

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS E TÓXICOS
DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE PLANTAS EM
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE PEIXES DE PRODUÇÃO**

Fernando Cardoso Gomes
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO
FEVEREIRO, 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS E TÓXICOS
DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE PLANTAS EM
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE PEIXES DE PRODUÇÃO**

Discente: Fernando Cardoso Gomes

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

Coorientadora: Profa. Dra. Geovana Dotta

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

JABOTICABAL – SÃO PAULO

FEVEREIRO, 2024

G633a Gomes, Fernando Cardoso
Avaliação dos efeitos antimicrobianos e tóxicos de óleos essenciais e extratos de plantas em bactérias patogênicas de peixes de produção / Fernando Cardoso Gomes. -- Jaboticabal, 2024
iii, 86 p. : il., tabs.; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2024
Orientadora: Fabiana Pilarski
Coorientadora: Geovana Dotta
Banca examinadora: Sílvia Umeda Gallani, Thiago Fernandes Alves Silva, Róberson Sakabe, Simone Aquino
Bibliografia

1. Microbiologia. 2. Aquicultura. 3. Fitoterapia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

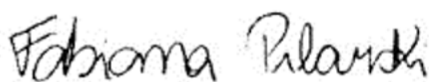
TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS E TÓXICOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE PLANTAS EM BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE PEIXES DE PRODUÇÃO

AUTOR: FERNANDO CARDOSO GOMES

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

COORIENTADORA: GEOVANA DOTTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp, Jaboticabal-SP



Profa. Dra. Silvia Umeda Gallani
Departamento de Medicina Veterinária, UniNilton, Manaus-AM



Prof. Dr. Thiago Fernandes Alves Silva
Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Delta do Parnaíba



Prof. Dr. Róberson Sakabe
Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Agrossocioambiental Sustentável, Universidade Federal Fluminense



Profa. Dra. Simone Aquino
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2024

EPÍGRAFE

“Ninguém é tão grande que não
possa aprender, nem tão pequeno
que não possa ensinar”

(Esopo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela minha vida.

Agradeço imensamente aos meus pais, Leni e Antônio, por todo apoio, suporte, paciência, conselhos e amor que recebi em toda a trajetória da minha vida, sem eles eu não seria nada.

Agradeço muito a minha orientadora, professora Fabiana Pilarski, que desde o mestrado vem confiando em mim e acreditando no meu potencial, e me transmitindo novos conhecimentos e ideias.

A todos os integrantes do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos – LAPOA do CAUNESP, por toda ajuda na realização dos meus trabalhos, e em especial à Daiane, Elielma, Daniel, Lindomar e André, que não mediram esforços para me ajudar, mesmo quando as coisas não seguiam conforme o planejado. Sem eles nada disso teria sido possível.

A todos funcionários do CAUNESP, que se dispuseram a me ajudar quando precisei.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
Capítulo 1.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Patógenos de Importância na Piscicultura	2
2.1.1 Grupo das <i>Aeromonas</i> móveis.....	3
2.1.2 <i>Citrobacter freundii</i>	3
2.1.3 <i>Flavobacterium oreochromis</i>	4
2.1.4 <i>Francisella orientalis</i>	5
2.1.5. <i>Lactococcus garviae</i>	6
2.1.6 <i>Streptococcus agalactiae</i>	7
2.2 Óleos Essenciais.....	7
2.2.1 Citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>).....	8
2.2.2 Melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	9
2.2.3 Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	9
2.2.4 Artemísia (<i>Artemisia vulgaris</i>).....	9
2.2.5 Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>).....	9
2.2.6 Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>).....	10
2.2.7 Ylang ylang (<i>Cananga odorata</i>).....	10
2.3 Extratos de plantas.....	10
2.3.1 Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>).....	11
2.3.2 Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i>).....	11
2.3.3 Abacate (<i>Persea americana</i>).....	11
3. OBJETIVOS GERAIS.....	11
3.1 Objetivos específicos.....	11
4. REFERÊNCIAS.....	12
Capítulo 2 – Manuscrito nas normas do periódico “Aquaculture”.....	26

RESUMO.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Óleos essenciais.....	30
2.2 Composição dos OEs.....	30
2.3 Citotoxicidade.....	31
2.4 Teste de atividade antimicrobiana.....	31
2.4.1 Bactéria.....	31
2.5 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	32
2.6 Interpretação dos Resultados de CIM e CBM.....	33
2.7 Toxicidade aguda <i>in vitro</i>	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1 Composição dos óleos essenciais.....	35
3.2 Citotoxicidade.....	35
3.3 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	36
3.4 Toxicidade aguda <i>in vivo</i>	37
4. DISCUSSÃO.....	38
5. AGRADECIMENTOS.....	41
6. BIBLIOGRAFIA.....	41
7. TABELAS.....	47
8. LEGENDAS DAS FIGURAS.....	48
Capítulo 3 – Manuscrito nas normas do periódico “Aquaculture”	52
RESUMO.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Extratos de plantas.....	55
2.2 Composição dos extratos.....	56
2.3 Produtos comerciais (Virkon®, formaldeído e permanganato de potássio).....	56
2.4 Teste de Citotoxicidade.....	57
2.5 Teste de atividade antimicrobiana.....	58

2.5.1 Microrganismos utilizados.....	58
2.5.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima (CIM e CBM).....	58
3. RESULTADOS.....	59
3.1 Composição dos extratos.....	59
3.2 Teste de Citotoxicidade.....	60
3.3 Teste de atividade antimicrobiana (CIM e CBM).....	61
4. DISCUSSÃO.....	62
5. AGRADECIMENTOS.....	65
6. BIBLIOGRAFIA.....	65
7. TABELAS.....	72
8. LEGENDAS DAS FIGURAS.....	76

RESUMO

Os compostos vegetais de origem vegetal como óleos essenciais (OEs) e extratos de plantas são utilizados pelos seres humanos há milhares de anos, tendo apresentado propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, anestésicas e imunoestimulantes já comprovados em diversos trabalhos científicos. Suas propriedades antimicrobianas são interessantes na tentativa de substituir produtos comerciais e antimicrobianos convencionais utilizados em pisciculturas, principalmente levando em consideração a problemática envolvendo a presença de resistência à antimicrobianos convencionais nos microrganismos patogênicos comuns neste meio. No presente trabalho foram testados óleos essenciais comerciais e extratos de plantas frente a bactérias patogênicas que são comumente encontradas em pisciculturas comerciais. No primeiro estudo foi testado o potencial antimicrobiano *in vitro* dos OEs de *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Artemisia vulgaris*, *Eucalyptus globulus*, *Ocimum basilicum* e *Cananga odorata* de forma isolada ou combinada frente à *Flavobacterium oreochromis*, bactéria que acomete principalmente pele e nadadeira de peixes, através dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Foram também realizados o teste de citotoxicidade *in vitro* frente a eritrócitos de tilápia-do-Nilo e o teste de toxicidade aguda *in vivo* com a combinação de óleos que apresentaram os melhores resultados de CIM e CBM. Os OEs que apresentaram o maior potencial antimicrobiano de forma isolada foram os de *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon nardus*, já de forma combinada a melhor resposta obtida foi decorrente da combinação dos OEs de *Cymbopogon basilicum* com *Cananga odorata*. No teste de citotoxicidade os resultados observados foram dose dependente, sendo que nas concentrações observadas nos testes de CIM e CBM a citotoxicidade se apresentou baixa. Já no teste de toxicidade aguda *in vivo* foram observados efeitos tóxicos aos animais a partir da concentração de 22,67 µl/L. A partir destes resultados foi concluído neste primeiro trabalho que a combinação de OEs se apresenta como uma alternativa ao uso de desinfetantes comerciais contra a bactéria utilizada no estudo. No segundo estudo foram verificados os potenciais antimicrobianos através dos testes de CIM e CBM de extratos de folhas de *Eugenia uniflora*, *Tamarindus indica* e *Persea americana*, juntamente com produtos comerciais Virkon®, formaldeído e permanganato de potássio frente à 9 bactérias patogênicas de importância em pisciculturas comerciais, sendo elas *Aeromonas veronii*, *Aeromonas caviae*, *Flavobacterium oreochromis*, *Francisella orientalis*, *Lacotococcus garvieae* e *Streptococcus agalactiae* sorotipos Ib e III. Foi também realizado o teste de citotoxicidade frente a hemácias de tilápia-do-Nilo com todos os extratos e produtos utilizados. Os extratos de plantas utilizados apresentaram efeito antimicrobiano contra a maioria dos patógenos, enquanto os produtos comerciais com os melhores resultados de CIM e CBM foram o Virkon® e formaldeído. Os extratos e produtos comerciais apresentaram baixa citotoxicidade em suas concentrações de CIM e CBM. De forma geral os melhores resultados foram observados com o Virkon® e o extrato de *Persea americana*. Apesar dos resultados satisfatórios ainda se faz necessário o teste *in vivo* para assegurar o uso destes produtos junto aos animais de produção. Sem esta informação o recomendado é que sejam utilizados como desinfetantes ambientais, sem contato direto com os animais.

ABSTRACT

Plant-derived compounds such as essential oils (EOs) and plant extracts have been utilized by humans for thousands of years, exhibiting proven antimicrobial, anti-inflammatory, anesthetic, and immunostimulant properties in various scientific studies. Their antimicrobial properties are of interest in attempting to replace commercial and conventional antimicrobial products used in aquaculture, especially considering the issue of resistance to conventional antimicrobials in common pathogens in this environment. In the present study, commercial essential oils and plant extracts were tested against pathogenic bacteria commonly found in commercial aquaculture settings. In the first study, the in vitro antimicrobial potential of EOs from *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Artemisia vulgaris*, *Eucalyptus globulus*, *Ocimum basilicum*, and *Cananga odorata*, either alone or in combination, was tested against *Flavobacterium oreochromis*, a bacterium that mainly affects the skin and fins of fish, through minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests. In vitro cytotoxicity testing was also conducted against Nile tilapia erythrocytes, and acute toxicity testing was performed in vivo with the combination of oils that showed the best MIC and MBC results. The EOs that exhibited the highest antimicrobial potential individually were those of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon nardus*, while the best response obtained from combined EOs was due to the combination of *Cymbopogon basilicum* with *Cananga odorata*. Cytotoxicity testing results were dose-dependent, with low cytotoxicity observed at the concentrations tested in the MIC and MBC tests. However, in vivo acute toxicity testing revealed toxic effects on animals starting from a concentration of 22.67 µl/L. Based on these results, it was concluded in this initial study that the combination of EOs presents an alternative to the use of commercial disinfectants against the bacterium used in the study. In the second study, the antimicrobial potentials of leaf extracts of *Eugenia uniflora*, *Tamarindus indica*, and *Persea americana*, along with commercial products Virkon®, formaldehyde, and potassium permanganate, were tested against 9 pathogenic bacteria of importance in commercial aquaculture, including *Aeromonas veronii*, *Aeromonas caviae*, *Flavobacterium oreochromis*, *Francisella orientalis*, *Lactococcus garvieae*, and *Streptococcus agalactiae* serotypes Ib and III, through MIC and MBC tests. Cytotoxicity testing was also performed against Nile tilapia erythrocytes with all extracts and products used. The plant extracts tested exhibited antimicrobial effects against most pathogens, while the commercial products with the best MIC and MBC results were Virkon® and formaldehyde. Both extracts and commercial products showed low cytotoxicity at their MIC and MBC concentrations. Overall, the best results were observed with Virkon® and the *Persea americana* extract. Despite the satisfactory results, in vivo testing is still necessary to ensure the use of these products with production animals. Without this information, it is recommended that they be used as environmental disinfectants, without direct contact with the animals.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura no Brasil é um setor que vem crescendo de forma constante desde que foi implantada como atividade comercial no país, não só em volume como também em valor de venda, sendo que em 2022 o país produziu 617,3 mil toneladas de pescado, faturando 5,7 bilhões de reais (IBGE, 2023).

Na busca por manter o crescimento da produção aquícola, os produtores frequentemente priorizam o aumento do volume de produção sem necessariamente considerar os cuidados essenciais e o bem-estar dos animais. Esta abordagem pode resultar em problemas que afetam a saúde dos animais, conforme observado por Garcia et al. (2013). Dentre os fatores que afetam diretamente a saúde dos peixes, podemos citar a extrapolação da densidade de estocagem suportada pelo sistema, alimentação e qualidade de água inadequadas, excesso de matéria orgânica, pontos de poluição próximos à piscicultura, como indústrias, dentre outros (Derome et al., 2016).

Com os animais estressados, existe maior probabilidade de infecção por diversos agentes patogênicos, dentre eles as bactérias, que são um problema na cadeia produtiva do pescado em todo o mundo. Os gêneros bacterianos que comumente causam doença e afetam as pisciculturas são *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Francisella* e *Streptococcus* (Türe e Alp, 2016; Abdelsalam et al., 2022). Estima-se que em 2017, as doenças bacterianas e parasitárias em criações comerciais de peixes no Brasil causaram a perda anual direta e indireta de aproximadamente 84 milhões de dólares (Tavares-Dias e Martins, 2017). Na tentativa de conter surtos de doenças e evitar perdas na produção, o produtor utiliza antimicrobianos, muitas vezes de uso autorizado para outras espécies animais, colocando em risco o ambiente aquático e a saúde do consumidor, já que não foram realizados estudos quanto a doses seguras e tempo de carência para animais aquáticos.

O registro de novos produtos veterinários de natureza farmacêutica no país é complexo, uma vez que requer diversos relatórios em conformidade com várias portarias e instruções normativas. Dentre os temas que devem constar nestes relatórios podemos citar aqueles que comprovem a eficácia para as indicações contidas nas rotulagens e também que comprovem a segurança para as espécies alvo. Desta forma, a adoção de medidas preventivas, como o uso de aditivos alimentares como os imunoestimulantes, probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais se mostram como alternativas interessantes ao uso de antimicrobianos convencionais (Bondad-Reantaso et al., 2023).

No Brasil estão licenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento apenas duas moléculas para uso em aquicultura: o florfenicol e a oxitetraciclina, sendo que em tilápias-do-Nilo somente o florfenicol tem autorização para ser utilizado (SINDAN, 2022). A utilização incorreta destes produtos, como o uso profilático pode desencadear reações negativas, como por exemplo a seleção de bactérias resistentes e multirresistentes, situação que vem crescendo exponencialmente nos últimos anos em todo o mundo (Hossain et al., 2022). Porém, este fenômeno também pode ocorrer de forma natural pela pressão de seleção aumentada pelos

antimicrobianos. Ainda, é possível a transmissão de genes de resistência entre as bactérias até mesmo de diferentes espécies, através de plasmídeos e dos mecanismos de conjugação, transformação ou transdução (Larsson e Flach, 2022; Wang et al., 2020).

Tudo isso pode resultar em maiores problemas, não apenas para a produção de peixes, mas pode afetar inclusive a saúde humana, uma vez que estes genes de resistência podem ser transmitidos a patógenos de importância na saúde humana. Isso pode ocorrer já que esta transferência de genes de resistência ultrapassa a barreira de espécies bacterianas, de forma que bactérias patogênicas de importância na saúde humana podem receber genes de resistência de espécies de bactérias patogênicas para peixes por exemplo. Agregado ao fato de que a produção destes animais ocorre na água, ambiente rico em diversos microrganismos e que faz parte do uso básico dos seres humanos, temos um problema de escala global (Gomes et al., 2020).

Cada dia mais os consumidores estão cientes destes problemas e riscos, e vem exigindo alternativas mais sustentáveis do mercado, como o uso de vacinas, prebióticos, probióticos, terapias com fagos e uso de óleos essenciais (Barrett et al., 2021). Essa linha de pensamento vai de encontro ao conceito de Saúde Única (One Health) que vem crescendo em importância nos últimos anos (Tiedje et al., 2019). Este termo foi inicialmente utilizado entre os anos de 2003 e 2004, período em que houve o surgimento de uma síndrome respiratória aguda ligada ao vírus influenza aviário H5N1, e que deixou clara a ligação entre saúde animal e saúde humana (Hernando-Amado et al., 2019). Inicialmente o conceito era ligado à questão de doenças infecciosas e zoonoses, porém evoluiu de forma a incluir outros problemas que podem afetar negativamente a saúde de seres vivos de um modo geral, como por exemplo a problemática envolvendo a crescente resistência bacteriana a antimicrobianos convencionais (Mackenzie et al., 2019).

Os óleos essenciais têm um grande apelo, por serem produtos naturais, renováveis e sustentáveis. São conhecidos há tempos por terem propriedades bactericidas, virucidas, fungicidas, antioxidantes, anti-inflamatórias, sedativas, analgésicas etc. Atualmente, são conhecidos aproximadamente 3000 tipos de óleos essenciais, sendo que 300 deles tem importância comercial, principalmente para a indústria farmacêutica, agrônoma e cosmética (Bakkali et al., 2008). As suas composições variam, mas a maioria dos óleos essenciais possuem dois ou três compostos majoritários, que aparecem em maior quantidade, e outros compostos em menores quantidades, podendo chegar até 60 componentes no total (Dhifi et al., 2016).

Com a propagação da resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas e até mesmo não patogênicas nos setores de produção animal, que pode afetar também a saúde pública, se faz necessário a busca de soluções alternativas a este problema, como o uso dos óleos essenciais, uma possível solução, ou mais um aliado para solucionar este problema e tornar toda a cadeia de produção mais segura e ecologicamente mais sustentável.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Patógenos de Importância na Piscicultura

2.1.1 Grupo das *Aeromonas* móveis

As bactérias do gênero *Aeromonas* foram documentadas inicialmente em 1891, pertencendo à família Aeromonadaceae, e que atualmente possuem 36 espécies documentadas (Fernández-Bravo e Figueras, 2020). Presente principalmente no ambiente aquático essas bactérias também podem se adaptar a outros ambientes e hospedeiros, sendo possível seu isolamento de alimentos, animais terrestres e solo. São bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, em forma de bastão e não formadoras de esporos, medindo entre 1 e 3 µm de comprimento e que conseguem suportar concentrações de NaCl de 0,3 a 5%. Podem ser psicrófilas, com temperaturas ótimas de crescimento entre 20°C e 25°C, ou mesófilas, com crescimento ótimo entre 35°C e 37°C (Pessoa et al., 2019), porém já foi observado em estudos o crescimento em laboratório de *A. caviae*, e *A. hydrophila* na temperatura de 28°C (Pattanayak et al., 2020; Xue et al., 2022) e de *A. veronii* na temperatura de 30°C (Chen et al., 2019), todas isoladas de peixes. Para o isolamento em laboratório podem ser utilizados meios de cultura não específicos, como por exemplo o ágar triptona de soja (*tryptic soy agar* -TSA) ou caldo triptona de soja (*tryptic soy broth* -TSB)(Dien et al., 2022).

Os fatores de virulência presentes nestas bactérias permitem e facilitam a infecção por esta bactéria, como exemplo podemos citar componentes estruturais, como por exemplo os flagelos, pili, lipopolissacarídeos (LPS) (Tomás, 2012), metaloproteases, enterotoxinas citotóxicas (Beaz-Hidalgo e Figueras, 2013) e a capacidade de produção de biofilme (Dias et al., 2018).

Nos peixes a principal espécie patogênica é a *A. hydrophila*, mas podemos também citar como importantes a *A. veronii*, *A. caviae* e *A. jandaei*. A má qualidade de água e o estresse causado por transporte e manejo são fatores que podem facilitar a ocorrência da doença (Marques et al., 2016). Essas bactérias podem desencadear de forma aguda a doença, como septicemia hemorrágica, ou de forma crônica como ulcerações dérmicas e necroses musculares (Fernández-Bravo e Figueras, 2020).

Para o diagnóstico clínico, o indicado é o isolamento laboratorial em meio de cultura, seguido do uso de técnicas moleculares, como por exemplo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional (Latif-eugenín et al., 2016). A terapia direcionada à doença se baseia no uso de antimicrobianos como exotetraciclina e ormetoprim (Anjur et al., 2021), porém alternativas como por exemplo o uso de bacteriófagos (Pereira et al., 2022) também vêm sendo estudadas. Vacinas comerciais estão disponíveis contra *A. salmonicida* em salmões (Bondad-Reantaso et al., 2023), e outras vacinas estão sendo estudadas e testadas para outras espécies para que se tenham maiores possibilidades de prevenção futuramente (Nayak, 2020).

2.1.2 *Citrobacter freundii*

Citrobacter freundii é um bacilo Gram-negativo, pertencente ao gênero *Citrobacter* e à família Enterobacteriaceae, anaeróbica facultativa e que foi inicialmente isolada de Peixes-lua (*Mola mola*) infectados e relatada por Sato et al., (1982). *C. freundii* também já foi isolada de outras espécies de peixes, como por exemplo peixe cabeça-de-cobra *Ophiocephalus argus*, Achigã *Micropterus salmoides* e Truta-arco-iris *Oncorhynchus mykiss* (Cao et al., 2019; Gong et al., 2023; Türe e Kutlu, 2018).

A doença causada por esta bactéria usualmente leva a inchaço da região anal, ulcerações dérmicas, alterações de parâmetros hematológicos e septicemia hemorrágica (Bandeira Junior et al., 2018; Sun et al., 2018). Esta é uma bactéria ubiquitária e oportunista, portanto, os fatores predisponentes são aqueles que debilitam o sistema imune dos animais, dentre eles podemos citar alguns como variações bruscas de temperaturas, hipóxia e excesso de matéria orgânica (Deng et al., 2022).

2.1.2 *Flavobacterium oreochromis*

A *Flavobacterium oreochromis*, previamente chamada de *Flavobacterium columnare*, foi isolada pela primeira vez em 1944, por Ordal e Rucker e hoje distribuída por todo o mundo, afetando diversas espécies de peixes de água doce. Pertencente ao gênero *Flavobacterium*, família Flavobacteriaceae, sendo Gram-negativa, com formato de bacilo, medindo de 4 a 10µm de comprimento, por 0,3 a 0,5µm de largura, móvel, com motilidade por deslizamento ou não, não produtora de esporos, estritamente aeróbica e, com temperatura de crescimento variando de 15°C a 36°C (LaFrentz et al., 2022).

Atualmente, a espécie foi reclassificada por LaFrentz et al., (2022) através de uma abordagem polifásica, comparando os genomas de referência para a *Flavobacterium columnare*, fundamentado nas características de cultivo da bactéria (temperatura, pH e halotolerância) e perfil enzimático de diferentes isolados e indicou que estes deveriam ser divididos em quatro novas espécies *F. columnare* GG1, *F. covae* GG2, *F. davinsii* GG3, *F. oreochromis* GG4 e não mais em grupos genéticos.

A bactérias está adaptada na microbiota de peixes de água doce, ovas e na própria microbiota da água de locais de produção de peixes (Donati et al., 2021). É um microrganismo fastidioso, necessitando de meios específicos para seu crescimento em condições de laboratório, como por exemplo Ágar Citofaga, meio de Shieh e meio de Hsu-Shotts (Loch e Faisal, 2015). Em 2016, Gao e Gaunt desenvolveram novos meios intitulados ágar G e caldo G, que diminuíram problemas comuns na cultura da bactéria e que ocorriam em outros meios, como por exemplo a formação de agregados celulares em meios líquidos, que dificultavam a leitura em espectrofotômetro.

Como fatores de virulência associados a esta bactérias temos como exemplos a capacidade de rápida disseminação e formação de biofilmes, geralmente formado por açúcares e que conferem a capacidade de se proteger contra possíveis tratamentos antimicrobianos e também a possibilidade desse patógeno sobreviver no ambiente por longos períodos (Testerman et al., 2022). Também é considerado como um fator de virulência a capacidade de adesão desta bactéria (Kumru et al., 2020). Segundo estudos a morfologia da colônia está associada com a virulência, sendo que colônias de morfologia rizoide estão presentes em estirpes mais virulentas (Guan et al., 2022; Kunttu et al., 2021).

Esta bactéria é responsável pela columnariose, que pode ser aguda ou crônica, e é caracterizada por erosões e úlceras branco amareladas na pele, nas nadadeiras e nas brânquias dos animais, mas que em casos mais graves também podem resultar em uma infecção sistêmica, sendo que o grau das lesões pode variar entre as cepas (Stringer-Roth et al., 2002; Declercq et al., 2013). Os surtos da doença estão associados a má qualidade

de água, variações térmicas bruscas, carga de matéria orgânica, e densidades de estocagem acima do limite suportado pelo sistema (Sarker e Abraham, 2019).

A idade dos animais influencia a severidade da doença, sendo que em animais jovens a doença geralmente ocorre de forma aguda, afetando principalmente as brânquias, enquanto nos animais adultos a doença pode evoluir de forma aguda, subaguda ou crônica (citação). Geralmente, quando a doença evolui de forma aguda ou subaguda, observa-se a presença de áreas amareladas nas brânquias, que são áreas de tecido necrosado com presença da bactéria, podendo resultar inclusive na total destruição das brânquias (Elgendy et al., 2022).

Na análise histopatológica inicial das brânquias, que é uma importante porta de entrada para o patógeno, é possível observar a proliferação de células epiteliais bem como do aumento no número de células produtoras de muco. Em estágios mais avançados, essa proliferação pode ocluir totalmente o espaço entre lamelas, juntamente com a presença de edema, congestão e infiltrados de células inflamatórias, culminando na fusão de lamelas e destruição do epitélio (Ravidra et al., 2019). Na pele, é possível observar ulceração da derme, podendo afetar a hipoderme e até mesmo o músculo, com presença a edema grave, bem como a perda de melanócitos. É possível também a presença de agregados de bactérias entre as fibras de colágeno. Quando a evolução é aguda, essas alterações podem culminar em necrose grave (Ferguson, 2006).

O diagnóstico da columnariose é feito através do isolamento da bactéria em meios específicos como Shieh e meio G (Decostere et al., 1997; Gao e Gaunt, 2016) e posterior identificação através de técnicas moleculares como o PCR. A amostra a ser semeada deve ser coletada das bordas das áreas lesionadas. As colônias podem ser observadas após 24 a 48 horas após a incubação entre 25°C a 30°C, com atenção a morfologia específica da espécie (Mitiku, 2018). A forma de tratamento contra a doença é realizada com a adição de antimicrobianos na ração, como a oxitetraciclina (Declercq et al., 2013).

2.1.3 *Francisella orientalis*

Anteriormente intitulada *Francisella noatunensis subs. orientalis* acabou sendo reclassificada como nova espécie, *Francisella orientalis* (Ramirez-Paredes et al., 2020) após estudos com uma abordagem polifásica, englobando caracterização genômica, fenotípica e análises quimiotáxicas envolvendo diversas cepas bacterianas e sequências genômicas das espécies *Francisella noatunensis subsp. orientalis*, *Francisella noatunensis subsp. noatunensis*, *Francisella philomiragia*, *Francisella tularensis subsp. holarctica*, *Francisella tularensis subsp. mediasiatica*, *Francisella utlarensis subsp. tularensis*, *Francisella tularensis subsp. novicida*, *Francisella hispaniensis* e *Allofrancisella guangzhouensis*.

Bactéria pertencente ao gênero *Francisella*, da família Francisellaceae, e se apresentam como microrganismos pleomórficos. São microrganismos Gram-negativos, aeróbicos estritos, sem motilidade e intracelular facultativos. Os primeiros relatos de achados relacionados a este microrganismo são de 1992 em Taiwan, onde foi-se observado a presença de granulomas viscerais em tilápias oriundas de pisciculturas (Chen et al., 1994). Este gênero possui espécies que são tanto patogênicas para seres humanos

quanto também para animais (Birkbeck et al., 2011). São bactérias fastidiosas, que para crescimento em laboratório necessitam de meios específicos enriquecidos com cisteína e fonte de ferro, como por exemplo ágar sangue enriquecido com 0,1% de cisteína e 1% de glicose (Ottem et al., 2009).

Em organismos aquáticos esta bactéria causa a doença chamada franciselose, caracterizada por se apresentar forma crônica, podendo ser acompanhada de exoftalmia, renomegalia e esplenomegalia (Soto et al., 2009) e pela presença característica de granulomas em diversos órgãos, como por exemplo fígado, baço, rim etc., resultando em mortalidade de graus variados (Ostland et al., 2006). A doença ocorre mais facilmente quando os animais passam por período de estresse, como por exemplo transporte ou alterações na temperatura da água (Birkbeck et al., 2009).

Por se tratar de um microrganismo que tem a capacidade de sobreviver dentro de células hospedeiras o tratamento da doença é dificultado, sendo que já foi observado casos em que animais doentes foram tratados com uso de oxitetraciclina, e dentre os sobreviventes ainda houve animais que não tiveram o patógeno totalmente eliminado do seu organismo, se tornando portadores e carreadores dessa bactéria (Favero et al., 2021; de Oliveira et al., 2023). Com isso formas de tratamentos alternativos ou de prevenir a doença vem sendo estudadas, como por exemplo o desenvolvimento de vacinas (Oliveira et al., 2022; Pulpipat et al., 2020).

2.1.4 *Lactococcus garvieae*

O *Lactococcus garvieae* é um microrganismo pertencente ao gênero *Lactococcus*, que está dentro da família Streptococcaceae, sendo descrito inicialmente em 1985 (Schleifer et al., 1985). Esta bactéria se apresenta na forma de cocos ovóides, Gram-positivos, sem motilidade, não formadoras de esporos, com faixa de temperatura de crescimento entre 4°C e 45°C. Para o cultivo em laboratório são utilizados meios ricos como por exemplo ágar infusão cérebro coração (BHI), TSA e TSB (Shahin et al., 2021).

Esta bactéria é capaz de causar doença em diversas espécies animais, inclusive em humanos. Na espécie humana ela se mostra como um patógeno oportunista, sendo que a maioria dos casos reportados foram em pessoas de idade avançada ou com o sistema imune comprometido (Gibello et al., 2016).

Em peixes este microrganismo causa septicemia hemorrágica hiperaguda (Rao et al., 2021). Alguns fatores podem influenciar na evolução da doença, como a variação de temperatura da água e a qualidade de água. A taxa de mortalidade em decorrência da doença pode chegar a 60%, o que foi observada em Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)(Shahin et al., 2021). Os sinais clínicos mais comuns são a presença de anorexia, letargia, natação errática, exoftalmia, opacidade de córnea e hemorragia intraocular (Egger et al., 2023).

O diagnóstico dessa doença consiste na observação dos sinais clínicos e nas alterações externas causadas pela bactéria, e encaminhando amostras para diagnóstico laboratorial com isolamento do patógeno e identificação através de técnicas moleculares

(Shahin et al., 2021). Já o tratamento é realizado com o uso de antimicrobianos como por exemplo oxitetraciclina e florfenicol (Shi et al., 2019).

2.1.5 *Streptococcus agalactiae*

Este patógeno pertence ao gênero *Streptococcus* e apresenta-se como coco Gram-positivo, com dimensão de 2µm de diâmetro, são anaeróbios facultativos, não móveis, catalase negativo. Quando cultivada em meio líquido seu crescimento se dá aos pares ou cadeias (Edwards e Nizet, 2011). O cultivo laboratorial necessita de meios ricos como por exemplo o ágar infusão cérebro coração ou caldo Todd-Hewitt suplementado com sangue de coelho. Sua faixa de crescimento varia entre 28°C a 37°C (Amal e Zamri-Saad, 2011). De acordo com a composição do polissacarídeo capsular, a espécie é diferenciada em diversos sorotipos, Ia, Ib, II até IX (Imperi et al., 2010). No Brasil temos maior prevalência do sorotipo Ib, mas estirpes pertencentes ao sorotipo Ia e III também já foram isoladas em diferentes estudos (Chideroli et al., 2017; Godoy et al., 2013).

A doença causada por essa bactéria em peixes é considerada comum e também está ligada a má qualidade de água, presença de fatores que causem estresse aos animais e também a rápida mudança na temperatura da água (Marcogliese, 2010; Martins et al., 2009). O patógeno causa meningoencefalite e possível epicardite no animal, e sua principal porta de entrada é o epitélio do trato gastrointestinal (Iregui et al., 2016). Os principais sinais clínicos observados nos animais doentes são a perda de apetite, presença de exoftalmia uni ou bilateral, opacidade de córnea, natação errática e falta de equilíbrio (Pulido et al., 2004).

Esta espécie bactéria possui fatores de virulência que podem auxiliar na adesão, invasão e também na capacidade de evadir o sistema imune, como por exemplo a sua cápsula polissacarídica, a proteína de ligação ao fibrinogênio A e B, a proteína de ligação à laminina, o antígeno beta, a presença de beta-hemolisina e beta citolisina (Landwehrkenzel e Henneke, 2014), dentre outros que fazem deste patógeno um desafio na produção animal.

O diagnóstico da doença é alcançado através da observação dos sinais clínicos e do isolamento e cultivo em laboratório, seguido posteriormente de identificação molecular através da técnica de PCR (Iregui et al., 2014). Para o tratamento é feito o uso de antimicrobianos como por exemplo o florfenicol (Gabriel et al., 2014). Como tratamento profilático temos também a possibilidade do uso de vacinas (Awad e Awaad, 2017; Liu et al., 2016; Mo et al., 2020).

2.2 Uso de Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis de origem vegetal que podem ser extraídos de diversas partes das plantas como folhas, flores, sementes e raízes, através de métodos como extração com uso de solventes orgânicos, prensagem a frio, destilação a vapor e hidrodestilação. Tanto a parte da planta, quanto a forma de extração, podem afetar a composição química do óleo obtido, sendo indicado utilizar sempre a mesma parte e o mesmo método a fim de tentar manter maior similaridade na composição dos óleos obtidos (Franz e Novak, 2020).

São compostos de baixo peso molecular, geralmente com menos de 500 daltons, sendo os terpenoides e fenilpropanoides os compostos comumente presentes nos óleos, mas também podem estar presentes componentes aromático, alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados. Os efeitos bioativos dos óleos essenciais podem estar associados a um ou dois compostos que estejam presentes em maiores quantidades (20-70%), mas também pode ser resultado da combinação da ação de todos os seus componentes (Raut e Karuppayil, 2014). Na natureza, estes óleos servem como fator de proteção para as plantas contra pragas e para evitar o consumo por herbívoros. Podem também servir para atrair insetos, para facilitar a dispersão de pólen e também de sementes, e repelir outros insetos indesejáveis (Bakkali et al., 2008).

São extraídos principalmente de plantas aromáticas presentes em países de clima temperado a tropicais. Geralmente se apresentam em forma líquida, sendo voláteis límpidos, solúveis em lipídios e solventes orgânicos, com densidade geralmente menor que a da água (Sharmeen et al., 2021). O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais pode variar tanto com relação aos óleos utilizados, mas também com as diferentes bactérias, como por exemplo o óleo de sândalo (*Santalum album*), mostrou eficácia contra bactérias Gram-positivas, mas não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas (Hammer e Carson, 2011). Uma característica bastante interessante e importante é que os óleos de origem vegetal têm mostrado potencial contra a formação de biofilme, que são formas que tem tolerância geralmente alta aos antimicrobianos clássicos (Galvão et al., 2012).

O modo de ação dos óleos essenciais consiste na habilidade de desestabilizar a membrana celular, já que são lipofílicos e por isso conseguem facilmente atravessar as paredes e membranas celulares. Com a desestabilização da membrana, a célula alvo perde a capacidade de equilibrar íons e até mesmo componentes celulares, ocasionando a morte celular (Saad et al., 2013). Outros modos de ação dos OEs sobre bactérias também já foram descritos, como por exemplo a inibição de biossíntese de proteínas, depleção de ATP intracelular, inibição de proteínas envolvidas na divisão celular, fragmentação de DNA, alterações na síntese de DNA e redução de atividades metabólicas (Álvarez-Martínez et al., 2021).

Além da ação antibacteriana e antiparasitária (Assane et al., 2020; Majolo et al. 2018, Valladão et al., 2015) os óleos essenciais também podem apresentar efeito antifúngico (Hammer e Carson, 2011), anticancerígeno (Kaefer e Milner, 2008; Hamid et al., 2011), antiviral (Astani et al., 2011; Meneses et al., 2009) e antimutagênico (Jeena et al., 2013; Varona et al., 2013). Pelo potencial de ação diverso os óleos essenciais se destacam como uma alternativa mais natural e sustentável aos medicamentos sintéticos.

2.2.1 Citronela (*Cymbopogon nardus*)

A citronela é uma planta perene, nativa da Índia, pertencente à família Poaceae, que também inclui mais de outras 100 espécies aromáticas. É cultivada principalmente em regiões subtropicais e tropicais, como as Américas, África e Ásia (Hamzah et al., 2014). Seus principais componentes são o citronelol e o geraniol (Mahalwal e Ali, 2003). Possui propriedades de repelir e matar insetos (Tawatsin et al., 2001; Quintans-Júnior et al., 2011), potencial antioxidante (Saputra et al., 2020) e estudos conduzidos inclusive na

área da aquicultura demonstraram propriedades antifúngicas, antibacterianas (García-Márquez et al., 2021; Kačániová et al., 2017; Wei e Wee, 2013) e herbicidas.

2.2.2 Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*)

Uma árvore nativa de regiões pantanosas da Austrália, pertencente à família Myrtaceae, popularmente conhecida como árvore do chá. Seu óleo geralmente é extraído das folhas, e seus principais componentes são hidrocarbonetos terpenos, sendo que suas atividades biológicas são atribuídas principalmente ao terpinen-4-ol (Oliveira et al., 2018).

O óleo dessa planta já vem sendo usado em produtos tópicos, geralmente usados no tratamento de infecções cutâneas (Silva et al., 2019), por suas propriedades antimicrobianas, mas também já apresentou ação anti-inflamatória, imunoestimulante (Groot e Schmidt, 2016; Valladão et al., 2017) e antiparasitária (Valladão et al., 2016).

2.2.3 Tomilho (*Thymus vulgaris*)

Se apresenta como arbusto pequeno, membro da família Lamiaceae, e já vem sendo usado há séculos por conta de suas propriedades biológicas (Rota et al., 2008). Geralmente suas folhas são usadas para a produção de óleo, através de processo de condensação. O principal constituinte de seu óleo é o timol, p-cimeno e então carvacrol (Bagamboula et al., 2004).

Sua atividade antimicrobiana (Al-Bayati, 2008) deriva de seu principal componente, timol, conferindo também efeito antioxidantes e anti-inflamatórios (Amiri, 2012), bem como propriedades protetoras ao trato gastrointestinal (Souza et al., 2011; Almanea et al., 2019). Também já foram observadas propriedades antiparasitárias em peixes (Salaro, 2018).

2.2.4 Artemísia (*Artemisia vulgaris*)

Distribuída por todo o mundo, povos antigos faziam uso desta planta, principalmente no tratamento de problemas urológicos e gastrointestinais (Ekiert et al., 2020). Esta planta já foi chamada de “mãe das ervas” na era medieval, dada a grande importância que teve na história da medicina. Faz parte da família Asteraceae e está distribuída por todo mundo e se apresentam como arbustos de pequeno porte. Seu óleo essencial é composto primariamente por monoterpenos e sesquiterpenos, como por exemplo canfora (Trinh et al., 2020).

Atualmente, já foi possível observar, através de experimentos, que seu óleo essencial possui efeito anti-inflamatório (Meng et al., 2022), anestésico (Raknak e Praphairaksit, 2020), antioxidante (Teixeira et al., 2013), hipolipêmico (Khan, 2015), hepatoprotetivo (Gilani et al., 2005) e antimicrobiano (Munda et al., 2019).

2.2.5 Eucalipto (*Eucalyptus globulus*)

O eucalipto é uma árvore pertencente à família Myrtaceae e usado há milhares de anos pela humanidade. É uma árvore nativa da Austrália, África e América tropical que

pode chegar a até 70 metros de altura. Esta árvore cresce em regiões de clima temperado, tropical e subtropical (Yost et al., 2021).

Seu óleo essencial pode ser obtido das folhas, galhos e flores, sendo que o principal constituinte do seu óleo é o 1,8-cineol (Hayat et al., 2015). O uso mais comum do óleo essencial é tradicionalmente para cuidar do sistema respiratório, como relaxante muscular e como antisséptico. Cientificamente são comprovadas as atividades antiespasmódicas, antimicrobianas (Park et al., 2016; Schnitzler et al., 2010; Kim et al., 2011), anti-inflamatórias e analgésicas em camundongos (Silva et al., 2003; Lima et al., 2019).

2.2.6 Manjerição (*Ocimum basilicum*)

Pertencente à família Lamiaceae, e possivelmente nativa da Índia (Cardoso et al., 2016). É uma planta usada tipicamente na culinária, mas também na área de perfumaria, cosméticos, medicamentos e na indústria alimentícia (Duke, 2001).

Seu óleo apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante (Pandey et al., 2016; Araújo Couto et al., 2019), anestésica (Ventura et al., 2021), bem como antimicrobiana e antifúngica (De Souza et al., 2019; Miao et al., 2020), apresentando também potencial antiviral (Matondo et al., 2021).

2.2.7 Ylang ylang (*Cananga odorata*)

Uma árvore da família Annonaceae, nativa da Ásia tropical, conhecida pelo perfume de sua flor, sendo muito explorada pela indústria da perfumaria (Goodrich, 2012). Com uso tradicional variado, que vai desde a incrementar o aroma de óleo de coco usado para massagem, até tratamento da malária (Nguyen-Pouplin et al., 2007). Assim como diversos outros óleos essenciais, o óleo essencial de ylang ylang também apresenta propriedades antimicrobianas (Assane et al., 2021; Kusuma et al., 2014) e também, no combate à formação de biofilmes (Lee et al., 2014), além de apresentar ação anti-inflamatória (Maniyar e Devi, 2015).

2.3 Extratos de Plantas

As plantas são utilizadas pela humanidade como forma de tratamento terapêutico ou até mesmo preventivo há séculos, além do uso como alimento (Boscolo e Valle, 2008) e muitos trabalhos já demonstraram as propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes dentre outros observados em diferentes espécies de plantas (Roleira et al., 2015).

Essas propriedades medicinais derivam da composição de compostos biologicamente ativos nestas plantas, que, no entanto, geralmente não estão prontamente disponíveis nestes vegetais, sendo necessário a aplicação de métodos que visam a extração destes compostos (Ribeiro et al., 2015; Salem et al., 2015). Dentre estes compostos podemos citar por exemplo os compostos fenólicos, fibras e outros componentes como polímeros de ácidos graxos (Adam et al., 2014; Duke et al., 2016; Lattanzio et al., 2013).

Estes compostos podem ser extraídos de diversas partes das plantas, como por exemplo das frutas, folhas, raízes e tubérculos, sendo que a parte utilizada pode

influenciar nos compostos presentes nos extratos (Holscher, 2017; Jiménez-Aguilar e Grusak, 2017; Marchesi et al., 2015).

2.3.1 Pitanga (*Eugenia uniflora*)

Uma planta pertencente à família Myrtaceae e amplamente distribuída na América do Sul, sendo uma planta de frutos comestíveis e bastante apreciada na medicina popular como hipotensor, antigota, estomáquico e hipoglicemiante (Auricchio e Bacchi, 2003). Na literatura existem diversos trabalhos apontando suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antibacterianas (de Brito et al., 2022; Falcão et al., 2018; Martinez-Correa et al., 2011; Oliveira et al., 2017).

2.3.2 Tamarindo (*Tamarindus indica*)

Esta planta faz parte da família Fabaceae, e é uma planta tropical nativa do continente Africano, sendo que várias partes dela já vem sendo utilizadas na área culinária, química, têxtil, farmacêutica e cosmética (Gaur e Parvez, 2019; Shammi et al., 2014). Na literatura já é documentado o uso de sua polpa, fruta, folhas, casca do tronco, raízes e semente sendo utilizados com fins medicinais, exibindo propriedades antibacterianas, antifúngicas, hepatoprotetora, imunoestimulante, dentre outras (Adeniyi et al., 2018; Shammi et al., 2014; Shehu et al., 2016).

2.3.3 Abacate (*Persea americana*)

O abacate está inserido na família Lauraceae, é uma planta subtropical/tropical originária do México. Este vegetal já vem sendo usado também na medicina tradicional com propósitos como por exemplo diminuir a pressão sanguínea, diminuir o nível de glicose no sangue, como antiviral, antidiarreico e contra doenças cardiovasculares (Cortés-Rojo et al., 2019; Melgar et al., 2018).

Propriedades antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias e antifúngicas também já foram relatadas em estudos científicos recentes (Jesus et al., 2015), e todos estes fatores recentemente levaram ao seu fruto de ser considerado um “superalimento” (Segovia et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo neste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* de extratos vegetais e óleos essenciais como alternativa ao uso de fármacos tradicionais contra patógenos de peixes comuns na piscicultura brasileira.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e a citotoxicidade dos óleos essenciais de manjeriço, artemísia, melaleuca, citronela, eucalipto, tomilho, ylang ylang isolados ou combinados contra a *F. oreochromis*.

- Avaliar o efeito bactericida da combinação dos dois melhores e dois piores óleos essenciais contra a bactéria.
- Avaliar o efeito tóxico *in vivo* da melhor combinação de óleos.
- Determinar a CIM, CBM e citotoxicidade de produtos comerciais usados na desinfecção de pisciculturas e também de extratos vegetais contra *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*., *C. freundii*, *L. garvieae*, *F. oreochromis*, *F. orientalis* e *Streptococcus agalactiae* sorotipo 1b e sorotipo III.

4. REFERÊNCIAS

- Abdelsalam, M., Elgendy, M.Y., Elfadadny, M.R., Ali, S.S., Sherif, A.H., Abolghait, S.K. 2022. A review of olecular diagnoses of bacterial fish diseases. Aquaculture International 31, 417-434. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00983-8>
- Adam, C. L., Williams, P. A., Dalby, M. J., Garden, K., Thomson, L. M., Richardson, A. J., Gratz, S. W., Ross, A. W. 2014. Different types of soluble fermentable dietary fibre decrease food intake, body weight gain and adiposity in young adult male rats. Nutrition & metabolism 11, 36. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-36>
- Adeniyi, O.V., Olaifa, F.E., Emikpe, B.O., Oyagbemi, A.A. 2018. Experimental evaluation of the wound-healing and antioxidant activities of tamarind (*Tamarindus indica*) pulp and leaf meal in African catfish (*Clarias gariepinus*). Acta Vet Eurasia 44, 63–72. <https://doi.org/10.26650/actavet.2018.011>
- Al-Bayati, F.A. 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinellaanisum* essential oils and methanol extracts. Journal of ethnopharmacology 116, 403-406. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.003>
- Almanea, A., El-Aziz, G.S.A., Ahmed, M.M.M. 2019. The Potential Gastrointestinal Health Benefits of *Thymus vulgaris* essential Oil: A Review. Biomedical and Pharmacology Journal 12. <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1810>
- Álvarez-Martínez, F.J., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., Micol, V. 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. Phytomedicine 90, 153626. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>
- Amal, M.N.A., Zamri-Saad, M. 2011. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. PERTANIKA Journal of Tropical Agricultural Science 34, 195-206.
- Amiri, H. 2012. Essential oils composition and antioxidante properties of three thymus species. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. <https://doi.org/10.1155/2012/728065>
- Araújo Couto, H.G.S., Blank, A.F., Silva, A.M.O., Nogueira, P.C.L., Arrigoni-Blank, M.F., Nizio, D.A.C., Pinto, J.A.O. 2019. Essential oils of basil chemotypes: Major compounds, binary mixtures, and antioxidant activity. Food Chemistry 293, 446-454. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.078>
- Assane, I.M., Valladão, G.M., Pilarski, F. 2021. Chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of selected plant-derived essential oils against fish pathogens. Aquaculture Research, 52, 793-809. <https://doi.org/10.1111/are.14935>

- Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P. 2011. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep187>
- Auricchio, M.T., Bacchi, E.M. 2003. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. Revista Do Instituto Adolfo Lutz 62, 55–61. <https://doi.org/10.53393/rial.2003.62.34958>
- Awad, E., Awaad, A. 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish & Shellfish Immunology 67, 40-54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.034>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46, 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J. 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. J. Fish Dis. 2013, 371–388. <https://doi.org/10.1111/jfd.12025>
- Birkbeck, T.H., Feist, S.W., Verner, D.W. 2011. *Francisella* infections in fish and shellfish. Journal of Fish Diseases 34, 173-187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01226.x>
- Bondad-Reantaso, M. G., MacKinnon, B., Karunasagar, I., Fridman, S., Alday-Sanz, V., Brun, E., Groumellec, M.L., Li, A., Surachetpong, W., Karunasagar, I., Hao, B., Dall’Occo, A., Urbani, R., Caputo, A. 2023. Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. Reviews in Aquaculture 15, 1421-1451. <https://doi.org/10.1111/raq.12786>
- Boscolo, O.H., Valle, L.S. 2008. Plantas de uso medicinal em quissamã, Rio De Janeiro, Brasil. Iheringia. Série Botânica 63, 263–278. <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/149>
- Brito, W.A., Ferreira, M.R.A., Dantas, D.S., Soares, L.A.L. 2022. Biological activities of *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) extracts in oxidative stress-induced pathologies: A systematic review and meta-analysis of animal studies. Pharma Nutrition 20. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100290>
- Cao, H., Chen, J., Guo, C., Wang, H., Gu, Y. 2019. *Citrobacter freundii*: a causative agent for ulcer disease in snakehead fish *Ophiocephalus argus* (Cantor). Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 71, 20982.
- Cardoso, N.N.R., Alviano, C.S., Blank, A.F., Romanos, M.T.V., Fonseca, B.B., Rozental, S., Rodrigues, I.A., Alviano, D.S. 2016. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5647182>
- Chen, F., Sun, J., Han, Z., Yang, X., Xian, J.A., Lv, A., Hu, X., Shi, H. 2019. Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas veronii* from diseased crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Frontiers in microbiology 10, 2742. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02742>

- Chideroli, R.T., Amoroso, N., Mainardi, R.M., Suphoronski, S.A., de Padua, S.B., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., Mosela, M., Morales, A.T., de Oliveira, A.G., Zanolo, R. 2017. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. *Aquaculture* 479, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.013>
- Cortés-Rojo C., Montoya-Pérez R., Rodríguez-Orozco A.R., Saavedra-Molina A., Calderón-Cortés E. 2019. Avocado Oil and Diabetic Complications Related to Mitochondrial Dysfunction, Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes. Elsevier. 2019:89–101.
- de Oliveira, T.F., de Queiróz, G.A., Pimenta Leibowitz, M., Leal, C.A.G. 2023. Therapeutic efficacy of enrofloxacin in treatment of *Francisella orientalis* infections in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1111/jvp.13382>
- De Souza, E.M., de Souza, R.C., Melo, J.F., da Costa, M.M., de Souza, A.M. and Copatti, C.E. 2019. Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture* 504, 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.052>
- Declercq, A.M., Haesebrouck, F., Broeck, W.V., Bossier, P., Decostere, A. 2013. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research* 44. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-27>
- Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L.A. 1997. Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish. *Journal of clinical microbiology* 35, 322-324. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.1.322-324.1997>
- Deng, D., Mu, Z., Lv, X., Jiang, X., Zhou, J., Guo, H., Zhang, W., Wang, B., Lu, Y., Wu, J. and Du, H., 2022. Pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* and *Citrobacter freundii* isolated from the endangered Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Microbial Pathogenesis* 173, 105818. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105818>
- Derome, N., Gauthier, J., Boutin, S., Llewellyn, M. 2016. Bacterial Opportunistic Pathogens of Fish. *Advances in Environmental Microbiology* 3, 81-108. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_4
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W. 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* 3, 25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- Dias, C., Borges, A., Saavedra, M.J., Simões, M. 2018. Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. from wild animals, *J Glob Antimicrob Resist* 12, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.010>
- Dien, L.T., Ngo, T.P.H., Nguyen, T.V., Kayansamruaj, P., Salin, K.R., Mohan, C.V., Rodkhum, C. and Dong, H.T., 2023. Non-antibiotic approaches to combat motile *Aeromonas* infections in aquaculture: Current state of knowledge and future perspectives. *Reviews in Aquaculture* 15, 333-366. <https://doi.org/10.1111/raq.12721>

- Donati, V.L., Dalsgaard, I., Runtuvuori-Salmela, A., Kunttu, H., Jørgensen, J., Castillo, D., Sundberg, L.R., Middelboe, M., Madsen, L., 2021. Interactions between rainbow trout eyed eggs and *Flavobacterium* spp. using a bath challenge model: preliminary evaluation of bacteriophages as pathogen control agents. *Microorganisms* 9, 971. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050971>
- Duke, J.A. 2001. Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants. Herbal Reference Library. ISBN: 9781351442121, 1351442120
- Duke, J.A., Cseke, L.J., Warber, S., Kirakosyan, S., Brielmann, H.L., Kaufman, P.B. 2016. Natural products from plants. Boca Raton: CRC Press.
- Edwards, M.S., Nizet, V. 2011. Group B streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, et al., editors. *Infectious Diseases Of The Fetus And Newborn Infant*. 7th edn. Amsterdam: Elsevier, 419–469.
- Egger, R.C., Rosa, J.C.C., Resende, L.F.L., de Pádua, S.B., de Oliveira Barbosa, F., Zerbini, M.T., Tavares, G.C. and Figueiredo, H.C.P., 2023. Emerging fish pathogens *Lactococcus petauri* and *L. garvieae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. *Aquaculture*, 565, 739093. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739093>
- Ekiert, H., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Slesak, H., Szopa, A. 2020. Significance of *Artemisia vulgaris* L. (Common Mugwort) in the History of Medicina and Its Possible Contemporary Applications Substantiated by Phytochemical and Pharmacological Studies. *Molecules* 25, 4415. <https://doi.org/10.3390/molecules25194415>
- Elgendy, M.Y., Abdelsalam, M., Mohamed, S.A., Ali, S.E. 2022. Molecular characterization, virulence profiling, antibiotic susceptibility, and scanning electron microscopy of *Flavobacterium columnare* isolates retrieved from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture International*, 30, 845-862. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00819-x>
- Falcão, T.R., de Araújo, A.A., Soares, L.A.L., Ramos, R.T.M., Bezerra, I.C.F., Ferreira, M.R.A., Neto, M.A.S., Melo, M.C.N., Araújo, R.F., Guerra, A.C.V.A., Medeiros, J.S., Guerra, G.C.B. 2018. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. *BMC Complement Altern Med* 18, 84. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2144-6>
- Favero, L.M., Facimoto, C.T., Chideroli, R.T., da Costa, A.R., Umezu, D.F., Honda, B.T.B., de Oliveira, A.G., Flaiban, K.K.M.D.C., Di Santis, G.W., Pereira, U.D.P. 2021. Administration of dehydrated oxytetracycline effectively reduces francisellosis mortality in Nile tilapia. *Aquaculture Research* 52, 4116-4126. <https://doi.org/10.1111/are.15250>
- Ferguson, H.W. 2006. Systemic Pathology of Fish. 2nd Edition. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00825.x>
- Fernández-Bravo A, Figueras MJ. 2020. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* 8, 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>
- Franz, C., Novak, J., 2020. Sources of essential oils. In *Handbook of essential oils* (pp. 41-83). CRC Press.

- Gabriel, A., Kamble, M., Omeji, S., Azpeitia, T., Chavan, B., Medhe, S. 2014. Potency of Herbal Extracts for the Treatment of Streptococcus Infection in Tilapia. *International Journal of Basic and Applied Biology* 2, 2394-5820.
- Galvão, L.C.D.C, Furletti, V.F., Bersan, S.M.F, Cunha, M.G., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E.D., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Rosalen, P.L. 2012. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 12p. <https://doi.org/10.1155/2012/751435>
- Gao, D.X.; Gaunt, P.S. 2016. Development of new G media for culture of *Flavobacterium columnare* and comparison with other media. *Aquaculture* 463, 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.006>
- Garcia F., Romera, D.M., Gozi, G.S., Onaka, E.M., Fonseca, F.S., Schalch, S.H.C., Candeira, P.G., Guerra, L.O.M., Carmo, F.J., Carneiro, D.J., Martins, M.I.E.G., Portella, M.C. 2013. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. *Aquaculture* 410, 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.010>
- García-Márquez, J., Barany, A., Ruiz, Á. B., Costas, B., Arijo, S., Mancera, J. M. 2021. Antimicrobial and toxic activity of citronella essential oil (*Cymbopogon nardus*), and its effect on the growth and metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fishes* 6, 61. <https://doi.org/10.3390/fishes6040061>
- Gaur, N., Parvez, N. 2019. Extraction and characterization of polysaccharide from tamarind seed for its pharmaceutical application. *World J Pharm Res* 8, 1219-1230. <https://doi.org/10.20959/wjpr20197-14982>
- Gibello, A., Galán-Sánchez, F., Blanco, M.M., Rodríguez-Iglesias, M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. 2016. The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Research in Veterinary Science* 109, 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.09.010>
- Gilani, A.H., Sheikh, Y., Jamal, Q., Ghayur, M.N. 2005. Hepatoprotective activity of aqueous-methanol extract of *Artemisia vulgaris*. *Phytotherapy Research* 19, 170-172. <https://doi.org/10.1002/ptr.1632>
- Godoy, D.T., Carvalho-Castro, G.A., Leal, C.A. G., Pereira, U.P., Leite, R.C., Figueiredo, H.C.P. 2013. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. *Letters in applied microbiology* 57, 476-483. <https://doi.org/10.1111/lam.12138>
- Gomes, I.B., Maillard, J.Y., Simões, L.C. and Simões, M., 2020. Emerging contaminants affect the microbiome of water systems—strategies for their mitigation. *NPJ Clean Water* 3, 39. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-00086-y>
- Gong, C., Guo, M., Lou, J., Zhang, L., An, Z., Vakharia, V. N., Kong, W., Liu, X. 2023. Identification and characterization of a highly virulent *Citrobacter freundii* isolate and its activation on immune responses in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Fish & Shellfish Immunology* 143, 109224. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109224>

- Goodrich, K.R. 2012. Floral scent in Annonaceae. *Botanical Journal* 169, 262-279. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01220.x>
- Groot, A.C., Schmidt, E. 2016. Teatreeoil: contact allergy and chemical composition. *Contact Dermatitis* 73, 129-143. <https://doi.org/10.1111/cod.12591>
- Guan, B., Cai, Y., Zhou, Y., Zhao, S., Wang, Y., Zhang, D., Wang, S. 2022. Pathogen identification, risk factor and preventive measure of a columnaris disease outbreak in *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) eggs and larvae from a tilapia hatchery. *Aquaculture* 561. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738718>
- Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usman, L.A. 2011. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. *International Journal of Current Research* 33, 86-98.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. 2011. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, p. 255-306. <https://doi.org/10.1002/9780470976623>
- Hamzah, M.H., Man, H.C., Abidin, Z.Z., Jamaludin, H. 2013. Comparison of Citronella Oil Extraction Methods from *Cymbopogon nardus* Grass by Ohmic-heated Hydro-distillation, Hydro-Distillation, and Steam Distillation. *Bioresources* 9. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.9.1.256-272>
- Hayat, U., Jilani, M.I., Rehman, R., Nadeem, F. 2015. A Review on *Eucalyptus globulus*: A New Perspective in Therapeutics. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences* 8, 85-91.
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., Martínez, J. L. 2019. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature microbiology* 4, 1432-1442. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Holscher H.D. 2017. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes* 8, 172–184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>
- Hossain, A., Habibullah-Al-Mamun, M., Nagano, I., Masunaga, S., Kitazawa, D., Matsuda, H., 2022. Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: Risks, current concern, and future thinking. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17825-4>
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2023. SIDRA-Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <https://www2.sidra.ibge.gov.br>
- Ige, B.A. 2016. Probiotics use in intensive fish farming. *African Journal of Microbiology Research* 7, 2701-2711. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.5897/AJMRx12.021>
- Imperi, M., Pataracchia, M., Alfarone, G., Baldassarri, L., Orefici, G., Creti, R. 2010. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of microbiological methods* 80, 212-214. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.010>
- Iregui, C., Comas, J., Vásquez, G., and Verján, N. 2016. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of Fish Diseases* 39, 205–215. <https://doi.org/10.1111/jfd.12347>

Iregui, C., Barato, P., Rey, A., Vasquez, G. and Verjan, N., 2014. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and strepto-coccosis in tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Epidemiology I: Theory, Research and Practice*, pp.251-268.

Jeena, K., Liju, V.B., Viswanathan, R., Kuttan, R. 2013. Antimutagenic potential and modulation of carcinogen-metabolizing enzymes by ginger essential oil. *Phytotherapy Research* 28, 849-855. <https://doi.org/10.1002/ptr.5064>

Jesus D., Oliveira J.R., Oliveira F.E., Higa K.C., Junqueira J.C., Jorge A.O.C., Back-Brito G.N., Oliveira L.D. 2015. *Persea americana* Glycolic Extract. In Vitro Study of Antimicrobial Activity against *Candida albicans* Biofilm and Cytotoxicity Evaluation. *Sci. World J.* 2015, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/531972>

Jiménez-Aguilar, D.M., Grusak, M.A. 2017. Minerals, vitamin C, phenolics, flavonoids and antioxidant activity of *Amaranthus* leafy vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 58, 33-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.005>

Kačániová, M., Terentjeva, M., Vukovic, N., Puchalski, C., Roychoudhury, S., Kunová, Klůga, A., Tokár, M., Kluz, M., Ivanišová, E. 2017. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25, 1108-1116. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.07.005>

Kaefer, C.M., Milner, J.A. 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. *The Journal of Nutritional biochemistry* 19, 347-361. <https://doi.org/10.1016%2Fj.jnutbio.2007.11.003>

Khan, K.A. 2015. A preclinical antihyperlipidemic evaluation of *Artemisia vulgaris* root in diet induced hyperlipidemic animal model. *International Journal of Pharmacological Research* 5, 110-114. <http://dx.doi.org/10.7439/ijpr.v5i4.1885>

Kim, J.H., Kim, M.J., Choi, S.K., Bae, S.H., An, S.K., Yoon, Y.M. 2011. Antioxidant and antimicrobial effects of lemon and eucalyptus essential oils against skin floras. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* 37, 303-308. <https://doi.org/10.15230/SCSK.2011.37.4.303>

Kumru, S., Tekedar, H. C., Blom, J., Lawrence, M. L., Karsi, A. 2020. Genomic diversity in flavobacterial pathogens of aquatic origin. *Microbial pathogenesis*, 142, 104053. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104053>

Kuntu, H.M., Runtuvuori-Salmela, A., Sundell, K., Wiklund, T., Middelboe, M., Landor, L., Ashrafi, R., Hoikkala, V. and Sundberg, L.R., 2021. Bacteriophage resistance affects *Flavobacterium columnare* virulence partly via mutations in genes related to gliding motility and the Type IX secretion system. *Applied and Environmental Microbiology* 87, e00812-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00812-21>

Kusuma, I.W., Murdiyanto, Arung, E.T, Syafrizal, Kim, Y. 2014. Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. *Food Science and Human Wellness* 3, 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.12.004>

Landwehr-Kenzel, S., Henneke, P. 2014. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. *Frontiers in immunology* 5, 519. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00519>

- Larsson, D.G., Flach, C.F. 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology* 20, 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lattanzio, V. 2013. Phenolic Compounds: Introduction. In: Ramawat, K., Mérillon, JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57
- Latif-eugenín, F., Beaz-hidalgo, R., José, M. 2016. A culture independent method for the detection of *Aeromonas* sp. from water samples. *Ital J Food Saf* 5. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5489>
- Lee, K., L, J.H., Cho, M.W., Lee, J. 2014. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. *Environmental biotechnology* 98, 9447-9457. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5903-4>
- Lima, C.V.R., Neves, F.J.M., Maior, L.P.S., Pires, L.L.S., Matos-Rocha, T.J., Santos, A.F. 2019. Ação antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus globulus*, frente a patógenos multirresistentes. *Diversitas Journal* 4, 242-252. <https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v4i1.633>
- Liu, G., Zhu, J., Chen, K., Gao, T., Yao, H., Liu, Y., Zhang, W., Lu, C. 2016. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. *Diseases of Aquatic Organisms* 122, 163–170. <https://doi.org/10.3354/dao03084>
- Mahalwal, V.S., Ali, M. 2002. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle. *Flavour and Fragrance Journal* 18, 73-76. <https://doi.org/10.1002/ffj.1144>
- Majolo, C., Pilarski, F., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R., Chagas, E. C. 2018. Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 30, 388-397. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1487343>
- Mackenzie, J.S. and Jeggo, M. 2019. The One Health approach—Why is it so important?. *Tropical medicine and infectious disease* 4, 88. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Maniyar, Y.A., Devi, C.H.J. 2015. Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Cananga odorata* Lam in experimental animals. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* 4, 354–357. <https://www.ijbcp.com/index.php/ijbcp/article/view/926>
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L. V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65, 330–339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- Marcogliese, D.J. 2010. The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals. *OIE Revue Scientifique et Technique* 27, 467-484.
- Martinez-Correa, H.A., Magalhães, P.M., Queiroga, C.L., Peixoto, C.A., Oliveira, A.L., Cabral, F.A. 2011. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of

extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. The Journal of Supercritical Fluids 55, 998-1006. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.09.001>

Martins, M.L., Miyazaki, D.M.Y., Tavares-Dias, M., Fenerick, J.R.J., Onaka, E.M., Bozzo, F.R., Moraes, F.R. 2009. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female)(Osteichthyes). Brazilian Journal of Biology 69, 957-962. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000400026>

Marques, D.S.C, Ferreira, D.A., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Araújo, J.M., Carvalho, E.V.M.M., Coelho, L.C.B.B. 2016. Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge. Environ. Technol. 37, 3030–3035. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1174313>

Matondo, A., Kilembe, J. T., Ngoyi, E. M., Kabengele, C. N., Kasiana, G. N., Lengbiye, E. M., Mbadiko, C. M., Inkoto, C. L., Bongo, G. N., Gbolo, B. Z., Falanga, C. M., Mwanangombo, D. T., Opota, D. O., Tshibangu, D. S. T., Tshilanda, D. D., Ngbolua, K.-N., Mpiana, P. T. 2021. Oleanolic Acid, Ursolic Acid and Apigenin from *Ocimum basilicum* as Potential Inhibitors of the SARS-CoV-2 Main Protease: A Molecular Docking Study. International Journal of Pathogen Research 6, 1–16. <https://doi.org/10.9734/ijpr/2021/v6i230156>

Melgar B., Dias M.I., Ciric A., Sokovic M., Garcia-Castello E.M., Rodriguez-Lopez A.D., Barros L., Ferreira I.C.R.F. 2018. Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. Ind Crops Prod 111, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.11.031>

Meng, R., Wu, S., Chen, J., Cao, J., Li, L., Feng, C., Liu, J., Luo, Y., Huang, Z. 2022. Alleviating effects of essential oil from *Artemisia vulgaris* on enteritis in zebrafish via modulating oxidative stress and inflammatory response. Fish & Shellfish Immunology, 131, 323-341. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.10.010>

Miao, Q., Zhao, L., Wang, Y., Hao, F., Sun, P., He, P., Liu, Y., Huang, J., Liu, X., Liu, X., Deng, G., Li, H., Li, L., Tang, Y., Wang, L., Feng, M., Jia, W. 2020. Microbial metabolomics and network analysis reveal fungistatic effect of basil (*Ocimum basilicum*) oil on *Candida albicans*. Journal of Ethnopharmacology, 260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113002>

Mitiku, M., A., A. 2018. Review on Columnaris disease in freshwater farmed fish. Review Article. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, Volume 5, Issue 6. <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2018.05.06.007>

Mo, X., Wang, J., Guo, S., Li, A. 2020. Potential of naturally attenuated *Streptococcus agalactiae* as a live vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 518. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734774>

Munda, S.; Pandey, S.K.; Dutta, S.; Baruah, J.; Lal, M. 2019. Antioxidant Activity, Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oil of *Artemisia vulgaris* L. Leaves from Northeast India. Journal of Essential Oil Bearing Plants 22, 368-379. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1602083>

- Nayak, S.K. 2020. Current prospects and challenges in fish vaccine development in India with special reference to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *Fish & Shellfish Immunology* 100, 283-299. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.064>
- Nguyen-Poupelin, J., Tran, H., Tran, H., Phan, T.A., Dolecek, C., Farrar, J., Tran, T.H., Caron, P. Bodo, B., Grellier, P. 2007. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 417-427. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.011>
- Oliveira, P. S., Chaves, V. C., Bona, N. P., Soares, M. S. P., Cardoso, J. S., Vasconcellos, F. A., Tavares, R. G., Vizzotto, M., Silva, L. M. C. D., Grecco, F. B., Gamaro, G. D., Spanevello, R. M., Lencina, C. L., Reginatto, F. H., & Stefanello, F. M. 2017. *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 92, 935–941. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.131>
- Oliveira, F.L., Silva, J.W.F., Correia, K., Leite, F.D. 2018. Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia* – natural products that show promise in candidiasis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* 49, 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.008>
- Oliveira, T.F., Quieróz, G.A., Leibowitz, M.P., Leal, C.A.G. 2022. Development of an inactivated whole cell vaccine through immersion for immunoprophylaxis of *Francisella orientalis* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings and juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* 127, 405-411. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.040>
- Ordal EJ, Rucker RR: Pathogenic myxobacteria. *PSEBM* 1944 56, 15–18. <https://doi.org/10.3181/00379727-56-14572>
- Ottem K.F., Nylund A., Karlsbakk E., Friis-Møller A. & Krøsoy B. 2007. Characterization of *Francisella* sp., GM 2212, the first *Francisella* isolate from marine fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Archives of Microbiology* 187, 343–350. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0198-1>
- Pandey, V., Patel, A., Patra, D. D.2016. Integrated nutrient regimes ameliorate crop productivity, nutritive value, antioxidant activity and volatiles in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Industrial Crops and Products* 87, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.035>
- Park, J.W., Wendt, M., Heo, G.J. 2016. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. *Laboratory animal research*, 32, 87-90. <http://dx.doi.org/10.5625/lar.2016.32.2.87>
- Pattanayak, S., Priyadarsini, S., Paul, A., Kumar, P.R., Sahoo, P.K. 2020. Diversity of virulence-associated genes in pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolates and their in vivo modulation at varied water temperatures. *Microbial Pathogenesis* 147, 104424. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104424>
- Pessoa, R.B.G., Oliveira, W.F., Marques, D.S.C., Correia, M.T.S., Carvalho, E.V.M.M., Coelho, L.C.B.B. 2019. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis* 130, 81-94. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036>

- Pulido, E.A., Iregui, C.A., Figueroa, J., & Klesius, P. 2004. Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas em Colombia. *Revista AquaTic* 20, 97-106. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49402010>
- Pulpipat, T., Maekawa, S., Wang, P. C., Chen, S. C. 2020. Immune Responses and Protective Efficacy of a Formalin-Killed *Francisella Noatunensis* Subsp. *Orientalis* Vaccine Evaluated through Intraperitoneal and Immersion Challenge Methods in *Oreochromis Niloticus*. *Vaccines* 8, 163. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020163>
- Quintans-Júnior, L., Rocha, R.F., Caregnato, F.F, Moreira, J.C.F., Silva, F.A., Araújo, A.A.S., Santos, J.P.A., Melo, M.S., Sousa, D.P., Bonjardim, L.R., Gelain, D.P. 2011. Antinociceptive action and redox Properties of Citronellal, an essential oil present in lemongrass. *Journal of Medicinal Food* 14, 630-639. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0125>
- Raknak, K., Praphairaksit, N. 2020. The development of anesthetic for koi carp (*Cyprinus carpio* L.) using mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) oil emulsion. <http://ir-thesis.swu.ac.th/dspace/handle/123456789/1079>
- Ramirez-Paredes, J.G., Larsson, P., Thompson, K.D., Penman, D.J., Busse, H.J., Öhrman, C., Sjödin, A., Soto, E., Richards, R.H., Adams, A., Colquhoun, D.J. 2020. Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Ottem et al. 2009 as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 2034-2048. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004009>
- Rao, S., Pham, T.H., Poudyal, S., Cheng, L.W., Nazareth, S.C., Wang, P.C. and Chen, S.C., 2022. First report on genetic characterization, cell-surface properties and pathogenicity of *Lactococcus garvieae*, emerging pathogen isolated from cage-cultured cobia (*Rachycentron canadum*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, 1197-1211. <https://doi.org/10.1111/tbed.14083>
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M. 2014. A status review on the medicinal Properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109173>
- Ravidra; Pradhan, P.K., Pande, V., Yadav, D.K., Sood N. 2019. Modulation of the innate immune responses in Indian major carp, *Catla catla* following experimental infection with *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture* 510, 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.015>
- Ribeiro, A., Estanqueiro, M., Oliveira, M., Lobo, J.S. 2015. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics* 2, 48–65. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2020048>
- Roleira, F.M.F., Elisiário, J., Tavares-da-Silva, Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J., Borges, F. 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry* 183, 235–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>

- Rota, M.C., Herrera, A. Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J. 2008. Antimicrobial activity and Chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control* 19, 681-687. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007>
- Saad, N.Y., Muller, C.D., Lobstein, A. 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* 28, 269-279. <https://doi.org/10.1002/ffj.3165>
- Salaro, R.E.G., 2018. Atividade in vitro de óleos essenciais contra *Neoechynorhynchus buttnerae* de tabaqui e seus efeitos no hospedeiro. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/6bf61a53-5924-477c-baf3-37aa05a8b9e3/content>
- Salem, M.B., Affes, H., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., Hammami, S., Zeghal, K. M. 2015. Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant foods for human nutrition* 70, 441–453. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0503-8>
- Saputra, N.A., Wibisono, H.S., Darmawan, S., Pari, G., 2020. Chemical composition of *Cymbopogon nardus* essential oil and its broad spectrum benefit. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 415, 012017). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/415/1/012017>
- Sarker, S. and Abraham, T.J., 2019. Isolation, identification and pathogenicity of *Flavobacterium columnare* SGM4 in catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus 1758). *European Journal of Biology* 78, 139-146. <https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2019.0027>
- Sato, N., Yamane, N., Kawamura, T. 1982. Systemic *Citrobacter freundii* infection among sunfish *Mola mola* in Matsushima Aquarium. *Nippon Suisan Gakkaishi* 11, 1551–1557. <https://doi.org/10.2331/suisan.48.1551>
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M.D., Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen nov. *Syst Appl Microbiol* 6, 183-195. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80052-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80052-7)
- Schnitzler, P., Astania, A., Reichling J. 2010. Antiviral effects of plant-derived essential oils and pure oil components, in *Lipids and Essential Oils*. <https://doi.org/10.1002/9780470976623.ch10>
- Segovia F., Hidalgo G., Villasante J., Ramis X., Almajano M. 2018. Avocado Seed: A Comparative Study of Antioxidant Content and Capacity in Protecting Oil Models from Oxidation. *Molecules* 23, 2421. <https://doi.org/10.3390/molecules23102421>
- Shahin, K., Veek, T., Heckman, T.I., Littman, E., Mukkatira, K., Adkison, M., Welch, T.J., Imai, D.M., Pastenkos, G., Camus, A., Soto, E. 2022. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, from California, USA. *Transboundary and Emerging Diseases* 69, 2326-2343. <https://doi.org/10.1111/tbed.14250>
- Shammi, N., Choudhry, Z., Khan, M., & Hossain, M. 2014. A Comparative Study on the Hepatoprotective Effect of *Tamarindus indica* and Vitamin E in Long Evans Rats.

Sharmeen, J.B., Mahomoodally, F.M., Zengin, G., Maggi, F., 2021. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules*, 26, 666. <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>

Shehu, K., Kasarawa, A.B., Nasiru, A.M., Sambo, S., Sulaiman, B., Yalli, A.A., Aliyu, L.S. 2016. Antifungal activities of *Tamarindus indica* and *Azadirachta indica* extracts on the growth of some selected fungal species. *Int J Innovative Biochem Microbio Res* 4, 23–26.

Shi, Y.Z., Nishiki, I., Yanagi, S. and Yoshida, T., 2019. Epidemiological study on newly emerging *Lactococcus garvieae* serotype II isolated from marine fish species in Japan. *Fish Pathology* 54, 51-57. <https://doi.org/10.3147/jsfp.54.51>

Silva, K., Abebe, W., Sousa, S., Duarte, V., Machado M., Matos, F. 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of ethnopharmacology* 89, 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.007>

Silva, L.L., Almeida, R., Verícimo, M.A., Macedo, H.W., Castro, H.C. 2019. Therapeutic activities of melaleuca essential oil (*Melaleuca alternifolia*) A literature review. *Brazilian Journal of Health Review* 2. <https://doi.org/10.34119/bjhrv2n6-094>

SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários. 2022.

Soto E., Hawke J.P., Fernandez D. & Morales J.A. 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of Fish Diseases* 32, 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x>

Souza, R.H.L., Cardoso, M.S.P., Menezes, C.T., Silva, J.O., De Sousa, D.P., Batista, J.S. 2011. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 19, 277-281. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22615669>

Stringer-Roth, K.M., Yunghans W., Caslake, L.F. 2002. Differences in chondroitin AC lyase activity of *Flavobacterium columnare* isolates. *Journal of Fish Diseases* 25, 687-691. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00421.x>

Tavares-Dias, M., Martins, M.L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. 2017. *Journal of Parasitic Diseases* 41, 913-918. <https://doi.org/10.1007%2Fs12639-017-0938-y>

Tawatsin, A., Wratten, D.S., Scott, R.R., Thavara, U. 2001. Repellency of volatile oils from plantas against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology* 26, 76-82. PMID: 11469188

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products* 43, 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.069>

- Testerman, T., Beka, L., McClure, E.A., Reichley, S.R., King, S., Welch, T.J., Graf, J., 2022. Detecting flavobacterial fish pathogens in the environment via high-throughput community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 88, 02092-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.02092-21>
- Tiedje, J. M., Fang, W. A. N. G., Manaia, C. M., Virta, M., Sheng, H., Liping, M. A., Tong, Z., Edward, T. O. P. P. 2019. Antibiotic resistance genes in the human-impacted environment: a one health perspective. *Pedosphere* 29, 273-282. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60062-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60062-1)
- Tomás, J.M. 2012. The Main Aeromonas Pathogenic Factors. *International Scholarly Research Notices* 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/256261>
- Türe, M., Alp, H. 2016. Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. *Journal of Veterinary Research* 60, 141-146. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2016-0020>
- Türe, M., Kutlu, I. 2018. Isolation of *Citrobacter freundii* from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Freshwater Cage. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research* 4, 85-89. <http://doi.org/10.17216/limnofish.396496>
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pilarski, F. 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 38, 417-428. <https://doi.org/10.1111/jvp.12202>
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Ikefuti, C.V., Da Cruz, C., Levy-Pereira, N., Rodrigues, M.V.N., Pilarski, F. 2016. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *Journal of fish diseases*, 39, 1143-1152. <https://doi.org/10.1111/jfd.12447>
- Valladão, G.M., Gallani, S.U., Pala, G., Jesus, R.B., Kotzent, S., Costa, J.C., Silva, T.F., Pilarski, F. 2017. Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture research*, 48, 5640-5649. <https://doi.org/10.1111/are.13386>
- Varona, S., Rodriguez, R.S., Martín, A., Cocero, M.J., Serra, A.T., Crespo, T., Duarte, C.M. 2013. Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products* 42, 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.020>
- Ventura, A.S., Jerônimo, G.T., Corrêa Filho, R.A.C., de Souza, A.I., Stringheta, G.R., da Cruz, M.G., dos Santos Torres, G., Gonçalves, L.U., Povh, J.A. 2021. *Ocimum basilicum* essential oil as an anesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum*: Hematological, biochemical, non-specific immune parameters and energy metabolism. *Aquaculture* 533. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736124>
- Wang, Y., Lu, J., Engelstädter, J., Zhang, S., Ding, P., Mao, L., Yuan, Z., Bond, P.L., Guo, J. 2020. Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. *The ISME Journal* 14, 2179-2196. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0679-2>

Wei, L. S., Wee, W. 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of Cymbopogon nardus citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. Iranian journal of microbiology, 5, 147.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23825733>

Xue, M., Xiao, Z., Li, Y., Jiang, N., Liu, W., Meng, Y., Fan, Y., Zeng, L., Zhou, Y. 2022. Isolation, identification and characteristics of Aeromonas caviae from diseased largemouth bass (Micropterus salmoides). Fishes 7, 119.

<https://doi.org/10.3390/fishes7030119>

Yost, J.M., Wise, S.L., Love, N.L., Steane, D.A., Jones, R.C., Ritter, M.K. and Potts, B.M., 2021. Origins, diversity and naturalization of Eucalyptus globulus (Myrtaceae) in California. Forests 12, 1129. <https://doi.org/10.3390/f12081129>

Capítulo 2 – Manuscrito nas normas do periódico “Aquaculture”

Potencial antimicrobiano *in vitro* de óleos essenciais contra *Flavobacterium oreochromis*

Fernando Cardoso Gomes^a, Daiane Vaneci^a, Elielma Lima de Sousa^b, Daniel de Abreu Reis Ferreira^b, André do Vale Oliveira^a, Fabiana Pilarski^{a,b*}

^aPrograma de Pós-graduação em Aquicultura, Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal SP 14884-900, Brasil

^bPrograma de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual de São Paulo (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal SP, 14870-000, Brasil

*Autor correspondente em Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal SP 14884-900, Brasil. Telefone +55 16 3209-8137; email: fabiana.pilarski@unesp.br

Resumo

A produção comercial de peixes no Brasil de forma intensiva vem aumentando, e essa intensificação quando feita sem os devidos cuidados pode levar a uma maior facilidade na disseminação de patógenos, que muitas vezes são controlados com o uso de antimicrobianos. Estes antimicrobianos quando utilizados de forma incorreta propiciam o surgimento de microrganismos resistentes e a disseminação de genes de resistência entre bactérias de organismos aquáticos, humanos e ambiente. Como alternativa a essa problemática, os fitoterápicos vêm se destacando na prevenção e controle de doenças de peixes, em função das propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas presentes nas plantas. Com este intuito, neste trabalho foi avaliado o potencial bacteriostático e bactericida *in vitro* dos óleos essenciais de manjerição, artemísia, melaleuca, citronela, eucalipto, tomilho e ylang ylang isolados ou combinados. O ensaio de microduição em placa foi realizado contra *F. oreochromis*, uma bactéria que vem provocando grandes perdas econômicas na cadeia de produção de peixes. Foi também realizado teste *in vitro* das combinações dos óleos para a observação da porcentagem de lise dos eritrócitos de tilápia-do-Nilo a fim de determinar a segurança no uso destes óleos. Neste estudo, foi possível observar que os óleos essenciais de ylang ylang e manjerição apresentaram os melhores resultados quanto ao efeito bactericida, com CBM de 71,48 µg/mL e 69,45 µg/mL respectivamente. As combinações dos óleos de ylang ylang e manjerição e ylang ylang e citronela revelaram resultados ainda melhores, com concentrações bactericidas mínimas de 8,80 µg/mL e 8,73 µg/mL respectivamente. Nos testes de citotoxicidade foi observado um valor de absorbância estatisticamente semelhante ao do controle negativo nas concentrações bactericidas mínimas das combinações de óleos, com valores de percentual de hemólise de 0,19% para a combinação dos óleos de ylang ylang e manjerição e 0,14% na combinação dos óleos de

ylang ylang e citronela. De forma geral os resultados demonstraram a efetividade dos óleos essenciais de plantas contra a *Flavobacterium oreochromis* e baixa citotoxicidade frente a eritrócitos de tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: Fitoterápicos, óleos essenciais, patógenos, bactéria, MIC, MBC

1. Introdução

Atualmente uma das maiores problemáticas enfrentadas na cadeia de produção de peixes para consumo no mundo diz respeito à ocorrência de doenças causadas por vírus, bactérias e parasitas. Dentre os fatores que afetam diretamente a saúde dos peixes, podemos citar a densidade de estocagem, alimentação e qualidade de água inadequada, excesso de matéria orgânica, pontos de poluição próximos a piscicultura, como por exemplo aqueles causados por indústrias (Derome et al., 2016).

Com os animais estressados, há uma maior probabilidade de infecção por diversos agentes patogênicos, incluindo as bactérias, que representam um problema na cadeia produtiva da piscicultura em todo o mundo. Dentre as bactérias, a *F. oreochromis* é responsável por causar morbidade e mortalidade em várias espécies de peixes em todo o mundo, causando mortalidade massiva em alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo e espécies nativas. (Reis et al., 2022).

Em 2017, as doenças bacterianas e parasitárias em criações comerciais de peixes no Brasil resultaram em uma perda anual direta e indireta de aproximadamente 84 milhões de dólares (Tavares-Dias e Martins, 2017). Para conter surtos de doenças e evitar perdas na produção, os produtores frequentemente recorrem a antimicrobianos que são legislados para outras espécies animais, colocando em risco o ambiente aquático e a saúde

do consumidor. Assim, a adoção de medidas preventivas, como o uso de aditivos alimentares, imunostimulantes, prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais, torna-se crucial para modificar esse cenário (Skalli et al., 2013).

No Brasil estão licenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento apenas duas moléculas para uso como antimicrobiano na piscicultura: o florfenicol e a oxitetraciclina (MAPA, 2022). A utilização indiscriminada destes produtos, como o uso profilático pode desencadear reações negativas, como por exemplo a seleção de bactérias resistentes e multirresistentes, situação que vem crescendo exponencialmente nos últimos anos em todo o mundo. Porém, este fenômeno também pode ocorrer de forma natural pela pressão de seleção aumentada pelos antimicrobianos. Ainda, é possível a transmissão de genes de resistência entre as bactérias, através dos mecanismos de conjugação, transformação ou transdução (Romero et al., 2012). Tudo isso pode resultar em maiores problemas, não apenas para a produção de peixes, mas pode afetar inclusive a saúde humana, visto que esta transferência de genes de resistência ultrapassa a barreira de espécies bacterianas. Agregado ao fato de que a produção destes animais ocorre na água, ambiente rico em diversos microrganismos e que faz parte do uso básico dos seres humanos, provocando um problema de escala global (Igbinosa, 2015).

Os óleos essenciais têm um grande apelo, devido ao potencial como alternativa aos fármacos convencionais, por serem produtos naturais, renováveis e sustentáveis. São conhecidos há tempos por terem propriedades bactericidas, virucidas, fungicidas, antioxidantes, anti-inflamatórias, sedativas e analgésicas. Atualmente, são conhecidos aproximadamente 3000 tipos de óleos essenciais, sendo que 300 deles tem importância comercial, principalmente para a área de medicamentos e cosméticos dentro da indústria farmacêutica e também na indústria agrônômica (Bakkali et al., 2008). As suas composições variam, mas em sua maioria, os óleos essenciais possuem dois ou três

compostos majoritários, que aparecem em maior quantidade, podendo chegar até 60 componentes no total (Reyes-Jurado et al., 2020).

Com a propagação da resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas e até mesmo não patogênicas nos setores de produção animal, que pode afetar também a saúde pública, se faz necessário a busca de soluções alternativas a este problema. O uso dos óleos essenciais se apresenta como uma possível solução, ou mais um aliado para solucionar este problema e tornar toda a cadeia de produção mais segura e ecologicamente mais sustentável.

2. Material e métodos

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais foram adquiridos da empresa Phytoterápica® e foram armazenados em frasco âmbar original em temperatura de 4°C até o momento da utilização. Os óleos essenciais utilizados foram manjerição (*Ocimum basilicum*) (Phytoterápica, Brasil, lote OEM 19.02); Artemísia (*Artemisia vulgaris*) (Phytoterápica, Brasil, lote POAM19.02); Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) (Phytoterápica, Brasil, lote POM19.02); Citronela (*Cymbopogon nardus*) (Phytoterápica, Brasil, lote 2F 8/18); Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (Phytoterápica, Brasil, lote POEG19.03); Tomilho (*Thymus vulgaris*) (Phytoterápica, Brasil, lote OET19.01); Ylang ylang (*Cananga odorata*) (Phytoterápica, Brasil, lote POEY211).

2.2 Composição dos OEs

Os componentes principais dos óleos foram identificados através de cromatografia gasosa de alta resolução. Os óleos foram testados isoladamente e em combinação com base no resultado da CIM. Os dois óleos com melhores e piores resultados na CIM foram

combinados e uma nova CIM foi realizada seguindo os protocolos utilizados na CIM inicial.

2.3 Citotoxicidade

A análise de citotoxicidade foi realizada com as duas combinações de óleos que exibiram as menores CBMs, sendo realizada com base na ação hemolítica destas combinações de óleos essenciais frente a eritrócitos de tilápia-do-Nilo. Esta análise foi feita como descrito por Assane et al. (2021), sendo seus resultados expressos em porcentagem total de lise de hemácias. A média e desvio padrão dos dados de absorbância para cada dose foram calculadas a partir de triplicatas. A normalidade e homoscedasticidade dos dados foram analisadas através do teste de Shapiro-Wilk, sendo os dados então analisados por one-way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas, com intervalo de confiança de 95%. Foram consideradas seguras as concentrações que não demonstraram diferença estatística ao controle negativo.

2.4 Teste de atividade antimicrobiana

2.4.1 Bactéria

A cepa de *Flavobacterium oreochromis* utilizada neste estudo foi isolada e a espécie identificada por Reis et al. (2022). Identificada como DV001 e foi isolada de lesões na pele de tilápia-do-Nilo, que havia sido encaminhada ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP para análise de rotina, devido a um surto na piscicultura, localizada no estado de São Paulo. O isolamento foi feito seguindo os protocolos padrões, como análise do histórico clínico, observação

de alterações macroscópicas no animal, realização de plaqueamento, observação da morfologia de colônias, seguido de coloração de Gram em que foram observados bacilos Gram-negativos finos e longos.

A bactéria foi inicialmente identificada como *Flavobacterium columnare* através de extração de DNA, seguido do uso da técnica de PCR e então sequenciamento e comparação com outras sequencias disponíveis no NCBI, sendo depositada no GenBan sob número de acesso MW732243. Porém através de análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição e de filogenia realizada posteriormente foi observado que o isolado DV001 pertencia ao genovar II e grupo genético 4. Em 2022 LaFrentz et al. (2022) reclassificou o patógeno *Flavobacterium columnare* com base nos grupos genéticos distintos dentro da espécie através de abordagem polifásica e poligenética. Segundo este estudo os isolados pertencentes ao grupo genético 4 seriam reconhecidos com uma nova espécie, *Flavobacterium oreochromis*. A patogenicidade contra Pacus, *Piaractus mesopotamicus*, também foi verificada, através de teste de DL50 por Reis et al. (2020).

Para o cultivo da bactéria foram utilizados os meios de Shieh e meio G, com cultivo da bactéria a 28°C, durante 48 a 72 horas em estufa bacteriológica. Após a purificação das colônias, estas foram armazenadas em criotubos estéreis com utilização de caldo G e glicerol (20%) e armazenadas em ultrafreezer na temperatura de -80°C até o momento do uso.

2.5 Atividade antimicrobiana *in vitro*

A determinação da concentração inibitória mínima dos OEs foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 poços com fundo em “U”, em duplicata. Os OEs foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). As concentrações

dos óleos testados variaram entre 25% e 0,05%, e a concentração final mais alta utilizada do DMSO foi de 0,05%. Foi avaliado também o efeito isolado do solvente frente a bactéria testada.

Foram seguidas as orientações descritas no manual VET03 do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020), utilizando-se caldo Muller Hinton (MH)(BD, USA)(4g/L) com cátions ajustados, como meio de cultura para a bactéria. Foram utilizados como controles negativos poços preenchidos somente com meio de cultura, e como controle positivo poços preenchidos com meio de cultura e adicionados do inóculo. Para controle de qualidade foi utilizada a cepa de *E. coli* ATCC25922 e florfenicol, conforme orientação do CLSI. O antimicrobiano foi preparado conforme descrito por Assane et al., 2021.

Para o preparo do inóculo foi seguido o método de cultura em caldo, com uso inicial de ágar MH com cátions ajustados, e então uso do caldo MH com cátions ajustados (4g/L). Nas placas de 96 poços a concentração final de bactéria foi de 5×10^5 . As placas foram incubadas a 28 °C, durante 48h. Os valores de CIM foram dados com base nas menores concentrações em que não foi observado crescimento bacteriano.

Com base nos resultados da CIM, foram plaqueados em ágar Muller Hinton com cátions ajustados 10 µl dos três poços com as menores concentrações de cada óleo essencial e das combinações dos óleos onde não houve crescimento bacteriano aparente. As placas foram incubadas a 28 °C, por 48h, a fim de avaliar o crescimento bacteriano. A menor concentração onde não houve crescimento bacteriano observado foi considerada como sendo a concentração bactericida mínima (CBM).

2.6 Interpretação dos resultados de CIM e CBM

As CIMs e CBMs foram convertidas de (v/v) para $\mu\text{g/mL}$, com a utilização da densidade de cada óleo. Para a caracterização quanto ao poder de inibição dos OEs foi utilizado a classificação adotada por Espinoza et al. (2019), onde $\text{CIM} < 500\mu\text{g/mL}$ indica um poder forte de inibição, CIM entre 600 e $1,500\mu\text{g/mL}$ indica um poder moderado de inibição e $\text{CIM} > 1,600\mu\text{g/mL}$ indica um poder fraco de inibição.

2.7 Toxicidade aguda *in vivo*

O teste de toxicidade aguda *in vivo* foi conduzido utilizando uma combinação dos óleos essenciais (OEs) que demonstraram os melhores resultados em testes anteriores. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal – UNESP, São Paulo, Brasil, sob o protocolo de número 003812/23. A metodologia adotada seguiu as diretrizes propostas pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2020). O teste foi adaptado para um período de 48 horas, conforme sugerido por Katsiadaki et al., 2021, devido à observação de que a maioria, senão todos, os sinais clínicos de toxicidade se manifestam nas primeiras 24 horas do teste, e também devido à redução da taxa de mortalidade ao longo do tempo do teste. Além disso, considerou-se a questão do bem-estar animal, uma vez que os peixes permanecem sem alimentação durante todo o período do teste.

Foram utilizados 72 alevinos de tilápia-do-Nilo, com peso médio de $0,63\pm 0,03$ g e comprimento total médio de $3,76\pm 0,08$ cm. Os animais foram alojados em aquários contendo 2,5L de água, de modo a não exceder a densidade de 0,8 g de peso vivo por litro, sendo nove animais utilizados por concentração testada. Um grupo controle negativo, contendo apenas água, e um grupo controle de solvente, utilizando DMSO na

concentração de 100 µl/L, também foram incluídos. As concentrações de OEs testadas variaram de 100 a 2,49 µl/L. A CL50 foi estimada com base no modelo regressão probit (Lei e Sun, 2018) e com uso do software MedCalc 22.020 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Bélgica).

3. Resultados

3.1 Composição dos OEs

Os três principais componentes de cada óleo foram: canfora (17,3%), eucaliptol (14,2%) e limoneno (14,2%) no óleo essencial de artemisia, geraniol (34,7%), citronelal (24,8%) e citronelol (10,9%) no óleo essencial de citronela, estragol (77,4%), linalool (16,9%) e nerolidol (1,6%) no óleo essencial de manjerição, terpinen-4-ol (40,5%), γ -terpineno (19,7%) e α -terpineno (9,3%) no óleo essencial de melaleuca, timol (53,3%), p-cimeno (20,8%) e carvacrol (8,9%) no óleo essencial de tomilho, 1,8-cineol (73%), limoneno (12,1%) e p-cimeno (4,4%) no óleo essencial de eucalipto, germacreno d (24,9%), β -cariofileno (19,8%) e β -farneseno (10,2%) no óleo essencial de ylang ylang.

3.2 Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados apenas com as combinações de óleos de exibiram as duas menores CBM, sendo elas ylang ylang e citronela, e ylang ylang e manjerição. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 5, com a porcentagem de lise de eritrócitos nas diferentes concentrações de óleos essenciais utilizados.

Foi possível observar que a porcentagem de lise de eritrócitos se mostrou dose dependente, já que nas concentrações mais altas o percentual de hemólise chegou a 97,50 % na combinação de ylang ylang e citronela e 58,65% na combinação de ylang ylang e manjerição. Já quando observamos a taxa de hemólise nas mesmas concentrações daquelas observadas nas CBMs vemos que essa taxa cai drasticamente, para 0,19 % no caso da combinação de ylang ylang e manjerição, e 0,14 % na combinação de ylang ylang e citronela. Os resultados envolvendo a comparação dos dados de absorbância podem ser observados na Figura 1.

3.3 Atividade antimicrobiana *in vitro*

A CIM e CBM do solvente utilizado, dimetilsulfóxido, se mostraram acima das CIMs e CBMs dos óleos e combinações testadas. Os óleos que apresentaram as menores CIM foram os de manjerição e ylang ylang, enquanto aqueles que apresentaram as maiores CIM foram os óleos essenciais de citronela e melaleuca. Os resultados estão descritos na Tabela 1.

A CBM mais baixa foi observada na combinação do óleo de ylang ylang e citronela, com a concentração de 8,73 µg/mL, seguido então pela combinação do óleo de ylang ylang com o de manjerição, com CBM de 8,80 µg/mL. A CBM da combinação do óleo de ylang ylang com o óleo de melaleuca ficou levemente acima, na concentração de 17,69 µg/mL. As combinações dos óleos de manjerição e citronela, manjerição e melaleuca e citronela e melaleuca tiveram resultados de CBM bastante próximos, sendo de 34,41 µg/mL, 34,88 µg/mL e 34,61 µg/mL respectivamente.

Os resultados menos satisfatórios foram observados no uso dos óleos individualmente, com valores de CBM crescente observados no óleo de manjerição,

seguido do óleo de ylang ylang que apresentaram valores próximos, de 69,45 µg/mL e 71,48 µg/mL, seguidos então dos óleos de eucalipto, artemisia e tomilho, que também apresentaram valores bastante próximos, com CBMs nas concentrações de 142,5 µg/mL, 145,46 µg/mL e 147,03 µg/mL respectivamente. O óleo de melaleuca teve seu valor de CBM na concentração de 280,17 µg/mL enquanto o óleo de citronela teve a concentração de 546,25 µg/mL, sendo o pior resultado observado nas CBMs dos óleos analisados de forma individual.

3.4 Toxicidade aguda *in vivo*

Durante o período de aclimação, não foram registradas mortalidades. A alimentação dos animais foi interrompida 24 horas antes do início dos testes, enquanto a temperatura e a oxigenação permaneceram estáveis e dentro dos parâmetros aceitáveis pela metodologia durante todo o teste. Após 20 minutos do início do teste, foram observadas alterações de cor, com os animais ficando com coloração mais escura e de comportamento, com presença de letargia e disposição dos animais no fundo do aquário, e também a diminuição na frequência dos batimentos operculares nos grupos submetidos às três maiores concentrações testadas (Figura 2). A mortalidade começou a ocorrer 1 hora após o início do teste, com a perda de todos os indivíduos do grupo exposto à maior concentração dos óleos essenciais (OEs) testados, 100µl/L. Uma morte foi registrada no grupo exposto à concentração 10,8µl/L após 3 horas do início do teste, seguida de uma morte no grupo exposto à concentração de 22,67µl/L após 6 horas. Após 15 horas do início do teste, um indivíduo do grupo exposto à segunda maior concentração de 47,62µl/L veio a óbito, seguido de mais dois indivíduos do mesmo grupo após 18 horas. Mais um óbito foi registrado após 21 horas, no grupo exposto à concentração de 22,67µl/L. As últimas mortes foram observadas com 42h, sendo de três animais que

estavam no grupo da dose de 47,62µl/L. Não houve mortalidade no grupo controle da água nem no grupo controle de solvente. Os animais que permaneceram vivos não apresentavam qualquer alteração física ou de comportamento. Com estes dados foi possível estimar a CL50 em 37,53µl/L. A curva de dose-resposta pode ser observada na Figura 3.

4. Discussão

Foi possível observar, com exceção da combinação de manjerição e melaleuca, que a combinação dos óleos essenciais demonstrou melhores resultados que o teste dos óleos isolados, sugerindo uma possível interação positiva entre os óleos, como por exemplo a presença de sinergismo entre eles (Basavegowda e Baek, 2021).

As combinações que apresentaram os melhores resultados foram as que tinham o ylang ylang presente, inclusive quando combinado com o OE de citronela, que apresentou o pior resultado quando analisado isoladamente. Esses resultados apontam uma opção interessante quanto ao uso combinado de um ou mais óleos, a fim de potencializar a ação dos compostos e até mesmo diminuir as doses necessárias para atingir a ação esperada.

Quando levamos em consideração a forma de análise adotada por Espinoza et al. (2019), foi possível observar que apenas o óleo essencial de citronela, quando usado de forma isolada, apresentou poder de inibição moderado frente a *F. oreochromis*. Todos os outros óleos essenciais, isolados ou em combinação demonstraram forte poder de inibição contra a bactéria.

Os valores da CBM das combinações dos óleos de ylang ylang com manjerição, e de ylang ylang com citronela ficaram bem próximos dos valores de corte de florfenicol e oxitetraciclina estimados por Gieseke e Woods (2016), o que reforça o uso potencial destas combinações no controle contra esta bactéria.

Um fator que tem grande importância é a possível toxicidade dos óleos ao animal, uma vez que já foi reportado que a concentração sérica acima de 33,904 µg/mL de alguns óleos essenciais foi tóxica para hemácias de tilápia-do-Nilo (Assane et al., 2021) e não menos importante é fato de que óleos essenciais também podem ter potencial de serem tóxicos para o ecossistema aquático, como por exemplo o OE de manjerição (Pastorino et al., 2022), fator que ainda é pouco considerado.

Foi possível observar resultados semelhantes com outros trabalhos, os quais demonstraram efeito antimicrobiano dos óleos de citronela frente a *Edwardsiella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Andrade et al., 2012; Wei e Wee, 2013; Sagala et al., 2022); o óleo essencial de eucalipto se mostrou eficaz contra *S. iniae*, *L. garvieae*, *Vibrio harveyi*, *P. aeruginosa* (Roomiani et al., 2013; Park et al., 2016; Lima et al., 2019); o de manjerição para *Enterobacter amnigenus*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* (Moghaddam et al., 2011; Andleeb et al., 2014; Chalesshtori et al., 2018); O óleo de Ylang ylang foi eficaz contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus epidermidis* (Sacchetti et al., 2005; Vuuren et al., 2018) e o óleo essencial de tomilho demonstrou efeito antimicrobiano contra *A. salmonicida* e *A. veronii* (Tural et al., 2019).

Em contrapartida, existem estudos demonstrando somente ação bacteriostática do óleo essencial de manjerição contra *Streptococcus iniae* (Roomiani et al., 2013). Em nosso estudo, o efeito de todos os óleos essenciais, em combinação ou não, demonstraram efeito antimicrobiano contra *F. oreochromis*. Isto pode ter ocorrido pela presença de determinados compostos ativos nestes óleos cujos potenciais antimicrobianos já foram evidenciados em outros estudos (Álvarez-Martínez et al., 2021).

Como exemplo destes compostos que estavam presentes nos óleos testados podemos citar como exemplo a cânfora, citronelal, linalol, timol e tomilho, que estavam

presentes nos óleos essenciais de artemísia, citronela, manjerição, e tomilho, respectivamente. A forma de ação destes compostos se dá pela ruptura da membrana celular, que foi comprovado por Guimarães et al., 2019. Também foram observados outros compostos com diferentes formas de ação, como o limoneno, presente no óleo de artemísia e eucalipto, que agiu inibindo a expressão de proteínas do complexo da cadeia respiratória (Han et al., 2019) e o terpinen-4-ol que estava presente no óleo de melaleuca, e causou danos na integridade da estrutura celular e perturbação na síntese de proteínas e DNA (Zhang et al., 2018).

Nas duas combinações de óleos testadas, a porcentagem de lise de eritrócitos foi baixa nas concentrações de 8,80 µg/mL e 8,73 µg/mL, sendo menores até que 1 %. Apesar dos efeitos benéficos destes óleos, já foram observados em outros estudos efeitos tóxicos em variados graus, geralmente de forma dose dependente (Sestili et al., 2018; Sutili et al., 2015). Isto foi observado no presente estudo, já que na concentração de 281,6 µg/mL da combinação de óleos a taxa de lise chegou a ultrapassar 97%. Esta observação reforça ainda mais a cautela que deve ser aplicada na utilização desses produtos, devendo ser utilizados com atenção e de forma correta para evitar possíveis danos aos animais.

O potencial citotóxico *in vitro* verificado demonstrou-se bastante baixo nas concentrações inibitórias mínimas das combinações dos óleos. No entanto, ao observarmos os resultados do teste de toxicidade *in vivo* fica claro que a combinação dos óleos de ylang ylang e citronela apresentou um nível de toxicidade *in vivo* muito maior. Isto fica claro quando nos atentamos ao fato de que a CIM desta combinação, que foi de 500µl/L, se mostrou mais de dez vezes maior que a CL50 encontrada no teste de toxicidade aguda de 48h, que foi de 37,53µl/L. Levando em consideração esta alta toxicidade *in vivo* contra alevinos de tilápia-do-Nilo a forma mais segura de utilização

desta combinação de óleos, que apresentou os melhores resultados *in vitro*, seria com seu uso na desinfecção de equipamentos e ambientes, e não em contato direto com os animais.

Este estudo foi relevante para demonstrar que todos os óleos essenciais, isolados ou em combinação apresentaram atividade bactericida contra *Flavobacterium oreochromis*, e podem ser mais uma ferramenta útil no combate a este patógeno nas pisciculturas.

5. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

6. Bibliografia

Álvarez-Martínez, F.J., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., Micol, V., 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine* 90, 153626. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>

Andleeb, S., Madiha, M. T., Azeem, K. U., Riaz, A. N., Ali, S. 2014. Antibacterial and Antioxidant Activities of Tradional Herbs and Honey against Fish Associated Bacterial Pathogens. *Pakistan Journal of Zoology* 46, 933-940. <http://dx.doi.org/10.13140/2.1.1041.4728>

Andrade, M. A., Cardoso, M. G., Batista, L. R., Mallet, A. C. T., Machado, S. M. F. 2012. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber*

officinale: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Revista Ciência Agronômica 43, 399-408. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000200025>

Assane, I.M., Valladão, G.M.R., Pilarski, F. 2021. Chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of selected plant-derived essential oils against fish pathogens. Aquaculture Research 52, 793-809. <https://doi.org/10.1111/are.14935>

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, v.46, I. 2, p. 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Basavegowda, N., Baek, K.-H. 2021. Synergistic Antioxidant and Antibacterial Advantages of Essential Oils for Food Packaging Applications. Biomolecules 11, 1267-1285. <https://doi.org/10.3390/biom11091267>

Chaleshtori, R. S., Taghizadeh, M., Arani, N. M., Chaleshtori, F. S. 2018. A Comparative Study on the Antibacterial Activity of Artemisia dracunculus and Ocimum basilicum Essential Oils on Multidrug Resistant Bacteria Isolated from Ready to Eat Foods. Journal of Essential Oil Bearing Plants 21, 701-712. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1491328>

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. VET03 – Methods for Antimicrobial Broth Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals. 2nd Edition.

Derome, N., Gauthier, J., Boutin, S., Llewellyn, M. 2016. Bacterial Opportunistic Pathogens of Fish. Advances in Environmental Microbiology 3, 81-108. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_4

- Espinoza, J., Urzúa, A., Sanhueza, L., Walter, M., Fincheira, P., Muñoz, P., Mendoza, L., Wilkens, M. 2019. Essential oil, extracts, and sesquiterpenes obtained from the heartwood of *pilgerodendron uviferum* act as potential inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA multidrug efflux pump. *Frontiers in Microbiology* 10, 337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00337>
- Gieseke, C.M., Woods L.C. 2016. Provisional epidemiological cutoff values for standard broth microdilution susceptibility testing of *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Diseases* 40, 679-686. <https://doi.org/10.1111/jfd.12549>
- Guimarães, A.C., Meireles, L.M., Lemos, M.F., Guimarães, M.C.C., Endringer, D.C., Fronza, M., Scherer, R., 2019. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24, 2471. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
- Han, Y., Sun, Z., Chen, W., 2019. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules* 25, 33. <https://doi.org/10.3390/molecules25010033>
- Igbinosa, E.O. 2015. Detection and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* Isolates in Aquaculture Environments: Implications for Public Health. *Microbial Drug Resistance* 22, 238-245. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0169>
- Katsiadaki, I., Ellis, T., Andersen, L., Antczak, P., Blaker, E., Burden, N., Fisher, T., Green, C., Labram, B., Pearson, A., Petersen, K. 2021. Dying for change: A roadmap to refine the fish acute toxicity test after 40 years of applying a lethal endpoint. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 223, 112585. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112585>

Lei, C., Sun, X., 2018. Comparing lethal dose ratios using probit regression with arbitrary slopes. BMC Pharmacology and Toxicology 19, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0250-1>

Lima, C.V.R., Neves, F.J.M., Maior, L.P.S., Pires, L.L.S., Matos-Rocha, T.J., Santos, A.F. 2019. Ação antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus globulus*, frente a patógenos multirresistentes. Diversitas Journal 4, 242-252. <https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v4i1.633>

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2023. Produtos Farmacêuticos Veterinários Registrados. Disponível em: <
<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios> >

MedCalc® Statistical Software version 22.020 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org> ; 2024)

Moghaddam, A.M.D., Shayegh, J., Mikaili, P.I., Sharaf, J.D. 2011. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria Journal of Medicinal Plants Research 5, 3453-3456. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000162>

OECD. 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>

Park, J.W., Wendt, M., Heo, G.J. 2016. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. Laboratory Animal Research 32, 87-90. <https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.2.87>

- Pastorino, P., Prearo, M., Anselmi, S., Broccoli, A., Provenza, F., Barcelò D., Renzi, M. 2022. Ecotoxicity of basil (*Ocimum Basilicum*) extract in aquaculture feeds: Is it really eco-safe for the aquatic environment?. *Ecological Indicators* 142. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109173>
- Reis, D.A.F., Assane, I.M., Vaneci-Silva, D., Oliveira, A.V., Tamashiro, G.D., Hashimoto, D.T., Pilarski, F. 2022. Morpho-molecular identification, pathogenicity for *Piaractus mesopotamicus*, and antimicrobial susceptibility of a virulent *Flavobacterium columnare* isolated from Nile tilapia cultured in Brazil. *Aquaculture* 560. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738486>
- Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A.R., Ochoa-Velasco, C.E., Palou, E., López-Malo, A. and Ávila-Sosa, R., 2020. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. *Critical reviews in food science and nutrition* 60, 1641-1650. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1586641>
- Roomiani, L., Soltani, M., Akhondzadeh, B.A., Mahmoodi, A., Mirghaed, A., Yadollahi, F. 2013. Evaluation of the Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12, 702-716. <https://doi.org/10.1001.1.15622916.2013.12.3.17.4>
- Sacchetti, G., Maietti, S., MUzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini S., Radice, M., Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91, 621-632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>

- Sagala, R. J., Kambira, P. F. A., Gunawan, U., Pollin, G. 2022. The potential of citronella grass to inhibit growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. *Pharmacy Education* 22, 218-224. <https://doi.org/10.46542/pe.2022.222.218224>
- Sestili, P., Ismail, T., Calcabrini, C., Guescini, M., Catanzaro, E., Turrini, E., Layla, A., Akhtar, S., Fimognari, C. 2018. The potential effects of *Ocimum basilicum* on health: a review of pharmacological and toxicological studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 14, 679-692. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1484450>
- Skalli, A., Castillo, M., Andree, K.B., Tort, L., Furones, D., Gisbert, E. 2013. The LPS derived from the cell walls of the Gram-negative bacteria *Pantoea agglomerans* stimulates growth and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture* 416, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.037>
- Sutili, F.J., Silva, L.L., Gressler, L.T., Battisti, E.K., Heinzmann, B.M., Vargas, A.C., Baldisserotto, B. 2015. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: in vitro activity and their use in experimentally infected fish. *Journal of Applied Microbiology* 119, 47-54. <https://doi.org/10.1111/jam.12812>
- Tavares-Dias, M.; Martins, M.L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. 2017. *Journal of Parasitic Diseases* 41, 913-918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Tural, S.; Durmaz, Y.; Urçar, E.; Turhan S. 2019. Antibacterial activity of thyme, laurel, rosemary and Parsley essential oils against some bacterial fish pathogen. *Acta Aquatica Turcica*, 15(4), 440-447. <https://doi.org/10.22392/actaquat.549380>
- Vuuren, A.R.S.F., Viljoen, A.M., Kamatou, G. 2018. The in vitro antimicrobial evaluation of commercial essential oils and their combinations against acne. *International Journal of Cosmetic Science* 40, 226-243. <https://doi.org/10.1111/ics.12456>

Wei, L. S., Wee, W. 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of Cymbopogon nardus citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. Iranian Journal of Microbiology 5, 147-152.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3696851/>

Zhang, X., Guo, Y., Jiang, H., Ji, Q. 2018. In Vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Melaleuca alternifolia Essential Oil. BioMed Research International 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2396109>

Zhang, Y., Feng, R., Li, L., Zhou, X., Li, Z., Jia, R., Song, X., Zou, Y., Yin, L., He, C., Liang, X., 2018. The antibacterial mechanism of terpinen-4-ol against Streptococcus agalactiae. Current microbiology 75, 1214-1220. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1512-2>

7. Tabelas

Tabela 1. Valores da Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais testados frente a *F. oreochromis*

Óleo	CBM (µg/mL)
Citronela	546,25
Melaleuca	280,17
Tomilho	147,03
Artemísia	145,46
Eucalipto	142,5
Manjeriço	69,45
Ylang ylang	71,48
Y+MA	8,80
Y+ME	17,69
Y+C	8,73
MA+C	34,41
MA+ME	34,88
C+ME	34,61

Y= ylang ylang, MA= manjeriço, ME= melaleuca, C= citronela

Tabela 2. Porcentagem de hemólise observada no teste de citotoxicidade *in vitro* das menores Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM)(em µg/mL) das combinações de óleos essenciais.

Concentrações (ug/mL)	4505,6	2252,8	1126,4	563,2	281,6	140,8	70,40	35,20	17,16	8,80
Óleos Essenciais										
Y+MA	58,65%	39,81%	29,72%	24,23%	11,49%	0,93%	0,51%	0,47%	0,32%	0,19%
Y+C	97,50%	89,60%	34,55%	7,49%	6,88%	6,09%	2,32%	1,48%	0,84%	0,14%

Y= ylang ylang, MA= manjerição, C= citronela

8. Legendas das figuras

Figura 1. Níveis de absorvância observados no teste de citotoxicidade das combinações de óleos essenciais de ylang ylang (*Cananga odorata*) com manjeriço (*Ocimum basilicum*), ylang ylang com citronela (*Cymbopogon nardus*), do controle positivo—TRITON e do controle negativo—PBS. Letras diferentes indicam diferença estatística entre valores de absorvância ($p<0,05$).

Figura 2. Foto demonstrando coloração e comportamento alterados nos animais submetidos à combinação de óleos de ylang ylang e citronela na concentração de 47,62 µL/L (A), e animais com coloração e comportamentos normais expostos   combinação dos mesmo óleos na concentração de 10,8 µL (B).

Figura 3. Curva dose-resposta indicando a CL50 e a relação entre probabilidade de morte e concentração da combinação dos óleos de ylang ylang e citronela.

Figura 1

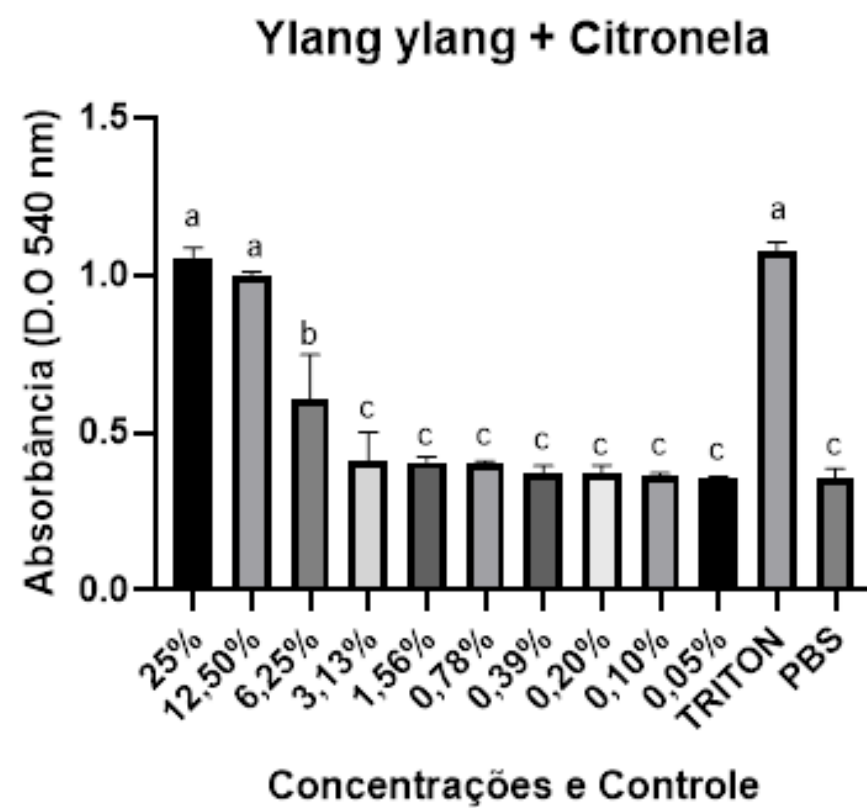
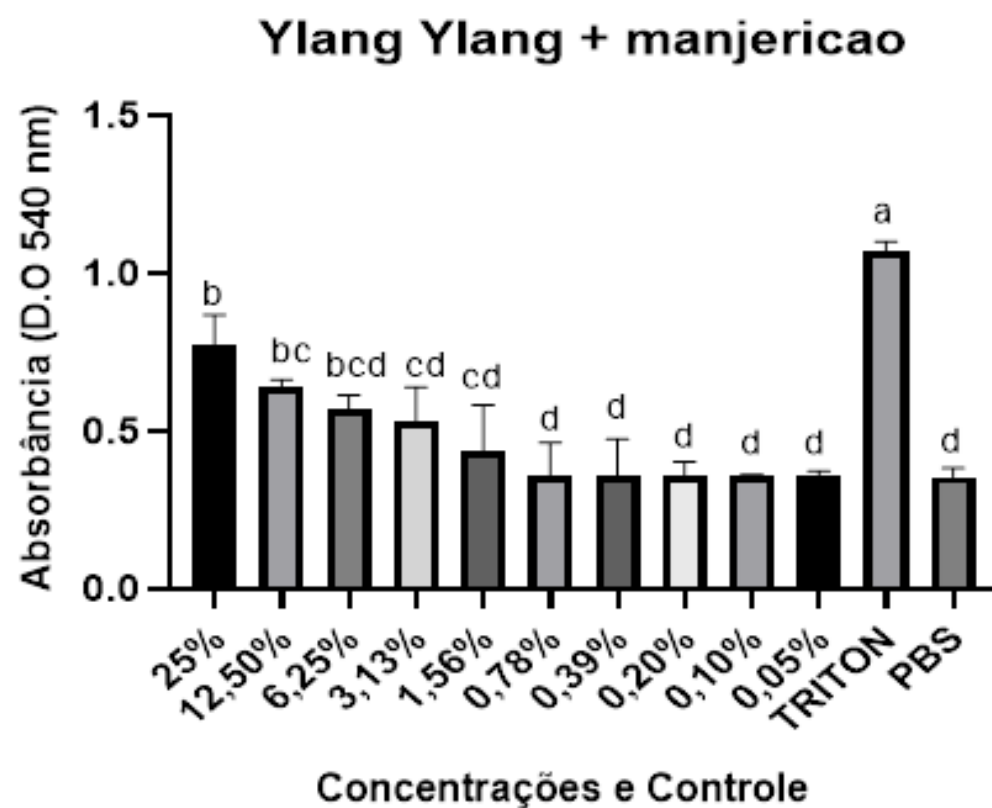


Figura 2

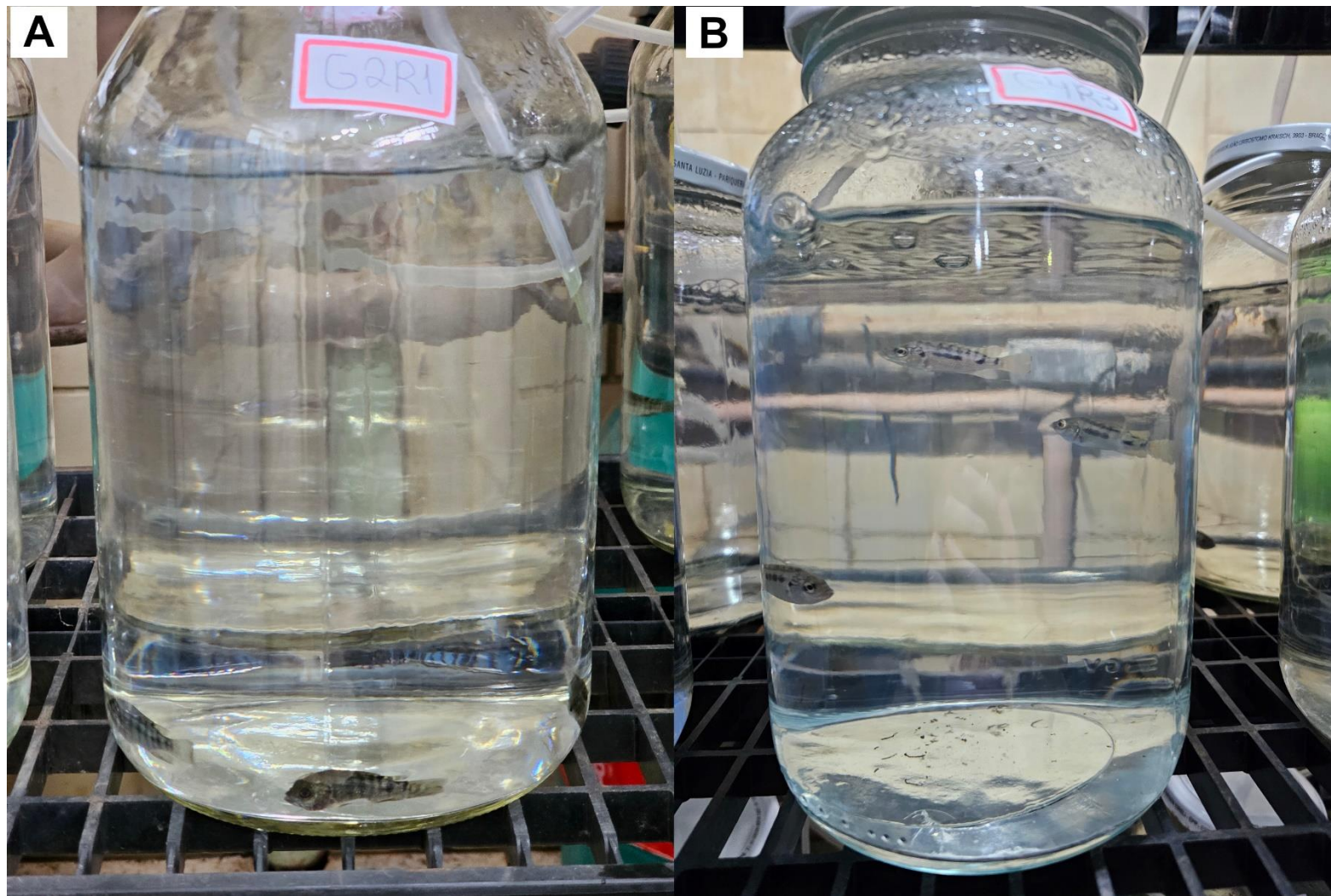
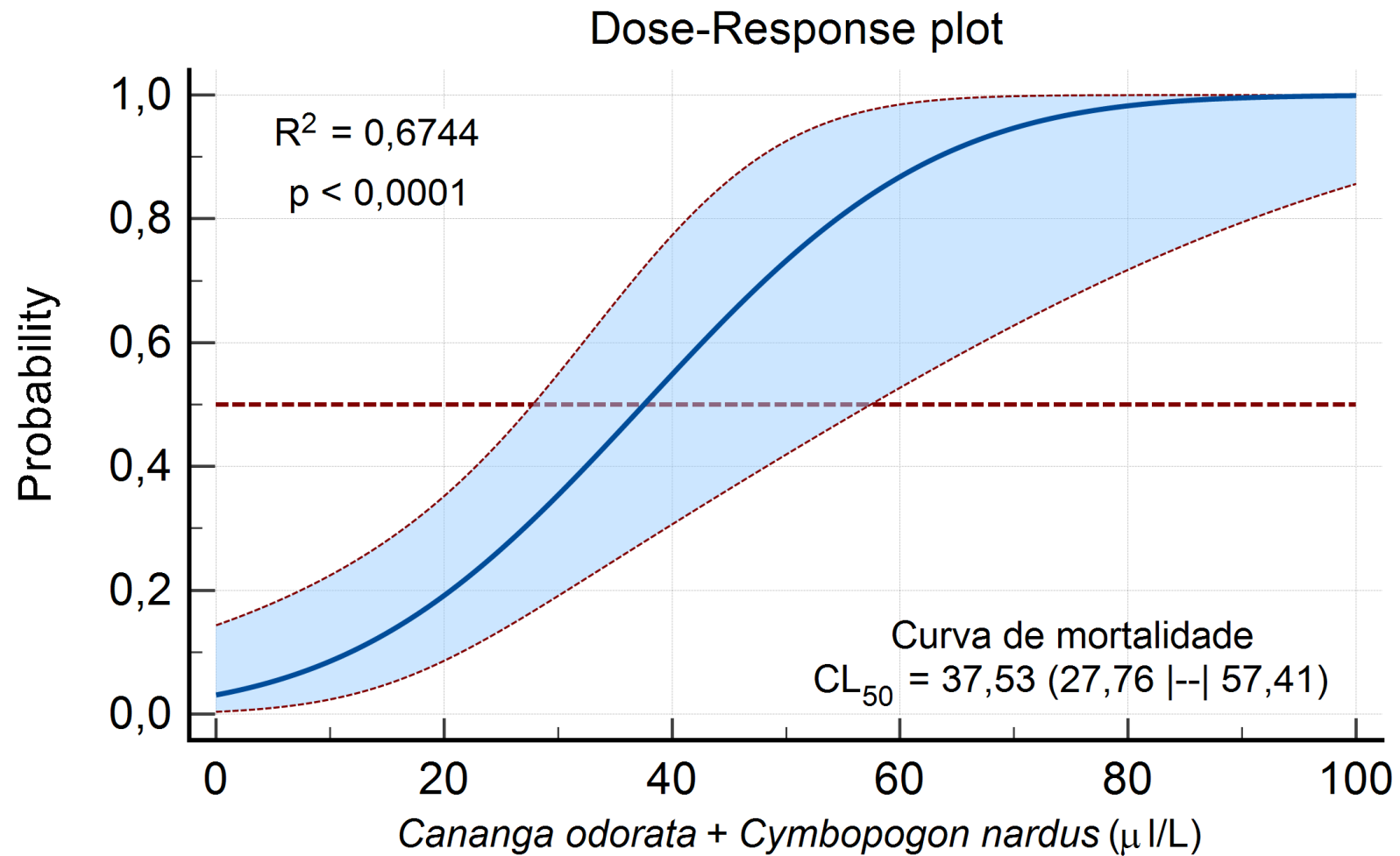


Figura 3



Capítulo 3 – Manuscrito nas normas do periódico “Aquaculture”

Efeito *in vitro* de produtos comerciais utilizados para a desinfecção e extratos de plantas contra bactérias patogênicas de peixes

Fernando Cardoso Gomes^a, Daiane Vaneci^a, Elielma Lima de Sousa^b, Daniel de Abreu Reis Ferreira^b, André do Vale Oliveira^a, Fabiana Pilarski^{a,b*}

^aPrograma de Pós-graduação em Aquicultura, Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal SP 14884-900, Brasil

^bPrograma de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual de São Paulo (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal SP, 14870-000, Brasil

*Autor correspondente em Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal SP 14884-900, Brasil. Telefone +55 16 3209-8137; email: fabiana.pilarski@unesp.br

Resumo

A intensificação da produção, quando não acompanhada de boas práticas sanitárias e de manejo pode acarretar maior propensão de doenças e disseminação de patógenos entre os animais. Para a prevenção dessas doenças, existem produtos comerciais para a desinfecção de ambientes e objetos que são utilizados na rotina da produção e fármacos para o tratamento de doenças nos peixes. Como alternativa a estes produtos comerciais,

os fitoterápicos se destacam por não ocasionarem seleção por resistência nos microrganismos e por serem ecologicamente mais sustentáveis, reduzindo a possibilidade de acúmulo de resíduos no pescado e no ambiente. Neste estudo, o potencial antimicrobiano e citotóxico de três produtos comerciais (Virkon®, Formaldeído e Permanganato de potássio) e extratos de pitanga *Eugenia uniflora*, tamarindo *Tamarindus indica* e abacate *Persea americana* foram testados contra nove bactérias comumente isoladas de peixes e do ambiente aquícola (*Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Citrobacter freundii*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib, *Streptococcus agalactiae* sorotipo III, *Flavobacterium oreochromis* e *Francisella orientalis*). O efeito antibacteriano (Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra as nove bactérias e a atividade hemolítica dos extratos e dos produtos comerciais foram avaliados *in vitro*. Os testes foram realizados através de microdiluições em placas de Elisa com concentrações variando de 16,60% a 0,03% (v/v) para os extratos e de 2,5% a 0,00195% (v/v) para os produtos comerciais por plaqueamento e incubação a 28°C por 24 a 48h. Nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) o melhor resultado foi observado para o formaldeído, seguido do Virkon®, com CIMs chegando a 0,0039%. Com relação aos extratos, a menor CIM (0,06% v/v) foi observada na *T. indica* para *L. garvieae* e *S. agalactiae* sorotipo III, porém o extrato de *E. uniflora* apresentou a segunda CIM mais baixa (0,13% v/v) para *S. agalactiae* sorotipo III e o extrato de *P. americana* apresentou CIM de 0,25% (v/v) para *L. garvieae* e *S. agalactiae* sorotipo III. No teste de citotoxicidade para eritrócitos de tilápia-do-Nilo, as porcentagens de lise se mostraram dose dependente, com o desinfetante Virkon® apresentando a menor taxa de hemólise (0,69% de hemólise na concentração de 0,00195%). Com estes resultados, foi possível observar que os produtos comerciais Virkon® e formaldeído,

utilizados como desinfetante realmente são eficazes contra bactérias de peixes, demonstraram efeito antimicrobiano contra oito e nove, das nove bactérias utilizadas no estudo, respectivamente, e que o extrato vegetal de abacate também demonstrou potencial antimicrobiano contra sete dos nove patógenos testados, que são espécies de patógenos de grande importância na piscicultura atual.

Palavras-chave: Extratos vegetais, patógenos, aquicultura, citotoxicidade, MIC, MBC

1. Introdução

O setor da piscicultura tem um importante papel na produção de proteína de alto valor para o consumo humano, e foi estimado pela Organização para a Alimentação e a Aquicultura (FAO) em 2018 que metade dos peixes utilizados na alimentação humana tinha como origem a piscicultura. Para suprir a crescente demanda um caminho que pode ser tomado diz respeito ao aumento de produtividade, porém esse aumento vem geralmente acompanhado do aumento na densidade de estocagem dos animais, facilitando a disseminação de patógenos neste ambiente produtivo (Hossain et al., 2022; Zhou et al., 2021).

Dentre esses patógenos, temos uma diversidade de parasitas e bactérias. Dentre as bactérias patogênicas mais comumente associadas a doenças em peixes podemos citar *Streptococcus agalactiae*, grupo das *Aeromonas* móveis, *Flavobacterium* sp., *Francisella orientalis*, *Citrobacter freundii* e *Lactococcus garvieae* (Maldonado-Miranda et al., 2022).

O tratamento das doenças causadas por estas bactérias se dá com o uso de antimicrobianos, porém o não cumprimento das boas práticas veterinárias no uso destes fármacos acarreta a seleção de bactérias resistentes e contaminação das águas e do

pescado, se o período de carência não for respeitado (Liu et al., 2017; Santos et al. 2018a; Silva et al., 2021). Como alternativa para a prevenção das doenças causadas por bactérias, muitos produtores realizam a desinfecção de equipamentos e maquinários utilizados na rotina da piscicultura, com desinfetantes próprios para este fim ou outros produtos que apresentem potencial desinfetante, como o formaldeído (Leal et al., 2016).

Devido a este cenário, a busca por diferentes produtos desinfetantes se faz interessante. Dentre as possibilidades, destacam-se os fitoterápicos, como por exemplo os óleos essenciais e extratos de plantas. Estas substâncias são produtos obtidos após o processamento de vegetais e já são utilizadas na medicina humana e animal há muitos anos (Mumtaz et al., 2017).

Desta forma, este estudo investigou o efeito antimicrobiano e citotóxico dos extratos de folhas de abacate *Persea americana*, pitanga *Eugenia uniflora* e tamarindo *Tamarindus indica*, do desinfetante comercial Virkon® (Lanxess, Alemanha) (VIR), do formaldeído (FOR) e do permanganato de potássio (PER) frente à *S. agalactiae* sorotipo Ib, *S. agalactiae* sorotipo III, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Flavobacterium oreochromis*, *Citrobacter freundii*, *Lactococcus garvieae* e *Francisella orientalis*.

2. Material e métodos

2.1 Extratos de plantas

No presente estudo foram utilizados extratos de folhas de *E. uniflora*, *T. indica* e *P. americana*. Para a obtenção dos extratos, as folhas colhidas na Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho (UNESP) (Latitude: 21° 14' 05" S Longitude: 48° 17' 09" W) foram liofilizadas (SuperModulyo, Thermo Fisher Scientific) até a completa

remoção da umidade e, posteriormente, transformadas em pó fino, utilizando um micromoinho analítico (IKA A11, Sigma Aldrich). A solubilização dos extratos em pó para utilização nos testes foi feita com o uso de dimetilsulfóxido (DMSO, Êxodo Científica, Brasil). As concentrações iniciais e finais utilizadas nos testes de CIM e citotoxicidade foram de 16,60% e 0,00097%, respectivamente.

2.2 Composição dos extratos

A análise da composição dos extratos foi realizada através da técnica de cromatografia gasosa acoplado ao detector por espectrometria de massas em série (GC-MS/MS). Para tal, foi utilizado como solvente o acetato de etila e os seguintes equipamentos: Cromatógrafo Gasoso modelo GC-2010 Plus (Shimadzu Corporation, Japão), Espectrômetro de Massas modelo GCMS-TQ8050 (Shimadzu Corporation, Japão) e auto amostrador AOC-6000 (Shimadzu Corporation, Japão). A identificação foi feita com base no método de Adams (2017).

2.3 Produtos comerciais (Virkon®, formaldeído e permanganato de potássio)

Os produtos comerciais utilizados foram Virkon® (Lanxess, Alemanha, peroximonosulfato de potássio), formaldeído (Êxodo Científica, Brasil) e permanganato de potássio (Synth, Brasil). Os produtos comerciais foram adquiridos de empresas fornecedoras de materiais para laboratório e preparados e utilizados conforme orientação do fabricante (VIR) ou baseado em trabalhos descritos na literatura (FOR, PER)(Tavares-Dias, 2021; Zhao et al., 2021).

2.4 Teste de Citotoxicidade

A atividade citotóxica *in vitro* dos extratos e dos produtos comerciais foi analisada através da atividade hemolítica dos produtos nos eritrócitos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). No teste, foi utilizado como controle positivo, solução de 1% (v/v) Triton X-100, que causa 100 % de hemólise nos eritrócitos, e solução de tampão fosfato (PBS) como controle negativo, que não provoca hemólise. Para o preparo da solução de eritrócitos, foi coletado sangue de juvenis de tilápia-do-Nilo saudáveis com seringas e agulhas heparinizadas. O sangue total foi lavado três vezes com PBS através de centrifugação a 500 g por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram utilizados para confecção de uma solução contendo 1% (v/v) de eritrócitos em PBS.

Microtubos de 2 ml contendo 1 ml da solução de eritrócitos e 1 ml das diferentes concentrações dos extratos e produtos comerciais foram incubados em estufa mantida a 28°C durante 1 hora. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 500xg durante 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes transferidos para placa de 96 poços com fundo plano e a absorbância realizada através de leitura em espectrofotômetro (2100, ÚNICO), com comprimento de onda de 625 nm.

Para determinar a porcentagem de hemólise foi utilizada a equação:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{Aa - Apbs}{(Atriton - Apbs)} \times 100$$
, sendo que *Aa* representa o valor de absorbância da amostra, *Apbs* o valor de absorbância do PBS e *Atriton* o valor de absorbância da solução de 1% (v/v) Triton X-100 (Assane et al., 2021). O teste foi realizado em triplicata.

A média e desvio padrão dos dados de absorbância para cada dose foram calculadas a partir de triplicatas. A normalidade e homoscedasticidade dos dados foram analisadas através do teste de Shapiro-Wilk, sendo os dados então analisados por one-

way ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas, com intervalo de confiança de 95%. Foram consideradas seguras as concentrações que não demonstraram diferença estatística ao controle negativo (PBS).

2.5 Teste de atividade antimicrobiana

2.5.1 Microrganismos utilizados

Nos testes foram utilizadas nove cepas de bactérias isoladas de peixes de várias espécies que foram encaminhados pelos produtores de pisciculturas com animais doentes ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Aquicultura da UNESP, para isolamento e identificação. As cepas foram *S. agalactiae* sorotipo Ib, *S. agalactiae* sorotipo III, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Flavobacterium oreochromis*, *Citrobacter freundii*, *Lactococcus garvieae* e *Francisella orientalis*. As cepas foram isoladas de amostras de rim cranial e cérebro de tilápias do Nilo, sendo então mantidas em um banco de cepas do laboratório, conservadas meio líquido com a adição de glicerol como crioprotetor e então armazenadas em ultrafreezer na temperatura de -80°C. O florfenicol e uma cepa de *E. coli* ATCC® 25.922™ foram utilizados como controle de qualidade nos testes de atividade antimicrobiana conforme procedimentos descritos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

2.5.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima (CIM e CMB)

A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de microdiluição em caldo Muller Hinton (MH) com uso de placas de 96 poços, em duplicata, seguindo os

procedimentos descritos pelo manual VET03 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). As nove bactérias selecionadas para os testes foram repicadas em Ágar Muller Hinton (BD, USA), incubadas em temperatura de 28°C durante 24-48 h em estufa de crescimento (Quimis®, São Paulo, Brasil). Após este período foi preparado o inóculo pelo método de suspensão de colônias com todas as bactérias com exceção da *F. oreochromis*, onde foi utilizado o método de cultura em caldo.

Os extratos e os produtos comerciais foram preparados conforme descrito anteriormente. A concentração inicial dos extratos foi de 16,60%, e a concentração final analisada foi de 0,03%. Já no caso dos produtos comerciais as concentrações iniciais e finais foram de 1—0,00195% VIR, 2,5—0,00488% FOR, 0,5—0,00097% PER. Cada teste foi acompanhado de um controle negativo, composto apenas pelo meio de cultura estéril, e um positivo, contendo meio de cultura estéril e o microrganismo testado. Para o antimicrobiano, foi utilizada a metodologia descrita por Assane et al. (2019), o qual foi dissolvido em etanol a 95% (FFC) para produzir as soluções antimicrobiana-mãe.

O resultado da CIM foi dado através de observação visual da concentração onde não houve crescimento bacteriano evidente, sendo utilizado cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio quando necessário para evidenciar respiração celular e, portanto, o crescimento bacteriano. Para o teste da CBM foram plaqueadas amostras do poço de menor concentração sem crescimento bacteriano e os dois poços anteriores em meio Muller Hinton (BD, USA) sólido, incubadas durante 24 a 48 horas de acordo com a bactéria, sendo o resultado a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano.

3. Resultados

3.1. Composição dos extratos

No total foram identificados 36 compostos químicos (Tabelas 1-3). No extrato de *Persea americana* foram identificados 16 destes compostos, sendo os principais o Cyclopropanecarboxylic acid, undec-2-enyl ester (20,37%), Eicos-9-ene-1,20-diacetate (19,43%) e Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, acetate, (3.β.,22E)-(18,10%). No extrato de *Eugenia uniflora* foram identificados 20 compostos químicos, e um não identificado. Os compostos mais abundantes quantitativamente foram Selina-1,3,7(11)-trien-8-one (35%), Selina-1,3,7(11)-trien-8-one epoxide (27,30%) e 2,6-Octadiene, 4,5-dimethyl-(8,63%). No extrato de *Tamarindus* foram identificados apenas dois compostos químicos, o Phytol (75,28%) e o Neophytadiene (24,72%).

3.2 Teste de Citotoxicidade

Os controles positivos (Triton X-100 a 1%) e negativos (PBS) apresentaram 100% e 0% de lise as hemácias da tilápia-do-Nilo. A hemólise ocasionada pelos extratos de plantas teve pouca variação nas diferentes concentrações. O extrato que apresentou maior porcentagem de hemólise e maior variação desta porcentagem foi o de *Eugenia uniflora* (Tabela 5).

Com relação aos produtos comerciais, o que apresentou menor porcentagem de hemólise e menor variação desta porcentagem foi o Virkon®, seguido do formaldeído e por último o permanganato de potássio (Tabela 6). O extrato de *E. uniflora* na concentração de 0,13% (v/v), que foi sua a menor CIM observada apresentou percentual de hemólise de 11,13%. Já a porcentagem de hemólise do extrato de *T. indica* também na sua concentração de menor CIM foi de 3,07%, enquanto no caso do extrato de *P. americana* a taxa de hemólise em sua concentração de menor CIM foi de 3,69%.

Quando abordamos os resultados que dizem respeito aos produtos comerciais podemos observar que o percentual de hemólise causado pelo Virkon® na concentração de menor CIM, de 0,66%, quando observamos a taxa de hemólise do formaldeído na concentração de sua menor CIM o resultado foi de 3,82% e o percentual de 3,71% de hemólise causado pelo permanganato de potássio na mesma concentração observada em sua menor CIM. Os resultados envolvendo a comparação dos dados de absorvância podem ser observados na Figura 1.

3.3 Teste de atividade antimicrobiana (CIM e CBM)

A CIM e CBM do florfenicol frente a bactéria utilizada como controle de qualidade, *E. coli* ATCC® 25922 foi de 8µg/mL, resultado já esperado, como descrito pelo manual VET04 (3rd ed., CLSI, 2020).

O formaldeído apresentou melhor ação antimicrobiana contra todas as cepas. O Virkon® apresentou ação antimicrobiana na concentração de uso indicada pelo fabricante, porém, não demonstrou eficácia contra a *C. freundii*. O permanganato de potássio demonstrou potencial antimicrobiano apenas contra *S. agalactiae* sorotipo I, *F. oreochromis* e *F. orientalis*.

Dentre os extratos de plantas, o que apresentou melhor resultado foi o de *P. americana*, com efeito bactericida contra a maioria das cepas testadas, exceto para *S. agalactiae* sorotipo I e a *F. oreochromis*. Os extratos de *E. uniflora* e *T.* apresentaram resultados semelhantes, porém nenhum dos deles foi bactericida para a *A. hydrophila*. O melhor resultado observado foi o do extrato de *T. indica* frente a *L. garvieae* e *S. agalactiae* sorotipo 3 (Tabela 4).

O extrato de *E. uniflora* apresentou CIM e CBM respectivamente de 8,30% (v/v) e 8,30 % (v/v) para *A. cavieae*, de 4,15 % (v/v) e 8,40 % (v/v) para *A. veronii*, de 2,08 % (v/v) e

16,60 % (v/v) para *C. freundii*, de 0,26 % (v/v) e 16,60 % (v/v) frente à *L. garvieae* e de 0,13 % (v/v) e 0,26 % (v/v) para *F. orientalis*.

Já o extrato de *T. indica* apresentou CIM e CBM respectivamente de 16,60% (v/v) e 16,60% (v/v) para *A. cavieae*, 16,60% (v/v) e 16,60% (v/v) para *A. veronii*, 0,26% (v/v) e 16,60% (v/v) para *C. freundii*, 0,06% (v/v) e 16,60% (v/v) frente a *L. garvieae*, 0,06% (v/v) e 16,60% (v/v) para *S. agalactiae* sorotipo III e 2,08% (v/v) e 2,08% (v/v) para a *F. orientalis*.

O extrato de *P. americana* apresentou CIM e CBM de 8,30% (v/v) e 8,30% (v/v) para *A. cavieae*, 8,30% (v/v) e 8,30% (v/v) para *A. hydrophila*, 2,08% (v/v) e 4,15% (v/v) para *A. veronii*, 2,08% (v/v) e 16,60% (v/v) para *C. freundii*, 0,26% (v/v) e 16,60% (v/v) para *L. garvieae*.

4. Discussão

Para controlar e prevenir as perdas causadas por bactérias patogênicas durante todas as etapas do processo produtivo, antimicrobianos são utilizados, muitas vezes desrespeitando as boas práticas veterinárias. Fato este, que pode ocasionar à presença de resíduos na carne (Chen et al., 2020), e promover um ambiente propício para a seleção de microrganismos resistentes, que podem transferir essa resistência para outros microrganismos até mesmo de espécies diferentes (Larsson e Flach, 2022). Para reduzir essa probabilidade, alternativas ao uso destes fármacos convencionais vêm sendo pesquisadas (Stratev et al., 2018). Dentre estas alternativas destacam-se os fitoterápicos, utilizados há muitos anos em todo o mundo (Bulfon et al., 2015).

O potencial antimicrobiano de extratos vegetais para uso preventivo e curativo, frente à diversos patógenos de peixes, com a utilização de variadas espécies de plantas já

foi comprovado cientificamente (Alam et al., 2014; Castro et al., 2008; Foysal et al., 2012; Hardi et al., 2017; Karga et al., 2020; Razak et al., 2019; Reverter et al., 2014). O potencial antimicrobiano destas espécies vegetais, inclusive utilizando somente os compostos majoritários como por exemplo o phytol também foi evidenciado em estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* em bagre-africano, tilápia-do-Nilo e tilápia de Moçambique (Novosak et al., 2022; Pereira, 2022; Ukwe et al., 2021; Solís-Salas et al., 2021; Ehsan et al., 2021; Adeniyi et al., 2021; Seth et al., 2021; Islam et al., 2018; Santos et al., 2018b).

Em estudos *in vitro* foi observado também atividade antifúngica e potencial atividade antiviral do composto Selina-1,3,7(11)-trien-8-one presente no óleo essencial de *E. uniflora* (Dos Santos et al., 2018), bem como também foi demonstrado atividade antibacteriana do extrato de *Terminalia catappa*, que continha o composto Cyclopropanecarboxylic acid, undec-2-enyl ester, que foi encontrado no extrato de *P. americana* utilizada no presente estudo e que poderia justificar o amplo espectro de ação contra os patógenos testados, dentre os três extratos utilizados.

Os produtos comerciais apresentaram bons resultados, com exceção do permanganato de potássio, que não demonstrou efeito para seis das nove bactérias testadas. O Virkon® mostrou ação antimicrobiana dentro da concentração recomendada pelo fabricante, exceto para *C. freundii*. Este produto é um agente oxidante, tendo como componente o peroximonosulfato de potássio, que possui potencial antimicrobiano, devido à sua capacidade de oxidar tanto os componentes da matriz quanto da parede bacteriana (Kunanusont et al., 2020; Osland et al., 2020), o que justifica sua eficácia contra a maior parte dos patógenos de peixes testados neste estudo.

O formaldeído foi o produto que apresentou a CIM mais baixa, sendo inclusive o único que mostrou efeito bactericida para todas as bactérias. Seu modo de ação é relacionado à alta reatividade com macromoléculas biológicas, como por exemplo DNA,

RNA e proteínas, que resultam em mudanças físicas em tecidos (Leal et al., 2018). Um fator de destaque sobre o formaldeído é que com o seu potencial tóxico, quando utilizado em concentrações altas ou incorretas, pode ocasionar danos não somente aos animais (Tavares-Dias, 2021), como também aos filtros biológicos (Leal et al., 2016). O uso incorreto do formaldeído pode também representar um risco a quem o manipula, uma vez que ele é absorvido através da inalação, ingestão ou através da pele e tem potencial carcinogênico importante (Dan et al., 2020).

Apesar de o permanganato de potássio ser um poderoso oxidante e considerado um dos principais desinfetantes (Zhao et al., 2021), sua ação antimicrobiana se mostrou fraca, com efeito somente contra três das nove bactérias testadas. Esta baixa eficácia no teste *in vitro* pode ter ocorrido pelas baixas concentrações utilizadas neste estudo, já que esse composto demonstra potencial oxidante de forma não seletiva, podendo reagir com qualquer material orgânico (Piezer et al., 2021). Isto inclui não somente o meio de cultura utilizado, no caso do teste *in vitro*, mas também seria de importância em aplicações como desinfetante em equipamentos ou ambientes com alta concentração de matéria orgânica, algo que ocorre frequentemente em pisciculturas. Isto levaria a uma diminuição no potencial deste composto em agir diretamente nos microrganismos patogênicos.

Em testes *in vivo* este produto também já demonstrou um potencial antimicrobiano variável contra bactérias patogênicas para peixes (Darwish et al., 2012), inclusive prejudicando a microbiota natural dos animais e os deixando mais propensos a infecção por *Flavobacterium columnare* (Mohammed e Arias, 2015). O permanganato de potássio poderia também representar riscos para quem o manipula, uma vez que em altas concentrações ele pode causar irritação e até mesmo queimaduras na pele (Kandpal e Gautam, 2021) e também existem indícios de que seja carcinogênico (Gencer et al., 2020).

Com relação a citotoxicidade, a lise dos eritrócitos da tilápia foi dose dependente no extrato de *E. uniflora*, no permanganato de potássio e no formaldeído.

Os resultados deste estudo demonstraram que os três extratos de plantas testados e dois produtos comerciais (Virkon® e formaldeído) tem efeito bactericida *in vitro* contra as principais bactérias isoladas em peixes e ambiente aquícola, apresentando baixa citotoxicidade para os eritrócitos de peixes. Dentre estes temos o Virkon® como produto comercial que se destacou por conta de seu amplo espectro de ação e baixa citotoxicidade nas concentrações observadas nas CIM e CBM. Já no caso dos extratos vegetais temos o extrato de abacate, que mostrou eficácia contra um maior número de patógenos testados e também apresentou citotoxicidade baixa em todas as concentrações.

5. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

6. Bibliografia

Adeniyi, O., Olaifa, F., Emikpe, B., Ogunbanwo, S. 2021. Effects of dietary tamarind (*Tamarindus indica* L.) leaves extract on growth performance, nutrient utilization, gut physiology, and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *International Aquatic Research*, 13(1), 37-51.

<https://doi.org/10.22034/IAR.2021.1916077.1115>

Alam, M.N., Ahmed, G.U., Chowdhury, M.B.R. 2014. Performance of herbal extracts on diseased fish. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 12, 225-230.

<http://dx.doi.org/10.3329/bjvm.v12i2.21299>

- Assane, I.M., Gozi, K.S., Valladão, G.M.R. and Pilarski, F., 2019. Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use of thiamphenicol/florfenicol against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 507, 238-245. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.021>
- Assane, I.M., Valladão, G.M.R., Pilarski, F. 2021. Chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of selected plant-derived essential oils against fish pathogens. *Aquaculture Research* 52, 793-809. <https://doi.org/10.1111/are.14935>
- Bulfon, C., Volpatti, D., Galeotti, M. 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research* 46 (3), 513-551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>
- Castro, S.B., Leal, C.A., Freire, F.R., Carvalho, D.A., Oliveira, D.F., Figueiredo, H.C. 2008. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. *Braz J Microbiol.* 39, 756-760. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400030>
- Chen, J., Sun, R., Pan, C., Sun, Y., Mai, B., Li, Q.X. 2020. Antibiotics and Food Safety in Aquaculture. *J. Agric. Food Chem.* 68, 11908–11919. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03996>
- Chua, L.Y.W., Chong, C.H., Chua, B.L., Figiel, A. 2019. Influence of Drying Methods on the Antibacterial, Antioxidant and Essential Oil Volatile Composition of Herbs: a Review. *Food Bioprocess Technol* 12, 450–476. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2227-x>
- CLSI, 2020. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01393.x>

Darwish, A.M., Bebak, J.A., Schrader, K.K. 2012. Assessment of Aquaflor®, copper sulphate and potassium permanganate for control of *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* infection in sunshine bass, *Morone chrysops* female × *Morone saxatilis* male. *Journal of fish diseases*, 35, 637-647.

Dos Santos, J.F.S., Rocha, J.E., Bezerra, C.F., do Nascimento Silva, M.K., de Matos, Y.M.L.S., de Freitas, T.S., Dos Santos, A.T.L., da Cruz, R.P., Machado, A.J.T., Rodrigues, T.H.S., de Brito, E.S. 2018. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. *Food Chemistry* 261, 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.015>

Ehsan, R., Rahman, A., Paul, S.I., Ador, M.A.A., Haque, M.S., Akter, T., Rahman, M.M. 2023. *Aeromonas veronii* isolated from climbing perch (*Anabas testudineus*) suffering from epizootic ulcerative syndrome (EUS). *Aquaculture and Fisheries* V.8, I.3, 288-295. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.11.005>

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. <Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en?details=I9540EN> >

Foysal, M.J., Rahman, M., Alam, M.T. 2012. Antibiotic sensitivity and in vitro antimicrobial activity of plant extracts to *pseudomonas fluorescens* isolates collected from diseased fish. *International Journal of Natural Sciences* 1, 82-88. <http://dx.doi.org/10.3329/ijns.v1i4.9733>

Gencer, G., Özdemir, L., Özdemir, Ö., 2020. Detection of genotoxic effect of potassium permanganate by using in vitro micronucleus assay. *Cumhuriyet Medical Journal* 42, 79-85. <http://dx.doi.org/10.7197/cmj.vi.667750>

Hardi, E.H., Kusuma, I.W., Suwinarti, W., Saptiani, G., Sumoharjo, S., Lusiastuti, A.M. 2017. Utilization of several herbal plant extracts on Nile tilapia in preventing *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp. bacterial infection. Nusantara Bioscience 9, 220-228. <http://dx.doi.org/10.13057/nusbiosci/n090219>

Hossain, A., Habibullah-Al-Mamun, M., Nagano, I., Masunaga, S., Kitazawa, D., Matsuda, H. 2022. Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: risks, current concern, and future thinking. Environ Sci Pollut Res 29, 11054–11075. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17825-4>

Islam, M.T., Ali, E.S., Uddin, S.J., Shaw, S., Islam. M.A., Ahmed. M.I., Shill, M.C., Karmakar, U.K., Yarla, N.S., Khan, I.N., Billah, M.M., Pieczynska, M.D., Zengin, G., Malainer, C., Nicoletti, F., Gulei, D., Berindan-Neagoe, I., Apostolov, A., Banach, M., Yeung, A.W.K., Atanasov, A.G. 2018. Phytol: A review of biomedical activities. Food and Chemical Toxicology 121, 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.032>

Kandpal, R., Gautam, S., 2021. Accidental ocular injury by topical dermatological agent: potassium permanganate (KMnO₄). Indian dermatology online journal 12, 752. https://doi.org/10.4103%2Fidoj.IDOJ_935_20

Karga, M., Kenanoglu, O.N., Bilen, S. 2020. Investigation of Antibacterial Activity of Two Different Medicinal Plants Extracts Against Fish Pathogens. Journal of Agricultural Production 1, 5-7. <https://doi.org/10.29329/agripro.2020.341.2>

Kunanusont, N., Punyadarsaniya, D., Jantafong, T., Pojprasath, T., Takehara, K., Ruenphet, S. 2020. Bactericidal efficacy of potassium peroxymonosulfate under various concentrations, organic material conditions, exposure timing and its application on various surface carriers. Journal of Veterinary Medical Science, 82, 320-324. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0562>

- Larsson, D.G., Flach, C.F., 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20, 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Leal, J.F., Neves, M.G.P.M.S., Santos, E.B.H., Esteves, V.I. 2016. Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality. *Reviews in Aquaculture* 10, 281-295. <https://doi.org/10.1111/raq.12160>
- Liu, X., Steele, J.C., Meng, X.Z. 2017. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. *Environmental Pollution* 223, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.003>
- Maldonado-Miranda, J.J., Castillo-Pérez, L.J., Ponce-Hernández, A., Carranza-Álvarez, C. 2022. Summary of economic losses due to bacterial pathogens in aquaculture industry. *Bacterial Fish Diseases*, Chapter 19, 399-417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85624-9.00023-3>
- Mohammed, H.H. Arias, C.R. 2015. Potassium permanganate elicits a shift of the external fish microbiome and increases host susceptibility to columnaris disease. *Veterinary Research*, 46, p.82. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0215-y>
- Mumtaz, M.W., Hamid, A.A., Akhtar, M.T., Anwar, F., Rashid, U., AL-Zuaidy, M.H. 2017. An overview of recent developments in metabolomics and proteomics—phytotherapeutic research perspectives. *Frontiers in life science* 10, 1-37. <https://doi.org/10.1080/21553769.2017.1279573>
- Novosak, M.G., Winnik, D.L., Laczeski, M.E., Quiroga, M.I. 2022. Antibacterial activity of medicinal plants against *Streptococcus agalactiae*. *Nova Biotechnol Chim* 21, 1-11. <http://dx.doi.org/10.36547/nbc.1264>

Osland, A.M., Vestby, L.K., Nesse, L.L. 2020. The effect of disinfectants on quinolone resistant *E. coli* (QREC) in biofilm. *Microorganisms* 8, p.1831. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111831>

Pereira, M. F. M. 2022. Isolamento e purificação de compostos sesquiterpênicos do óleo essencial das folhas *Eugenia uniflora* L. e avaliação da atividade antimicrobiana. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena.

Razak, R.A., Shariff, M., Yusoff, F.M., Ismail, I.S. 2019. Bactericidal Efficacy of Selected Medicinal Plant Crude Extracts and their Fractions against Common Fish Pathogens. *Sains Malaysiana* 48, 1601-1608. <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2019-4808-05>

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433, 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>

Santos, J.F.S., Rocha, J.E., Bezerra, C.F, Silva, M.K.N., Matos, Y.M.L.S., Freitas, T.S., Santos, A.T.L., Cruz, R.P., Machado, A.J.T., Rodrigues, T.H.S., Brito, E.D., Sales, D.L., Almeida, W.O., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Morais-Braga, M.F.B. 2018b. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. *Food Chemistry* 261, 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.015>

Santos, L., Ramos, F., 2018a. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>

- Seth, M., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Thomas, J. 2021. Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* in *Oreochromis mossambicus* and treatment by *Tamarindus indica* seed extract. *Aquacult Int* 29, 1829–1841. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00719-0>
- Silva, C.P., Louros, V., Silva, V., Otero, M., Lima, D.L.D. 2021. Antibiotics in Aquaculture Wastewater: Is It Feasible to Use a Photodegradation-Based Treatment for Their Removal? *Toxics* 9, 194. <https://doi.org/10.3390/toxics9080194>
- Solís-Salas, L.M., Sierra-Rivera, C.A., Cobos-Puc, L.E., Ascacio-Valdés, J.A., Silva-Belmares, S.Y. 2021. Antibacterial Potential by Rupture Membrane and Antioxidant Capacity of Purified Phenolic Fractions of *Persea americana* Leaf Extract. *Antibiotics* 10, 508. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050508>
- Tavares-Dias, M. 2021. Toxicity, physiological, histopathological and antiparasitic effects of the formalin, a chemotherapeutic of fish aquaculture. *Aquaculture Research* 52, 1803-1823. <https://doi.org/10.1111/are.15069>
- Ukwe, I.O.K., Etire, D.I. 2021. The Effects of *Persea americana* leaves on the Enzymes and Organosomatic indices of *Pseudomonas aeruginosa* Infect *Clarias gariepinus*. *Journal of Medical Care Research and Review* 4, 1067–1078. <https://mcrr.info/index.php/mcrr/article/view/178>
- Zhao, X., Su, H., Xu, W., Hu, X., Xu, Y., Wen, G. and Cao, Y., 2021. Removal of antibiotic resistance genes and inactivation of antibiotic-resistant bacteria by oxidative treatments. *Science of The Total Environment* 778, 146348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146348>
- Zhou, M., Yu, S., Hong, B., Li, J., Han, H., Qie, G. 2021. Antibiotics control in aquaculture requires more than antibiotic-free feeds: A tilapia farming case. *Environmental Pollution* 268, 115854. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115854>

7. Tabelas

Tabela 1

Composição química e índice de retenção do extrato de *Persea americana*.

Porcentagem	Composto	IR
0,47%	Neophytadiene	1839
0,46%	2-Nonadecanone, O-methyloxime	2102
0,64%	Phytol	2113
0,36%	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-	2168
2,93%	2-((8Z,11Z)-Heptadeca-8,11-dien-1-yl)furan	2178
0,80%	Z-(13,14-Epoxy)tetradec-11-en-1-ol acetate	2185
1,86%	3-Methyl-1-dodecyn-3-ol	2193
20,37%	Cyclopropanecarboxylic acid, undec-2-enyl ester	2220
4,14%	Cyclopropanecarboxylic acid, tridec-2-ynyl ester	2251
18,10%	Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, acetate, (3.beta.,22E)-	2352
3,16%	Ergocalciferol	2383
8,06%	Z-(13,14-Epoxy)tetradec-11-en-1-ol acetate	2460
6,27%	Z-(13,14-Epoxy)tetradec-11-en-1-ol acetate	2479
19,43%	Eicos-9-ene-1,20-diacetate	2502
6,79%	10-Methyl-E-11-tridece-1-ol acetate	2513
6,16%	2,6,10,14-Hexadecatetraen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-	2532

Tabela 2Composição química e índice de retenção do extrato de *Eugenia uniflora*.

Porcentagem	Composto	IR
0,37%	beta.-Ocimene	1048
0,41%	delta.-Elemene	1339
1,89%	beta.-Elemene	1393
1,15%	Caryophyllene	1420
2,54%	Germacrene D	1482
0,33%	beta.-Selinene	1487
4,82%	Bicyclogermacrene	1497
0,68%	alpha.-Bulnesene	1506
1,44%	Germacrene B	1558
1,43%	Spathulenol	1579
35,00%	Selina-1,3,7(11)-trien-8-one (Adams)	1633
0,59%	Germacrene	1696
27,30%	Selina-1,3,7(11)-trien-8-one epoxide (Adams)	1747
1,21%	Não identificado	1805
0,41%	Neophytadiene	1839
0,80%	2,5,9-Trimethylcycloundeca-4,8-dienone	1843
8,63%	2,6-Octadiene, 4,5-dimethyl-	1849
0,46%	Panaxene	1915
2,06%	1,5,9-Cyclododecatriene, 1,5,9-trimethyl-	1919
1,43%	(R,1E,5E,9E)-1,5,9-Trimethyl-12-(prop-1-en-2-yl)cyclote	1991
7,06%	Spiro[2.5]octane, 5,5-dimethyl-4-(3-oxobutyl)-	1995

Tabela 3Composição química e índice de retenção do extrato de *Tamarindus indica*.

Porcentagem	Composto	IR
24,72%	Neophytadiene	1839
75,28%	Phytol	2113

Tabela 4

Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos produtos comerciais e extratos de plantas contra principais bactérias patogênicas na piscicultura. SE: sem efeito.

Bactérias	Produtos											
	Virkon®		Formaldeído		Permanganato de Potássio		<i>Eugenia uniflora</i>		<i>Tamarindus indica</i>		<i>Persea americana</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>A. caviae</i>	0,25%	0,50%	0,0039%	0,0039%	SE	SE	8,30%	8,30%	16,60%	16,60%	8,30%	8,30%
<i>A. hydrophila</i>	0,50%	1%	0,0039%	0,0039%	SE	SE	SF	SF	SF	SF	8,30%	8,30%
<i>A. veronii</i>	0,50%	1%	0,0039%	0,0039%	SE	SE	4,15%	8,30%	16,60%	16,60%	2,08%	4,15%
<i>C. freundii</i>	ND	ND	0,0039%	0,0039%	SE	SE	2,08%	16,60%	0,26%	16,60%	2,08%	16,60%
<i>L. garvieae</i>	0,13%	0,13%	0,0039%	0,0039%	SE	SE	0,26%	16,60%	0,06%	16,60%	0,26%	16,60%
<i>S. agalactiae</i>	0,06%	0,13%	0,0039%	0,0039%	SE	SE	0,13%	16,60%	0,06%	16,60%	0,26%	16,60%
<i>Sorotipo 3</i>												
<i>S. agalactiae</i>	0,03%	0,06%	0,01%	0,02%	0,13%	0,13%	SE	SE	SE	SE	SE	SE
<i>Sorotipo 1</i>												
<i>F. oreochromis</i>	0,01%	0,02%	0,02%	0,02%	0,13%	0,13%	SE	SE	SE	SE	SE	SE
<i>F. noatunensis</i>	0,06%	0,06%	0,0039%	0,0039%	0,03%	0,03%	0,13%	0,26%	2,08%	2,08%	0,26%	16,%

Tabela 5

Porcentagem de hemólise observada no teste de citotoxicidade dos extratos de plantas contra hemácias de tilápia do Nilo.

Concentrações Extratos	16,60%	8,30%	4,15%	2,08%	1,04%	0,52%	0,26%	0,13%	0,06%	0,03%
<i>Eugenia uniflora</i>	14,14%	13,75%	13,48%	13,02%	12,87%	12,23%	11,93%	11,17%	10,79%	10,51%
<i>Tamarindus indica</i>	3,22%	3,20%	3,17%	3,17%	3,15%	3,12%	3,10%	3,05%	3,02%	3,02%
<i>Persea americana</i>	4,03%	3,96%	3,90%	3,80%	3,78%	3,73%	3,70%	3,63%	3,58%	3,53%

Tabela 6

Porcentagem de hemólise observada no teste de citotoxicidade dos produtos comerciais contra hemácias de tilápia do Nilo.

Concentrações Produtos										
Virkon®	1%	0,50%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,03125%	0,01562%	0,00781%	0,00391%	0,00195%
	1,28%	1,21%	1,01%	1,04%	1,01%	1,20%	0,96%	0,66%	0,66%	0,69%
Formaldeído	2,5%	1,25%	0,625%	0,3125%	0,15625%	0,07812%	0,03906%	0,01953%	0,00976%	0,00488%
	10,28%	9,69%	9,05%	8,17%	7,33%	6,89%	3,82%	2,75%	1,81%	1,07%
Permanganato de Potássio	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,03125%	0,01562%	0,00781%	0,00391%	0,00195%	0,00097%
	31,70%	8,84%	6,27%	4,59%	3,71%	2,75%	2,59%	2,27%	2,11%	1,94%

8. Legendas das figuras

Figura 1. Níveis de absorbância observados no teste de citotoxicidade das combinações de óleos essenciais de ylang ylang (*Cananga odorata*) com manjerição (*Ocimum basilicum*), ylang ylang com citronela (*Cymbopogon nardus*), do controle positivo—TRITON e do controle negativo—PBS. Letras diferentes indicam diferença estatística entre valores de absorbância ($p < 0,05$).

Figura 1

