UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL E RECURSOS PESQUEIROS

PROSPECÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM COMBINAÇÃO COM FLORFENICOL FRENTE *Aeromonas* MÓVEIS ISOLADAS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

ANA MARIA SOUZA DA SILVA

MANAUS - AM
OUTUBRO - 2021

ANA MARIA SOUZA DA SILVA

PROSPECÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM COMBINAÇÃO COM FLORFENICOL FRENTE *Aeromonas* MÓVEIS ISOLADAS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Orientadora: Dra. Edsandra Campos Chagas
Coorientadora: Dra. Fernanda de Alexandre Sebastião

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, na área de concentração de Produção Animal.

MANAUS - AM
OUTUBRO - 2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586p

Silva, Ana Maria Souza da
Prospecção de óleos essenciais em combinação com florfenicol frente Aeromonas móveis isoladas de tambaqui (Colossoma macropomum) / Ana Maria Souza da Silva . 2021
76 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Edsandra Campos Chagas
Coorientadora: Fernanda de Alexandre Sebastião
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Aeromonas sp.. 3. Biofilme. 4. Colossoma macropomum. 5. Produtos naturais. I. Chagas, Edsandra Campos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ANA MARIA SOUZA DA SILVA

Prospecção de óleos essenciais em combinação com florfenicol frente *Aeromonas* móveis isoladas de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovado em 07 de outubro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Edsandra Campos Chagas

Dra. Edsandra Campos Chagas - Presidente
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

Fabiana Pilarski

Dra. Fabiana Pilarski – Membro
Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP

Silvia Gallani

Dra. Silvia Umeda Gallani - Membro
Universidade Nilton Lins - UniNiltonLins

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e por ter mostrado esse caminho. Por me dar muita luz, sabedoria e discernimento nessa jornada, sem ele eu não teria capacidade para desenvolver estapesquisa.

Aos meus filhos Juliana Leticía da Silva Souza e Vinicius da Silva e Silva que muitas vezes foram privados da minha companhia, entretanto, foram sempre compreensivos. Dedico meu amor incondicional á vocês.

À minha orientadora Dra. Edsandra Campos Chagas por compartilhar sua experiência e semprese fazer presente e prestativa ao logo desses dois anos, não medindo esforços em suas contribuições durante todas as coletas e elaboração desta dissertação, serei eternamente grata aos seus ensinamentos.

À minha coorientadora Dra. Fernanda de Alexandre Sebastião obrigada por todos os ensinamentos, dedicação e por contribuir para a minha formação profissional, seu incentivo foi de fundamental importância para prosseguir.

À Embrapa Amazônia Ocidental por toda infraestrutura concedida, juntamente a toda equipe que me ajudou incansavelmente em todas as fases deste trabalho, em especial ao Dr. Francisco Célio Chaves e Dr. Marcelo Róseo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à Embrapa pelo financiamento deste estudo. Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros (PPG- CARP/UFAM), local onde aprendi e conheci pessoas maravilhosas, Adriana (em memória), Paula, Flávia, Edson, Luíza, Marilson, Damy Caroline e aos demais.... os momentos de estudos, correrias e risadas jamais serão esquecidos.

À Dra. Kedma Yamamoto (PPG-CARP/UFAM), meu eterno respeito, carinho e admiração porsua simplicidade, humildade e atenção.

À Antônia, secretária do curso, por sua disponibilidade e atenção.

Aos meus mais que amigos, que me deram todo suporte tecnico e emocional, Patrícia Sousa, Dona Gracinda, Paulo, Daniel, Patrícia Castro, Caio Francisco e as minhas tias.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram na realização desta etapa de minha vida.

Já me perdi tentando me encontrar
Já fui embora querendo nem voltar
Penso duas vezes antes de falar
Porque a vida é louca, mano

Sempre fiquei quieta, agora vou falar
Se você tem boca, aprenda a usar
Sei do meu valor e a cotação é dólar
Porque a vida é louca, mano
A vida é louca

Me perdi pelo caminho
Mas não paro não
Já chorei mares e rios
Mas não afogo não

A vida é louca...
(Dona de mim, Iza)

RESUMO

Com o crescimento atual da piscicultura no cenário nacional e internacional, têm-se a intensificação dos sistemas de produção. Apesar de mais lucrativo, este sistema deve ser acompanhado de boas práticas de manejo, caso contrário, atua como facilitador da instalação de enfermidades. Dentre as doenças que podem acometer peixes, destacam-se as bacterioses. Por serem consideradas limitadoras de produtividade, comumente são tratadas com antimicrobianos e quimioterápicos de forma indiscriminada. Como resultado, tem-se observado aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. Nesse sentido, a busca por produtos naturais com atividade antimicrobiana e sua associação com antimicrobianos sintéticos de interesse para piscicultura faz-se necessária. Portanto, o objetivodeste estudo foi avaliar as atividades antimicrobianas, antibiofilme e sinérgica de cinco óleos essenciais (OEs) com florfenicol contra *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* isoladas de tambaqui (*Colossoma macropomum*). As cepas bacterianas foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA¸ e destas foram selecionadas três cepas *A. hydrophila* e uma de *A. jandaei* para o estudo. Os OEs das espécies de *Aloysia triphylla, Croton cajucara* morfotipo vermelho, *Croton cajucara* morfotipo branco, *Cymbopogon citratus* e *Lippia gracilis* apresentaram como constituinte majoritário o composto β-pineno (22,1%), germacreno D (11,5%), linalol (23%), geranial (45,7%) e carvacrol (42,2%), respectivamente. Para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foi utilizada a técnica de microdiluição em placas de 96 poços e, para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos OEs, foram realizadas semeaduras em meio ágar Muller Hinton (MHA). Para a atividade sinérgica foi utilizada a técnica de tabuleiro de xadrez "checkerboard". Os cinco OEs avaliados foram classificados com fraca atividade antimicrobiana, apresentando ação bactericida frente aos patógenos alvos,com CIM variando de 5.000 a 640.000 ug mL^{-1}. Os OEs de *L. gracilis* e *C. citratus* apresentaram as menores concentrações contra os patogenos investigados (CIM e CBM de 5.000 ug mL^{-1}). Os OEs interferiram no biofilme inicial e no consolidado quando comparados ao controle negativo (*E. coli*), passando de produtores fracos para não produtores. Os OEs de *A. triphylla, C. citratus, C. cajucara* morfotipo branca e *L. gracilis* combinados com o florfenicol reduziram a CIM, e o índice de concentração inibitória fracionada variou entre 0,38 e 0,50, indicando efeito sinérgico. Nesta dissertação, foi possível demonstrar o efeito sinérgico de quatro OEs com o florfenicol, reduzindo a dose deste antimicrobiano e dos OEs. Considerando o custo dos tratamentos em piscicultura que

ainda são altos, este trabalho contribuiu para a redução da quantidade dos fármacos utilizados (sintéticos e naturais) e, consequentemente, redução do custo do tratamento. Além disso, a diminuição de antimicrobianos sintéticos na água de cultivo torna o tratamento mais sustentável ao meio ambiente, reduzindo, inclusive, a seleção de cepas bacterianas resistentes ao antimicrobiano.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, *Aeromonas* sp., biofilme, *Colossoma macropomum*, produtos naturais, sinergia

ABSTRACT

With the current growth of fish farming on the national and international scene, there is an intensification of production systems. Although more profitable, this system must be accompanied by good management practices, otherwise it acts as a facilitator for the installation of diseases. Among the diseases that can affect fish, bacteriosis stand out. As they are considered productivity limiting, they are commonly treated with antimicrobials and chemotherapy indiscriminately. As a result, an increase in bacterial resistance to antimicrobials has been observed. In this sense, the search for natural products with antimicrobial activity and their association with synthetic antibiotics of interest to fish farming is necessary. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial, antibiofilm and synergistic activities of five essential oils (EOs) with florfenicol against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*). Bacterial strains were identified by sequencing the 16S rRNA¸ gene and from these, three *A. hydrophila* and one *A. jandaei* strains were selected for the study. The EOs of the species of *Aloysia triphylla*, *Croton cajucara* morphotype red, *Croton cajucara* morphotype white, *Cymbopogon citratus* and *Lippia gracilis* had as major constituent the compound β-pinene (22.1%), germacrene D (11.5%), linalool (23%), geranial (45.7%) and carvacrol (42.2%), respectively. To determine the minimal inhibitory concentrations (MIC) the microdilution technique in 96-well plates was used, and to determine the minimal bactericidal concentration (CBM) of the EOs, platings were performed in Muller Hinton agar (MHA). For the synergistic activity, the checkerboard technique was used. The five EOs evaluated were classified as having weak antimicrobial activity, showing bactericidal action against target pathogens, with MIC ranging from 5,000 to 640,000 ug mL^{-1}. The EOs of *L. gracilis* and *C. citratus* showed the lowest concentrations against the investigated pathogens (MIC and CBM of 5,000 ug mL^{-1}). The EOs interfered in the initial and consolidated biofilm when compared to the negative control (*E. coli*), going from weak producers to non-producers. The EOs of *A. triphylla, C. Citratus, C. cajucara* white morphotype and *L. gracilis* combined with florfenicol reduced the MIC, and the fractional inhibitory concentration index varied between 0.38 and 0.50, indicating a synergistic effect. In this dissertation, it was possible to demonstrate the synergistic effect of four EOs with florfenicol, reducing the dose of this antimicrobial and EOs. Considering the cost of treatments in fish farming that are still high, this work contributed to reducing the amount of drugs used (synthetic and natural) and, consequently, reducing the cost of treatment. In addition, the reduction of synthetic antimicrobials in the water makes the treatment more sustainable for the environment, even reducing the selection of bacterial strains resistant to the antimicrobial.

Keywords: Antimicrobial activity, *Aeromonas* sp., biofilm, *Colossoma macropomum*, naturalproducts, synergy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de *Colossoma macropomum*..... 14

Figura 2. Sinais clínicos de *Aeromonas hydrophila* e fatores de virulência em *Colossoma macropomum* acometido de enfermidade..... 17

Figura 3. Espécime de *Aloysia triphylla* cultivada em Manaus - AM..... 27

Figura 4. Espécimes de *Croton cajucara* cultivada em Manaus - AM. (A) morfotipo vermelho, (B) morfotipo branco. 28

Figura 5. Espécime de *Cymbopogon citratus* cultivada em Manaus - AM..... 29

Figura 6. Espécime de *Lippia gracilis* cultivada em Manaus - AM..... 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais óleos essenciais de plantas utilizados contra bactérias com potencial patogênico para peixes. 20

Tabela 2. Sinergismo entre óleos essenciais e antimicrobianos frente a bactérias de interessena piscicultura 25

Tabela 3. Principais compostos majoritários dos óleos essenciais avaliados neste estudo 40

Tabela 4. Classificação dos isolados de *Aeromonas* spp. para produção de biofilme. 41

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla, Cymbopogon citratus, Croton cajucara* morfotipos branco e vermelho, *Lippia gracilis* e do antibiótico florfenicol frente aos isolados de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* 42

Tabela 6. Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla, Cymbopogon citratus, Croton cajucara* morfotipo branco *e Lippia gracilis* isolados e combinados com florfenicol, somatório dos índices de frações inibitórias e classificação do efeito sinérgico apresentado frente às cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* 44

Tabela 7. Interferência dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla, Cymbopogon citratus, Croton cajucara* morfotipo branco e *Lippia gracilis* no biofilme consolidado de cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*. DO = densidade optica..... 45

Tabela 8. Atividade dos óleos essenciais (em %) de *Aloysia triphylla, Cymbopogon citratus, Croton cajucara* morfotipo branco e *Lippia gracilis* na formação de biofilme das cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* classificados como produtores fracos. 46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
2. REVISÃO DE LITERATURA 14
2.1. A espécie *Colossoma macropomum* 14
2.2. *Aeromonas* spp. 15
2.3. Antimicrobianos utilizados na piscicultura, com destaque para o florfenicol 18
2.4. Óleos essenciais como alternativa para o tratamento de bacterioses em peixes 19
2.4.1. Sinergismo entre óleos essencias e antimicrobianos 24
2.4.2. *Aloysia triphylla* 27
2.4.3. *Croton cajucara* 28
2.4.4. *Cymbopogon citratus* 29
2.4.5. *Lippia gracilis* 30
3. HIPÓTESES 32
4. OBJETIVOS 33
4.1. Objetivo geral 33
4.2. Objetivos específicos 33
5. MATERIAL E MÉTODOS 34
5.1. Coleta de material vegetal e extração de óleo essencial 34
5.2. Determinação da composição química dos óleos essenciais 34
5.3. Coleta, isolamento e identificação bioquímica de *Aeromonas* spp. 35
5.4. Identificação molecular dos isolados de *Aeromonas* sp. 35
5.4.1. Extração de DNA 35
5.4.2. PCR padrão 35
5.4.3. Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento genético 36
5.4.4. Análise das sequências de nucleotídeos 36
5.5. Produção de biofilme 36
5.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima 37
5.7. Atividade antibiofilme dos óleos essenciais 38
5.8. Potencial sinérgico dos óleos essenciais e florfenicol 38
6. RESULTADOS 40
7. DISCUSSÃO 47
8. CONCLUSÕES 54
9. REFERÊNCIAS 55

1. INTRODUÇÃO

O Brasil acompanha a tendência de crescimento da aquicultura mundial, com uma pespectiva de produção superior 706 mil toneladas em 2021 (FAO, 2020). A tilápia (*Oreochromis* sp.) é a espécie de peixe mais produzida no Brasil, seguido do tambaqui (*Colossoma macropomum*), que representa a espécie nativa mais produzida no país, com 19,7% do total (IBGE, 2019).

No sistema de criação intensivo é prática comum o uso de elevadas densidades de estocagem dentre outras práticas de manejo que, por vezes, são utilizadas de forma inadequada afetam as condições de saúde e a sobrevivência dos peixes (COSTA et al., 2019). Estudos mostram que a produtividde em pisciculturas intensivas torna-se limitadas quando as medidas de biosseguridade encontram-se comprometidas, o que favorece a entrada e disserminação de doenças infecciosas com perda estimada para o setor aquícola de 84 milhões de dólares/ano (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). Esses resultados mostram a importância do monitoramento das condições de saúde dospeixes para detectar a ocorrência de doenças ainda no início, e assim, evitar a disseminação dos agentes infecciosos nas pisciculturas (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017).

Dentre os diversos patógenos que acometem os peixes, as bactérias do gênero *Aeromonas* são bastante numerosas e são reconhecidas por sua capacidade de hemólise e formação de biofilme, fatores estes que interferem na virulência da cepa (SEBASTIÃO et al., 2015; PESSOA et al., 2019). Atualmente, são reconhecidas 36 espécies de *Aeromonas* spp., sendo que pelo menos 19 são considerados patógenos emergentes (PESSOA et al., 2019; FERNÁNDEZ- BRAVO; FIGUERA, 2020). Entre as espécies, *Aeromonas hydrophila* (com três subespécies: *A. hydrophila, A. dhakensis e A. ranae*), se destaca por ser mais isolada na piscicultura mundial, capaz de infectar diversos hospedeiros (PESSOA et al., 2019). Em peixes nativos do Brasil, há registros de ocorrência dessa bactéria em tambaqui (*Colossoma macropomum*) (LEÃO et al., 2020; PESSOA et al., 2020; GALLANI et al., 2020), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (BELÉM, 2006), híbrido do surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* × *Pseudoplatystoma fasciatum*) (DA SILVA et al., 2011) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (BARCELLOS et al., 2008). O gênero *Aeromonas* causa a doença conhecida como septicemia hemorrágica por *Aeromonas* móveis (MAS), com lesões cutâneas, hemorragias e úlceras, além disso, esse gênero bacterianoé responsável por causar hiperlocomoção relacionada ao estresse, aumentando as taxas de morbimortalidade no setor de aquicultura (FIGUEIREDO; LEAL, 2008; TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017; BANDEIRA JUNIOR et al., 2019; PESSOA et al., 2019).

Para o tratamento de infecções bacterianas em peixes são utilizados antimicrobianos. No Brasil, apenas dois fármacos são liberados para uso pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento, o florfenicol e a oxitetraciclina, sendo que nenhum desses é registrado para as espécies nativas (MAPA, 2011). O antibiótico tem sido usado na aquicultura para prevenir e tratar doenças, entretanto é comum o relato de uso de antimicrobianos não liberados, o que tem contribuído principalmente para o desenvolvimento de resistência das cepas bacterianas, que culminam afetando a saúde e segurança da população e do ambiente (GASTALHO et al., 2014; PESSOA et al., 2019). Nesse contexto, os produtos naturais como os OEs, que são misturas naturais de compostos voláteis e aromáticos, são excelentes alternativas para serem utilizadas em substituição ou em sinergismo com os antimicrobianos, visando estabelecer protocolos adequados para o tratamento de doenças bacterianas em peixes (CHOUHAN et al., 2017; SOUZA et al., 2017; SHAABAN, 2020).

Atividade antimicrobiana dos OEs de espécies das famílias Verbenaceae (*Lippia alba*, *Lippia origanoides* e *Lippia sidoides*), Lamiaceae (*Mentha piperita* e *Mentha arvensis*) e Piperaceae (*Piper callosum*, *Piper hispidinervum*, *Piper hispidum* e *Piper marginatum*), frente isolados de *Aeromonas* spp. de tambaqui apresentaram bons resultados de concentrações inibitórias mínimas (CIM) e nas concentrações bactericidas mínimas (CBM), despontando como potenciais candidatos para o tratamento desta bacteriose em função de seu potencial bactericida (MAJOLO et al., 2017; 2019; CHAGAS et al., 2020). Com relação à aplicação de OEs em protocolos de banhos terapêuticos observou-se que tambaquis infectados experimentalmente com *A. hydrophila* demostraram maior taxa de sobrevivência (79,2%) após banho com 10 mg L^{-1} do OE de *L. origanoides* (OLIVEIRA et al., 2018). A inclusão de *L. alba*, 2,0 ml kg^{-1} de dieta, foi recomendada para juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) por contribuir com melhores valores de conversão alimentar e atividade imunológica, além de aumentar a sobrevivência dos peixes após infecção por *Aeromonas* spp. (SOUZA et al., 2019). Neste sentido destaca-se ainda o papel dos compostos isolados carvacrol, citral, eugenol, linalol e timol, presentes em muitas espécies de plantas bioativas, na inibição da formação de biofilme e hemólise. Destes cinco compostos, o linalol em combinação com o florfenicol ou com a oxitetraciclina contra *A. hydrophila*, isoladas de *R. quelen*, demonstraram potencial sinérgico, contribuindo para a diminuição do uso do antimicrobiano e consequentemente de seus resíduos no ambiente aquático (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018).

Dentre os óleos essenciais que despertam interesse para dar continuidade aos estudos sobre o seu potencial antimicrobiano, isolados ou em sinergismo na aquicultura, destacam-se os das espécies de *Aloysia triphylla* (cedrina), *Croton cajucara*, morfotipos branca e vermelha (sacacas), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Lippia gracilis* (alecrim-de-tabuleiro) (AZEVEDO et al., 2012; COSTA et al., 2013; TADTONG et al., 2014; SILVA et al., 2017; SOUZA et al.,2017). Para estas espécies não há informações disponíveis sobre atividade antimicrobiana, potencial antibiofilme e sinergismo dos óleos essenciais com o antimicrobiano florfenicol frente cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, isoladas de tambaqui, até o momento. Portanto, neste projeto pretende-se disponibilizar essas informações contribuindo para o estabelecimento de protocolos para o tratamento de septicemia hemorrágica causada por *A. hydrophila* e por *A. jandaei* em tambaqui, garantindo maior sustentabilidade ao sistema de produção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A espécie *Colossoma macropomum*

Colossoma macropomum popularmente conhecido como tambaqui (Figura 1), é um peixe nativo da bacia Amazônica que apresenta alta taxa de fecundidade e crescimento. É conhecido como peixe redondo pelo seu formato abaloado, sendo um dos maiores peixes de escamas de água doce da América do Sul, depois do pirarucu (*Arapaima gigas*), podendo chegar a medir 90 cm de comprimento e 30 kg de peso (SANTOS et al., 2006; MORAIS; O´SULLIVAN, 2017). É uma espécie com grande aceitação e valor econômico agregado, por isso é o principal peixe de água doce produzido na aquicultura brasileira, também em vários países asiáticos. É a espécie de maior destaque para a piscicultura na Amazônia, sendo produzido em açudes particulares, viveiros de barragem, viveiros escavados e tanques- rede (VALLADÃO et al., 2018). É oriundo das bacias dos rios Orinoco e Amazonas, e sua distribuição geográfica compreende o Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia, (SAINT-PAUL, 2017; GOMES et al., 2010)

Figura 1. Exemplar de *Colossoma macropomum*. Foto: arquivo pessoal.

A produção de peixes nativos concentra-se principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Com destaque para a região Norte, três estados estão entre os cinco principais produtores, Rondônia em primeiro lugar na produção de peixes nativos, produziu 68.800 toneladas, o estadodo Pará ocupou o quarto lugar com produção de 25.005 toneladas e o estado do Amazonas produziu 20.596 toneladas, ocupando a quinta posição na produção de peixes nativos, com o tambaqui como a principal espécie produzida (PEIXE BR, 2020).

Em sistemas intensivos, o tambaqui pode alcançar até 2,62 kg e produção de 18.530 kg ha^{-1} após 10 meses de engorda em tanques escavados com emprego de aeradores (IZEL et al., 2013). Esses bons resultados se devem às características peculiares da espécie como bom crescimento, aceitação de ração, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido, qualidade de água pobre e manuseio, além da facilidade de obtenção de juvenis durante todo o ano (IZEL et al., 2013, 2020; SAINT-PAUL, 2017; VALLADÃO et al., 2018; GOMES et al., 2010). Em adição, essa espécie apresenta alto valor comercial e boa aceitação pelo mercado consumidor (GOMES et al., 2010).

Estudos voltados ao levantamento e tratamento de doenças bacterianas no ambiente de cultivo se tornam necessários, uma vez que as bacterioses são uma das principais causas de perdas econômicas na criação de peixes (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017; BANDEIRA JUNIOR et al., 2019; PESSOA et al., 2019). Segundo Pessoa et al. (2020), *A. hydrophila* foi a bactéria isolada com maior prevalência (41,2%) em tambaquis estressados, mas houve também o registro das espécies *A. dhakensis*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. jandaei*. Esses resultados evidenciam que o tambaqui não está livre da ocorrência de surtos epizoóticos causados pelo gênero *Aeromonas*, e, portanto, maior atenção deve ser dada a este gênero bacteriano.

2.2 *Aeromonas* spp.

O grupo de *Aeromonas* móveis compreende bactérias Gram-negativas, oportunistas, de natureza ubíqua, e sua patogenicidade é considerada multifatorial (TAVARES et al., 2014; PESSOA et al., 2019). Tem a forma de bastonetes curtos, anaeróbias facultativas, apresentam resultado positivo nos testes de oxidase e catalase, medem aproximadamente 0,3-1,0 µm em diâmetro por 1,0-3,5 µm em comprimento e compreende inúmeras espécies, podendo assumir uma forma mais curta ou esférica em situações de baixa disponibilidade de nutrientes. Apresentam também uma camada cristalina em torno de suas células, são móveis, possuem um ou mais flagelos para locomoção e crescem em temperaturas que variam de 5 ºC a 37 ºC (PARKER; SHAW, 2011; PESSOA et al., 2019).

As *Aeromonas* possuem vários fatores de virulência ligados ao desenvolvimento de

doenças (FREIRE et al., 2019; PESSOA et al., 2019; 2020). Componentes estruturais, toxinas e produtos extracelulares, agindo em conjunto ou individualmente, permitem que esses microrganismos colonizem e infectem os hospedeiros. O complexo de virulência de *Aeromonas* spp., devido a essa diversidade, ainda não foi estabelecido (OTTAVIANI et al., 2011; PESSOA et al., 2019).

A composição estrutural de uma célula bacteriana tem grande influência no processo infeccioso. Vários fatores como flagelos, pili, proteínas e antígenos de membrana, entre outros, têm sido estudados e relacionados a papéis na patogenicidade bacteriana, por exemplo, locomoção, adesão ao tecido do hospedeiro, proteção contra agentes bactericidas, células do sistema imunológico e presença de biofilme (RASMUSSEN-IVEY et al., 2016; PESSOA et al., 2019). A formação de biofilme não é apenas uma etapa importante na patogenicidade dos organismos, mas seu estabelecimento em tecido do hospedeiro (biótico) ou superfícies inanimadas (abióticas) inibem a eficácia das terapias antimicrobianas e fornecem proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro (SEBASTIÃO et al., 2013). Além disso, biofilme facilita a comunicação entre bactérias para expressão de virulência, que cria um nicho ecológico para microrganismos, promovendo epizootias ou infecções recorrentes no ambiente de aquicultura (BASSON et al., 2008).

A espécie mais comum isolada em pisciculturas (61,5%) é *A. hydrophila*, a qual pertence à família Aeromonadaceae e seu habitat é predominantemente aquático (dulcícola e marinho) (PESSOA et al., 2019). A doença causada por *A. hydrophila* é chamada septicemia hemorrágica e está associada ao excesso de matéria orgânica na água, acometendo peixes em condições de estresse e/ou associada à infecção por outros patógenos (SEBASTIÃO et al., 2018). Essa doença é um obstáculo importante para o crescimento sustentável da aquicultura, sendo o seu agente causador de úlceras, putrefação, podridão da cauda em peixes, além de causar danos oxidativos ao peixe, que tenta combater a infecção liberando uma forma reativa de oxigênio e nitrogênio (BANDEIRA JR. et al., 2019; GALLANI et al., 2020).

Outras espécies de *Aeromonas* têm sido isoladas de tambaquis estressados, como as espécies *A. dhakensis*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. jandaei* (PESSOA et al., 2020). Esta última espécie com registros de isolamentos em peixes como Enguia europeia *(Anguilla anguilla)* (ESTEVE et al., 1993), tilápia do Nilo (DONG et al., 2017; ASSANE et al., 2021), panga (*Pangasianodon hipoftalmo*) (PHU et al., 2015) e Anabás (*Anabas testudineus*) (MAZUMDER et al., 2021).

Há informações disponíveis de que cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei* desenvolveram resistência contra muitos dos antimicrobianos disponíveis (MAHANTY et al., 2013; PESSOAet al., 2019; GALLANI et al., 2020; ASSANE et al., 2021).

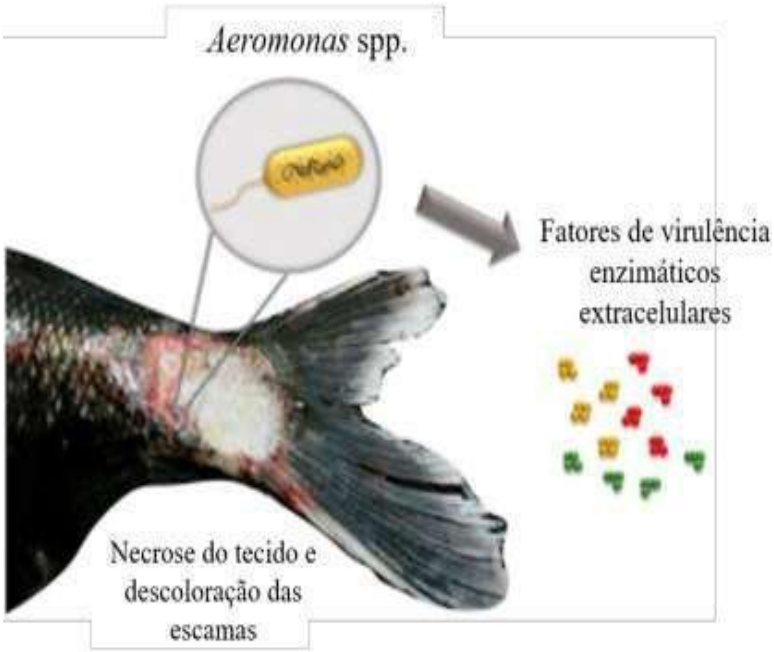

Figura 2. Sinais clínicos de *Aeromonas hydrophila* e fatores de virulência em *Colossoma macropomum* acometido de enfermidade. Fonte: Pessoa et al. (2019).

Cepas de *A. hydrophila* isoladas de tambaquis apresentaram-se suscetíveis aos antimicrobianos ceftriaxona, florfenicol, oxitetraciclina e tianfenicol, mas foram resistentes contra ampicilina, amoxicilina, penicilina, estreptomicina, sulfazotrina e vancomicina; intermediário contra gentamicina e doxiciclina (GALLANI et al., 2020). Já *A. hydrophila* isolada de tilápia híbrida vermelha (*O. niloticus* × *Oreochromis mossambicus*) na Malásia demonstrou resistência múltipla a antimicrobianos (MAR) como amicacina, ampicilina, cefotaxima, amoxicilina, sulfametoxazol-trimetoprima, eritromicina e estreptomicina, o que pode representar uma ameaça à saúde humana (PAUZI et al., 2020). Para *A. jandaei* isolada de *A. testudineus* foi relatada sensibilidade bacteriana aos 20 antimicrobianos avaliados, sendo os principais: clorafenicol, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina e florfenicol (MAZUMDER et al., 2021). Em cepas de *A. jandaei* e *A. hydrophila* isoladas de pirarucu foi observada resistência aos antimicrobianos imipenem e ceftriaxona, mas os isolados foram suscetíveis a ampicilina, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, ceftriaxona, imipenem, amicacina, estreptomicina, tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, trimetoprima/sulfametoxazol e cloranfenicol (PROIETTI-JUNIOR et al., 2021). Em outro estudo, foi constatado sensibilidade de cepas de *A. jandaei* isoladas de tilápia-do-Nilo para os antimicrobianos enrofloxacina, florfenicol, oxitetraciclina e tiafenicol (ASSANE et al., 2021). Esses resultados reforçam a necessidade de ser dada maior atenção ao monitoramento, diagnóstico e controle destas bactérias no ambiente.

2.3 Antimicrobianos utilizados na piscicultura, com destaque para o florfenicol

Os antimicrobianos são substâncias produzidas de forma sintética, semissintética ou natural, com a capacidade de impedir a multiplicação de bactérias ou destruir as mesmas (ROMERO et al., 2012). O mecanismo de ação dos antimicrobianos pode ser agrupado em cinco categorias: inibição da síntese de peptideoglicano da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana ou transporte ativo da membrana celular, inibição da síntese de proteína (inibição da tradução e transcrição do material genético), inibição da síntese do ácido nucléico e inibição da síntese de fosfato (NOGUEIRA et al., 2016; SAAVEDRA, et al., 2019; SOUZA, 2019).

Para o tratamento de infecções bacterianas em peixes, há apenas poucos antimicrobianos aprovados pela agência americana Food and Drug Administration. Nesta lista estão incluídos: sulfadimetoxina ormetoprim, florfenicol e oxitetraciclina (FDA, 2018). Já no Brasil, apenas dois antimicrobianos têm o uso aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a oxitetraciclina para os salmonídeos e bagres e o florfenicol para trutas e tilápia, com administração via oral na ração (SINDAN, 2018). Dentre estes, o florfenicol tem sido o antimicrobiano mais comumente usado na aquicultura para o tratamento de várias doenças bacterianas em peixes (ZHANG et al., 2020).

O florfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro, sendo principalmente bacteriostático, cujo modo de ação é através da ligação à subunidade ribossomal 50S e inibição da etapa da transpeptidil-transferase na síntese de proteínas, eficaz contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (MILLER, 2007). Esse antimicrobiano vem sendo testado na aquicultura em várias espécies de peixes, como em tambaqui frente *Aeromonas* spp. e *Streptococcus* spp. (FERRANTE et al., 2020), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e carpa comum (*Cyprincus carpio*) frente *A. hydrophila* (CARRASCHI et al., 2014; ZHAO et al., 2018), e em tilápia-do-Nilo frente a *Streptococcus iniae* e *S. agalactiae* (GAIKOWSKI et al., 2014), entre outros. Entretanto, quando os antimicrobianos são usados de forma errônea na aquicultura como profiláticos eterapêuticos, este fato contribui para a seleção de bactérias resistentes, bem como na seleção e disseminação de seus respectivos genes codificadores de resistência a antimicrobianos (MIRANDA et al., 2018; PESSOA et al., 2019),

O tratamento com o florfenicol por 10 dias em tanques com bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) alterou a estrutura da microbiota e reduziu a biodiversidade desta nos tanques. Os autores relataram a transferência horizontal de genes de resistência, e que as bactérias podem adquirir a resistência ao florfenicol através da regulação do sistema de efluxo inato, por meio de mutações (ZENG et al., 2019). Já utilizando o pacu como modelo, a utilização do florfenicol

resultou em aumento da diversidade dos genes de resistência aos antimicrobianos e de sua abundância relativa total no microbioma intestinal do pacu (SÁENZ et al., 2019). Em adição, Silva et al. (2018) também relataram que a resistência ao florfenicol em *Aeromonas* spp. pode ser explicada pela presença do gene *floR*, e que esse gene está relacionado com uma bomba de efluxo.

Diante deste quadro, estratégias de terapia combinada têm sido empregadas para aumentar a eficácia do tratamento de bacterioses, permitindo reduzir o uso de antimicrobianos na aquicultura e consequentemente os resíduos no ambiente. Neste sentido, Assane et al. (2019) relataram que isolados de *Aeromonas* spp. foram sensíveis aos antimicrobianos florfenicol e tiafenicol, tanto individualmente quanto em combinação. Em adição, a combinação dos dois antimicrobianos apresentou um efeito sinérgico, mostrando que é possível reduzir a quantidade de antimicrobiano e obter o mesmo efeito terapêutico no tratamento de aeromoniose em tilápia-do-Nilo. Com relação somente ao efeito isolado do florfenicol, estudos de depleção de resíduos com o antimicrobiano administrado isoladamente (10 mg kg^{-1}), por 10 dias para o tambaqui, evidenciaram potencial de tratamento para as principais bacterioses que acometem a espécie, e determinaram que o período de carência após 10 dias de tratamento foi menor do que 24 horas(CASTELO BRANCO, 2015).

Diante destas informações, há necessidade de avaliar novos protocolos para o uso de antimicrobianos para o tratamento de bacterioses registradas na produção de tambaqui, considerando os efeitos terapêuticos sinérgicos, antagônicos ou aditivos dos antimicrobianos sintéticos e naturais como os óleos essenciais (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018).

2.4 Óleos essenciais (OEs) como alternativa para o tratamento de bacterioses em peixes

Os OEs são misturas complexas obtidas a partir de material vegetal. São voláteis e lipofílicos, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídas, em sua maioria, por moléculas de natureza terpênica (MORAIS, 2009; TARIQ et al., 2019), muitos dos quais comprovadamente possuem propriedades antimicrobianas fortes (RADULOVIC et al., 2013; CUNHA et al., 2018; TARIQ et al., 2019), pertencem ao metabolismo secundário das plantas e estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e na atração de insetos e outros agentes polinizadores. De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos (BAKKALI et al., 2008).

Os OEs das famílias Piperaceae (*Piper aduncum*, *P. callosum*, *P. hispidinervum*, *P. hispidum* e *P. marginatum*), Lamiaceae (*Mentha arvensis*, *M. piperita* e *Ocimum gratissimum*), Verbenaceae (*Lippia alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides*), Zingiberaceae (*Zingiber officinale*), Lauraceae (*Cinnamomum zeylanicum*) e Myrtaceae (*Eugenia caryophyllata*) se destacam devido atividade antimicrobiana contra isolados considerados patogênicos na piscicultura, como: *Aeromonas* spp. em tambaqui (MAJOLO et al., 2017; 2019; CHAGAS et al., 2020; GALLANI et al., 2020; MONTEIRO et al., 2020) e *Streptococcus agalactiae* em tilápia-do-Nilo (MAJOLO et al., 2018). Na Tabela 1 são apresentados valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), evidenciando a atividade antimicrobiana de diferentes OEs. Em adição, os OEs também vêm apresentando bons resultados como antiparasitários (ALVES et al., 2021; COSTA et al., 2020; VALETIM et al., 2017), imunoestimulante (ZARGAR et al., 2019; CHUNG et al., 2021), entre outras atividades biológicas.

Tabela 1. Principais óleos essenciaiss de plantas utilizados contra bactérias com potencial patogênico para peixes.

Plantas	**Família**	**CIM** ($\mu g\ mL^{-1}$)	**CBM** ($\mu g\ mL^{-1}$)	**Bactérias**	**Referências**
Piper aduncun	Piperaceae	30.000	-	*Aeromonas hydrophila*	Majolo et al.(2019)
P. callosum		30.000	-		
P.hispidinervun		30.000	-		
P.marginatum		234	-		
Aloysia triphyla	Verbenaceae	-	197,3 a 3.125	*Aeromonas spp.*	Souza et al.(2017)
Lippia alba		-	197,3 a 3.125		
Lippia origanoides	Verbenaceae	200	2000	*Aeromonas hydrophila*	Bandeira et al.(2019)
Achyrocline satureioides	Lamiaceae	>6.400	> 6.400		
Aniba parviflora	Lauraceae	800	1.600		
Aniba rosaeodora		3.200	3.200		
Anthemis Nobilis	Asteraceae	6.400	6.400		
Conobea scoparioides	Plantaginaceae	200	200		
Cupressus sempervirens	Crupressaceae	> 6.400	> 6.400		
Illicium verum	Illiciceae	1.600	3.200		

Melaleuca alternifolia	Myrtaceae	3.200	6.200		
Melaleuca alternifolia	Myrtaceae	780 a 12.506	12.506 a 50000	*Aeromonas hydrophila*	Kot et al. (2019)
		780 a 3.120	6.240 a 3.120	*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*	
		780 a 3.120	6.240 a 3.120	*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*	
Thymusvulgaris	Lamiaceae	390 a 780	390 a 3.120	*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*	
		90 a 1.560	90 a 6.240	*Aeromonas hydrophila*	
		90 a 390	90 a 390	*Aeromonas sobria*	
Eugenia caryop hyllus	Myrtaceae	50 a 190	400 a 190	*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*	
		190 a 1.560	380 a 3.120	*Aeromonas hydrophila*	
		10 a 380	200 a760	*Aeromonas sobria*	
Lippia sidoides	Verbenaceae	625 a 1.250	625 a 1.250	*Aeromonas spp.*	Monteiro et al.(2020)
Ocimum gratissimum	Lamiaceae	1.250 a5.000	1.250 a5.000		
Zingiber officinale	Zingiberaceae	1.250 a5.000	1.250 a5.000		
Mentha arvensis	Lamiaceae	1.250	16.666,7	*Aeromonas spp.*	Chagas et al. (2020)
M. piperita		1.250	16.666,7		
Eugenia caryophyllata	Myrtaceae	235	470	*Aeromonas hydrophila*	Gallani et al. (2020)
Allium sativum	Liliaceae	937,5	1.875		
Cinnamomum seylacium	Lauraceae	235	235		
Citrus aurantium linne	Rutaceae	7.500	7.500		
Cymbopogon citratus	Poaceae	1.875,5	1.875		
Cymbopogon martini					

		3.750	3.750		
Cymbopogon nardus		3.750	3.750		
Melaleuca alternifolia		7.500	15.000		
Mentha piperita	Lamiaceae	3.750	3.750		
Ocimum basilicum		7.500	7.500		
Thymus vulgaris		3.750	7.500		
Hesperozygis ringens	Lamiaceae	400	400	*Aeromonas hydrophila*	Bandeira et al. (2017)
		1.600	3.200		
		800	800	*Aeromonas veronii*	
Ocimum gratissimum	Lamiaceae	400-800	400-1600	*Aeromonas hydrophila*	
		800	1600	*Aeromonas veronii*	
O. gratissimum	Lamiaceae	200 - 1.600	400 -1.600	*Aeromonas hydrophila*	Sutili et al. (2016)
		6.400	-		
Hesperozygis ringens		800 - 3.200	800 - 3.200		
Cinnamomum zeylanicum verum	Lauraceae	245-490	-	*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*	Hayatgheib et al.(2020)
Origamun vulgamun		226-453	-		
Origamun heracleoticum		458-458	-		
Origamun compactum	Lamiaceae	458 – 458			
Eugenia caryophylla	Myrtaceae	5.20-5.20	-		
Melaleuca alternifolia		3.624 ≥3.624	-		
Cinnamomum camphora	Lauraceae	≥3.592 ≥3.628	-		
Allium sativum	Liliaceae	5.415	10.830	*Aeromonas hydrophila*	Assane et al. (2020)
A. sativum		10.830	24.660	*Aeromonas jandaei*	
Artemisia vulgaris	Asteraceae	18.610	18.610	*A. hydrophila*	
		18.610	37.220	*A. jandaei*	
Boswellia carterii	Burseraceae	16.952	16.952	*A. hydrophila*	
		16.952	16.953	*A. jandaei*	
Cananga odorata		36.600	> 36.600	*A. hydrophila*	

	Annonaceae	18.300	36.600	*A. jandaei*	
Cinnamomum verum	Laureaceae	662,5	1.325	*A. hydrophila*	
		2.650	2.650	*A. jandaei*	
Citrus aurantium	Rutaceae	35.560	35.560	*A. hydrophila*	
		17.780	35.560	*A. jandaei*	
Citrus bergamia	Rutaceae	8.740	8.740	*A. hydrophila*	
		17.480	17.480	*A. jandaei*	
Corymbia citriodora	Myrtaceae	4.315	4.315	*A. hydrophila*	
		17.260	17.260	*A. jandaei*	
Cupressus sempervirens	Cupressaceae	17.260	17.260	*A. hydrophila*	
		17.260	17.260	*A. jandaei*	
Cymbopogon citratus	Poaceae	2.185	4.370	*A. hydrophila*	
		4.370	4.370	*A. jandaei*	
Eucalyptus globulus	Myrtaceae	18.240	18.240	*A. hydrophila*	
		18.240	18.240	*A. jandaei*	
Mentha piperita	Lamiaceae	2.245	4.490	*A. hydrophila*	
		8.990	17.960	*A. jandaei*	
Ocimum basilicum	Lamiaceae	1.113	2.222	*A. hydrophila*	
		8.890	8.890	*A. jandaei*	
Pelargonium graveolens	Geraniaceae	2.222	2.222	*A. hydrophila*	
		4.445	4.445	*A. jandaei*	
Syzygium aromaticum	Myrtaceae	662.5	1.3251	*A. hydrophila*	
		2.650	2.650	*A. jandaei*	
Thymus vulgaris	Lamiaceae	294,06	588,13	*A. hydrophila*	
		2.352	2.352	*A. jandaei*	
Origanum vulgare	Lamiaceae	61-67	-	*Aeromonas veronni bv. sobria*	Anastasiou et al.(2020)
Thymbra capitata		58-69	-		
Satureja thymbra	Lamiaceae	58-70	-		
Mentha pulegium	Lamiaceae	283-379	-		

Lavandula angustifolia	Lamiaceae	320-350	-		
Melissa officinalis	Lamiaceae	274-360	-		
Foeniculum vulgare	Apiaceae	275-448	-		
Daucus carota	Apiaceae	124-187	-		
Crithmum maritimum	Apiaceae	261-365	-		
Matricaria chamomilla	Asterarceae	598-985	-		

Com relação à atividade antimicrobiana dos OEs, o mecanismo de ação está ligado à sua hidrofobicidade, que lhes permite associação aos lipídios da membrana celular e das mitocôndrias. A membrana torna-se permeável e ocorrem perdas de componentes celulares e íons, o que leva à ruptura da membrana e, consequentemente ao seu vazamento. Ocorre mudança da morfologia da célula, interrompendo as atividades celulares, como a produção de energia e transporte da membrana (NAZZARRO et al., 2013; TARIQ et al., 2019).

2.5. Sinergismo entre óleos essenciais e antimicrobianos

A interação sinérgica significa que o efeito de duas substâncias químicas tomadas em conjunto é maior do que a soma de seus efeitos separados nas mesmas doses, as interações podem ser investigadas tanto entre componentes de extratos vegetais quanto entre produtos naturais e fármacos sintéticos (CASANOVA; COSTA, 2017). Estas estratégias com OEs ou terapia combinada com antimicrobianos permitem aumentar a eficácia de tratamentos para bacterioses (CHOUHAN et al., 2017; SOUZA et al., 2017; BANDEIRA JUNIOR et al., 2018; SHAABAN, 2020; ASSANE et al., 2020), com isso facilitando a aplicação desses compostos para superar problemas com bactérias multirresistentes (CHOUHAN et al., 2017). O efeito sinérgico dos fármacos contra um determinado microrganismo é alcançado quando o efeito combinado das substâncias é maior do que a soma dos efeitos individuais (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018; ASSANE et al., 2020). Já o efeito antagônico ocorre quando uma combinação de substâncias mostra um efeito menor quando comparado com os efeitos das aplicações individuais (BURT, 2004; ASSANE et al., 2020). Várias pesquisas vêm enfatizando o pontencial da sinergia entre OEs e antimicrobianos (Tabela 2).

Souza et al. (2017) avaliaram o efeito sinérgico dos OEs de *A. triphylla* e *L. alba* com o

antimicrobiano florfenicol frente *Aeromonas* spp., isoladas da espécie pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) e de tilápia-do-Nilo . Tal sinergismo permitiu reduzir a concentração utilizada dos antimicrobianos e resíduos dispensados na água de cultivo dos peixes. Sharma et al. (2020) testaram seis OEs em sinergismo com vários antimicrobianos frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo que as Gram-positivas demonstraram ser mais sensíveis às combinações. A combinação aumentou a eficácia antibacteriana dos compostos sintéticos e reduziu significativamente as doses ativas do antimicrobiano. El Atki et al. (2019) testou o OE de canela (*Cinnamomum cassia*) em sinergismo com ampicilina e clorafenicol frente a bactérias multirresistentes e constatou o efeito sinérgico. A combinação poderá ser usada como alternativa terapêutica, reduzindo as doses, os efeitos adversos, e os custos do uso de antimicrobiano.

Neste contexto, os estudos sobre o emprego de OEs individualmente ou em combinação devem ser aprofundados visando o tratamento de doenças bacterianas, como àquelas causadas por *A. hydrophila* e *A. jandaei*, na criação de espécies nativas como o tambaqui.

Tabela 2. Sinergismo entre óleos essenciais e antimicrobianos frente a bactérias de interesse napiscicultura.

Plantas	**Antimicrobiano**	**Bactérias**	**∑IFI**	**Referências**
Aloysia Triphylla	Florfenicol	*Aeromonas* spp.	0,28	Souza et al.(2017)
		Aeromonas spp.	0,15	
		Aeromonas spp.	0,18	
		Aeromonas spp.	0,27	
Lippia alba	Florfenicol	*Aeromonas* spp	0,28	
		Aeromonas spp.	0,15	
		Aeromonas spp.	0,09	
		Aeromonas spp.	0,15	
Callistemon lanceolatus	Cloranfenicol	*Staphylococcus aureus*	0,49	Sharma et al. (2020)
	Ampicilina	*Staphylococcus aureus*	0,48	
Ocimum gratissimum	Cloranfenicol	*Micrococcus luteus*	0,48	
		Bacillus subtilis	0,50	

		Klebsiella pneumoniae	0,50	
Cymbopogon winterianus	Ampicilina	*Staphylococcus aureus*	0,496	
		Micrococcus luteus	0,496	
		Bacillus subtilis	0,496	
		Escherichia coli	0,48	
		Klebsiella pneumoniae	0,496	
		Staphylococcus aureus	0,50	
Cymbopogon flexuosus	Cloranfenicol	*Micrococcus luteus*	0,50	
		Bacillus subtilis	0,50	
		Escherichia coli	0,50	
		Klebsiella pneumoniae	0,50	
		Staphylococcus aureus	0,496	
Mentha longifolia	Cloranfenicol	*Micrococcus luteus*	0,496	El atki et al. (2019)
		Klebsiella pneumoniae	0,50	
	Ampicilina	*Staphylococcus aureus*	0,38	
		Escherichia coli	0,50	
Cinnamomum Cassia	Cloranfenicol	*Staphylococcus aureus*	0,50	
Thymus Vulgaris	Cloranfenicol	*Citrobacter freundii*	0,375	
P. armeniaca	Tiafenicol	*Escherichia coli*	0,312	Assane et al. (2020)
		Staphylococcus aureus	0,05	
		Pseudomonas aeruginosa	0,258	
		Klebsiella pneumoniae	0,375	
Lauru nobilis	Tiafenicol	*Bacillus subtilis*	0,5	

		Micrococcus luteus	0,5	
		Escherichia coli	0,375	
		Pseudomonas aeruginosa	0,266	
Lauru nobilis	Vancomicina	*Klebsiella pneumoniae*	0,313	Nafis et al. (2020)
		Micrococcus luteus	0,497	
		Staphylococcus aureus	0,497	
		Bacillus subtilis	0,375	
		Escherichia coli	0,5	
		Pseudomonas aeruginosa	0,75	
		Klebsiella pneumoniae	0,375	
Cladanthus Arabicus	Vancomicina	*Salmonela sp.*	0,27	
		Proteus mirabilis	0,03	
Bubonuum imbricatum	Amoxicilina	*Enterobacter cloacae*	0,13	Aghraz et al. (2018)
		Salmomella sp.	0,29	
		Proteus mirabilis	0,13	
		Escherichia coli	0,13	
	Neomicina	*Proteus mirabilis*	0,13	
		Escherichia coli	0,26	

2.6 *Aloysia triphylla*

Pertencente à família Verbenaceae, a planta *A. triphylla* (Figura 3) é um arbusto grande, de dois a três metros de altura, ramificado e ereto. É conhecida pelos nomes populares de cidrão, erva-cidreira, cidró, erva-luísa e cidrozinho (LORENZI; MATOS, 2008). No Brasil é comum o seu cultivo como planta ornamental, sendo uma planta bastante aromática. O rendimento do óleo essencial de *A. triphylla* é de 0,45% (PAULUS et al., 2013), sendo o citral, neral e geranial os seus principais constituintes químicos (CARNOT et al., 1999; PAULUS et al., 2013).

Figura 3. Espécime de *Aloysia triphylla* cultivada em Manaus – AM. Foto: Franmir Brandão

Na medicina tradicional a folha de *A. triphylla* é utilizada para insônia, ansiedade e como analgésico, sedativo, para combater resfriados e antiespasmódico (LORENZI & MATOS, 2008). Na aquicultura foi investigado seu potencial antibacteriano contra *Aeromonas* sp. isolada de peixes (PARODI et al., 2013). Seu efeito anestésico foi observado em jundiá (SANTOS et al., 2017), pacamã (BECKER et al., 2017) e em tambaqui (BRANDÃO et al., 2021). Em *R. quelen* mostrou ser um antioxidante eficaz em concentração de 2,0 ml kg^{-1} na dieta (ZEPPENFELD et al., 2017), reduzindo o estresse no transporte (SANTOS etal., 2017). Como aditivo alimentar foi avaliado em jundiá (SANTOS et al., 2017), tilápia do Nilo (SOUZA et al., 2019) e peixe-zebra (*Danio rerio*) (ZAGO et al., 2018).

2.7 *Croton cajucara*

Croton cajucara (Figura 4) é uma importante planta medicinal no Brasil, com ocorrência na região Amazônica. É um arbusto de folhas lanceoladas, dotadas de pecíolo, com coloração verde ou parda, com flores e casca, e estas são pulverulentas e aromáticas. Esta espécie pertence à família Euphorbiaceae e possui dois morfotipos conhecidos como sacaca branca e sacaca vermelha, os quais são identificados pela cor das folhas e caules (LORENZI; MATOS, 2008; NASCIMENTO et al., 2017).

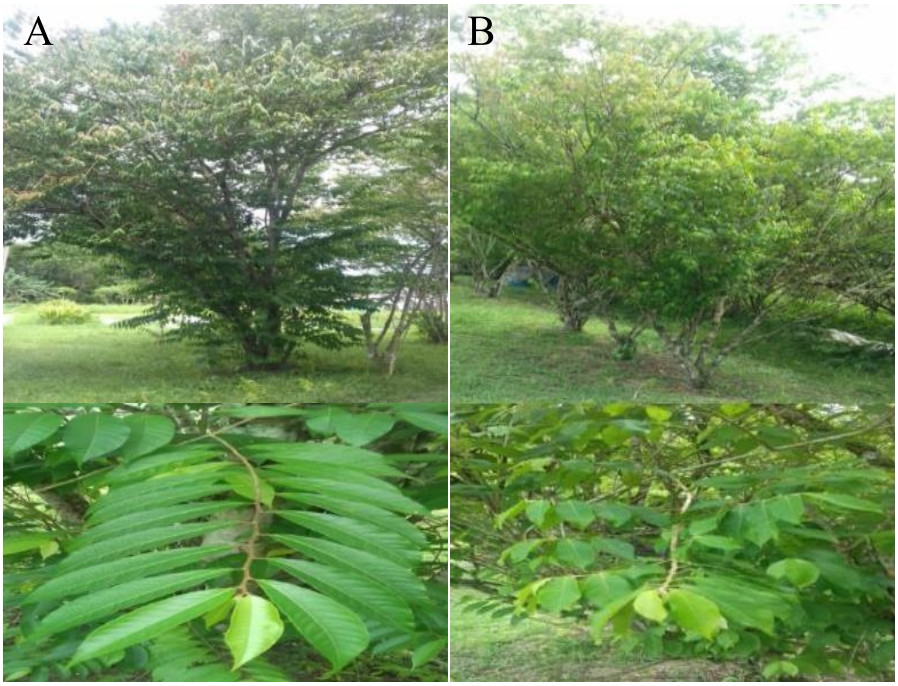

Figura 4. Espécimes de *Croton cajucara* cultivada em Manaus – AM. (A) morfotipo vermelho; (B) morfotipo branco. Foto: Márcio Rosa.

Na medicina popular as folhas e cascas do caule das sacacas são utilizadas no tratamento de diabetes, diarreia, malária, distúrbios gastrintestinais e no controle do colesterol (MACIEL et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008). O óleo essencial da sacaca morfotipo branca é rico em linalol, enquanto a sacaca do morfotipo vermelha é rica em 7-hidroxicalameneno, com atividades anti-inflamatória, antitumoral, antiparasitárias e antimicrobianas descritas (CHAVES et al., 2006; AZEVEDO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013). No controle do endoparasito *Neoechinorhynchus buttnerae* de tambaquis, o óleo essencial de *C. cajucara*, morfotipos branco e vermelho, na concentração de 6,25 mg mL^{-1}, apresentaram 100% de eficácia *in vitro* após duas horas de exposição (OLIVEIRA et al., 2021).

2.8 *Cymbopogon citratus*

O gênero *Cymbopogon* possui mais de 100 espécies nos países tropicais, incluindo o Brasil, destas, aproximadamente 56 são aromáticas. Pertencente à família Poaceae, a espécie *C. citratus* (Figura 5) é conhecida popularmente como capim cidreira, capim-limão, capim-santo ou capim-cidrão (LORENZI; MATOS, 2008). Na composição química deste óleo essencial estão neral, geranial, geraniol, limoneno, citronelal e mirceno (GUERRA et al., 2000; ANDRADE et al., 2009; MATASYOH et al., 2011; GONZALES et al., 2020).

Figura 5. Espécime de *Cymbopogon citratus* cultivada em Manaus – AM. Foto: Francisco Célio Maia.

Na medicina popular essa planta é utilizada como ansiolítica e anti-hipertensiva (LORENZI; MATOS, 2008). Há ainda a descrição da atividade antifúngica e antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus* (GUERRA et al., 2000). Com relação à atividade antimicrobiana

estudos têm comprovado a atividade em peixes. Starliper et al. (2015) relataram valores relativamente baixos para a concentração bactericida mínima do óleo de *C. citratus* frente *Aeromonas* spp., *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. hydrophila* e *A. veronii* bv. *sobria*. Assane et al. (2020) testaram o óleo de *C. citratus* frente às bactérias *Aeromonas* spp. e *Citrobacter frendii*, com resultados positivos de 4.370 µg mL^{-1} para atividade antibacteriana (Tabela 1). Gallani et al. (2020) também testaram o óleo de *C. citratus* frente *A. hydrophila*, com valor de CIM de 1.825 mg mL^{-1} (Tabela 1). Já atividade anti-helmíntica deste óleo essencial tem sido descrita para parasitos monogenea (*Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* e *Notozothecium janauachensis*) em tambaqui, com 100% de eficácia *in vitro*, sendo o efeito dose-dependente (GONZALES et al., 2020).

2.9 *Lippia gracilis*

Lippia gracilis (Figura 6), da família Verbenaceae, é conhecida como alecrim-da-chapada ou alecrim-de-tabuleiro. Essa planta tem arbustos caducifólios, ramificados, com caule quebradiço, de até dois metros de altura. As folhas desta planta são aromáticas e picantes, simples, cartáceas, com enervação impressa bem visível, de um pouco mais de 1 cm de comprimento (LORENZI; MATOS, 2008). Apresentam inflorescências axilares, tetrásticas, brácteas membranáceas, ovais, imbricadas, conatas na base, glandulosas; corola alva, com 0,5-1,8 cm de comprimento (SALIMENA; SILVA, 2009).

Figura 6. Espécime de *Lippia gracilis* cultivada em Manaus - AM (Foto: Márcio Rosa).

Essa planta é encontrada em regiões do cerrado e da caatinga brasileira. É bastante usada na medicina popular para tratar problemas respiratórios como gripes, tosse, sinusite, bronquite, congestão nasal, na forma de chá ou tintura das folhas, raízes e talos por via oral ou tópico como

antisséptico e antimicrobiano (PASCUAL et al., 2001). Seu óleo essencial é composto principalmente por carvacrol, timol, *p*-cimeno, β-cariofileno, γ-terpineno (LORENZI; MATOS, 2008; SANTOS et al., 2014). Estudos têm comprovado ação antibacteriana, antiinflamatória, antioxidante, antifúngica, antiparasitária, além de atividade inseticida (DA SILVA et al., 2019; MELO et al., 2013).

Atividade antiparasitária tem sido comprovada em tambaqui, com eficácia no controle *in vitro* do acantocéfalo *N. buttnerae* na concentração de 0,9 mg mL^{-1} (OLIVEIRA et al., 2021) e no controle *in vivo* de monogena na concentração de 700 mg L^{-1} (BARRIGA et al., 2020)

2. HIPÓTESES

- As cepas patogênicas para o tambaqui, *A. hydrophila e A. jandaei*, formam biofilme;
- Os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Croton cajucara*, morfotipos branco e vermelho, *Cymbopogon citratus* e *Lippia gracilis* possuem mecanismos de ação bactericidas e o florfenicol bacteriostático contra *A. hydrophila* e *A. jandaei*;
- Os óleos essenciais investigados apresentam atividade antibiofilme que potencialmente inviabiliza a adesão das bactérias-alvo;
- Os óleos essenciais e o antimicrobiano florfenicol investigados apresentam respostas sinérgicas contra *A. hydrophila* e *A. jandaei*, permitindo diminuir a quantidade de fármaco e resíduos no ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Prospecção de óleos essenciais em combinação com florfenicol frente *Aeromonas* móveis isoladas de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os principais constituintes químicos dos óleos essenciais das espécies de *Aloysia triphylla*, *Croton cajucara*, morfotipos branco e vermelho, *Cymbopogon citratus* e *Lippia gracilis*;

- Realizar a prospecção *in vitro* de cinco óleos essenciais e do antibiótico florfenicol contra as cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, a partir da determinação da atividade antimicrobiana e da atividade antibiofilme;

- Avaliar o potencial de sinergismo dos óleos essenciais de *A. triphylla*, *C. cajucara*, morfotipos branco e vermelho, *C. citratus* e *L. gracilis* com o antibiótico florfenicol, baseado no valor do índice IFI (Índice de Fração Inibitório).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de material vegetal e extração de óleo essencial

Foram utilizadas folhas e inflorescências de *A. triphylla*, *C. cajucara*, morfotipos branco e vermelho, *C. citratus* e *L. gracilis*, coletadas de plantas adultas pertencentes à Coleção de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental, município de Manaus, AM. Este material foi exposto a temperatura ambiente para a secagem, até atingir o peso constante. Após este processo, os OEs foram extraídos pelo método de hidrodestilação, com o uso de aparelho de Clevenger. Em cada extração foram colocadas amostras de 500 g de folhas secas e inflorescências de cada espécie de planta, em balão volumétrico de 12L, acoplado a umamanta aquecedora. Foi adicionada água destilada até a imersão das folhas. Em seguida, a manta aquecedora foi ligada e quando o OE começou a ser extraidofoi considerado o início do processo. Ao final da extração, o volume do OE foi medido, e logo em seguida foi recolhido e armazenado em vidros âmbar lacrados com tampa e batoque e estocados em freezer até o momento da análise da sua composição química.

4.2. Determinação da composição química dos óleos essenciais

Amostras dos OEs de *A. triphylla*, *C. cajucara*, morfotipos branco e vermelho, *C. citratus* e *L. gracilis* foram enviadas para a Embrapa Agroindústria de Alimentose realizado o fracionamento e a caracterização química por cromatografia em fase gasosa em equipamento Agilent 6890 acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N, operando no modo ionização eletrônica (70 eV). Para a separação dos componentes foi utilizada uma coluna capilar HP5-MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm), com programação de temperatura de 60a 240 ºC, variando a uma taxa de 3ºC/min. As amostras (1,0 µL) foram injetadas no modo com divisão de fluxo (1:100) em injetor mantido a 250 ºC. Hélio foi usado como gás carreador (1,0 mL min^{-1}).

Para a quantificação relativa (área %) dos componentes dos OEs, foi utilizado um cromatógrafo a gás, modelo Agilent 6890N, equipado com um detector de ionização por chama mantido a 280ºC, uma coluna capilar HP5 (30 m X 0,32 mm X 0,25 µm)e utilizando hidrogênio (1,5 mL min^{-1}) como gás carreador. Os demais parâmetros de análise foram os mesmos descritos acima. A identificação dos constituintes de cada óleo foi feita por comparação do espectro de massas obtido com aquele da biblioteca de espectros de massa Wiley (6ª edição) e por comparação do índice de retenção calculado de cada componente com dados da literatura (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963; ADAMS, 2007).

Os dados quantitativos foram obtidos de áreas de pico usando um detector de ionização de chama (FID). As áreas foram normalizadas por padrão interno (octanoato de etila). As amostras de cada OE foram analisadas em triplicata.

4.3. Coleta, isolamento e identificação bioquímica de *Aeromonas* spp.

Exemplares de tambaqui foram coletados em sistemas intensivos na fase de engorda em pisciculturas do município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas. Para análise microbiológica foram coletados fragmentos de rim caudal e cérebro, de forma asséptica em fluxo microbiológico e imediatamente inoculados em caldo BHI (Brain Heart Infusion, marca). Após incubação a 30 ºC por 24 h, uma alçada do caldo foi transferida para o meio de cultura ágar Mac Conkey e novamente incubado a 30 ºC por 24 h. Após crescimento de colônias rosadas ou esverdeadas, uma colônia foi transferida para meio TSA (Tryptic Soy Agar), incubada a 30°C por 24 h. Em seguida, foram realizadas as provas de catalase, oxidade e coloração de Gram. Com a confirmação da presença de cocobastonetes Gram-negativos puros, positivos para catalase e oxidase, partiu-se para a caracterização bioquímica por meio do kit API 20E. Os isolados sugestivos de *Aeromonas* spp. foram armazenados em TSB (Tryptic Soy Broth) com 20% de glicerol estéril, a -80°C, e fazem parte do banco de cepas do Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental.

4.4. Identificação molecular dos isolados de *Aeromonas* spp.

4.4.1. Extração de DNA

Uma colônia de cada isolado foi transferida a um tubo contendo meio de cultura TSB e incubado por 18 h ou até que se atingisse a DO_{600} de 1 a 1,5. Após os períodos de incubação, 1,0 mL da cultura bacteriana foi centrifugado a 12.000 ×g por 1 min, o sobrenadante descartado e o pellet congelado a -20°C para posterior extração do DNA. Utilizou-se o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) segundo metodologia do fabricante. A quantificação foi feita por fluorimetria, utilizando o aparelho QuBit 4.0 (ThermoFisher) e realizada no Laboratório Multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala e Expressão Gênica (UNESP, Jaboticabal, SP).

4.4.2. PCR padrão

A reação consistiu em: 2,5 µL de tampão 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl); 0,2 µL de 25 mM DNTP; 1,0 µL 50 mM $MgSO_4$; 0,2 µL de Taq High Fidelity (Platinum®Taq DNA Polymerase, Life Technologies, NY, USA); 2,0 µL de cada primer (10 pmol); DNA template

25 ng; água ultrapura q.s.p. 25 µL de reação. O programa de amplificação utilizado foi: 94 ºC por 2 min, 35 ciclos a 94 ºC por 30 segundos, temperatura de 55 °C, específica para anelamento de cada primer, por 30 s, 68 ºC por 1,5 min e 68 ºC por 10 min para extensão final.

Foram utilizados os "primers", para o gene 16S rRNA bacteriano, foram fD1 (GAG TTT GAT CCT GGC TCA G) e rD1 (TAA GGA GGT GAT CCA GCC), de acordo com descrito por Weisburg et al. (1991). Os amplicons gerados (1540 pb) foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo. A corrida foi realizada seguindo as recomendações de Sambrook et al. (2001).

4.4.3. Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento genético

Os produtos de PCR foram purificados pelo Kit MinElute (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK) de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, foi feita a quantificação dos produtos de PCR purificados em QuBit 4.0, e realizado sequenciamento genético, a partir de 50 ng μL^{-1} de amostra. A metodologia de sequenciamento foi a preconizada por Sanger (1977). Os produtos de PCR das amostras foram amplificados com a enzima AmpliTaq polimerase e "BigDye Terminator" (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores fD1 e rD1. O sequenciamento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala e Expressão Gênica (UNESP, Jaboticabal, SP).

4.4.4. Análise das sequências de nucleotídeos

As sequências obtidas foram visualizadas no programa Geneious (v. 11.5.1), onde foi possível obter a qualidade das sequencias, e limpeza das porções inicial e final. Utilizando a ferramenta BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), o fragmento foi comparado com as sequências depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), admitindo-se uma cobertura de 100% e identidade igual ou superior a 98% com o padrão depositado para confirmação da especificidade da sequência. Em seguida, as sequências deste estudo serão depositadas no banco de dados do NCBI GenBank para obtenção de números de acesso.

4.5. Produção de biofilme

Os isolados de *A. hydrophila* e *A. jandaei* foram inoculados em 3 mL de TSB e incubados a 30 °C por 24 h. Após a incubação, 5 µL foi aplicados em microplacas novas e estéreis contendo 195 µL de TSB e re-incubados a 30° C por 24 h. Então, as microplacas foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada e posteriormente coradas com 200 µL de

solução de violeta de genciana a 0,25% e expostas por 2-3 minutos à temperatura ambiente. As microplacas foram lavadas novamente e 200 µL de álcool-acetona (80:20) foram adicionados. Como controle negativo para este teste foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli* DH5-α por comprovadamente não formar biofilme.

A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida a 620 nm usando um leitor de placas ELISA Datamed tecnologia (Thermo scientific). Em seguida, as amostras foram classificadas como positivas ou negativas para formação biofilme. Com base na média do controle negativo (DNC), os isolados foram classificados como não formador biofilme (ODS ≤ ODNC), fraco (ODNC <ODS ≤ (2 x ODNC), moderado (2xODNC) <ODS ≤ (4xODNC) ou forte (4xODNC)≤ ODS produtores de biofilme (MERINO et al., 2009). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O equivalente a 0,20 g dos OEs de *A. triphylla*, *C. cajucara*, morfotipos branca e vermelha, *C. citratus* e *L. gracilis* foi pesado, e diluído em 1 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido 50% v/v). Em seguida o volume foi filtrado e 1 mL diluído em 4 mL de caldo Mueller Hinton (Himedia). A concentração no primeiro poço variou de 20.000 µg mL^{-1} para *L. gracilis e C. citratus* a 160.000 µg mL^{-1} para *A. triphilla* e *C. cajucara* morfotipos branca e vermelha. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo e a determinação da CIM foi realizada de acordo com Souza et al. (2017). Em resumo: distribuição de 100 µL de caldo Müller-Hinton (MHB) em microplaca de 96 poços. Em seguida, 100 µL da solução-mãe do OEs foram adicionados ao primeiro poço, homogeneizado, transferido para o segundoe assim obtendo sucessivamente as demais concentrações, totalizando sete concentrações. Em relação ao florfenicol, a solução estoque foi de 16 µg mL^{-1} e as concentrações finais na placa foram: 8, 4, 2, 1, 0,5; 0,25; 0,125 µg mL^{-1}. O inóculo inicial da bactéria foi preparado com turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland, diluído 1:1000 em caldo Mueller Hinton. Assim, 100 µL da suspensão bacteriana foi distribuídas aos poços contendo OEs eo diluente. As placas foram incubadas a 30°C por 24 h em condições aeróbicas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Posteriormente, uma alíquota de 10 µL foi semeada emMueller Hinton Agar. Após 24 horas de incubação a 30°C, a concentração bactericida mínima(CBM) foi definida como a menor concentração de OEs /florfenicol necessários para matar o inóculo bacteriano. Além do controle positivo (*Aeromonas*) e controle negativo (CaldoMueller Hinton) foi determinada a atividade do diluente (DMSO).

4.7. Atividade antibiofilme OEs

Os inóculos bacterianos foram cultivados em tubos contendo 3 mL de TSB a 0,25% por 24 h a 30°C. Em seguida, 100 µL dessa cultura foram adicionados a uma microplaca de 96 poços juntamente com 100 µL da solução que contém o equivalente a metade do valor da CBM, observado na microdiluição da placa. Após 24 h de incubação a 30°C, as microplacas foram lavadas com 200 µL de água destilada três vezes. Posteriormente, os poços foram corados com 100 µL de violeta de genciana a 0,25% por 5 min. Todos os poços foram lavados novamente e, em seguida, 200 µL de álcool-acetona (80:20) foram usados para análise de DO em um leitor de microplacas, medido a 620 nm.

A interferência dos OEs de *A. triphylla*, *C. cajucara*, morfotipo branca, *C. citratus* e *L. gracilis* no biofilme foi avaliada comparando-se a formação inicial do biofilme com a formação do biofilme após o uso dos OEs. Para avaliar a interferência dos OEs no biofilme consolidado, microplacas contendo 100 µL das suspensões bacterianas foram incubadas a 30°C por 24 h antes da formação do biofilme. Depois da incubação, as microplacas foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada para remover a população de células não ligadas. A DO (620 nm) foi determinada após a adição dos OEs nos horários 0 h e 24 h. A leitura foi realizada em leitor de placa de ELISA no tempo 0 h. Depois, 200 µL da solução que contém o OE, equivalente à metade do valor de CBM observado na microdiluição em placas foi adicionada e, imediatamente incubada. A segunda leitura foi realizada após 24 h. A interferência dos OEs no biofilme consolidado foi definida pela equação: DO 0 h em média / DO 24 h em média x 100. O controle negativo foi o meio TSB estéril. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8. Potencial sinérgico dos OEs e florfenicol

O ensaio de sinergismo foi realizado em placas de 96 poços, com emprego do florfenicol (antibiótico, Sigma-Aldrich a 99% de pureza) e dos OEs (*A. triphylla*, *C. citratus*, *C. cajucara* morfotipo branco e *L. gracilis*). Foram preparadas 12 diferentes concentrações de cada OE e 8 concentrações diferentes do florfenicol (32, 16, 8, 4, 2,1,0,5 e 0,125 µg mL^{-1}).

Um volume de 100 µL de caldo MHB foi introduzido em todos os poços da placa. Na coluna número 12 foram adicionados 100 µL do OE em uma concentração de 4 ordens de magnitude superior à concentração inibitória mínima (CIM), fazendo-se assim as diluições seriadas horizontalmente na placa até a coluna número 1. Em seguida, foram introduzidas as diluições do florfenicol iniciando na linha letra A na concentração de 32 µg mL^{-}

^{1}, na linha B 16 μg mL^{-1}, e assim sucessivamente até a linha G. Uma alíquota de 30 μL da suspensão bacteriana, preparada conforme descrito anteriormente, foi inoculada em cada poço. Na última linha da placa, 100 μL da bactéria foi introduzida em três poços (controle positivo) e outros três poços receberam somente meio de cultura MHB (controle negativo). Após a incubação a 30°C por 24 h, 30 μL de uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio (0,5 %) foram adicionados a cada poço.

O Índice de Frações Inibitórias (IFI) foi calculado usando a seguinte equação: IFI OEs = MIC combinado / MIC isolado ou IFI florfenicol = MIC combinado /MIC isolado. A soma das IFIs (ΣIFI = IFI OEs + IFI florfenicol) foi utilizada para classificar os efeitos através da seguinte forma: sinergismo quando ΣIFI ≤ 0,5; aditivo quando 0,5 <IIF <1; indiferente quando 1 <ΣIFI <2 e; e antagonismo quando ΣIFI> 2.

5. RESULTADOS

Conforme dados da Tabela 3, foram identificados pela análise química, 98,7% dos compostos químicos do OEs de *A. triphylla*, sendo β-pineno o monoterpeno mais abundante com 22,1 %, seguido por monotrans-pinocanfona, acetato de trans-pinocarvila, guaiol, *cis*-pinocanfona e trans-pinocarveol. Os demais compostos apresentaram concentrações inferiores a 3,0% do total.

No OE de *C. citratus* 97,8% de compostos químicos foram identificados, sendo o geranial (45,7 %) o composto majoritário, seguido por neral, mirceno e geroniol (Tabela 3), enquanto os outros compostos se apresentaram em concentrações inferiores a 1,4%. O OE de *C. cajucara* (morfotipo branco) apresentou como constituinte majoritário o linalol (23,02%), seguido pelos sesquiterpenos trans-cariofileno, Germacreno D, trans-nerolidol, beta-bourboneno e biciclogermacreno (Tabela 3). Foram identificados 91,7% dos compostos químicos deste OE. Os demais compostos somaram concentrações inferiores a 3,0 % do total. Já o óleo de *C. cajucara* (morfotipo vermelho) apresentou como constituinte majoritário ogermacreno D (11,5%), seguido por germacreno A, β-elemeno, biciclogermacreno e *E*–cariofileno (Tabela 3). Os demais compostos somaram concentrações inferiores a 3,0 % do total. Foram identificados 86,6% dos compostos químicos deste OE.

O OE de *L. gracilis* apresentou como composto majoritário o carvacrol (42,2 %), seguido pelo *p*-cimeno, γ-terpineno e timol, metil-éter (Tabela 3). Os demais compostos apresentaram concentrações inferiores a 5,1% do total. Foram identificados 99,8% dos componentes deste OE na análise química.

Tabela 3. Principais compostos majoritários dos óleos essenciais.

NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	COMPOSTOS (%)
Aloysia triphylla	Cidrão	β-pineno (22,1), mono trans-pinocanfona (13,1), acetato de trans-pinocarvila (7,6), guaiol (5,3), *cis*-pinocanfona (4,9), trans-pinocarveol (3,7).
Cymbopogon citratus	Capim santo	Geranial (45,7), neral (33,9), mirceno (6,6), geroniol (3,0).
Croton cajucara (morfotipo branco)	Sacaca branca	Linalol (23,02), *trans*-cariofileno (13,7), germacreno D (8,05), *trans*-nerolidol (7,3), beta-bourboneno (4,8), biciclogermacreno (3,8).
Croton cajucara (morfotipo vermelho)	Sacaca vermelha	Germacreno D (11,5), germacreno A (6,1), *B*-elemeno (6,0), biciclogermacreno (5,8), (*E*)-cariofileno (5,0).
Lippia gracilis	Alecrim de tabuleiro	Carvacrol (42,2), *p*-cimeno (11,2), γ-terpineno (10,7), timol, metil-éter (6,1).

Os isolados de *A. hydrophila* e *A. jandaei* foram selecionados quanto à formação de biofilme. Das sete cepas pertencentes ao acervo do laboratório de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, foi possível detectar a formação de biofilme classificado como fraco em quatro delas (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação dos isolados de *Aeromonas hydrophila e A. jandaei* para produção de biofilme.

CEPAS	N° DE ACESSO AO GENBANK	ESPÉCIE	D.O.	CLASSIFICAÇÃO
ATCC 7966	ATCC7966	*A. hydrophila*	0,066	Não produtor
A-562	MW940903	*A. hydrophila*	0,066	Não produtor
A-533	MW940900	*A. hydrophila*	0,071	Não produtor
A-284	MW940902	*A. hydrophila*	0,095	Produtor fraco
A-248	MW940899	*A. hydrophila*	0,085	Produtor fraco
INPA	MW940898	*A. hydrophila*	0,143	Produtor fraco
AM-70	Gallani, S. (dados não publicados)	*A. jandaei*	0,087	Produtor fraco

D.O.= densidade óptica

Em relação a CIM e CBM dos cinco OEs e o florfenicol avaliados neste estudo, todos os OEs foram classificadas com fraca atividade antimicrobiana. Os OEs apresentaram CIM entre 640.000 e 5.000 µg mL^{-1} (Tabela 3). Foi utilizada a cepa de *E. coli* (DH5-α) como controleda metodologia.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos OEs de *Aloysia triphylla*, *Cymbopogon citratus*, *Croton cajucara* morfotipos branco e vermelho, *Lippia gracilis* e do antibiótico florfenicol frente às cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*.

CEPAS	Óleos essenciais	CIM ($\mu g\ mL^{-1}$)	CBM ($\mu g\ mL^{-1}$)
AM-70	*Aloysia triphylla*	80.000	160.000
	Cymbopogon citratus	5.000	5.000
	Croton cajucara (morfotipo branco)	160.000	160.000
	Croton cajucara (morfotipo vermelho)	> 640.000	> 640.000
	Lippia gracilis	5.000	5.000
	Florfenicol	2	2
INPA	*Aloysia triphylla*	160.000	160.000
	Cymbopogon citratus	5.000	5.000
	Croton cajucara (morfotipo branco)	160.000	>160.000
	Croton cajucara (morfotipo vermelho)	> 640.000	> 640.000
	Lippia gracilis	5.000	5.000
	Florfenicol	4	4
A-248	*Aloysia triphylla*	160.000	160.000
	Cymbopogon citratus	5.000	5.000
	Croton cajucara (morfotipo branco)	>160.000	>160.000
	Croton cajucara (morfotipo vermelho)	>160.000	>160.000
	Lippia gracilis	5.000	5.000
	Florfenicol	4	4

A-284	*Aloysia thyphilla*	160.000	160.000
	Cymbopogon citratus	5.000	5.000
	Croton cajucara (morfotipo branco)	> 640.000	> 640.000
	Croton cajucara (morfotipo vermelho)	> 640.000	> 640.000
	Lippia gracilis	5.000	5.000
	Florfenicol	4	8
E. coli DH5-α	Florfenicol	16	> 32

Na Tabela 6 observam-se as diferentes interações entre os OEs testados e o florfenicol. Houve efeito sinérgico entre o OE de *C. citratus* e florfenicol para todas as cepas avaliadas. O mesmo ocorreu com *L. gracilis* e o florfenicol. Nas cepas AM-70 e INPA houve efeito antagônico entre o OE de *C. citratus* e o antimicrobiano. Efeito aditivo ocorreu entre o óleo essencial de *A. triphylla* e florfenicol na cepa INPA, enquanto para a cepa AM-70 esta interação foi indiferente, para a cepa A-248 o efeito foi sinérgico e para a cepa A-284 foi antagônica. O OE de *C. cajucara* morfotipo branco teve efeito antagônico frente às cepas AM-70 e INPA.

Tabela 6. Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais *Aloysia triphylla, Cymbopogon citratus, Croton cajucara* morfotipo branco *e Lippia gracilis* isolados e combinados com florfenicol, somatório dos índices de frações inibitórias e classificação do efeito sinérgico apresentado frente às cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei*.

Cepas	Óleo essencial / Antimicrobiano	CIM_I	CIM_C	∑IFI	Classificação
AM-70	*Aloysia triphylla*	80.000	80.000	1,25	Indiferente
	Florfenicol	2	0,5		
	Cymbopogon citratus	5.000	1.250	0,312	Sinergismo
	Florfenicol	2	0,125		
	Croton cajucara morfotipo branco	160.00	640.00	4,06	Antagonismo
	Florfenicol	2	0,125		
	Lippia gracilis	5.000	1.250	0,5	Sinergismo
	Florfenicol	2	0,5		
INPA	*Aloysia triphylla*	80.000	40.000	0,625	Aditivo
	Florfenicol	4	0,5		
	Cymbopogon citratus	5.000	1.250	0,375	Sinergismo
	Florfenicol	4	0,5		
	Croton cajucara morfotipo branco	160.00	640.00	4,125	Antagonismo
	Florfenicol	4	0,25		
	Lippia gracilis	5.000	1.250	0,375	Sinergismo
	Florfenicol	4	0,5		
A-248	*Aloysia triphylla*	160.00	312,5	0,5	Sinergismo
	Florfenicol	2	1		
	Cymbopogon citratus	5.000	1.250	0,5	Sinergismo
	Florfenicol	2	0,5		
	Lippia gracilis	5.000	1.250	0,5	Sinergismo
	Florfenicol	2	0,5		

A-284	*Aloysia triphylla*	160.00	640.00	4,250	Antagonismo
	Florfenicol	4	1		
	Cymbopogon citratus	5.000	5.000	1,125	Indiferente
	Florfenicol	4	0,5		
	Lippia gracilis	5.000	1.250	0,375	Sinergismo
	Florfenicol	4	0,5		

CIM_I = Concentração inibitória mínima do EOs/florfenicol isolado
CIM_C = Concentração inibitória mínima do óleo essencial/antimicrobiano combinado
∑IFI = Somatória dos índices de frações inibitórias
Sinergismo quando ΣIFI ≤ 0,5;
Aditivo quando 0,5 <IIF <1;
Indiferente quando 1 <ΣIFI <2 e
Antagonismo quando ΣIFI> 2.

Na Tabela 7 observa-se a interferência dos OEs de *A. triphylla, C. citratus, C. cajucara*morfotipo branco e *L. gracilis* no biofilme consolidado das cepas estudadas. A D.O. foi igual ou menor que o controle negativo, indicando que as cepas passaram de produtores fracos de biofilme para não produtores.

Tabela 7. Interferência dos OEs de *Aloysia triphylla, Cymbopogon citratus, Croton cajucara* morfotipo branco e *Lippia gracilis* no biofilme consolidado de cepas de *Aeromonas. hydrophila* e *Aeromonas jandaei*. D.O. = densidade optica.

Cepas	**OEs**				**Classificação**
	Aloysia triphylla	*Cymbopogon citratus*	*Croton cajucara* morfotipo branco	*Lippia gracilis*	
AM-70	0,05663	-	0,05940	0,07503	Não produtor
INPA	0,06070	0,06997	0,06700	0,06990	Não produtor
A-248	0,06307	0,06453	-	0,08180	Não produtor
A-284	0,05617	0,06477	-	0,06507	Não produtor
Controle negativo	0,054	0,083	0,072	0,087	

Na Tabela 8 observa-se a atividade dos OEs de *A. triphylla*, *C. citratus*, *C. cajucara* morfotipo branco e *L. gracilis* adicionados imediatamente (0 h) e após (24 h) sobre a formação de biofilme dos isolados de *A. hydrophila* e *A. jandaei*. Todos os OEs apresentaram alta atividade antibiofilme, com destaque para *L. gracilis* com 287,3% de atividade frente à cepa A-248, *C. citratus* com 827,4% frente à cepa INPA, *A. triphyla* com 145,2% frente à cepa A-284 e *C. cajucara* morfotipo branco frente à cepa AM-70 apresentando 135,8% de atividade.

Tabela 8. Atividade dos OEs (em %) de *Aloysia triphylla*, *Cymbopogon citratus*, *Croton cajucara* morfotipo branco e *Lippia gracilis* na formação de biofilme das cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* classificadas como produtores fracos.

CEPAS	**OEs**		
	Lippia gracilis		
	D.O. 0 h	D.O. 24 h	D.O. 24 h – 0 h (%)
AM-70	0,251	0,091	274,7
INPA	0,288	0,298	96,4
A-248	0,259	0,090	287,3
A-284	0,329	0,175	187,8
	Cymbopogon citratus		
AM-70	0,047	0,063	74,8
INPA	1,568	0,189	827,4
A-248	1,591	0,272	583,2
A-284	1,512	0,287	525,5
	Aloysia triphyla		
AM-70	0,281	0,422	66,7
INPA	0,427	0,330	129,5
A-248	0,357	0,255	140
A-284	0,278	0,192	145,2
	Croton cajucara morfotipo branco		
AM-70	0,741	0,545	135,8

6. DISCUSSÃO

Os OEs estão presentes nas plantas como produto natural e apresentam compostos aromáticos voláteis originados do metabolismo secundário das plantas. As propriedades terapêuticas e organolépticas dos OE se devem à presença de monoterpenos, sesquiterpenos e de fenilpropanoides, entre outros compostos voláteis. Esses compostos fornecem a atividade biológica dos OEs como antiparasitária, antimicrobiana e antifúngica (SARTO et al., 2014).

No presente trabalho, os componentes majoritários encontrados no OE de *A. triphylla* foram o β-pineno (22,1%), mono trans-pinocanfona (13,1%) e o acetato de trans-pinocarvila (7,6%). Em contrapartida, Souza et al. (2017) encontraram α-citral, E-carveol e limoneno como constituintes majoritários do mesmo OE, a partir de plantas cultivadas no município de Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul. Foi utilizada também a técnica de destilação a vapor com aparelho Clevenger. Sgarbossa et al. (2019) cultivaram essa mesma planta no estado do Rio Grande do Sul durante as quatro estações, com diferentes níveis de irrigação, e identificaram como constituintes majoritários α-citral, limoneno e o β-citral, pela mesma metodologia. Parodi et al. (2020) também identificaram como constituintes majoritários limoneno, α-citral e β-citral, sendo que o cultivo da planta foi na mesma cidade e foi utilizada a mesma técnica de extração que Sgarbossa et al. (2019). Na pesquisa de Silva et al. (2014), α-citral, β-citral e o mirceno foram identificados como componentes majoritários e o método de extração utilizado foi extrator por arrasto com vapor d'água, o qual foi construído com material de fácil aquisição e baixo custo.

Em relação aos compostos majoritários do OE de *C. citratus,* foram obtidos no presente estudo geranial (45,7%) e neral (33,9%). Corroborando com nossos resultados, Pinto et al. (2014), cuja origem das plantas é o estado do Paraná, identificaram geranial (39,7%) e neral (29,6%) como compostos majoritários do OE de capim santo. Assane et al. (2020) utilizando este mesmo OE comercial, mas de origem indiana, também encontraram os compostos majoritários geranial (40%) e neral (30,4%) como constituintes majoritários. Todos os trabalhos supracitados utilizaram para identificação dos constituintes químicos a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), ocorrendo pouca variação no percentual destes componentes majoritários comparados com nosso estudo. Em diversos outros estudos, estes mesmos componentes do OE de *C. citratus* cultivado em diferentes localidades diferiramm parcialmente apenas na quantidade de alguns compostos presentes no OE (SCOTTI et al., 2021; GALLANI et al., 2020; MARTINAZZO et al., 2019; D'AVILA et al., 2016).

Os compostos majoritários do OE de *L. gracilis* no presente estudo foram carvacrol (42,2%), *p*-cimeno (11,2%) e γ-terpineno (10,7%). Já Felix et al. (2021) avaliando a composição química desse mesmo OE, cujas plantas foram cultivadas na região da Serra da Gadelha, no Estado de Ceará, e utilizando técnica de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, identificaram o timol e o 1,8-cineol como constituintes majoritários. DASilva et al. (2019) fizeram levantamento dos constituintes majoritário do OE de *L. gracilis* de sete morfotipos diferentes no estado de Sergipe e os compostos timol e carvacrol foram identificados como constituintes químicos majoritários. Estes mesmos compostos foram encontrados por Santos et al. (2014) e Melo et al. (2013).

Componentes majoritários do OE de *C. cajucara* morfotipo branco em nosso estudo foram linalol (23%), *trans*-cariofileno (13,3%) e germacreno D (8,0%). Já Chaves et al.(2006) encontraram linalol (28,7%), beta-cariofileno (13,0%) e nerolidol (9,3%) como compostos majoritários no OE de sacaca branca, cujas plantas são de origem do estado doAmazonas. Estes mesmos compostos também foram encontrados por Azevedo et al. (2012) apenas em concentrações diferentes: linalol (45%), β -cariofileno (14,1%) e nerolidol (13,3%).

Os componentes majoritários do OE de *C. cajucara* morfotipo vermelho deste estudo foram germacreno D (11,5%), germacreno A (6,1%) e beta-elemeno (6,0%), enaquanto no trabalho de Chaves et al. (2006) foram 5-hidroxicalameneno (25,5%), linalol (18,9%) e deltacadinemo (7,1%). Azevedo et al. (2012) identificaram no OE da sacaca do morfotipo vermelho um alto teor de 7-hidroxicalameneno de até 44,3%, linalol (28,6 %) e β- cariofileno (10,4%). Tanto no trabalho de Chaves et al. (2006) quanto no de Azevedo et al. (2012), a técnica de extração para a obtenção dos OE foi hidrodestilação em aparelho de clevenger, entretanto, os dois resultados foram diferentes dos nossos.

Nota-se que a composição química dos OEs pode variar dependendo da localidade, estação, clima, metodologia de extração e vários outros fatores (SARAIVA et al., 2020; SCOTTI et al., 2021).

Entre os OEs testados, apenas a espécie *C. cajucara* morfotipo vermelho demonstrou atividade antimicrobiana fraca nas concentrações testadas (>640.000 µg mL^{-1}) frente *A. hydrophila* e *A. jandaei* isoladas de tambaqui. A atividade antimicrobiana do OE das espécies de *Croton* foi relatada por alguns autores para diferentes bactérias, entre elas *Staphylococcus aureus, Escherichia coli e Klebsiella pneumoniae* (SIQUEIRA et al., 2021), além de *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (PEREIRA et al., 2019). Em um trabalho realizado por Azevedo et al. (2013), o OE de *C. cajucara* morfotipo vermelho, rico em 7-hidroxicalameneno, foi eficaz contra *S. aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mucor circinelloides* e *Rhizopus oryzae* resistentes à meticilina, usando o ensaio de diluição em caldo com CIM de 4,76 µg mL^{-1}; 39,06 µg mL^{-1};

4,88 µg mL^{-1}; 0,152 µg mL^{-1} e 0,63 µg mL^{-1}, respectivamente. Para o OE de *C. cajucara* morfotipo branco, cujo componente majoritário foi o linalol, houve ação inibitória considerada fraca frente a cepa de *A. jandaei* (AM-70) e uma cepa de *A. hydrophila* (INPA) com CIM de 160.000 µg mL^{-1}. Azevedo et al. (2012) avaliaram a atividade antibacteriana do OEs de *C. cajucara*, morfotipos branco e vermelho, e seus compostos majoritários frente a *S. aureus*, e os autores constataram que o 7-hidroxicalameneno (composto do morfotipo vermelho) isolado apresentou alta atividade bactericida, com CIM de 0,3 µg mL^{-1}, enquanto o linalol (composto do morfotipo branco) demostrou atividade antibacteriana com CIM > 2.500 µg mL^{-1}.

No presente estudo, o OE de *A. triphylla* teve os valores de CIM de 80.000 µg mL^{-1} para cepa de *A. jandaei* (AM-70) e CBM de 160.000 µg mL^{-1}, e para as cepas de *A. hydrophila* CIM e CBM foram de 160.000 µg mL^{-1}, sendo classificada com fraca atividade antimicrobiana. Souza et al. (2017) analisaram a susceptibilidade de *Aeromonas* spp. ao OE de *A. triphylla* por meio da CBM e constataram que o OE inibiu o crescimento da bactéria em concentrações que variaram entre 3.125 e 195,5 µg mL^{-1}. Essa diferença na concentração bactericida do OE pode ser devida a diferenças nos compostos majoritários identificados em cada estudo. Em nossa pesquisa foram o β-pineno (22,1%), mono trans-pinocanfona (13,1%) e acetato de trans- pinocarvila (7,6%), já no Souza et al. (2017) foram α-citral (39,91%), E-carveol (25,36%) elimoneno (21,52%).

Gallani et al. (2020) e Assane et al. (2020) avaliaram o OEs de capim santo frente a *A. hydrophila* e *A. jandaei* isoladas de peixes de água doce exibindo efeito bactericida na concentração de 1.875 µg mL^{-1} e 4.370 µg mL^{-1}, respectivamente. A diferença da atividade antimicrobiana pode estar ligada à composição química dos OEs, como também na virulência da cepa. O OE de *L. gracilis* demostrou atividade antimicrobina, com CIM e CBM de 5.000 µg mL^{-1} para todas as cepas testadas. Há poucas pesquisas sobre atividade antimicrobiana do OE de *L. gracilis* com a técnica de microdiluição em placas de 96 poços. Dantas et al. (2010) e Cardoso-Junior et al. (2021) avaliaram esse OE por meio de teste de difusão em ágar e reportaram inibição do crescimento dos microrganismos testados: *L. monocytogenes* (34 mm), *S. aureus* (36 mm) e *S.epidermis* (40 mm) e *Salmonella* sp. (27,57 mm) e *E. coli* (20,55 mm). Pelo tamanho do diâmetro do halo, os isolados bacterianos foram classificados como susceptíveis ao OE de *L. gracilis*, pelos autores supracitados.

Para classificação da atividade antimicrobiana dos óleos, foi utilizado critérios reportados por Aligiannis et al. (2001), Gallani et al.(2020) e Assane et al., (2020) em que, valores de CIM até e 500 µg mL^{-1} são considerados como forte atividade antimicrobiana; de 600 a 1500 µg mL^{-1} moderada; e acima de 1600 µg mL^{-1} são caracterizados como tendo atividade antimicrobiana fraca. Sendo assim, de acordo com essa classificação, todos os OEs testados demostraram atividade antimicrobiana fraca frente as

cepas de *A.hydrophila* e *A. jandaei* avaliadas neste estudo.

Sugere-se aqui que a susceptibilidade de diferentes espécies bacterianas depende diretamente do componente majoritário presente no OE avaliado. Conforme as nossas análises, os OEs da família Verbenaceae (*A. triphylla* e *L. gracilis*) apresentam em seus compostos majoritários, monoterpenos β-pineno e o carvacrol, respectivamente. Há relatos de uma ampla variedade de atividades desses compostos incluindo modulação da resistência a antimicrobianos, efeitos anticoagulantes, antitumorais e antimicrobianos (SALEHI et al., 2019).

Bandeira et al. (2018) constataram que o fitoquímico carvacrol possui significativa atividade antibacteriana, inibindo a formação de biofilme e interferindo na hemólise celular frente a *A. hydrophila.* Várias pesquisas constataram a eficiência do carvacrol frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inibindo a atividade bacteriana e tendo ação de antibiofilme (MARCHESE et al., 2018; CABARKAPA et al., 2019; KACHUR et al., 2020).

Os OEs de *C. cajucara* mofortipos branco e vermelho apresentaram uma composição diferente entre si e, apenas o morfotipo branco apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei* testadas. Os constituintes em maiores concentrações no morfotipo branco foram o linalol, um terpeno, e trans-cariofileno, um sesquiperpeno. Foi relatado nos trabalhos de Bandeira et al. (2018; 2021) que o constituinte químico linalol tem atividade antibacteriana contra *A. hydrophila.* Os testes foram realizados *in vitro* com isolados bacterianos de jundiá, e *in vivo,* com banhos de imersão em combinação com florfenicol. Hayatghe et al. (2020) também avaliaram o linalol e identificaram em testes *in vitro* a atividade antibacteriana considerada moderada frente *A. hydrophila* e *A. salmonicida* isoladas de trutas (*Salvelinus fontinalis* e *Oncorhynchus mykiss*).

Nos testes para produção de biofilme, as cepas de *A. hydrophila* (INPA, A-248 e A-284) e *A. jandaei* (AM-70) foram classificadas como produtoras fracas de biofilme. Em seguida, no ensaio de antibiofilme, todos os OEs testados no presente estudo reduziram a formação de biofilme das cepas avaliadas, que passaram de produtoras fracas para não produtoras. Souza et al. (2017) avaliaram a atividade antibiofilme do OE de *A. triphylla* frente *Aeromonas* spp. utilizando a técnica de microdiluição em placas de 96 poços. O OE foi efetivo, reduzindo a formação de biofilme e as cepas que eram produtoras fracas, após tratamento com o OE passaram para não produtoras.

Em relação à interferência dos OEs no biofilme consolidado, no presente estudo, o OE de *A. triphylla* conseguiu reduzir a DO após 24 h de incubação nas 3 cepas de *A. hydrophila,* sendo elas: INPA (D.O. de 0,0427 para 0,330), A-248 (D.O. de 0,357 para 0,255) e A-284 (D.O. de 0,278 para 0,192; Tabela 8). Em contrapartida, no estudo de Souza et al. (2017) não houve efeito do OE de *A. triphylla* no biofilme consolidado dos isolados de *Aeromonas,* visto que a

D.O. aumentou frente as duas cepas de *Aeromonas* spp. testadas: cepa nº 60 (D.O. passou de 0,052 para 0,063 em 24 h) e cepanº 74 (D.O. passou de 0,044 para 0,050 em 24 h).

Há escassez de dados na literatura sobre o uso dos OEs das espécies usadas nessa pesquisa que exerçam atividade antibiofilme em bactérias, tornando difíceis as comparações com outros trabalhos. Porfírio et al. (2017) que relataram a ação antibiofilme do OE de *L. alba* e sugeriram que a atividade antimicrobiana deste OE possa estar relacionada ao citral, composto majoritário da planta, uma vez que esse composto isolado conseguiu inibir o crescimento da cepa de *S. aureus*, apresentando uma CIM de 0,5 µg mL^{-1}.

Azevedo et al. (2016) avaliaram a atividade antifúngica e antibiofilme do composto químico 7-hidroxicalameneno da espécie *C. cajucara* (morfotipo vermelho) frente a *Candida* spp., identificando valores de CIM variando de 39,06 µg mL^{-1} a 78,12 µg mL^{-1}, no entanto, os resultados revelaram que o 7-hidroxicalameneno afetou a formação de biofilme apenas na concentração de 2.500 µg mL^{-1} (27% de inibição).

Scotti et al. (2021) analisaram o potencial dos OE de *Cinnamomum verum*, *Cymbopogon martini*, *C. citratus* e *C. flexuosus* no crescimento, formação de biofilme e expressão gênica de 4 cepas de E. *coli* O157: H7. A atividade antimicrobiana foi calculada por meio de diluições dos OEs variando de 0,001 a 1,2% (v/v) e doses subinibitórias foram usadas para o ensaio de inibição de biofilme. Todos os OEs mostraram CIM variando de 0,0075 a 0,3% (v/v). O OE da casca de *C. verum* teve a melhor atividade (CIM de 0,0075% (v/v) em todas as cepas), enquanto o OE da folha de *C. verum* teve uma eficácia intermediária, com CIM de 0,175% (v/v) em quase todas as cepas. Os OEs de *Cymbopogon* spp. mostraram CIMs mais variáveis (entre 0,075 e 0,3% (v/v)) dependendo da cepa usada. Todavia, todos os OEs supracitados foram considerados de grande potencial para o tratamentode microrganismos.

No presente estudo analisamos o sinergismo entre os OEs de *A. triphylla, C. cajucara* morfotipo branco, *C. citratus, L. gracilis* com florfenicol. Dentre os OEs testados, apenas EO de *L. gracilis* obteve sinergia com o florfenicol, reduzindo a concentração do fármaco de 4 µg mL^{-1} para 0,5 µg mL^{-1} quando combinado com o OEs, frente todas as cepas avaliadas neste estudo. Essa interação também diminuiu a CIM do OEs de *L. gracilis*, visto que passou de 5.000 µg mL^{-1} para 1.250 µg mL^{-1}.

Já OE de *A. triphylla* teve efeito sinérgico na cepa A-248, reduzindo a concentração do florfenicol de 2 µg mL^{-1} para 1 µg mL^{-1}, o mesmo ocorreu com a CIM desse OE, que sozinho era de 160.000 µg mL^{-1} e combinado com o florfenicol foi reduzido para 312,5 µg mL^{-1}. Souza et al. (2017) avaliaram esse mesmo OE em combinação com florfenicol frente *Aeromonas* spp. e identificaram o sinergismo, com a redução do antibiótico sozinho de 1,95 mg mL^{-1} para 0,6 a 0,48 mg mL^{-1} (dependendo da cepa) e com a redução do OE, de 390.6 mg mL^{-1},sozinho, para 97,6 a 12,2 mg mL^{-1}, quando combinado com o antibiótico.

Deepika et al. (2019) também testaram florfenicol frente *A. hydrophila*, mas utilizando o composto rutina, isolado de casca de laranja (*Citrus sinensis*). Foi observado sinergismo, com redução do valor de CIM de ambos os compostos: florfenicol de 16 µg mL^{-1} sozinho para 4 µg mL^{-1} quando em combinação com o composto, e a rutina, que sozinha era de 1100 µg mL^{-1} e foi reduzida para 247 µg mL^{-1} quando combinada com florfenicol. Seguindo essa ideia, Zhoa et al. (2018) testaram *in vitro* e *in vivo* o mio-inositol que pertence ao complexo da vitamina B, como adjuvante do florfenicol contra infecção por *A. hydrophila* em carpa comum. Constararam que o florfenicol teve maior eficácia bactericida na presença de mio-inositol. Esses resultados mostram que a terapia combinada é uma opção promissora para o tratamento de *A. hydrophila* em peixes, visto que pode reduzir a resistência bacteriana e a quantidade de fármacos lançados na água.

Algumas espécies de *Croton* vêm sendo testadas sozinhas ou em sinergismo com antimicrobianos devido ao potencial antibacteriano frente a uma variedade de bactérias, tais como *Salmonella enterica, E. coli, Serratia marcescens* e *Shigella flexneri* (CIM de 500 µg mL^{-1}) e frente a *Enterococcus faecalis* com CIM de 62,5 µg mL^{-1} (FILHO et al., 2017). Outro exemplo está na pesquisa de Siqueira et al. (2021) que testaram o OE extraído da espécie de *Croton tetradenius* individualmente e em combinação com ciprofloxacina e meropenem frente a *S. aureus, E. coli* e *K. pneumoniae*. A atividade antibacterina foi demonstrada com CIM variando de 2,8 a 5,6 mg mL^{-1}, além do efeito sinérgico com os antimicrobianos. Os compostos majoritários do OE de *C. tetradenius* foram cânfora e *p*-cimeno. Todavia, em nosso estudo o OE de *C. cajucara* morfotipo branco não apresentou sinergismo com o florfenicol e foi classificado como antagônico frente às cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei* testadas. Contudo, a diferença na ação antibacteriana entre o presente estudo e o de Siqueira et al. (2021)pode ser explicada pela diferença dos compostos majoritários, que no caso do nosso estudo foio linalol.

O OE de *C. citratus* no presente estudo apresentou atividade antimicrobiana e sinérgica com florfenicol, reduzindo tanto a concentração do OE de 5.000 µg mL^{-1} sozinho para 1.250 µg mL^{-1} quando combinado com o florfenicol. Já o antibiótico, que variou entre 2 e 4 µg mL^{-1} isolado (dependendo da cepa avaliada), passou para 0,125 a 0,5 µg mL^{-1} quando combinado com o OE de capim-santo. O estudo de Lucena et al. (2015) demonstrou atividade antimicrobiana e sinérgica do OE de *C. citratus* com amicacina contra *E. coli* e *S. aureus*. Nesta interação, foi observado que ocorreu a redução do antibiótico quando associado ao OE, tanto para *E. coli* (312,5 µg mL^{-1} para 39,06 µg mL^{-1}) como para *S. aureus* (78,12 para 4,88 µg mL^{-1}).

Destaca-se que os OEs, com sua gama de metabólitos, em combinação constituem uma alternativa de tratamento de doenças bacterianas na piscicultura. A partir dos resultados

obtidos neste estudo, evidencia-se a atividade bactericida e antibiofilme de quatro OEs testados contra cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei*, assim como, uma redução na concentração do florfenicol quando combinado com os OEs, essas interações podem aumentar a eficácia terapêutica e contribuir para diminuir a seleção de cepas resistentes no ambiente aquático. Assim, diante da escassez de estudos que confirmem o potencial terapêutico das doses de OEs e antimicrobianos efetivos no processo de sinergismo *in vitro*, futuros estudos *in vivo* são necessários para que as concentrações de OE/florfenicol aqui apresentados possam ser testadas quanto à toxicidade e se há melhora nos parâmetros zootécnicos, imunológicos e fisiológicos do tambaqui.

7. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, conclui-se que:

O constituinte majoritário de cada um dos OEs das espécies de *A. triphylla, C. cajucara* morfotipo vermelho, *C. cajucara* morfotipo branco, *C. citratus* e *L. gracilis* foram: composto β-pineno (22,1%), germacreno D (11,5%), linalol (23%), geranial (45,7%) e carvacrol (42,2 %), respectivamente.

Os isolados de *Aeromonas* spp. identificados pelo método bioquímico, foram confirmados pela técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA como *A. hydrophila* (INPA, A248 e A284) e *A. jandaei* (AM-70)

Os cinco OEs foram classificados como tendo atividade antimicrobiana fraca. Alguns OEs apresentaram valores de CIM iguais à CBM, tais como *L. gracilis* (5.000 µg mL^{-1}) e *A. triphylla* (160.000 µg mL^{-1}) frente as cepas de *A. hydrophila*; *C. citratus* (5.000 µg mL^{-1}) e *C. cajucara* morfotipo branco (160.000 µg mL^{-1}) frente às cepas de *A. jandaei* (AM-70) e *A. hydrophila* (INPA).

Para formação de biofilme, as cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei* testadas foram classificadas como produtoras fracas.

Os OEs de *L. gracilis, A. triphylla, C. citratus e C. cajucara* morfotipo branco apresentaram atividade de antibiofilme frente às cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei* testadas.

Ocorreu redução do florfernicol quando combinado com os OEs frente as cepas de *A. hydrophila* e *A. jandaei* testadas. O OEs de *A. triphylla* apresentou sinergismo com o florfenicol para a cepa de *A. hydrophila* A-248. Com o OE de *C. citratus* ocorreu o sinergismo para as cepas de *A. hydrophila* A-248 e INPA e *A. jandaei* AM-70. O OE de *L. gracilis* apresentou sinergismo em todas as quatro cepas testadas. Em relação ao OE de *C. cajucara*, morfotipo branco, houve antagonismo com o antibiótico para as cepas de *A. hydrophila* INPA e *A. jandaei* AM-70. Com relação à atividade antimicrobiana e ao processo de sinergismo com florfenicol, verificou-se que, dentre todos os óleos essenciais avaliados neste estudo, os óleos de *L. gracilis e C. citratus* foram os que apresentaram os melhores resultados frente às cepas de *A. hydrophila* e *A. jandae.*

10. REFERÊNCIAS

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species, J. Agric. Food Chem. 49 (9) (2001) 4168–4170, https://doi.org/10.1021/jf001494m.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4. ed. Illinois: Allered Publishig Corporetion, 2007. 84.

ALVES, C. M. G.; NOGUEIRA, J. N.; LUZ, J. G. R.; CHAVES, F. C. M., & TAVARES-DIAS, M. (2021). Essential oil of *Piper callosum*, *Piper hispidum* and *Piper marginatum* (Piperaceae) possesses in vitro efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (tambaqui). *Aquaculture Research*, 00, 1– 10. https://doi.org/10.1111/are.15473

ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LIMA, M. P. Chemical composition of the essential oils of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf cultivated in North of Brazil. Journal of Essential Oil Bearing Plants, v. 12, n. 1, p. 41-45, 2009.

AGHRAZ, A. et al. (2018), Antibacterial activity of *Cladanthus arabicus* e *Bubonium imbricatum* óleos essenciais sozinhos e em combinação com antibióticos convencionais contra isolados de *Enterobacteriaceae*. Letters Appl Microbiol, v. 67: p.175-182. 2018. https://doi-org.ez2.periodicos.capes.gov.br/10.1111/lam.13007.

AGUIAR, J.D.P. et al. (2018) Perda da variabilidade genética em estoques cativos de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), em criadouros no Brasil e sua divergência com populações silvestres. *Aquac Res*. 2018 ; 49 : 1914

ANASTASIOU, T. I. et al. Avaliação comparativa de óleos essenciais de plantas medicinais-aromáticas da Grécia: composição química, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana contra patógenos bacterianos de peixes. *Molecules* **2020**, *25*, 148.https://doi.org/10.3390/molecules250101481925.

ASSANE, I. M. et al BERNARDO BALDISSEROTO (Org.). 3d., rev., atual. e ampl. – Santa Maria: Ed. UFSM, p. 147-162. 2020. Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use of thiamphenicol/florfenicol against Aeromonas hydrophila. Aquaculture, v. 507, p. 238-245, 2019. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.021.

ASSANE, I. M.; VALLADÃO, G. M. R.; PILARSKI, F. Chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of selected plant-derived essential oils against fish pathogens. Aquaculture Research, are.14935 Oct. 2020. https://doi.org/10.1111/are.14935.

ASSANE, I.M.; SOUZA, E.L.; VALLADÃO, G.M.R.;TAMASHIRO,G.D.; URBINATI, E.C.;HASHIMOTO, D.T.; PILARSKI, F.Phenotypic and genotypic characterization of Aeromonas jandaei involved in mass mortalities of cultured Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.) in Brazil, Aquaculture. v. 541, 2021,

https://doi.org/10.1016/j.aquaculture. 2021.736848.

AZEVEDO, M. M. B. et al. Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves of two morphotypes of Croton cajucara Benth. Journal of Essential Oil Research, v. 24, n. 4, p. 351-357, 2012. https://doi.org/10.1080/10412905.2012.692902.

AZEVEDO, M. M. B. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of 7-hydroxycalamenene-rich essential oils from Croton cajucara Benth. Molecules, v. 18, n. 1, p. 1128-1137, 2013. https://doi.org/10.3390/molecules18011128.

AZEVEDO, M.M.B.; ALMEIDA, C.A.; CHAVES, F.C.M.; RODRIGUES, I.A.; BIZZO, H.R.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. 7-hydroxycalamenene Effects on secreted aspartic proteases activity and biofilm ormation of candida spp. Phcog Mag 2016; v.12, p.36-40.
BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils–a review. Food and chemical toxicology, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106.

BARRIGA, I. B. et al. Essential oil of Lippia grata (Verbenaceae) is effective in the control of monogenean infections in Colossoma macropomum gills, a large Serrasalmidae fish from Amazon. Aquaculture Research, v. 51, n. 9, p. 3804-3812, 2020. https://doi.org/10.1111/are.14728.
BANDEIRA J.G.; SOUZA,C.F.; SILVA, H.N.P.; BIANCHINI, E.B.; RODRIGUES, P., COSTA, S.T.; HEINZMANN, B.M.; CARGNELUTT J.F.; BALDISSEROTTO, B. Combined effect of florfenicol with linalool via bath in combating Aeromonas hydrophila infection in silver catfish (Rhamdia quelen). Aquaculture. v. 545, 2021 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737247.

BANDEIRA JUNIOR,G et al. Potential uses of Ocimum gratissimum and Hesperozygis ringens essential oils in aquaculture. Industrial Crops and Products, v.97, p. 484–491, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.040 .

BANDEIRA JUNIOR, G. et al. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. Journal of applied microbiology, v. 125, n. 3, p. 655-665, 2018. https://doi.org/10.1111/jam.13906.

BANDEIRA JUNIOR, G. et al. Aeromonas hydrophila infection in silver catfish causes hyperlocomotion related to stress. Microbial pathogenesis, v. 132, p. 261-265, 2019. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.017.

BANDEIRA JUNIOR, Guerino et al. Óleos essenciais de plantas contra bactérias isoladas de peixes: uma triagem in vitro e eficácia in vivo de origanoides de Lippia. **Cienc. Rural** , Santa Maria, v. 49, n. 6, e20190064, 2019. Disponível em em 16 de maio de 2019. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190064 .

BANDEIRA, J.G.; BALDISSEROTTO, B. Fish infections associated with the genus Aeromonas: a review of the effects on oxidative status. J Appl Microbiol. 2020 Dec 31. doi: 10.1111/jam.14986. Epub ahead of print. PMID: 33382188.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Aeromonas hydrophila em Rhamdia quelen: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. Boletim do

Instituto de Pesca, v. 34, n. 3, p. 355-363, 2008.

BASSON, A.; FLEMMING, L. A.; CHENIA, H. Y. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of Flavobacterium johnsoniaelike isolates. Microbial ecology, v. 55, n. 1, p. 1-14, 2008. DOI: 10.1007/s00248-007- 9245-y.

BELÉM, C.A. CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Scientia Agricola* **63**: 281– 284.2006.

BECKER, A.G et al. The essential oil of Aloysia triphylla have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish Lophiosilurus alexandri after transport?.Aquaculture, v. 481, p.184-190. 2017. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.007

BRANDÃO, F.R. et al. Anesthetic potential of the essential oils of Aloysia triphylla, Lippia sidoides and Mentha piperita for Colossoma macropomum. Aquaculture, v.534 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736275
BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. International journal of food microbiology, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

BUSSMANN, R.W. et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. Journal of Ethnopharmacology,v.132, Issue 1,2010, p.101-108. ISSN 0378-8741, https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048.

CARDOSO-JUNIOR, G.S.; ROCHA, G.F.; SOUZA, D.M.; LOPES, C.C.; PEREIRA, H.B.J.; BLANK, A.F.; BARBOSA, F.H.F.; SILVA, C.M.; RODRIGUES, P.G.; OLIVEIRA-JUNIOR, G.M.(2021). Inhibitory action of Lippia gracilis Schauer essential oil on pathogenic bacteria and its effects as a growth promoter on quail. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 19, Issue 1, e0603. https://doi.org/10.5424/sjar/2021191-16101.

CARNOT, A.; CARNAT, A. P.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J. L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. Fitoterapia, v. 70, p. 44-49, 1999.
CASANOVA, L. M.; COSTA, S.S. Interações sinérgicas em produtos naturais: Pontencial terapêutico e desafios. Revista virtual Quim, v.9, 2, p. 575 – 595, 2017. https://doi 1021577/1984-6835.20170034.

CARRASCHI, S. P. et al. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in Piaractus mesopotamicus. Aquaculture, v. 431, p. 124-128, 2014. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.026.

CASTELO BRANCO, L. C. Farmacocinética e depleção de resíduos do florfenicol em tambaqui (Colossoma macropomum). 2016. 107p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, 2016.

CABARKAPA, I.; COLOVIC, R.; OLIVEIRA, D.; POPOVIC, S.; KOKIC, D.M.;

PEZO, L. (2019) actividades anti-biofilme de óleos essenciais ricos em carvacrol e timol contra *Salmonella* Enteritidis, bioincrustação, 35: 3, 361-375, DOI : 10.1080 / 08927014.2019.1610169.
CHAVES, F. C. M. Rendimento e composição química do óleo essencial de dois morfotipos de sacaca (Croton cajucara Benth.). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu - SP, v. 8, p. 117-119, 2006.

CHAGAS, E. C. et al. Composition of essential oils of Mentha species and their antimicrobial activity against Aeromonas spp. Journal of Essential Oil Research, v. 32, p. 1-7, 2020.
CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. Medicines, v. 4, n. 3, p. 58, 2017. Doi:10.3390/ medicines4030058.

CHUNG, S. et al. Essential oil from ginger influences the growth, haematological and biochemical variables and histomorphometry of intestine and liver of Nile tilapia juveniles. Aquaculture,v. 534. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736325COSTA, A. C. V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a Croton rhamnifolioides leaves Pax & Hoffm. Semina: Ciências Agrárias, v. 34, n. 6, p. 2853-2863, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n6p2853.

COSTA, C. M. S. et al. Efficacy of the essential oils of Mentha piperita, Lippia alba and Zingiber officinale to control the acanthocephalan Neoechinorhynchus buttnerae in Colossoma macropomum. Aquaculture Reports, v. 18, p. 100414, 2020. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100414.

COSTA, O. T. F. et al. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (Colossoma macropomum) farmed in Brazil. Aquaculture, v. 499, p. 260-268, 2019. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.040.

CUNHA, J. A.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens–a review. Journal of applied microbiology, v. 125, n. 2, p. 328-344, 2018. https://doi.org/10.1111/jam.13911.

D'AVILA, J.V.; MARTINAZZO, A.P.; SANTOS, F.S.S.; TEODORO, C.E.S.; PORTZ. Essential oil production of lemongrass (Cymbopogon citratus) under organic compost containing sewage sludge. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental, v.20, n.9, p.811-816, 2016.

DANTAS, L.I.S.; DA ROCHA, F.A.G.; MEDEIROS , F.G.M.; SANTOS, J.A. Atividade antibacteriana do óloe essencial de Lippia gracilis Schauer sobre patógeno de importância da indústria de alimentos. HOLOS, vol. 5, 2010, pp. 114-123 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte Natal, Brasil.

DA SILVA, R.S.; OLIVEIRA, M.M.G.; MELO,MELO, J.O.;BLANK, A.F.; CORRÊA, C.B.;SCHER, R.;FERNANDES, R.P.M.Antimicrobial activity of Lippia gracil essential oils on the plant pathogen Xanthomonas campestris pv. campestris and their effect on membrane integrity, Pesticide Biochemistry and Physiology,V.160,2019,P. 40-48,ISSN 0048-

3575,https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.014.

DA SILVA, R. S. et al. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. Pesticide Biochemistry and Physiology, 160 (2019), pp. 40-48.
DA SILVA, B. C. et al. Septicemia hemorrágica no surubim hídrido (*Pseudoplatystoma corruscansx Pseudoplatystoma fasciatum*) causada por *Aeromonas hydrophila*.Aquaculture Research, 43:908-916. https://doi.org/10.111/j.13652109.2011.02905.x

DEEPIKAA, M.S.; THANGAM, R.; VIJAYAKUMAR, T.S.; SASIREKHA,R.; VIMALA, R.T.V.; SIVASUBRAMANIANF, S.; ARUMA, S.; MANIKANDAN, D.B.; THIRUMURUGANA, R. Antibacterial synergy between rutin and florfenicol enhances therapeutic spectrum against drug resistant Aeromonas hydrophila. Microbial Pathogenesis 135 (2019) 103612, https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103612

DONG, H.;T.; TECHATANAKITAMAN, C.; JINDAKITTIKUL, P.; THAIPRAYOON, A.; TAENGPHU, S.; CHAROENSAPSRI, W.; KHUNRAE, P.; RATTANAROJPONG,T. and Senapin, S. (2017), *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J Fish Dis, 40: 1395-1403. https://doi.org/10.1111/jfd.12617

ESTEVE, C.; BIOSCA, E.G.; AMRAO, C. Virulence of *Aeromonas hydrophila* e algumas outras bactérias isoladas da enguia europeia *Anguilla anguilla* criada em água doce. *Dis. Aquat. Órgão.* **16** , 15–20. https://doi.org/10.3354/dao016015 (1993).

EL ATKI Y, et al. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de canela e seu pontencial sinérgicos co antimicrobianos. J Adv Pharm Technol Res(online) 2019, v. 10, edição 2, p.63-67. https://doi.org/10,4103/japtr.JAPTR36618

FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.https://doi.org/10.4060/ca9229en

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Roma: FAO. Disponível em: Acessso 09/09/2021

FERRANTE, M. et al. Evaluation of the florfenicol treatment of infections caused by streptococcus spp and aeromonas spp in tambaqui (Colossoma macropomum). Advances in Animal and Veterinary Sciences, v. 8, n. 6, p. 624-628, 2020. http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.6.624.628

FELIX, S.F.; RODRIGUES, A.M.; RODRIGUES, A.L.M.; DE FREITAS, J.C.C.; ALVES, D.R.; DA SILVA, A.A.; DOS SANTOS, D.L.; DE OLIVEIRA, K.R.L.; MONTES, R.A.; DA SILVA , M.V.F.; DA SILVA, F.F.L.; DE MORAIS, S.M. Composição Química, Atividade Larvicida e Inibição Enzimática do Óleo Essencial de *Lippia grata* Schauer do Bioma Caatinga contra Vetores da Dengue. *Pharmaceuticals* **2021** , *14* , 250. https://doi.org/10.3390/ph14030250

.

FERNÁNDEZ- BRAVO, A; FIGUERA, M.J. the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. Microorganisms. 2020 Jan 17;8(1):129. doi: 10.3390/microorganisms8010129. PMID: 31963469; PMCID: PMC7022790.

FILHO, J.M.T.A.; ARAÚJO, L.C.; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L.; PACHECO, A.G.M.; SILVA, F.S.; CAVALCANTI, L.S.; LUCCHESEC, A.M.; ALMEIDA, J.R.G. S.; ARAÚJO, E.C.C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of Croton heliotropiifolius in different seasons of the year. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 27 (2017) p. 440–444. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.004

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 37, p. 8-14, 2008. http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008001300002.

FREIRE, N. B. et al. Nutritional interference for phenotypic biofilm quantification in Aeromonas spp. isolates containing the fla gene. Microbial pathogenesis, v. 127, p. 198-201, 2019. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.044.

GAIKOWSKI, M. P. et al. Effectiveness of Aquaflor (50% florfenicol) administered in feed to control mortality associated with Streptococcus iniae in tilapia at a commercial tilapia production facility. North American Journal of Aquaculture, v. 76, n. 4, p. 375-382, 2014. https://doi.org/10.1080/15222055.2013.855283.

GALLANI, S. U. et al. (MAR) Microbial Pathogenesis, p. 104512, 2020. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104512.
GASTALHO, S.; SILVA, G.J. da, RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. Acta Farmacêutica Portuguesa, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GOMES, L. V.; SIMÕES, L. N.; ARAUJO-LIMA, EC. A. R. M. et al. Tambaqui (Colossoma macropomum). Cap. 8. In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil. BERNARDO BALDISSEROTO (Org.). 3d., rev., atual. e ampl. – Santa Maria: Ed. UFSM, p. 147-162. 2010.

GONZALES, A. P. P. F. et al. Anthelminthic efficacy of Cymbopogon citratus essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of Colossoma macropomum (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. Aquaculture, p. 735500, 2020. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735500.

GUERRA, M. J. M. et al. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de Cymbopogon citratus (DC) Stapf (caña santa). Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 5, n. 3, p. 97-101, 2000.

HAYATGHEIB, N.et al. (2020), *In vitro* efeito antimicrobiano de vários óleos essenciais comerciais e seus constituintes químicos em *Aeromonas*

salmonicida subsp. *salmonicida* . J Appl Microbiol, 129: 137-145. https://doi-org.ez2.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jam.14622

IZEL, A. C. U. et al. Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Embrapa Amazônia Ocidental (Circular técnica 39), p. 4, 2013. IZEL, A. C. U. Cultivo do tambaqui no Amazonas, 2a edição revista e atualizada. 2a. ed. Brasília: Embrapa, 59p 2018.

IZEL, J.S.; ONO, E.A.; QUEIROZ, M.N.; SANTOS, R.B.; AFFONSO, E.G. Aeration strategy in the intensive culture of tambaqui, Colossoma macropomum, in the tropics, Aquaculture, v.59. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735644.

IBGE, Instituto brasileiro de geografia e estatística. Produção da pecuária municipal 2018. vol. 56. Rio de Janeiro: IBGE 2018, 49 p. Prod. Pec. Municipal. Rio de Janeiro, v. 46, p.1-8, 2019.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. (2020) As propriedades antibacterianas dos isômeros fenólicos, carvacrol e timol, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60:18, 3042-3053, DOI: 10.1080 / 10408398.2019.1675585

KOT, B; KWIATEK, KINGA; JANIUK, J; WITESKA, M; P ¸ekala-Safi ´nska, A. Antibacterial Activity of Commercial Phytochemicals against Aeromonas Species Isolated from Fish. Pathogens 2019, 8, 142; doi:10.3390/pathogens8030142.

KUMAR, K., PRASAD, K., TRIPATHI, G., RAMAN, R.P, KUMAR, S., Tembhurne, M., & Purushothaman, C. (2015). Isolamento, identificação e patogenicidade de um Aeromonas jandaei virulento associado à mortalidade do hipoftalmo de Pangasianodon cultivado, na Índia

LUCENA, B. F. F.; TINTINO, S.R.; FIGUEREDO, F. G.; OLIVEIRA, C.D.M.; AGUIAR, J.J.S.; CARDOSO, E.N.; AQUINO, P. E. A.; ANDRADE, J. C.; COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E.F. F. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE AMINOGLICOSÍDEOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE Cymbopogon citratus (DC.) Stapf. Acta biol.Colomb., Bogotá , v. https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.41673.

LEÃO, S.O.A. et al. Ocorrência de Aeromonas multirresistentes em tambaquis cultivados em tamques escavados. Sciencia Amazonia. Scientia Amazonia, v.9, n. 4, CA17- CA24, 2020. Revista on- line http://www.scientia-amazonia.org. ISSN: 2238.1910.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.

MACIEL M.A.M.; MARTINS, J.R.; PINTO, A.C.; KAISER, C.R.; ESTEVES-SOUZA, A.E.A. 2007. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against Ehrlich carcinoma and human k562 leukemia cells. *J Braz Chem Soc 18*: 391-396

MAZUMDER, A.; CHOUDHURY, H.; DEY, A.; SARMA, D. *et al.* Isolamento e caracterização de dois Aeromonads virulentos associados a septicemia hemorrágica e doença da podridão-da-cauda em *anabas testudineus* . *Sci Rep* **11,** 5826 (2021). https://doi.org/10.1038/s41598-021-84997-x

MARTINAZZO, A.P.; OLIVEIRA, F.S.; TEODORAO, C.E.S. Atividade antifúngica do óleo essencial de Cymbopogon citratus contra Aspergillus flavus. Ci. e Nat., Santa Maria, v. 41, e 20, 2019.DOI: http://dx.doi.org/10.5902/2179460X36055

MARCHESE, A.; ARCIOL, C.R.; COPPO, E.; BARBIERI, R.; BARRECA, D.; CHEBAIBI, S.; SANCHEA-SOBARZO, E.; NEBAVI, S.F.; NABAVI, S.M.; DAGLIA, M. (2018) O composto natural da planta carvofilacrol como agente antimicrobiano e antibiótico : mecanismos, sinergias e materiais anti-infecciosos bio-inspirados, bioincrustantes, 34: 6, 630-656, DOI: 10,1080 / 08927014.2018.1480756

MAHANTY, A. et al. Phytoextracts-Synthesized Silver Nanoparticles Inhibit Bacterial Fish Pathogen Aeromonas hydrophila. Indian Journal of Microbiology, v. 53, n. 4, p. 438-446, 2013. DOI 10.1007/s12088-013-0409-9.

MAJOLO, C. et al. Chemical composition of Lippia spp. essential oil and antimicrobial activity against Aeromonas hydrophila. Aquaculture Research, v. 48, n. 5, p. 2380-2387, 2017. https://doi.org/10.1111/are.13073.

MAJOLO, C. et al. Antimicrobial activity of some essential oils against Streptococcus agalactiae, an important pathogen for fish farming in Brazil. Journal of Essential Oil Research, v. 30, n. 5, p. 388-397, 2018. https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1487343.

MAJOLO, C. et al. Essential Oils from Five Brazilian Piper Species as Antimicrobials Against Strains of Aeromonas hydrophila. Journal of Essential Oil Bearing Plants, v. 22, n. 3, p. 746-761, 2019. https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1645047.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários, Brasília- DF, 2011.

MATASYOH, J. C. et al. Chemical composition of Cymbopogon citratus essential oil and its effect on mycotoxigenic Aspergillus species. African Journal of Food Science, v. 5, n. 3, p. 138-142, 2011. https://doi.org/10.5897/AJFS.9000046.

MELO, J. O. et al. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from Lippia gracilis Schauer genotypes. Acta tropica, v. 128, n. 1, p. 110-115, 2013. https://doi.org/10.1016/j.actat ropica.2013.06.024.

MERINO, N. et al. Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus. Journal of bacteriology, v. 191, n. 3, p. 832-843, 2009. DOI: 10.1128/JB.01222-08.

MILLER, R. A. Development of standardized antimicrobial susceptibility testing methods and Aeromonas salmonicida epidemiologic cutoff values for antimicrobial agents used in aquaculture. 2007. 186p. Tese (Doctorate of Philosophy)- University of

Maryland, College Park, 2007.

MIRANDA, C. D.; GODOY, F. A.; LEE, M. R. Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. Frontiers in microbiology, v. 9, p. 1284, 2018. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01284.

MONTEIRO, P.C., Majolo, C., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R., Almeida O'Sullivan, F.L., Chagas, E.C. Antimicrobial activity of essential oils from Lippia sidoides, Ocimum gratissimum and Zingiber officinale against Aeromonas spp. (2020) Journal of Essential Oil Research. DOI: 10.1080/10412905.2020.1848653.

MORAIS, V.R.S. et al. Propriedades fitoquímicas e biológicas de Lippia gracilis. Akhtar M., Swamy M. (eds) Anticancer plants: Properties nd Application. Springer, Cingapura. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2-2 2009.

MORAIS, I.S.; O´SULLIVA, F.L.A. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui (Colossoma macropomum) (Cuvier, 1816). Scientia Amazonia, v. 6 p.81-93, 2017.

NASCIMENTO, A.M.; FERREIRA, D.M. DAL LIN, F.T.; KIMURA, A.; SANTANA-FILHO, A.P.; ARQUIMEDE, P.; WERNER, M.F.P.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G.L.; CIPRIANI, T.R.; DE SOUZA, L.M. Análise fitoquímica e avaliação antiinflamatória de compostos de um extrato aquoso de Croton cajucara Benth. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.145, p. 821-830, ISSN 0731-7085, https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.032.

NAZZARO, F.; FLORINDA, F.; MARTINO, L.; COPPOLO, R.; FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals. v.6, p.1451-1474, doi:10.3390/ph6121451, 2013.

NAFIS, A. et al. Um estudo comparativo do efeito antimicrobiano e sinérgico in vitro de óleos essenciais de Laurus nobilis L. e Prunus armeniaca L. de Marrocos com medicamentos antimicrobianos: nova abordagem para produtos de promoção da saúde. *Antibiotics* 2020 , *9* , 140 https://doi.org/10.3390/antibiotics 9040140**.**

NOGUEIRA, H. S. et al. Antibacterial: main classes, mechanisms of action and resistance. Revista unimontes científica, v. 18, n. 2, 2016.

OLIVEIRA, T.; SILVA-FILHO, C.; MALVEIRA, E.; AGUIAR, T.; SANTO, H.; ALBURQUERQUE, C.; MORAIS, M., TEIXEIRA, E.; VASCONCELOS, M. (2021), Atividade antifúngica e antibiofilme do óleo essencial de folhas de *Lippia gracilis* Schauer contra fungos fitopatogênicos. J Appl Microbiol, 130: 1117-1129. https://doi.org/10.1111/jam.14857.

OLIVEIRA, S. R. N. et al. Toxicity of Lippia origanoides essential oil in tambaqui (Colossoma macropomum) and its effect against Aeromonas hydrophila. Boletim Do Instituto De Pesca, v. 44, e346, 2018. DOI: 10.20950/1678-2305.2018.346.

OTTAVIANI, D. et al. Putative virulence properties of Aeromonas strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. International journal of food microbiology, v. 144, n. 3, p. 538-545, 2011.

https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.020.

PARKER, J. L.; SHAW, J. G. Aeromonas spp. clinical microbiology and disease. Journal of Infection, v. 62, n. 2, p. 109-118, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.12.003. Archives of Biology and Technology, v. 56, n. 2, p. 283-292, 2013. https://doi.org/10.590/S1516 - 89132013000200014.

PARODI, T.V. et al. Composição química do óleo essencial de *Aloysia triphylla* sob influência sazonal e sua atividade anestésica em peixes. *Aquac Res*. 2020 v. 51 p. 2515 - 2524. https://doi.org/10.1111/are.14594

PARODI, T. V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Aloysia triphylla (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO2 extraction. Brazilian. Biological and Applied Sciences • Braz. arch. biol. technol. 56 (2) • Apr 2013 • https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000200014

PASCUAL, M. E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of ethnopharmacology, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3.

PAULUS, D. et al. Teor e composição química do óleo essencial e crescimento vegetativo de Aloysia triphylla em diferentes espaçamentos e épocas de colheita. Revista Ceres, v. 60, n. 3, p. 372-379, 2013. https://doi.org/10.1590/S0034-737X2013000300010.

PAUZI, N. A. et al. Antibiotic susceptibility and pathogenicity of Aeromonas hydrophila isolated from red hybrid tilapia (Oreochromis niloticus× Oreochromis mossambicus) in Malaysia, Veterinary World, v. 13, n. 10, p. 2166-2171, 2020. www.doi.org/10.14202/vetworld.2020.2166-2171.

PESSOA, R. B. G. et al. Molecular characterization and evaluation of virulence traits of Aeromonas spp. isolated from the tambaqui fish (Colossoma macropomum). Microbial Pathogenesis, v. 147, e104273, 2020. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104273

PEIXE BR- Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário Brasileiro de Piscicultura. v. 101, 2020.

PESSOA, R. B. G. et al. The genus Aeromonas: a general approach. Microbial pathogenesis, v. 130, p. 81-94, 2019. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036

PESSOA, R. B. G. et al. Molecular characterization and evaluation of virulence traits of Aeromonas spp. isolated from the tambaqui fish (Colossoma macropomum). Microbial Pathogenesis, v. 147, e104273, 2020. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104273

PEREIRA, C.S.A.; NOGUEIRA, P.C.L.; BARBOSA, A.A.T.B.; NIZIO,D.A.C.; BLANK, A.T.S.S.; SAMPAIO, T.S.; ALVES, R.P.; COUTO, H.G.AS.A.; ALCANTARA, R.B.F.; ARIE, J.O.M.; BLANK, A.F.Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de um *Croton tetradenius* Baill. germoplasma, Journal of Essential Oil Research, 2019 31: 5, 379-389, DOI: 10.1080 / 10412905.2019.1607785

PROIETTI-JUNIOR, A.A.; LIMA, L.S.; ROGES, E.M.; RODRIGUES, Y.C.; LIMA, K.V.B.; RODRIGUES, D.P.; TAVARES-DIAS, M. Coinfecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas jandaei* em pirarucu *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Pesquisa em Aquacultura*. 2021; 52: 1688 - 1696. https://doi.org/10.1111/are.15021

PORFÍRIO, E.M.; MACHADO, H.M.; PEREIRA, A.M.G.; CAVALCANTE, T.T.R.; AMORIM, G.G.; CARVALHO, M.G.; COSTA, R.A.; JUNIOR, F.E.A.C. In vitro antibacterial and antibiofilm activity of Lippia alba essential oil, citral, and carvone against Staphylococcus aureus. Sci. World J. **2017**.

PHU, T.M.; PHUONG, N.T.; SCIPPO, M.L.; DALSGAARD, A. Quality of Antimicrobial Products Used in Striped Catfish (Pangasianodon hypophthalmus). **Aquaculture in Vietnam**. PLoS One. 2015 Apr 21;10(4):e0124267. doi: 10.1371/journal.pone.0124267

RADULOVIC, N.S.; BLAGOJEVIC, P.D.; TZZOJANOVIC-RADIC, Z.Z. Antimirobial plants metabolites: Structural diversity and mechanism of action (Review). Current Medicinal Chemestry, v. 20, n. 7, p. 932-952, 2013.

RASMUSSEN-IVEY, C. R. et al.Virulence factors of Aeromonas hydrophila: in the wake of reclassification. Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1-10, 2016. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337.

RODRIGUES, I. A. et al. *In vitro* cytocidal effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7-hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*. BMC complementary and alternative medicine, v. 13, n. 1, p. 249, 2013. https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-249

ROMERO, J.; FEIJOO, C. J.; NAVARRETE, P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives, Health and Environment in Aquaculture, E. D. C.; G. S. David; R. J. Silva, IntechOpen, 2012. DOI: 10.5772/28157. Available from: https://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/antibioticsin-aquaculture-use-abuse-and-alternatives

SARTO, MARCELLA PAULA MANSANO; ZANUSSO JUNIOR, GERSON. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais .Revista Uningá revisão[S.l.], v. 20, n. 1, out. 2014. ISSN 2178-2571. Disponível em: <http://34.233.57.254/index.php/uningareviews/article/view/1559>.

SALEHI, B .; UPADHYAY, S .; N,ORHN, I.E.; JUGRAN, A .K.; JAYAWEERA, S.L.D.; DIAS, D.A.; SHAROPOV, F.; YASAMAN, T.; MARTINS.; BAGHALPOUR, N.; CHO, C.W.; SHARIFI,R.J. Therapeutic Potential of α- and β-Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules* **2019** , *9* , 738. https://doi.org/10.3390/biom9110738.

SARAIVA, A.G.Q.; SARAIVA, R.L.; ALBUQUERQUE, C.E.S.; NOGUEIRA, C.E.S.;TEXEIRA, A.M.R.; LIMA, L.B.;CRUZ, B.G.; DE SOUZA, F.F.Chemical analysis and vibrational spectroscopy study of essential oils from Lippia sidoides and of

its major constituent,Vibrational Spectroscopy,V. 110,ISSN 0924-2031,https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103111.

SAAVEDRAA, M. J.; SOUSA, J. C. O Ensino da Antibioterapia: Estado da arte. História da Ciência e Ensino: construindo interfaces, v. 20, p. 632-637, 2019. https://doi.org/10.23925/2178-2911.2019v20espp632-637.

SÁENZ, J. S. et al. Oral administration of antibiotics increased the potential mobility of bacterial resistance genes in the gut of the fish Piaractus mesopotamicus. Microbiome, v. 7, p. 1-14, 2019. https://doi.org/10.1186/s40168-019-0632-7.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. Acta of Fisheries and Aquatic Resources, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017. DOI 10.2312/ActaFish.2017.5.1.1-9.

SGARBOSSA, J. et al. Effect of season and irrigation on the chemical composition of Aloysia triphylla essential oil. Revista Ceres, v. 66, n. 2, p. 85-93, 2019. http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201966020002.

SALIMENA, F. R. G.; SILVA, T. R. S. Flora de grão-mogol, Minas Gerais: Verbenaceae. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, v. 27, n. 1, p.119-120, 2009. www.jstor.org/stable/42871769.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001. SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 74, n. 12, p. 5463- 5467, 1977. doi:10.1073/pnas.74.12.5463

SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A. S. Peixes comerciais de Manaus. In: Geraldo (Ed.). – Manaus: IBAMA/AM, ProVárzea, p. 144, il. ISBN 85-7300-211-5. 2006.

SANTOS, M. M. et al. Estudos dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de Lippia gracilis a Xanthomonas campestris pv. viticola "in vitro. Summa Phytopathol., Botucatu, v. 40, n. 3, p. 277-280, 2014

SANTOS, A. C. et al. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of Aloysia triphylla and Cymbopogon flexuosus in silver catfish (Rhamdia quelen). Veterinary anaesthesia and analgesia, v. 44, n. 1, p. 106-113, 2017. https://doi.org/10.1111/vaa.12386.

SANTOS, F. A.C et al. Growth performance and physiological parameters of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system (RAS): Importance of stocking density and classification. Aquacuture. v.534.https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736274

SANTOS, F.G.B. Caracterização Fenotípica e Molecular de Bactérias com Potencial Patogênico em Pacamã (Lophiosilurus alexandri Steindachner, 1877). 2011. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, PE, 2011.

SEBASTIÃO, F. A.; PILARSKI, F.; LEMOS, M. V. F. Composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by Flavobacterium columnare isolated from 36 tropical fish in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n. 3, p. 861-864, 2013. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013005000058.

SEBASTIÃO, F. A. et al. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. Advances in Microbiology, v. 5, n. 6, p. 409-424, 2015. DOI 10.4236/aim.2015.56042.

SEBASTIÃO, F. A.; LEMOS, E. G. M.; PILARSKI, F. Development of an absolute quantitative real-time PCR (qPCR) for the diagnosis of Aeromonas hydrophila infections in fish. Acta Scientific Microbiology, v. 1, p. 23-29, 2018.

SHAABAN, H. A. Essential Oil as Antimicrobial Agents: Efficacy, Stability, and Safety Issues for Food Application. IntechOpen, 2020. DOI: 10.5772/intechopen.92305.

SHARMA, K. et al.,Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds, Industrial Crops and Products,Volume 154, 2020,112569, ISSN 0926-6690, https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112569

SILVA, B. C. J. et al. Antimicrobial property of lemongrass (Cymbopogon citratus) oil against pathogenic bacteria isolated from pet turtles. Laboratory animal research, v. 33, n. 2, p. 84-91, 2017. https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.84.

SILVA, N. C. S. L. et al. Gene floR e a resistência ao florfenicol em isolados de Aeromonas spp. autóctones de organismos aquáticos. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 38, n. 3, p. 357-366, 2018. https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4842.

SILVA, F. F. M.; MOURA, L. F.; BARBOSA, T.T.; FERNANDES, A. B. D.; BERTINI, L. M.; ALVES, L. A. Analise da composição químicas do óleo essencial de capim santo(*Cymbogon citratus*) obtido através de extrator por arraster co vapor dágua construído com material de fácil aquisição ebaixo custo. HOLOS, Ano 30, Vol. 4ISSN1807-1600. DOI: 10.15628/holos.2014.1762

SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários, 2018. Disponível em:< http://www.cpvs.com.br/cpvs.

SIQUEIRA, I.B.; BARBOSA, A.A.T.; JAIR, S.; FERNANDES, R.P.M.; SILVA, A.R.S.T.; BARBOSA, F.H.F.; SHIMIEGUEL, D.M.; BLANK, A.F.; SACRAMENTO, A.G.; NIZIO, D.A.C.; DOLABELLA, S.S. In vitro Antibacterial Activity of Essential Oils of Croton tetradenius Baill. From the Brazilian Caatinga Biome and Its Synergistic Effect With Ciprofloxacin and Meropenem. J. Essent. Oil-Bear. Plants 2021, 24, 12-21. DOI: 10.1080/0972060X.2020.1871079.

SOUZA, R. C. et al. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of Aloysia triphylla and Lippia alba against Aeromonas spp. Microbial Pathogenesis, v. 113, p. 29-33, 2017. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.013

SOUZA, R. C. et al. Dietary addition of the essential oil from Lippia alba to Nile tilapia and its effect after inoculation with Aeromonas spp. Aquaculture Nutrition, v. 25, p. 39-45, 2019. https://doi.org/10.1111/anu.12827.

SOUZA, R. C. et al. Dietary Aloysia triphylla essential oil on growth performance and biochemical and haematological variables in Nile tilapia, Aquaculture, v. 519, 2020 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734913

STARLIPER, C. E. et al. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to Aeromonas spp. Journal of advanced research, v. 6, n. 1, p. 89-97, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007

SUTILI, F.J. et al. The use of *Ocimum americanum* essential óleo contra os patógenos *Aeromonas hydrophila* e *Gyrodactylus* sp. em bagre prateado (*Rhamdia quelen*). Lettrs in Applied Microbiol, v.63 edição.2 p. 82-88. 2016 https://doi-org.ez2.periodicos.capes.gov.br/10.1111/lam.12602

SCOTTI, R.; STRINGARO, A.; NICOLINI, L.; ZANELLATO, M.; BOCCIA, P.; MAGGI, F.; GABBIANELLI, R. Effects of Essential Oils from Cymbopogon spp. and Cinnamomum verum on Biofilm and Virulence Properties of Escherichia coli O157:H7. Antibiotics 2021, 10, 113. https://doi.org/10.3390/antibiotics10020113

TADTONG, S.; WATTHANACHAIYINGCHAROEN, R.; KAMKAEN, N. Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from Cymbopogon citratus and Alpinia galanga. Natural product communications, v. 9, n. 2, p. 1934578X1400900237, 2014. https://doi.org/10.1177/1934578X1400900237.

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microbial pathogenesis, v. 134, p. 103580, 2019. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580.

TAVARES, A. B.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Ocorrência de Aeromonas spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. Arquivos do Instituto Biológico, v. 82, p. 1-8, 2014. https://doi.org/10.1590/1808-1657000662013.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. Journal of Parasitic Diseases, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017. https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y.

VALENTIM, D. S. S. et al. Effects of a nanoemulsion with Copaifera officinalis oleoresina against monogenean parasites of Colossoma macropomum: A Neotropical Serrasalmidae. Journal of Fish Diseases, v. 41, n. 7, p. 1041–1048, 2017.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. Reviews in Aquaculture, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018. https://doi.org/10.1111/raq.12164.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal

of Chromatography, v.11, p. 463-471, 1963.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of bacteriology, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

ZAGO, D.C. et al. Aloysia triphilla na comida do peixe- zebra: efeito na fisiologia, comportamento e desepenho de crescimento. Fish Physiol Biochem, v. 44, p. 465-478. 2018. https://doi.org/10.1007/s10695-017-0446-0.

ZARGAR, A. et al. Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed Thymus vulgaris essential oils. Aquaculture Research, v. 50, n. 11, p. 3097-3106, 2019. https://doi.org/10.1111/are.14243

ZENG, Q. et al. Impacts of florfenicol on the microbiota landscape and resistome as revealed by metagenomic analysis. Microbiome, v. 7, n. 1, p. 155, 2019. https://doi.org/10.1186/s40168-019-0773-8.

ZEPPENFELD, C. C. et al. Aloysia triphylla essential oil as food additive for Rhamdia quelen–Stress and antioxidant parameters. Aquaculture Nutrition, v. 23, n. 6, p. 1362-1367, 2017. https://doi.org/10.1111/anu.12511.

ZHAO, X. L. et al. Myo-inositol as an adjuvant to florfenicol against Aeromonas hydrophila infection in common carp Cyprinus carpio. FEMS microbiology letters, v. 365, n. 20, p. 212, 2018. https://doi.org/10.1093/femsle/fny212.

ZHANG, Q. et al. Study on florfenicol-contained feeds delivery in Dicentrarchus labrax seawater recirculating and flow aquaculture systems. Aquacultura. v. 526, 2020, https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735326