento adquirido ao longo desses 5 anos. Sou grata por terem mudado minha vida e proporcionado momentos únicos que levarei comigo.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) e a todos os funcionários e prestadores de serviços, que de algum modo, me ajudaram na realização do meu trabalho.

Ao LAPOA (Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos) e seus membros, por terem me acolhido como uma família, terem me auxiliado e ensinado tanto, em especial Alex, Daiane, Daniel, Débora, Elielma, Ericson, Gabriel e Inácio. Obrigada pelo crescimento, tanto científico quanto profissional e por todo aprendizado, prozas e risadas.

À minha orientadora Fabiana Pilarski, por toda compreensão, paciência, ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidas.

Ao meu coorientador Daniel que desempenhou um papel muito importante no meu aprendizado, sou grata por toda compreensão, paciência, auxílio e principalmente de ter me escutado e apoiado em todas as minhas ideias e decisões.

Aos meus pais Alcides e Walkiria que são a minha base, sem os quais esse sonho não seria possível, pelo apoio e incentivo durante toda minha vida e por serem

presentes em todas as etapas. Sou grata por nunca terem soltado a minha mão! Amo muito vocês!

Ao meu irmão Rafael que sempre esteve ao meu lado, ao qual agradeço imensamente por todo apoio e incentivo e à minha cunhada Márcia, que sempre esteve me aconselhando e me apoiando.

Aos meus avós Otaviano (*in memorian*) e Maria, que sempre me aconselharam, apoiaram e incentivaram, sou imensamente grata por tudo que fizeram e nunca me deixaram desistir. Aos meus tios, tias e primos, que sempre me aconselharam, apoiaram e incentivaram.

À minha amiga e irmã Vanessa, por sempre estar ao meu lado sendo minha companheira de vida, sempre me aconselhando, incentivando e apoiando. Sou muito grata por esses 20 anos de amizade!

Aos meus amigos de Campinas que sempre estiveram ao meu lado, em especial Bruna, Daniel Lucas, Jacqueline, Michel, Pedro, Rafael e Thiago (*in memorian*).

Aos irmãos que a FCAV me deu, Larissa e Willian, vou levar vocês para vida, sou muito grata pela amizade de vocês, pelo tempo que moramos juntos e por todos os momentos compartilhados de alegrias e tristezas. Aos amigos, Isabela Milla, Luís Gustavo, Paulo e Victória e a todos os meus colegas do Curso de Zootecnia e da FCAV, que de algum modo contribuíram para minha formação. Quero agradecer a companhia, atenção e carinho de todos, amo todos vocês!

Ao meu companheiro de vida, Marco Aurélio que esteve ao meu lado desde o começo e ao final da faculdade, sou grata pela companhia, atenção, carinho e de sempre me apoiar e incentivar. Foram muitos desafios a serem enfrentados e muitas conquistas alcançadas, você é muito especial para mim.

SUMÁRIO

EPÍGRAFE.....	I
DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTO	III
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Aquicultura no Brasil e no mundo	3
3.2. Riscos do uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças em peixes.....	5
3.3. Uso de fitoterápicos no tratamento de doenças na piscicultura	6
3.4. Taninos	7
3.5. Protocolos de segurança para uso de aditivos na saúde animal	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.1. Origem dos taninos	8
4.2. Cepas bacterianas e condições de cultivo	9
4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	10
5. RESULTADO	14

5.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).	14
5.2. Atividade hemolítica do <i>blend</i> de taninos comercial contra eritrócitos da tilápia-do-Nilo	15
6. DISCUSSÃO.....	16
7. CONCLUSÃO.....	19
8. RESUMO.....	19
9. SUMMARY	20
10. REFERÊNCIA.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparo do blend de tanino; (A) pesagem e (B) diluição com dimetilsulfóxido (DMSO).....	9
Figura 2. Cepas cultivadas em placas de Petri com meio de cultura específico para cada bactéria, de acordo com os protocolos do CLSI.	10
Figura 3. Material utilizado para o Teste de Microdiluição em Caldo, os quais foram esterilizados e mantidos na cabine de segurança (Veeco).	11
Figura 4. Preparo das placas de 96 poços para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).	12
Figura 5. Demonstração em diferentes doses que o composto foi citotóxico, apresentando forte atividade hemolítica. Formação de pellets na cor marrom evidenciam que as células foram lisadas.	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do blend de taninos comercial, representada pelo CIM contra bactérias isoladas de peixes..... 14

Tabela 2. Resultado do teste de citotoxicidade em placa, mostrando a ação do blend de taninos comercial em eritrócitos de tilápia-do-Nilo. Colunas A-C (linha 1-10) tanino + eritrócitos; (linhas 11) controle negativo: PBS + eritrócitos e (linha 12) controle positivo: Triton 1% + eritrócitos, coluna D-F (linhas 1-10) tanino + PBS, coluna H (linhas 1-12) tanino + eritrócitos + Triton 1% e eritrócitos. 15

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países com maior potencial para a produção de peixes de água doce em todo o mundo, ocupando a 8ª posição no *ranking* mundial (FAO 2020, CONAB, 2022). Características do país como disponibilidade hídrica, clima e diferentes espécies com potencial de produção contribuem para este cenário (VALENTI et al., 2021). Em 2022, o Brasil atingiu 887,029 toneladas com a produção de peixes cultivados, arrecadando cerca R\$ 9 bilhões de reais (PEIXE BR, 2023). Dentre as espécies mais produzidas no Brasil, destaca-se a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), com produção anual de 579,080 mil toneladas em 2023 (PEIXE BR, 2024).

Entretanto, a intensificação da produção pode ocasionar queda na qualidade de água, aumentando as concentrações de amônia, nitrato e nitrito, influenciando negativamente na produção e, consequentemente, tornando os animais mais susceptíveis a doenças (IWASHITA e MACIEL, 2013), resultando na redução do desempenho produtivo, aumento da mortalidade e do descarte de animais no frigorífico (JUNIOR et al., 2020).

Dentre os patógenos que acometem a tilapicultura brasileira (LEIRA et al., 2016), destacam-se as bacterioses causadas por *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila* (JANDA e ABBOTT, 2010; NICHOLSON, 2020), *Aeromonas jandaei* (ASSANE et al., 2021), *Citrobacter freundii* (DE PADUA, 2014), *Edwardsiella tarda* (MINIERO, Davies et al., 2018), *Pseudomonas putida* (ALZHRANI et al., 2022), *Streptococcus agalactiae* (MARCUSO et al., 2015), *Francisella orientalis* (RAGHIANTE, 2017; FERNANDEZ-Alarcon et al., 2019), *Lactococcus garvieae* e *Lactococcus petauri* (EGGER et al., 2023) e *Flavobacterium oreochromis* (SEBASTIÃO et al., 2013).

Diversos estudos demonstram que a maioria destas espécies bacterianas apresentam resistência aos antimicrobianos utilizados na aquicultura mundial (ASSANE et al., 2019; SCHAR et al., 2020; PEP& FOCARDI, 2021). Além da resistência, o tempo residual dos antimicrobianos na carne do pescado também gera preocupação na saúde humana (SERWECINSKA, 2020).

Dessa forma, o uso de aditivos funcionais em rações vem ganhando atenção como alternativa para diminuir o uso de antimicrobianos na aquicultura. Dentre estes aditivos, os taninos extraídos de plantas vêm se destacando no decorrer dos anos. Eles são amplamente reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e de interação com as proteínas (SOARES, et al., 2020; HUANG et al., 2018). Os taninos demonstraram exercer efeitos benéficos na motilidade intestinal, proteção da barreira intestinal e modulação da microbiota, fortalecimento do sistema imunológico prevenindo doenças como coccidiose e enterite necrótica em monogástricos, bem como timpanismo e acidose em ruminantes (LILLEHOJ et al., 2018; MONIR et al., 2020; VAN DOAN et al., 2020; ALMARRI et al., 2023).

Estudos *in vitro* que comprovem a eficácia desses aditivos contra bactérias patogênicas são de extrema importância. Portanto, este estudo avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* de um produto comercial contendo um *blend* de taninos contra bactérias patogênicas para peixes com a finalidade de verificar o seu potencial no controle dos surtos bacterianos nas pisciculturas brasileiras

2. OBJETIVO

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de composto de taninos comercial contra bactérias patogênicas para peixes, bem como avaliar sua citotoxicidade para tilápia-do-Nilo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aquicultura no Brasil e no mundo

A produção e o consumo de pescado expandiram-se significativamente nas últimas décadas. Os alimentos oriundos da aquicultura, globalmente, contribuíram com aproximadamente 17% da proteína animal e 7% de todas as proteínas em 2019 (FAO, 2022). De acordo com o relatório *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2022), o consumo per capita por ano foi entorno de 20,5 kg em 2019, sendo que, 75% foram de peixes e os 25% restantes de mariscos. Além disso, espécies de água doce equivalem a 40% do consumo proveniente da aquicultura.

A intensificação dos sistemas de produção e a globalização do comércio de produtos aquáticos têm causado o aparecimento e ressurgimento de doenças infecciosas que apresentam importante risco econômico e ambiental (COMBE et al., 2023). Com o passar dos anos, a incidência de doenças que acometem organismos aquáticos tem aumentado, causando sérios prejuízos à aquicultura. A intensificação da produção associada ao manejo inadequado, falta de controle na produção e baixa qualidade da água tem levado ao desenvolvimento e aparecimento principalmente de doenças de origem bacterianas, que muitas vezes acarretam danos irreversíveis e altas taxas de mortalidade (VANEKI- SILVA, 2020; DEBNATH et al., 2023).

O Brasil ocupa um importante papel na produção de peixes mundialmente, ocupando a quarta posição no *ranking* mundial dos maiores produtores de tilápia, com produção de 550 mil toneladas em 2022, representando 8,4% do volume total da produção mundial, com um crescimento 3% em comparação ao ano anterior. Consequentemente, a tilápia continua sendo a espécie mais produzida na piscicultura brasileira, com volume de 63,93% da produção nacional (PEIXE BR, 2023).

As doenças bacterianas na aquicultura restringem consideravelmente sua expansão e seu desenvolvimento, além de causar grandes perdas econômicas (HAENEN et al., 2023). Grande parte das espécies bacterianas consideradas importantes para a piscicultura são patógenos oportunistas, os quais estão presentes tanto na água quanto na microbiota dos peixes saudáveis, podendo causar enfermidades quando o hospedeiro está debilitado. Dentre os fatores estressantes, responsáveis por imunossupressão do sistema imunológico do hospedeiro, destacam-se alterações na qualidade de água, alta densidade de estocagem, manejo incorreto e falta de biossegurança na produção (LEIRA et al., 2016).

Cepas de *Aeromonas* spp., *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* spp., *Lactococcus garvieae*, *Flavobacterium oreochromis* e *Francisella orientalis*, são as mais comumente encontradas na aquicultura brasileira (MEYBURGH et al., 2017; PETTY et al., 2018; CNA BRASIL, 2018; GAZAL et al., 2020; CAVALLI et al., 2021; HAENEN, 2023).

Os sinais clínicos mais comuns nos peixes acometidos por bacterioses são abscessos, ascite, hemorragias, septicemia, lesões subcutâneas, exoftalmia e natação errática, os quais aumentam a morbidade e mortalidade em peixes, ocasionando perdas e prejuízos na produção (CETESB, 1997, SUDHEESH et al., 2017).

3.2. Riscos do uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças em peixes

Antimicrobianos são comumente utilizados para controlar diversas infecções bacterianas em peixes, dentre eles o Florfenicol e a Oxitetraciclina, os quais são os únicos licenciados para uso na aquicultura para controlar doenças bacterianas (GUIDI et al., 2016, SINDAN, 2023). Entretanto, vários antimicrobianos sem registro e aprovação são utilizados, como por exemplo: Tetraciclina, Ampicilina, Estreptomicina, Eritromicina Flumenquina, Kanamicina, Cloranfenicol, Cefuroxima, Enrofloxacin (GASTALHO et al., 2014, SINDAN, 2016). O uso indiscriminado desses fármacos, estão causando uma problemática relacionada à seleção de bactérias resistentes nos sistemas de criação. Devido ao uso inadequado dos antimicrobianos na aquicultura, a resistência não está relacionada somente às bactérias encontradas em peixes, mas também na microbiota bacteriana humana, ambiental e de outros animais, desencadeando problemas de saúde pública (VALLADÃO et al., 2015). Este fenômeno ocorre devido à transferência horizontal de genes de resistência entre as bactérias encontradas no ambiente (BURRIDGE, 2010) e esta transferência pode ter seu risco potencializado por se tratar de ambientes aquáticos (SAPKOTA et al., 2008).

O uso de antimicrobianos para animais de produção teve um aumento significativo relacionado ao consumo global quando comparado a 2010, ano em que foram consumidas 63 toneladas, tendo estimativa de aumento de 67%, com o uso de

105 toneladas até 2030. O Brasil está entre os países que mais utilizam antimicrobianos na produção animal (VAN BOECKEL et al., 2015), ocasionando aumento no número de mortes em pisciculturas decorrente de patógenos multirresistentes, quadro que irá aumentar com o passar do tempo, caso o cenário não seja revertido, colocando em risco tanto a saúde animal, quanto ambiental e humana.

3.3. Uso de fitoterápicos no tratamento de doenças na piscicultura

Uma classe de medicamentos utilizados na piscicultura são os fitoterápicos, os quais apresentam um grande potencial para prevenção e controle de patógenos, através da utilização de substâncias presentes em plantas (TAVECHIO et al., 2009).

Fitoterápicos, em sua definição são produtos obtidos de matéria-prima vegetal ativa (planta medicinal, droga vegetal e derivados), exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática ou paliativa (BRASIL, 2021). Estes compostos apresentam atividade antiparasitária, antimicrobiana e antifúngica (SILVA & FERNANDES- Júnior, 2010; VALLADÃO, 2014).

Mundialmente, tem-se aumentado o interesse em pesquisas sobre antimicrobianos naturais no controle e prevenção de doenças, pois em sua maioria não causam efeitos colaterais, além de não deixarem resíduos contaminantes no ambiente e nos animais (HUTSON et al., 2012; Costa, 2016). Vale salientar que a utilização desses medicamentos tem como principal objetivo reduzir o uso de antimicrobianos, estimulando a resposta imune do animal (HUANG et al., 2013) ou atuando diretamente na inibição do crescimento do patógeno, além de trazer maior sustentabilidade à produção animal, diminuição dos riscos ambientais e humanos, reduzindo a mortalidade e perdas econômicas associadas à segurança do consumidor.

3.4. Taninos

Os taninos são um grupo de compostos polifenólicos vegetais extraídos de plantas e seus componentes, os quais possuem diversas atividades fisiológicas, destacam-se os efeitos antimicrobiano, antiparasitário, antiviral, antioxidante, anti-inflamatório e imunomodulador (BOLÍVAR- RAMÍREZ et al., 2022; HUANG et al., 2018). São compostos por diferentes estruturas químicas, sendo classificados como taninos hidrossolúveis ou condensados (RICCI et al., 2016). Taninos hidrossolúveis são classificados como poliésteres de ácidos fenólicos e não são muito abundantes na natureza. Já os condensados são definidos como polímeros dos flavonoides, em que não ocorre facilmente a quebra por hidrólise e, conseqüentemente, não são absorvidos pelo trato gastrointestinal (CORDÃO et al., 2010). Além disso, os taninos condensados por não serem degradados facilmente, podem ser tóxicos para alguns microrganismos. Todavia, a composição da dieta e suas concentrações, bem como o estado fisiológico do animal, podem acarretar efeitos benéficos ou adversos no desempenho animal (CORDÃO et al., 2010).

De acordo com Morais et al., (2019), a produção de tanino em determinadas espécies vegetais está diretamente relacionada ao fato de possuírem propriedades antimicrobianas, protegendo o vegetal contra patógenos. Os compostos fenólicos têm atividade antimicrobiana porque podem se complexar de forma irreversível com as proteínas da membrana bacteriana, formando uma camada protetora, inibindo a ação das enzimas, impedindo seu crescimento e desenvolvimento, resultando em sua destruição (KACZMAREK, 2020). Vale ressaltar que a eficácia antimicrobiana dos taninos se mostrou mais eficaz contra bactérias Gram-positivas, as quais foram mais susceptíveis

quando comparado com as Gram-negativas, que se mostraram mais resistentes (BELHAOUES e BENSOUILAH, 2020).

3.5. Protocolos de segurança para uso de aditivos na saúde animal

Estudos estão sendo realizados com objetivo de isolar novos princípios ativos a partir de plantas medicinais para diminuir o uso de drogas sintéticas presentes no mercado. As plantas medicinais despertaram grande interesse dos pesquisadores por serem ricas em compostos fitoquímicos biologicamente ativos (SASIDHARAN, 2011; YU et al., 2021). Assim, é de grande importância que os níveis citotóxicos dessas plantas também sejam avaliados contra as células do animal para qual o produto é destinado, para que seja observado o potencial da planta como agente terapêutico e possíveis efeitos colaterais. Deste modo, os compostos bioativos não devem ter nenhum ou pouco efeito tóxico ao animal para que este possa ser efetivo no controle de patógenos (NEMUDZIVHADI e MASOKO, 2014). Assim, os testes de toxicidade são indispensáveis, pois através deste método, riscos associados à determinada substância ou composto podem ser revelados (TEMOTEO et al., 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem dos taninos

O *blend* de taninos (BT) foi obtido da empresa Silvafeed®. Desta forma, 80 mg do composto em pó foi diluído em 350 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA), sendo adicionado PBS até completar 1 mL (Figura 1).

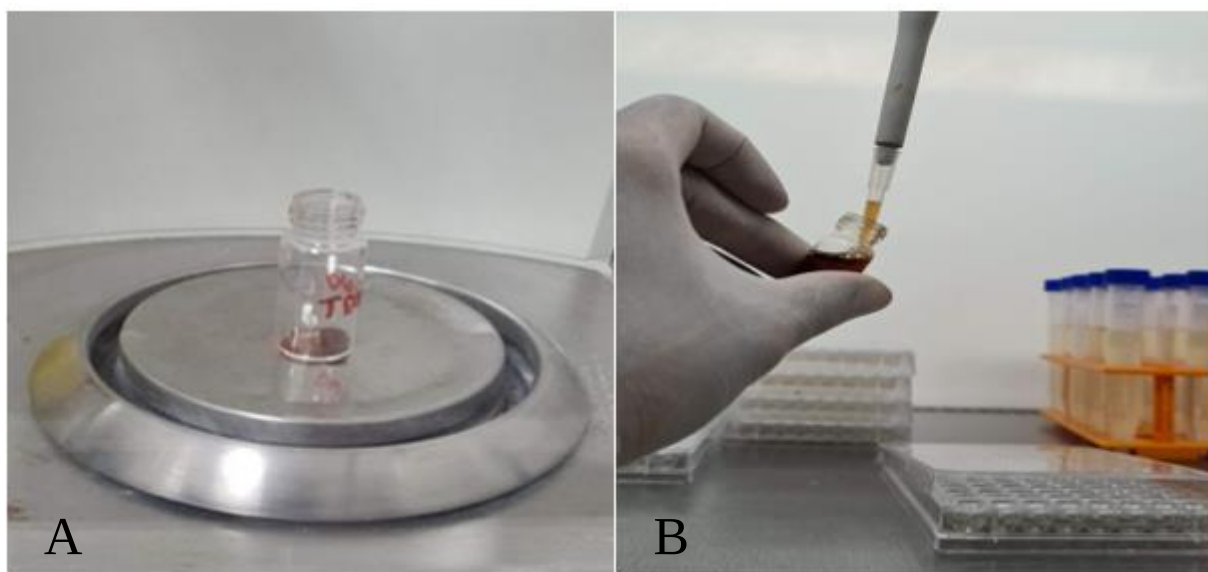


Figura 1. Preparo do blend de tanino; (A) pesagem e (B) diluição com dimetilsulfóxido (DMSO)

4.2. Cepas bacterianas e condições de cultivo

Foram selecionadas oito cepas de bactérias patogênicas para peixes nativos e tilápias, sendo cinco Gram-negativas (*Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella* sp., e *Citrobacter freundii*) e três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae* e *Micrococcus luteus*), com a finalidade de determinar a susceptibilidade *in vitro* frente ao BT (Figura 2). Uma cepa ATCC[®] 25922[™] (*Escherichia coli*) foi utilizada como controle de qualidade do teste, de acordo com protocolo de Microdiluição em Caldo proposto pela CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020a). Esta etapa é fundamental para atribuir confiança aos dados gerados. O antimicrobiano oxitetraciclina (Sigma) (OTC) foi utilizado como medicamento para o controle de qualidade (CLSI, 2020b).



Figura 2. Cepas cultivadas em placas de Petri com meio de cultura específico para cada bactéria, de acordo com os protocolos do CLSI.

4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para obtenção dos valores de corte epidemiológico para o produto testado, as cepas bacterianas foram cultivadas em ágar BHI e após o tempo de cultivo de cada espécie de bactéria, variando de 24-48h em uma temperatura de 28°C, as colônias foram suspensas em solução fosfato (PBS), com a adição de 3 a 5 colônias em microtubo estéril contendo a solução. O conteúdo foi ajustado por absorvância 0,08 – 0,12 a 625 nm em espectrofotômetro (Unico®) para obtenção de solução com aproximadamente 10^8 UFC / mL⁻¹ de acordo com protocolo proposto pela CLSI (CLSI, 2020b). As concentrações 20 - 0,039 mg.mL⁻¹ do composto foram determinadas através do Método de Microdiluição em Caldo, com diluição seriada fator 2 da 1^o-10^a coluna de microplaca de 96 poços com fundo em “U”. O BT foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e

diluído em PBS, obtendo uma solução estoque de 80 mg.mL^{-1} . Anteriormente, a oxitetraciclina (OTC) foi diluída de acordo com as recomendações da CLSI e ajustada com CAMHB (*Cation Adjusted Mueller Hinton Broth*) para o preparo da solução na concentração de $16 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (valor de inibição para ATCC 25922: $0,5 - 2 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1} / 28 \text{ }^{\circ}\text{C} / 24 \text{ horas}$ – CLSI, 2020).

Em seguida o inóculo bacteriano já ajustado foi novamente diluído em meio CAMHB obtendo a concentração final de inóculo de $10^5 - 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$.

Para a realização do teste *in vitro* (figura3), foram adicionados $100 \text{ }\mu\text{L}$ do meio CAMHB em cada poço de microplaca de 96 poços com fundo “U” (Figura 4). Foi adicionado $100 \text{ }\mu\text{L}$ do BT na primeira coluna da placa e o conteúdo foi diluído por diluição seriada fator 2 até a décima coluna, dispensando-o ao final para manter todos os poços com o volume de $100 \text{ }\mu\text{L}$. Após a diluição, foi adicionado $100 \text{ }\mu\text{L}$ de cada inóculo nos poços, com exceção da décima primeira coluna, a qual foi utilizada como controle negativo. As microplacas foram seladas com filme PVC e incubadas a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 horas. As CIMs foram realizadas em triplicatas.



Figura 3. Material utilizado para o Teste de Microdiluição em Caldo, os quais foram esterilizados e mantidos na cabine de segurança (Veeco).

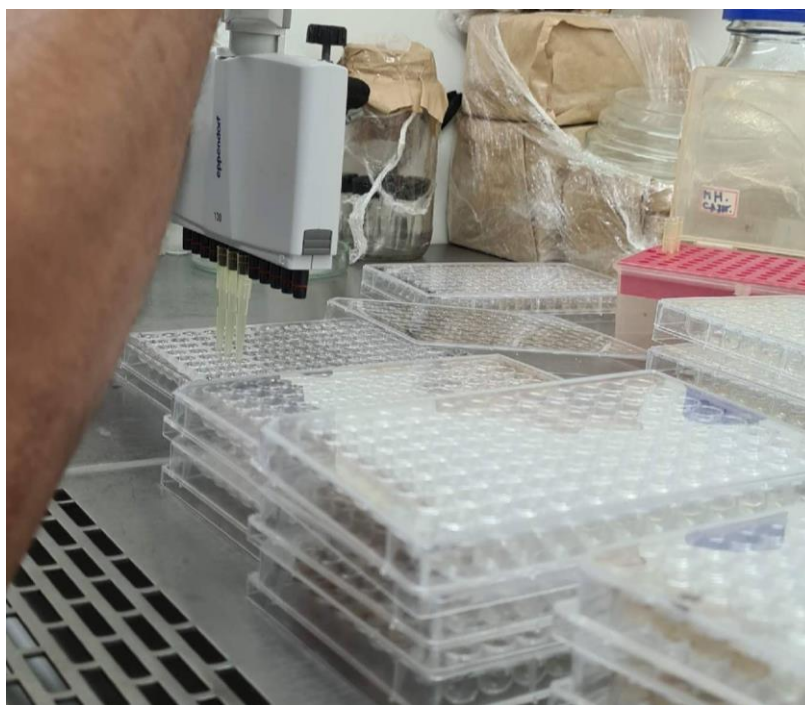


Figura 4. *Preparo das placas de 96 poços para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).*

Após o período de incubação, os poços foram inspecionados visualmente através da adição de 20 μL de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) (Sigma- Aldrich® - 5 mg.mL^{-1}) em todos os poços e observação por 15 minutos. A coloração formada foi observada, sendo constatada a cor rosada apenas nos poços que continham bactéria (essa análise visual serve para avaliar macroscopicamente o crescimento bacteriano, uma vez que alguns compostos podem apresentar cor muito escura dificultando a avaliação). A concentração mais baixa do composto, no qual não houve crescimento visível foi definida como a CIM. Para a determinação da CBM, os três poços com a menor concentração do produto foram plaqueados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton e incubados (mesmo método acima descrito). A presença ou ausência do crescimento bacteriano na placa determinou a atividade como bacteriostática ou bactericida, sendo a CBM o poço com a menor concentração em que não foi verificado crescimento no meio sólido.

4.4 Teste de citotoxicidade para os eritrócitos de tilápia

A análise de citotoxicidade *in vitro* do BT para os eritrócitos (ER) foi realizada para observar a atividade hemolítica do tanino contra os eritrócitos de tilápia-do-Nilo. Para isto, foi utilizada solução Triton 1% como controle positivo (100% de lise) e solução salina tamponada com fosfato (PBS - pH 7,4) como controle negativo (0% de lise).

O sangue fresco foi coletado de juvenis de tilápia saudáveis por punção do vaso caudal, com seringas contendo heparina. Os eritrócitos coletados foram lavados duas vezes por centrifugação (1760 rpm / 5 min, 4 °C) com PBS. Após uma suspensão de eritrócitos a 4% (v/v) (1% ER). Em microtubos (2 mL) contendo 4% ER e diferentes concentrações de tanino (diluições: 40 - 0,0097 (v/v)) ou solução controle de (1% (v/v) Triton X-100 ou PBS), foi realizado a incubação por 1 hora a 28 °C, após, as amostras foram centrifugadas (1760 rpm / 5 min, 4 °C) e 100 µL do sobrenadante foi transferido para microplacas de 96 poços, sendo a absorbância estabelecida em 540 nm. O teste foi realizado em duplicata e a porcentagem de lise foi determinada através da seguinte equação:

$$\text{Taxa\% hemólise} = \frac{\text{ABS}_{\text{amostra}} - \text{ABS}_{\text{PBS}}}{\text{ABS}_{\text{Triton}} - \text{ABS}_{\text{PBS}}} \times 100, \text{ em que ABS representa a}$$

absorbância da amostra, PBS e 1% (v/v) Triton X-100, respectivamente. A partir do teste em duplicata, foi calculado a média e o desvio padrão.

5. RESULTADO

5.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Os resultados da CIM/CBM determinaram que o *blend* de taninos comercial possui atividade bactericida e bacteriostática, apresentando melhor resultado para *Micrococcus luteus* com CIM/CBM de 0,312 mg.mL⁻¹.

Os valores de CIM/CBM mg.mL⁻¹ do *blend* de taninos (BT) frente às cepas estudadas estão demonstrados na (Tabela 1). Nos resultados obtidos, todas as cepas e suas réplicas apresentaram o mesmo valor de inibição.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do *blend* de taninos comercial, representada pelo CIM contra bactérias isoladas de peixes.

Cepas	Espécies	CIM ¹ (mg.mL ⁻¹)	CBM ² (mg.mL ⁻¹)	Método de Identificação de Espécies	Referência
AvCm1-22	<i>Aeromonas veronii</i>	0,125	1,25	16SrRNA	Dados ainda não publicados
T3R	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,625	0,625	16SrRNA	Sebastião et al. (2016)
Cf1498	<i>Citrobacter freundii</i>	1,25	Bacteriostático >5	16SrRNA	Dados ainda não publicados
AmSal	<i>Salmonella sp.</i>	2,5	Bacteriostático >7,5	Bioquímica TSI test	Dados ainda não publicados
Micc	<i>Micrococcus luteus</i>	0,312	0,312	16SrRNA	Dados ainda não publicados
Saur	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,08	Bacteriostático >0,312	Bioquímica (hidrólise do manitol)	Dados ainda não publicados
N4	<i>Lactococcus garvieae</i>	0,156	Bacteriostático >0,625	16SrRNA	Vaneci-Silva
DV022	<i>Edwardsiella tarda</i>	0,312	Bacteriostático >1,25	16SrRNA	Vaneci-Silva

¹CIM= concentração inibitória mínima,

²CBM= concentração bactericida mínima,
(mg.mL⁻¹) = miligrama por mililitro.

5.2. Atividade hemolítica do *blend* de taninos comercial contra eritrócitos da tilápia-do-Nilo

Os resultados (Tabela 2) obtidos evidenciaram que o *blend* de taninos comercial tem a capacidade de hemolisar os eritrócitos de tilápia-do-Nilo, ou seja, o teste realizado *in vitro* possibilitou observar que o composto foi citotóxico, apresentando forte atividade hemolítica.

Tabela 2. Resultado do teste de citotoxicidade em placa, mostrando a ação do blend de taninos comercial em eritrócitos de tilápia-do-Nilo. Colunas A-C (linha 1-10) tanino + eritrócitos; (linhas 11) controle negativo: PBS + eritrócitos e (linha 12) controle positivo: Triton 1% + eritrócitos, coluna D-F (linhas 1-10) tanino + PBS, coluna H (linhas 1-12) tanino + eritrócitos + Triton 1% e eritrócitos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,875	0,670	0,535	0,323	0,450	0,361	0,329	0,344	0,306	0,216	0,187	0,884
B	0,907	0,806	0,532	0,421	0,476	0,363	0,361	0,317	0,364	0,300	0,270	0,06
C	0,877	0,612	0,632	0,470	0,469	0,340	0,319	0,312	0,300	0,263	0,181	0,792
D	0,825	0,658	0,560	0,468	0,350	0,303	0,249	0,228	0,208	0,192	0,051	0,049
E	0,978	0,748	0,601	0,440	0,347	0,321	0,243	0,215	0,203	0,191	0,044	0,049
F	0,759	0,632	0,608	0,498	0,385	0,273	0,275	0,231	0,185	0,255	0,043	0,043
G	0,283	0,264	0,277	0,317	0,268	0,297	0,292	0,276	0,282	0,301	0,041	0,054
H	0,718	0,446	0,637	1,023	0,796	0,683	0,867	0,925	0,995	0,974	0,047	0,864

Devido a interação do tanino com proteínas, ocorre a precipitação da hemoglobina presente no eritrócito (Figura 5), resultando em alteração no teste de hemólise, observada no espectrofotômetro.

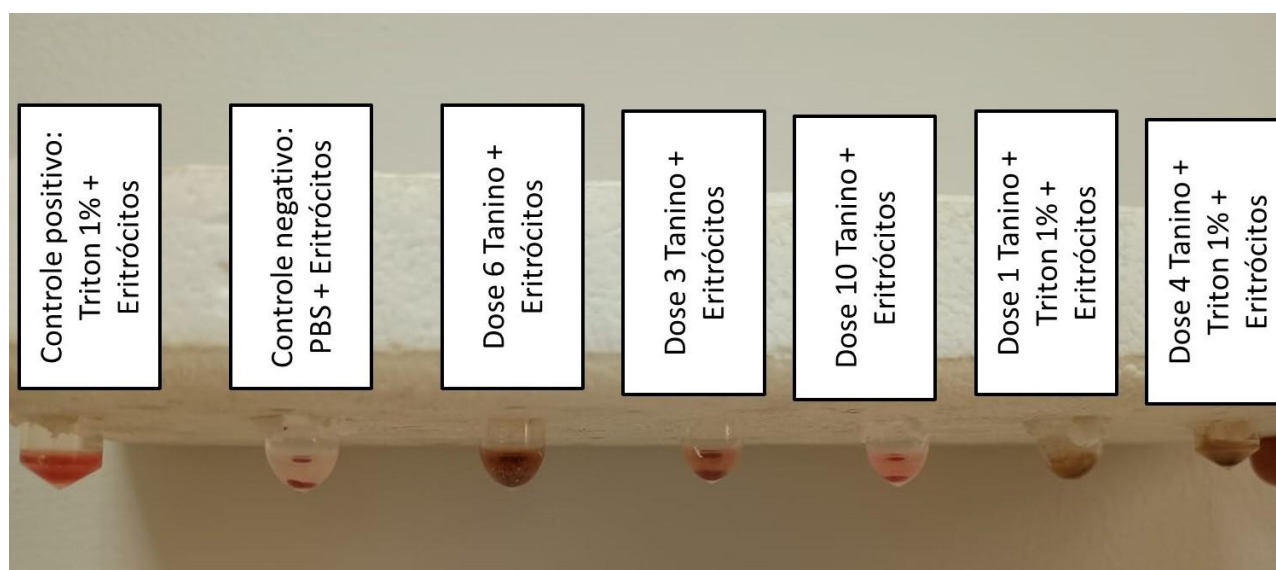


Figura 5. Demonstração em diferentes doses que o composto foi citotóxico, apresentando forte atividade hemolítica. Formação de pellets na cor marrom evidenciam que as células foram lisadas.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliado o potencial antimicrobiano do *blend* comercial de taninos contra bactérias isoladas de peixes de produção no Brasil (*Aeromonas veronii*, *A. hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* sp., *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae* e *Edwardsiella tarda*). Este estudo demonstrou que o *blend* comercial de taninos apresentou um ótimo potencial como antimicrobiano para bactérias patogênicas de peixes, o mesmo resultado foi observado por FARHA et al., (2020) e CHUNG et al., (1998).

Estudos realizados com taninos e outros polifenóis demonstraram inibir várias espécies bacterianas (DAGLIA, 2012, OTHMAN et al., 2019), apresentando dados semelhantes aos obtidos neste estudo. Foi observado neste experimento que a atividade antimicrobiana foi mais eficaz contra bactérias Gram-negativas (*A. veronii*, *A. hydrophila*, *E. tarda*, *Salmonella* sp. e *C. freundii*) do que contra bactérias Gram-

positivas (*S. aureus* e *L. garvieae*). Este diferencial pode estar relacionado à diferença de estrutura e composição da parede celular bacteriana, uma vez que bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular rica em peptidoglicano que lhes proporciona maior resistência e proteção (SINGH et al., 2019, FARHA et al., 2020).

Dong et al., (2020) relataram que o ácido tânico testado contra *S. aureus* obteve CIMs variando de 0,04 - 0,160 mg.L⁻¹, já Chung (1993) identificou valor de CIMs de 5 mg.mL⁻¹ contra *Salmonella* sp. Taguri et al., (2004) descreveram que o composto Castalagin (Sigma-Aldrich) (tipo de tanino hidrolisável), apresentou atividade contra *Salmonella* sp. e *S. aureus* com valores de CIM variando de 8 - 0,08 mg.mL⁻¹. Desta forma, os valores de CIMs obtidos foram semelhantes aos obtidos em nosso estudo.

O *blend* de taninos apresentou atividade bacteriostática para 62% das cepas analisadas. Isto deve-se ao alvo molecular de ação dos compostos polifenólicos, que formam complexos com as proteínas secretadas e presentes nas bactérias (FISCHMANN et al., 2020), diminuindo assim o transporte de íons e nutrientes, atuando primariamente na quebra da homeostase do microrganismo.

Para avaliar o efeito tóxico do blend comercial de taninos para tilápia, realizou-se o teste de citotoxicidade de lise dos eritrócitos (SANTOS-Filho et al., 2017; SÆBØ et al., 2023). A hemólise induzida pelo *blend* comercial de taninos para as hemácias de peixes nas concentrações testadas (20 - 0,039 mg.mL⁻¹) indicou toxicidade para células sanguíneas da espécie. Além disso, foi observado que o *blend* de taninos possui a capacidade de precipitar o sangue hemolisado. Uma hipótese é que isso ocorre devido a interação da hemoglobina com o tanino, pois alguns estudos realizados com compostos à base de taninos também relataram a ocorrência dessa interação tanino-proteína

(MUINDI, et al., 2021; HUANG et al., 2018), desta forma, podemos sugerir que esse método não é o mais adequado para a leitura da hemólise.

Com a busca de métodos alternativos de origem natural para o controle sanitário em animais de produção, não se pode descartar a possibilidade destes métodos apresentarem efeitos tóxicos ou adversos ao hospedeiro.

Dados da literatura sobre compostos à base de taninos são controversos, uma vez que diversos estudos demonstram que estes são benéficos, seguros e com baixa toxicidade tanto para animais monogástricos, quanto para ruminantes, sugerindo bom potencial quimioterápico (MAKKAR, 2003, BIAGI et al., 2010, NAUMANN et al., 2017, SAFARI et al., 2020, PENG et al., 2020). E outros trabalhos mostram que os polifenóis apresentam fatores antinutricionais, causando efeito adverso, dependendo da concentração/dose ofertada a determinado grupo de animais como suínos, peixes e frangos de corte (HASSAN et al., 2003, HUANG et al., 2018, PINTO et al., 2000). Devido a este cenário, é importante que estudos *in vitro* e *in vivo* sejam realizados a fim de se obter uma dose segura para o animal mantendo as propriedades benéficas, visto que, o composto pode ser tóxico, podem afetar a capacidade de transporte de oxigênio da hemoglobina presente no sangue, causar adstringência (salivação e aceitabilidade do alimento) ou, até mesmo, diminuir a digestibilidade de proteínas (KUMAR, 1992; DE JESUS BENEVIDES et al., 2011, XIE et al., 2022). Todavia, estas características são dose-dependentes.

A ausência do teste *in vivo* traz limitações para esse estudo, pois não foi possível obter dados que comprovem a eficácia do produto para a tilápia-do-Nilo. Contudo, experimentos futuros *in vivo*, relacionados à farmacocinética, farmacodinâmica, imunoestimulação e biodisponibilidade devem ser realizados para

futuras discussões sobre o emprego deste grupo de moléculas para a prevenção e tratamento de doenças bacterianas em peixes.

7. CONCLUSÃO

O *blend* comercial de taninos apresentou atividade bactericida para *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila* e *Micrococcus luteus* e, bacteriostática, para *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae*, *Salmonella* sp. e *Edwardsiella tarda*. O teste de citotoxicidade utilizado (mensuração da citotoxicidade baseada na lise de eritrócitos) não foi suficiente para avaliar os efeitos do tanino na tilápia-do-Nilo.

8. RESUMO

Os taninos são compostos polifenólicos oriundos de plantas, podendo apresentar efeito antimicrobiano, antiparasitário, antiviral, antioxidante e anti-inflamatório, com grande potencial de atuar como antimicrobiano natural. Este estudo analisou, *in vitro*, a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do *blend* comercial de tanino (concentrações testadas de 40 - 0,078 mg.mL⁻¹), contra importantes bactérias patogênicas para peixes (*Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae* e *Edwardsiella tarda*). A atividade antimicrobiana e a citotoxicidade foram avaliadas utilizando o método de microdiluição em caldo e teste de hemólise, respectivamente. O teste de susceptibilidade antimicrobiana (Concentração Inibitória Mínima – CIM e Concentração Bactericida Mínima – CBM) do *blend* de taninos contra as bactérias *A. veronii*, *A. hydrophila* e *M. luteus*, mostrou-se eficiente, tendo efeito bactericida (CIM e CBM: 1,25; 0,625; 0,312 mg.mL⁻¹) e contra as bactérias *C. freundii*,

S. aureus, *L. garvieae*, *Salmonella* sp. e *E. tarda*, apresentou efeito bacteriostático (CIM: 1,25; 2,5; 0,08; 0,156; 0,312 mg.mL⁻¹ e CBM: >5; >7,5; >0,312; >0,625; >1,25 mg.mL⁻¹).

Este trabalho demonstrou que o teste de citotoxicidade realizado com o BT não permitiu avaliar a toxicidade do composto para os peixes. O presente estudo ressalta o potencial do uso do tanino para o controle de bacterioses em peixes de produção.

Palavra-chave: Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima, Citotoxicidade, Bacterioses em Peixes, Aditivos fitogênicos.

9. SUMMARY

Tannins are polyphenolic compounds derived from plants, which can exhibit antimicrobial, antiparasitic, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory effects, with significant potential to act as natural antibiotic agent. This study analyzed, in vitro, the antimicrobial activity and cytotoxicity of a commercial tannin blend (tested concentration ranging from 40 to 0.078 mg.mL⁻¹) against important pathogenic bacteria for fish (*Aeromonas veronni*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae* and *Edwardsiella tarda*). The antimicrobial activity and cytotoxicity were evaluated using the broth microdilution method and hemolysis test, respectively. The antimicrobial susceptibility test (Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the tannin blend against *A. veronni*, *A. hydrophila* and *M. luteus*, demonstrated efficacy, showing bactericidal effect (MIC and MBC: 1.25; 0.312; 0.625 mg.mL⁻¹), while against *C. freundii*, *S. aureus*, *L. garvieae*, *Salmonella* sp.

and *E. tarda*, it showed bacteriostatic effects (CIM: 1.25; 2.5; 0.08; 0.156; 0.312 mg.mL⁻¹ e CBM: >5; >7.5; >0.312; >0.625; >1.25 mg.mL⁻¹).

This study also showed that the cytotoxicity test conducted with the tannin blend did not adequately assess the compound's toxicity to fish. The present research highlights the potential of using tannins for the control of bacterial infections in farmed fish.

Keywords: Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration, Cytotoxicity, Bacterial Infections in Fish, Phytochemical Additives.

10. REFERÊNCIA

ALMARRI, S. H., KHALIL, A. A., MANSOUR, A. T., EL-HOUSEINY, W. *Antioxidant, immunostimulant, and growth-promoting effects of dietary Annona squamosa leaf extract on Nile tilapia, Oreochromis niloticus, and its tolerance to thermal stress and Aeromonas sobria infection. Animals*, v. 13, n. 4, p. 746, 2023.

ALZHRANI, O. M., ELUMALAI, P., NADA, H. S., AHMED, S. A., ZAGLOOL, A. W., SHAWKY, S. M., ... & MAHBOUB, H. H. *Pseudomonas putida: Sensitivity to Various Antibiotics, Genetic Diversity, Virulence, and Role of Formic Acid to Modulate the Immune-Antioxidant Status of the Challenged Nile tilapia Compared to Carvacrol Oil. Fishes*, v. 8, n. 1, p. 6, 2022.

ASSANE, I. M., GOZI, K. S., VALLADÃO, G. M. R., & PILARSKI, F. *Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use of thiamphenicol/florfenicol against Aeromonas hydrophila. Aquaculture*, v. 507, p. 238-245, 2019.

BIAGI, G., CIPOLLINI, I., PAULICKS, B. R., & ROTH, F. X. *Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets*. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 121-135, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição**. Brasília: Anvisa 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>. Acesso em: 17 ago. 2023.

BOLÍVAR-RAMÍREZ, Norha Constanza et al. *Tannins as a food additive in pacific white shrimp diet*. **Aquaculture**, v. 556, p. 738232, 2022.

BURRIDGE, L., WEIS, J. S., CABELLO, F., PIZARRO, J., & BOSTICK, K. *Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 7-23, 2010.

CAVALLI, L. S. ET AL. (ORG.). *Principais doenças infecciosas em camarões e tilápias na aquicultura*. Porto Alegre, SEAPDR/DDPA, 63 p., 2021.

CETESB. *Patógenos: Mortandade de Peixes*. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/doencas/patogenos/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CHUNG, K. T., J. R., S. S., LIN, W. F., & WEI, C. I. *Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 29-32, 1993.

CHUNG, K. T., WEI, CHENG-I., JOHNSON, MICHAEL G. *Are tannins a double-edged sword in biology and health?* **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 4, p. 168-175, 1998.

CLSI, 2020a. CLSI guideline VET03, in: *Methods for Antimicrobial Broth Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals*. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2020.

CLSI, 2020b. *VET04 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals*. **Clinical Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2020.

CNA BRASIL. *Doenças de Animais Aquáticos de Importância para o Brasil- Manual de Identificação no Campo*, 2018. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/publicacoes/cartilhas-de-cna-de-sanidade-aquicola>.

COMBE, M., REVERTER, M., CARUSO, D., PEPEY, E., & GOZLAN, R. E. *Impact of Global Warming on the Severity of Viral Diseases: A Potentially Alarming Threat to Sustainable Aquaculture Worldwide*. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1049, 2023.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Boletim Hortigranjeiro**, Brasília, DF, v. 8, n. 4, abr. 2022. Disponível em: www.conab.gov.br

CORDÃO, M. A., PEREIRA FILHO, J. M., BAKKE, O. A., & BAKKE, I. A. *Taninos e seus efeitos na alimentação animal–Revisão bibliográfica*. **Pubvet**, v. 4, p. 924-930, 2010.

DAGLIA, M. *Polyphenols as antimicrobial agents*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DE JESUS BENEVIDES, C. M., SOUZA, M. V., SOUZA, R. D. B., & LOPES, M. V. *Fatores antinutricionais em alimentos: revisão*. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

DE PÁDUA, S. D., MARQUES, D. P., SEBASTIÃO, F. A., PILARSKI, F., MARTINS, M. L., & ISHIKAWA, M. M. *Isolation, characterization and pathology of Citrobacter freundii infection in Native Brazilian Catfish Pseudoplatystoma*. 2014.

DEBNATH, S. C., MCMURTRIE, J., TEMPERTON, B., DELAMARE-DEBOUTTEVILLE, J., MOHAN, C. V., & TYLER, C. R. *Tilapia aquaculture, emerging diseases, and the roles of the skin microbiomes in Health and disease*. **Aquaculture International**, p. 1-32, 2023.

DONG, G., LIU, H., YU, X., ZHANG, X., LU, H., ZHOU, T., & CAO, J. *Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, v. 32, n. 18, p. 2225-2228, 2018.

EGGER, R. C., ROSA, J. C. C., RESENDE, L. F. L., DE PÁDUA, S. B., DE OLIVEIRA BARBOSA, F., ZERBINI, M. T., ... & FIGUEIREDO, H. C. P. *Emerging fish pathogens Lactococcus petauri and L. garvieae in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) farmed in Brazil*. **Aquaculture**, v. 565, p. 739-093, 2023.

FAO. *O Estado da Pesca e Aquicultura Mundial 2022. Towards Blue Transformation*. Roma, **FAO**, 2022.

FARHA, A. K., YANG, Q. Q., KIM, G., LI, H. B., ZHU, F., LIU, H. Y., ... & CORKE, H. *Tannins as an alternative to antibiotics*. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100751, 2020.

FISCHMANN, C., TAYLOR, F., BORGES, L. P., JUN, A., SILVA, J., SAORI, L. *Suplementação de Compostos Fenólicos São Benéficos à Saúde? Projeto Nutrigenômica* - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

GASTALHO, S.; SILVA, G.J. da, RAMOS, F. *Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. Acta Farmacêutica Portuguesa*, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GAZAL, L. E. D. S., BRITO, K. C. T. D., KOBAYASHI, R. K. T., NAKAZATO, G., CAVALLI, L. S., OTUTUMI, L. K., & BRITO, B. G. D. *Antimicrobials and resistant bacteria in global fish farming and the possible risk for public health. Arquivos do Instituto Biológico*, v. 87, 2020.

GUIDI, L. R. *Desenvolvimento de métodos por CL-EM/Em e ocorrência de antimicrobianos em peixes de aquicultura*. 2016.

HAENEN, O. L., DONG, H. T., HOAI, T. D., CRUMLISH, M., KARUNASAGAR, I., BARKHAM, T., ... & BONDAD-REANTASO, M. G. *Bacterial diseases of tilapia, their zoonotic potential and risk of antimicrobial resistance. Reviews in Aquaculture*, v. 15, p. 154-185, 2023.

HASSAN, I. A. G., ELZUBEIR, E. A., EL TINAY, A. H. *Growth and apparent absorption of minerals in broiler chicks fed diets with low or high tannin contents. Tropical Animal Health and Production*, v. 35, p. 189-196, 2003.

HUANG, A. G., YI, Y. L., LING, F., LU, L., ZHANG, Q. Z., & WANG, G. X. *Screening of plant extracts for anthelmintic activity against Dactylogyrus intermedius (Monogenea) in goldfish (Carassius auratus). Parasitology Research*, v. 112, n.12, p. 4065-4072, 2013.

HUANG, Q., LIU, X., ZHAO, G., HU, T., & WANG, Y. *Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. Animal Nutrition*, v. 4, n. 2, p. 137-150, 2018.

HUTSON, K. S., MATA, L., PAUL, N. A., & DE NYS, R. *Seaweed extracts as a natural control against the monogenean ectoparasite, Neobenedenia sp., infecting farmed barramundi (Lates calcarifer)*. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 13-14, p. 1135-1141, 2012.

IWASHITA, MARINA KEIKO PIERONI; MACIEL, P. O. *Princípios Básicos de Sanidade de Peixes. Piscicultura de Água Doce: Multiplicando Conhecimentos*, Brasília, DF, Embrapa, p. 215-272, 2013.

JANDA, J. MICHAEL; ABBOTT, SHARON L. *O gênero Aeromonas: taxonomia, patogenicidade e infecção*. **Revisões de Microbiologia Clínica**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JUNIOR, J. A. F., LEAL, C. A. G., DE OLIVEIRA, T. F., NASCIMENTO, K. A., DE MACÊDO, J. T. S., & PEDROSO, P. M. O. *Anatomopathological characterization and etiology of lesions on Nile tilapia fillets (Oreochromis niloticus) caused by bacterial pathogens*. **Aquaculture**, v. 526, p. 735-387, 2020.

KACZMAREK, B. *Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials—A minireview*. **Materials**, v. 13, n. 14, p. 3224, 2020.

KUMAR, R. *Anti-nutritional factors, the potential risks of toxicity and methods to alleviate them*. **Legume trees and other fodder trees as protein source for livestock**. **FAO Animal Production and Health Paper**, v. 102, p. 145-160, 1992.

LEIRA, M. H., DE ASSIS LAGO, A., BOTELHO, H. A., MELO, C. C. V., MENDONÇA, F. G., DO NASCIMENTO, A. F., & DE FREITAS, R. T. F. *Principais*

infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil—Uma revisão. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública, v. 3, n. 1, p. 44-59, 2016.

MAKKAR, HARINDER PS. *Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research*, v. 49, n. 3, p. 241-256, 2003.

MARCUSSO, P. F., AGUINAGA, J. Y., DA SILVA CLAUDIANO, G., ETO, S. F., FERNANDES, D. C., MELLO, H., MARINO NETO, F. A., SALVADOR, R., MORAES, J.R., MORAIS, F. R. *Influence of temperature on Streptococcus agalactiae infection in Nile tilapia. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 52, n. 1, p. 57-62, 2015.

MEYBURGH, C. M., BRAGG, R. R., BOUCHER, C. E. *Lactococcus garvieae: an emerging bacterial pathogen of fish. Diseases of Aquatic Organisms*, v. 123, n. 1, p. 67-79, 2017.

MINIERO DAVIES, Y., XAVIER DE OLIVEIRA, M. G., PAULO VIEIRA CUNHA, M., SOARES FRANCO, L., PULECIO SANTOS, S. L., ZANOLLI MORENO, L., ... & KNÖBL, T. *Edwardsiella tarda outbreak affecting fishes and aquatic birds in Brazil. Veterinary Quarterly*, v. 38, n. 1, p. 99-105, 2018.

MONIR, Walid et al. *Pomegranate peel and moringa-based diets enhanced biochemical and immune parameters of Nile tilapia against bacterial infection by Aeromonas hydrophila. Microbial pathogenesis*, v. 145, p. 104202, 2020.

MORAIS, S. A. *Otimização do processo de extração de taninos a partir da espécie Mimosa tenuiflora (Willd.) Poiret*, 2019.

MUINDI, H. M., KIBITI, C. M., & NGUGI, M. P. *Hemoglobin Precipitation: An Index of In Vitro Vasoconstrictive Activities of Methanol Leaf Extracts of Croton*

megalocarpus Hutch and Lantana camara Linn. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021.

NAUMANN, H. D., TEDESCHI, L. O., ZELLER, W. E., & HUNTLEY, N. F. *The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations, and future directions.* **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, p. 929-949, 2017.

NEMUDZIVHADI, V., MASOKO, P. *In vitro assessment of cytotoxicity, antioxidant, and anti-inflammatory activities of Ricinus communis (Euphorbiaceae) leaf extracts.* **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

NGO, T. P. H., SMITH, P., BARTIE, K.L., THOMPSON, K. D., VERNER-JEFFREYS, D.W., HOARE, R., ADAMS, A. *Antimicrobial susceptibility of Flavobacterium psychrophilum isolates from the United Kingdom.* **Journal Fish Diseases**, 41, 309-320, 2018.

NICHOLSON, P., MON-ON, N., JAEMWIMOL, P., TATTIYAPONG, P., & SURACHETPONG, W. *Coinfection of tilapia lake virus and Aeromonas hydrophila synergistically increased mortality and worsened the disease severity in tilapia (Oreochromis spp.).* **Aquaculture**, v. 520, p. 734746, 2020.

OTHMAN, L., SLEIMAN, A., ABDEL-MASSIH, R. M. *Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants.* **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 911, 2019.

PEIXES BR. *Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2022.* **Associação Brasileira da Piscicultura**, 2022.

PEIXES BR. *Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2023/2024.* **Associação Brasileira da Piscicultura**, 2023/2024.

PENG, K., WANG, G., WANG, Y., CHEN, B., SUN, Y., MO, W., ... & HUANG, Y. *Condensed tannins enhanced antioxidant capacity and hypoxic stress survivability but not growth performance and fatty acid profile of juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, p. 114-671, 2020.

PEPI, MILVA; FOCARDI, SILVANO. *Antibiotic-resistant bacteria in aquaculture and climate change: A challenge for health in the Mediterranean area*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 11, p. 5723, 2021.

PETTY, BÁRBARA D.; FLOYD-FRANCIS, RUTH; YANONG PE, ROY. *Doenças Bacteriana dos Peixes*. **Manual MSD, Manual Veterinário**, 2022. Disponível em: <https://www.msdvvetmanual.com/exotic-and-laboratory-animals/aquarium-fish/bacterial-diseases-of-fish>.

PINTO, L. G. Q., Pezzato, L. E., de Miranda, E. C., Barros, M. M., & Furuya, W. M. *Ação do tanino na digestibilidade de dietas pela tilápia Ação do tanino na digestibilidade de dietas pela tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)*. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 3, p. 677-681, 2000.

RAGHIANTE, F., DE MATTOS FERRASSO, M., RODRIGUES, M. V., BIONDI, G. F., & MARTINS, O. A. *Francisella spp. em tilápias no Brasil: Uma revisão*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p. 119-130, 2017.

RICCI, A., OLEJAR, K. J., PARPINELLO, G. P., MATTIOLI, A. U., TESLIĆ, N., KILMARTIN, P. A., & VERSARI, A. *Antioxidant activity of commercial food*

grade tannins exemplified in a wine model. Food Additives & Contaminants: Part A, v. 33, n. 12, p. 1761-1774, 2016.

SAFARI, R., HOSEINIFAR, S. H., IMANPOUR, M. R., MAZANDARANI, M., SANCHOU, H., & PAOLUCCI, M. *Effects of dietary polyphenols on mucosal and humoral immune responses, antioxidant defense and growth gene expression in beluga sturgeon (Huso huso). Aquaculture*, v. 528, p. 735-494, 2020.

SAMTIYA, M., ALUKO, R. E., DHEWA, T. *Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. Food Production, Processing and Nutrition*, v. 2, p. 1-14, 2020.

SANTOS-FILHO, N. A., FERNANDES, R. S., SGARDIOLI, B. F., RAMOS, M. A., PICCOLI, J. P., CAMARGO, I. L., ... & CILLI, E. M. *Antibacterial activity of the non-cytotoxic peptide (p-BthTX-I) 2 and its serum degradation product against multidrug-resistant bacteria. Molecules*, v. 22, n. 11, p. 1898, 2017.

SAPKOTA, A., SAPKOTA, A. R., KUCHARSKI, M., BURKE, J., MCKENZIE, S., WALKER, P., & LAWRENCE, R. *Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. Environment International*, v. 34, n. 8, p. 1215-1226, 2008.

SASIDHARAN, S., CHEN, Y., SARAVANAN, D., SUNDRAM, K. M., & LATHA, L. Y. *Extraction, isolation, and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, v. 8, n. 1, 2011.

SCHAR, D., KLEIN, E. Y., LAXMINARAYAN, R., GILBERT, M., & VAN BOECKEL, T. P. *Global trends in antimicrobial use in aquaculture. Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 21878, 2020.

SERWECIŃSKA, LILIANA. *Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health*. **Water**, v. 12, n. 12, p. 3313, 2020.

SIDAN. *Sindicato nacional de produtos de saúde animal*. Disponível em: < <http://www.sindan.org.br/> . Acesso em: 15 setembro 2023.

SILVA, DAIANE VANEI. *Monitoramento da resistência à antimicrobianos na aquicultura: Isolamento e infecção experimental de Tilápia-do-Nilo com Klebsiella pneumoniae*, 2020.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. *Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, p. 402-413, 2010.

SOARES, S., BRANDÃO, E., GUERREIRO, C., SOARES, S., MATEUS, N., & DE FREITAS, V. *Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste*. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2590, 2020.

SUDHEESH, P. S., AL-GHABSHI, A., AL-MAZROOEI, N., & AL-HABSI, S. *Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish*. **International Journal of Evolutionary Biology**, v. 2012, 2012.

TAGURI, T., TANAKA, T., KOUNO, I. *Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 12, p. 1965-1969, 2004.

TAVECHIO, W. L. G., GUIDELLI, G., PORTZ, L. *Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.

TEMOTEO, J. L. M. *Avaliação fitoquímica, microbiológica e citotóxica da cavalinha (Equisetum arvense)*, 2017.

VALENTI, W. C., BARROS, H. P., MORAES-VALENTI, P., BUENO, G. W., & CAVALLI, R. O. *Aquaculture in Brazil: past, present and future*. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, 2021.

VALLADÃO, G. M. R. *Potencial de óleos essenciais de plantas para o tratamento de enfermidade em peixes*, 2014.

VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., PILARSKI, F. *Phytotherapy as an alternative for treating fish disease*. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 417-428, 2015.

VAN BOECKEL, T. P., BROWER, C., GILBERT, M., GRENFELL, B. T., LEVIN, S. A., ROBINSON, T. P., ... & LAXMINARAYAN, R. *Global trends in antimicrobial use in food animals*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VAN DOAN, Hien et al. *Dietary inclusion of chestnut (Castanea sativa) polyphenols to Nile tilapia reared in biofloc technology: Impacts on growth, immunity, and disease resistance against Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 105, p. 319-326, 2020.

WATTS, J. E., SCHREIER, H. J., LANSKA, L., & HALE, M. S. *The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions*. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, p. 158, 2017.

YU, M., GOUVINHAS, I., ROCHA, J., & BARROS, A. I. *Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 10041, 2021.

Xie, Z., Wang, M., Deng, Y., Li, J., Li, J., Pang, W., ... & Yang, G. *Acute toxicity of eucalyptus leachate tannins to zebrafish and the mitigation effect of Fe³⁺ on tannin toxicity*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 229, p. 113077, 2022.