



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

PATRIKY PEREIRA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Melaleuca alternifolia* E *Mentha piperita* FRENTE
Aeromonas spp. ISOLADAS DO PEIXE AMAZÔNICO
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*).**

Recife
2023

PATRIKY PEREIRA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Melaleuca alternifolia* E *Mentha piperita* FRENTE
Aeromonas spp. ISOLADAS DO PEIXE AMAZÔNICO
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*).**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elba Verônica
Matoso Maciel de Carvalho

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia
Manoella de Souza Lima

Recife
2023

PATRIKY PEREIRA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Melaleuca alternifolia* E *Mentha piperita* FRENTE
Aeromonas spp. ISOLADAS DO PEIXE AMAZÔNICO
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*).**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho
UFPE/ Departamento de Bioquímica

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Manoella de Souza Lima
UFPE/ Departamento de Antibióticos

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório
UFPE/ Departamento de Histologia e Embriologia

MSc. Rafael Bastos Gonçalves Pessoa
UFPE/ Departamento de Bioquímica

Suplente: Prof. Dr. Bruno Mendes Tenório
UFPE/ Departamento de Histologia e Embriologia

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Patriky Pereira da.

Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* frente *Aeromonas* spp. isoladas do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*). / Patriky Pereira da Silva. - Recife, 2023.

45 : il., tab.

Orientador(a): Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho

Coorientador(a): Gláucia Manoella de Souza Lima

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. *Aeromonas*. 2. Tambaqui (Peixe). 3. Biofilme . 4. *Melaleuca alternifolia*.
5. *Mentha piperita*. I. Carvalho, Elba Verônica Matoso Maciel de. (Orientação). II.
Lima, Gláucia Manoella de Souza. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

Dedico este trabalho aos meus pais,
irmãos e amigos que sempre me
apoiam e me motivam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus que é o responsável por todas as vitórias e todos os objetivos que alcancei em minha vida.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho, pela paciência, dedicação, amizade durante esses anos de orientação e por ter confiado em mim e acreditado no meu potencial quando duvidei que seria capaz. Agradeço por ter feito minha passagem pela graduação ser tão especial e por ser uma referência profissional para mim.

À professora Gláucia Manoella de Souza Lima pela coorientação, pelo apoio e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho e pelo acolhimento no laboratório durante esses anos.

Agradeço ao Departamento de Bioquímica - CCS/UFPE e ao Departamento de Antibióticos - CB/UFPE por todos os recursos fornecidos para a realização deste trabalho.

Meus agradecimentos à equipe do Laboratório de Genética de Microrganismos e da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos pela cumplicidade, aprendizado e acolhimento.

Agradeço à Diego Marques por ter me conduzido nos experimentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Diretório Acadêmico de Biomedicina, o qual fui presidente, pelos amigos que ganhei e pela experiência que adquiri.

Agradeço aos meus pais, Dionísio Pereira e Márcia Telma, pelo apoio, por toda dedicação, por todo tempo investido no meu futuro e por serem meus maiores exemplos na vida.

Aos meus irmãos, Dijaiky e Eriky Pereira, pelo companheirismo de sempre, pelos conselhos, pelas conversas e pelos aprendizados juntos.

Aos meus padrinhos Jaildes e Adalto, por serem tão presentes e apoiarem minhas decisões.

À Ana Júlia Leal, Amanda Marcelino e Camila Lima pelos anos de amizade, apoio emocional e experiências trocadas.

À Ana Carolina Ribeiro pela amizade durante o curso.

À Endrielle Wanderley por todas as memórias, risadas, perrengues e conselhos durante nossa trajetória no curso.

À Gabriel Solthatos pela amizade construída dentro e fora da UFPE.

À Ryan Cristian pela amizade e compartilhamento de experiências em laboratório.

À Rafael Bastos que, desde o início, sempre esteve disponível para ajudar e acrescentar ao projeto.

À Caio (*in memorian*) por ter sido tão solícito durante a fase de experimentos.

Aos meus amigos músicos do Sesc Santo Amaro e do Conservatório que me apoiaram emocionalmente durante o curso.

Por fim, a todas as pessoas que fizeram parte deste ciclo, direta ou indiretamente, e a todos aqueles que torceram por mim. Muito obrigado.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

DA SILVA, Patriky Pereira. **Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* frente *Aeromonas* spp. isoladas do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2023. 45. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe onívoro da Bacia Amazônica e é o segundo peixe mais cultivado no Brasil. O manejo inadequado dos espécimes, na piscicultura, pode ocasionar estresse aos peixes, agravando mais a saúde desses animais enfermos, que muitas vezes já estão bastante debilitados pela ação dos parasitos e patógenos. Os Tambaquis, que passam por estresse em cativeiros, ficam suscetíveis a bactérias aquáticas, como *Aeromonas*, que se fixam nos tecidos do peixe, podendo formar biofilme, resultando na morte do peixe. Além disso, o uso de medicamentos, como os antibióticos, de forma exacerbada, pode impactar negativamente o meio ambiente contaminando as águas dos rios. Por isso, faz-se necessário, então, buscar novas abordagens terapêuticas para os tambaquis criados em cativeiros. Os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita*, derivados de plantas, possuem propriedades antimicrobianas devido a compostos presentes como terpenos e esteróides. Este projeto teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme, como característica de virulência das cepas de *Aeromonas* spp. previamente isoladas do Tambaqui e a atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita*. 4 cepas de *Aeromonas hydrophila*, 1 de *Aeromonas veronii*, 3 de *Aeromonas caviae* e 2 de *Aeromonas dhakensis*, anteriormente preservadas em óleo mineral, foram reativadas em caldo BHI e preservadas em Ágar Nutriente. Para avaliação dos biofilmes, foram usadas placas para cultura de células de 96 poços. Foi feita a diluição das colônias em BHI, padronização de células no espectrofotômetro e distribuição nas placas. Para o ensaio antibiofilme uma suspensão das cepas a 10^6 foi distribuída em triplicatas juntamente com 10ul de cada óleo essencial e 150ul de caldo Muller Hinton. Foi usado Tween 80 a 1% como diluente dos óleos e o teste foi feito a partir do CMI dos mesmos por meio de diluição seriada. Em ambos os testes, após 24h em estufa, foram feitas as lavagens das placas, fixação dos poços e coloração. Após o ensaio de Elisa a 570nm as cepas foram classificadas, de acordo com a capacidade de aderência. A cepa de *A. veronii* e 1 das cepas de *A. caviae* não apresentaram aderência. As demais cepas de *A. dhakensis*, *A. caviae* e *A. hydrophila* foram classificadas como “fracamente aderente”, 2 das 4 cepas de *A. hydrophila* se classificaram como “moderadamente aderente”. Os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* apresentaram atividade antibiofilme. O óleo de *Melaleuca alternifolia* teve uma melhor atividade sobre as cepas de *A. dhakensis* tendo 78% de inibição em uma das cepas. O óleo de *Mentha piperita* mostrou uma boa atividade sobre as cepas de *A. caviae* e teve atividade em todas as cepas. Em suma, os óleos essenciais apresentaram resultados satisfatórios de inibição das cepas, porém estudos são necessários para entender a relação dos óleos com a inibição dos biofilmes. Testes bioquímicos, genéticos e microscopia podem ajudar na visualização da estrutura da bactéria e os danos causados ao biofilme.

Palavras-chave: *Aeromonas*. Tambaqui. Biofilme. *Melaleuca alternifolia*. *Mentha piperita*.

DA SILVA, Patriky Pereira. **Anti-biofilm activity of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* and *Mentha piperita* against *Aeromonas* spp. isolated from the Amazonian fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2023. 45. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

The Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is an omnivorous fish from the Amazon Basin and is the second most cultivated fish in Brazil. Inadequate management of specimens in fish farming can cause stress to the fish, further worsening the health of these already weakened animals, often due to the action of parasites and pathogens. Tambaquis that experience stress in captivity become susceptible to aquatic bacteria, such as *Aeromonas*, which attach to the fish's tissues and can form biofilms, resulting in the death of the fish. Additionally, the excessive use of medications, such as antibiotics, can negatively impact the environment by contaminating river waters. Therefore, it is necessary to seek new therapeutic approaches for captive Tambaquis. The essential oils of *Melaleuca alternifolia* and *Mentha piperita*, derived from plants, possess antimicrobial properties due to compounds present, such as terpenes and steroids. This project aimed to evaluate the biofilm formation capability as a virulence characteristic of *Aeromonas* spp. strains previously isolated from Tambaqui and the antibiofilm activity of *Melaleuca alternifolia* and *Mentha piperita* essential oils. Four strains of *Aeromonas hydrophila*, one of *Aeromonas veronii*, three of *Aeromonas caviae*, and two of *Aeromonas dhakensis*, previously preserved in mineral oil, were reactivated in BHI broth and preserved in Nutrient Agar. For biofilm evaluation, 96-well cell culture plates were used. Colony dilution in BHI, cell standardization in the spectrophotometer, and distribution on plates were carried out. For the antibiofilm assay, a suspension of strains at 10^6 was distributed in triplicates along with 10 μ l of each essential oil and 150 μ l of Muller Hinton broth. Tween 80 at 1% was used as the diluent for the oils, and the test was performed starting from their MIC through serial dilution. In both tests, after 24 hours in an incubator, plate washes, well fixation, and staining were performed. After the ELISA assay at 570 nm, the strains were classified according to their adherence capacity. The strain of *A. veronii* and one of the *A. caviae* strains did not show adherence. The remaining strains of *A. dhakensis*, *A. caviae*, and *A. hydrophila* were classified as "weakly adherent," and two out of the four *A. hydrophila* strains were classified as "moderately adherent." *Melaleuca alternifolia* and *Mentha piperita* essential oils exhibited antibiofilm activity. *Melaleuca alternifolia* oil showed better activity against *A. dhakensis* strains, with 78% inhibition in one of the strains. *Mentha piperita* oil exhibited good activity against *A. caviae* strains and had activity against all strains. In summary, essential oils showed satisfactory inhibition results for the strains, but further studies are needed to understand the relationship between the oils and biofilm inhibition. Biochemical, genetic, and microscopic tests may help visualize the structure of the bacteria and the damage caused to the biofilm.

Key words: *Aeromonas*. Tambaqui. Biofilm. *Melaleuca alternifolia*. *Mentha piperita*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tambaqui da Estação de Aquicultura Continental Prof. Johei Koike, do Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco.	15
Figura 2 – Sinais clínicos de Tambaqui infectado por <i>Aeromonas spp.</i>	18
Figura 3 – Etapas evolutivas na formação do biofilme bacteriano.	20
Figura 4 – Visão geral da árvore da <i>Melaleuca alternifolia</i> (Tea tree).	23
Figura 5 – Visão geral da <i>Mentha piperita</i> (Hortelã-Pimenta).	24
Figura 6 – Esquematização do ensaio antibiofilme	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas isoladas do Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) e reativadas.	30
Tabela 2 – Classificação das cepas de <i>Aeromonas spp.</i> quanto à formação de biofilme.....	31
Tabela 3 – Concentração Mínima Inibitória (%) dos óleos essenciais frente <i>Aeromonas spp.</i>	33
Tabela 4 – Valores de inibição (%) de biofilmes pelo óleo essencial <i>Melaleuca alternifolia</i>	33
Tabela 5 – Valores de inibição (%) de biofilmes pelo óleo essencial <i>Mentha piperita</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEM	Agência Europeia de Medicamentos
BHI	Brain Heart Infusion
CMI	Concentração Mínima Inibitória
OE	Óleo essencial
OEMA	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
OEMP	Óleo essencial de <i>Mentha piperita</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	AQUICULTURA	14
2.1.1	Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	15
2.1.1.1	<i>Aeromonas</i>	17
2.1.1.1.1	<i>Biofilme bacteriano</i>	19
2.1.1.1.1.1	<i>Óleos essenciais</i>	21
3	JUSTIFICATIVA	25
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL	26
4.1.1	Objetivos Específicos	26
5	METODOLOGIA	27
5.1	REATIVAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS	27
5.1.1	Avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados	27
5.1.1.1	Ensaio antibiofilme	28
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O *Colossoma macropomum* (Tambaqui) está entre as espécies mais cultivadas em países tropicais. É o segundo peixe mais cultivado no Brasil (FAO, 2020) e é apontado como dono de um grande potencial econômico no mercado não apenas nacional, como global, podendo se tornar uma verdadeira commodity brasileira (HILSDORF et al., 2022). Originário das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (SOUSA, et al., 2016), é um dos principais produtos envolvidos na atividade aquícola nacional (CARVALHO et al., 2014). O Tambaqui tornou-se o peixe símbolo da Amazônia porque ele incorpora, em uma única espécie, parte dos problemas que precisam ser resolvidos para se manejar a pesca e, ao mesmo tempo, desenvolver a aquicultura (KUBITZA, 2010).

A aquicultura é uma das atividades agropecuárias que mais se desenvolve e, dentre seus ramos, a piscicultura (produção de peixes), ganha destaque (TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015). Porém o uso indiscriminado de antibióticos causa impactos negativos nos ambientes aquáticos (CARVALHO; JUNIOR; AMÉRICO, 2016). A classe dos antibióticos é a que desperta maior preocupação, pois mesmo uma baixa concentração de um determinado antibiótico por longos períodos pode induzir o surgimento de bactérias resistentes (HERNANDEZ et al., 2007). O uso excessivo e não controlado de antimicrobianos em animais tem consequências na saúde pública, tendo transformado a resistência aos antimicrobianos num preocupante problema global (GASTALHO et al., 2014).

O manejo inadequado dos espécimes, na piscicultura, pode ocasionar estresse aos peixes, agravando mais a saúde desses animais enfermos, que muitas vezes já estão bastante debilitados pela ação dos parasitos e patógenos (BOWER; DAESCHEL, 1999). Para isso são usados antibióticos que podem influenciar negativamente o meio ambiente. Por isso, o uso de produtos naturais derivados de plantas, como os óleos essenciais, têm sido descritos como antiestressantes, promotores de crescimento e imunoestimuladores, além de conter propriedades antimicrobianas devido a compostos presentes como

terpenos e esteróides (KUMAR et al., 2013).

Fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, como também pela constância de sua qualidade (LEITE; CROZARA, 2015). Desde os primórdios da existência humana, os homens buscam na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida (BALICK; COX, 1997). Porém pesquisas realizadas em várias partes do mundo têm demonstrado que extratos de alguns vegetais ou substâncias puras obtidas deles têm efeito positivo no controle e prevenção de doenças em animais aquáticos, bem como, melhoram a imunidade dos mesmos. O uso de fitoterápicos surge como uma alternativa ao tratamento com antibióticos, haja vista que produz um menor impacto ambiental, reduz a quantidade de resíduos químicos nos animais, são menos tóxicos e possuem diversas propriedades biológicas capazes de impedir o crescimento e disseminação de patógenos (FUJIMOTO, 2012).

Os óleos essenciais são líquidos ou semi líquidos voláteis (STRINGARO; COLONE; ANGIOLELLA, 2018). São extraídos de plantas aromáticas e podem ser sintetizados por qualquer parte da planta, como cavidades e canais, e são conhecidos por suas funções antissépticas, bactericidas e medicinais (BAKKALI et al., 2008). Além disso, são biodegradáveis e devido a seus multicomponentes naturais são menos propensos a causar o desenvolvimento de resistência bacteriana (KULKARNI et al., 2013).

Entre as bactérias que acometem os peixes de água doce destaca-se o gênero *Aeromonas*, que são consideradas como patógenos emergentes e autóctones de ambientes aquáticos, desse modo, o contato com peixes e outros frutos do mar é desenvolvido quase que inevitavelmente (HU et al., 2012; IGBINOSA et al., 2012). Responsáveis por surtos infecciosos frequentes e durante o diagnóstico muitas vezes aparecem como o agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica nos peixes de água doce (PESSOA et al., 2019; SAHA; PAL, 2002; SOUZA; SILVA-SOUZA, 2001; BARONY et al., 2015).

O biofilme é constituído por microrganismos sésseis que produzem matriz com polímero orgânico e hidratado e tem a finalidade de se defender das intempéries do ambiente externo (variação de pH, temperatura, ação de agentes químicos e físicos), de respostas inatas e adquiridas e da ação de antimicrobianos dentro do organismo (CLUTTERBUCK et al., 2007). A capacidade de formar biofilmes não é expressa por todas as bactérias, portanto é importante conhecer esses microrganismos formadores de biofilme pois, a exibição desse fenótipo é uma forma de resistência e transmissão de doenças.

Diante disso, se faz necessário a busca por novos métodos terapêuticos para a piscicultura a fim de evitar a contaminação do meio ambiente, promover uma alternativa para a perda de espécimes e evitar possíveis infecções em humanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AQUICULTURA

Aquicultura é o cultivo ou criação de organismos de interesse para o ser humano (DE JESUS et al., 2021). Os produtos pesqueiros representam uma importante fonte alimentar para as populações humanas, com elevado valor nutricional (ALMEIDA; FRANCO, 2006; SOARES; GONÇALVES, 2012). Além de importante atividade econômica, que gera emprego e renda para milhões de pessoas, a aquicultura contribui com a segurança alimentar da população, sobretudo nas regiões mais carentes (SÁ Marcelo, 2023). Entre 1990 e 2020 a aquicultura cresceu 300% e o consumo de pescado 40%. Quase metade de todo pescado produzido no mundo em 2020 foi proveniente da aquicultura (FAO, 2022). As práticas aquícolas, quando realizadas de acordo com as melhores orientações técnicas, são ambientalmente corretas, por isso, nos países desenvolvidos, os consumidores de pescado exigem que o produto tenha biossegurança e tenha sido obtido em sistemas sustentáveis de produção (Sá Marcelo, 2023).

Dentre os países com maior potencial para a aquicultura, o Brasil tem papel de destaque, em especial por sua disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de espécies aquáticas que possuem interesse zootécnico e

mercadológico (TROMBETA et al, 2020). A piscicultura brasileira vem se desenvolvendo de maneira robusta nos últimos anos, com significativos avanços em termos de aumento da produção e profissionalização do setor (PEDROSA FILHO, 2020). Em 2020, a aquicultura brasileira produziu quase 552 mil toneladas de peixes e camarões, um aumento de 4,3% em relação ao ano anterior (IBGE, 2021) e o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) aparece em 2º lugar dentre as 10 espécies mais cultivadas no Brasil com 143.959 toneladas.

2.1.1 Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi descrito, pela primeira vez, por George Cuvier em 1816 (Figura 1). Membro da família Characidae, ordem Characiformes e Originário das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (SOUSA et al., 2016), é um peixe rústico de grande porte apreciado na Região Amazônica e muito explorado pela pesca extrativista desde o século XIX. Tem grande destaque na piscicultura em grande parte do Brasil, e é um dos principais produtos envolvidos na atividade aquícola nacional (MENEZES et al., 2008; CARVALHO et al., 2014). É considerado o segundo maior peixe de escamas de água doce na América do Sul e, em seu habitat natural, pode atingir 1 metro de comprimento e pesar 30 Kg (JACOMETO et al., 2010; KUBITZA, 2010). Sua grande resistência a quedas de temperatura e variações de oxigênio dissolvido na água, tornam-o capaz de ser cultivado na maioria das regiões brasileiras, com exceção do Sul e Sudeste, visto que a temperatura ideal para criação é de 26 a 32 °C (CARVALHO, Elba Verônica Matoso Maciel et al., 2012; BARÇANTE; DE SOUSA, 2015).

Figura 1 - Tambaqui da Estação de Aquicultura Continental Prof. Johei Koike, do Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco.



FONTE: CARVALHO, Elba Verônica Matoso Maciel, 2007.

A produção em larga escala do tambaqui exige que a mesma seja feita em sistemas de cultivo intensivos geralmente realizada em viveiros com fundo de argila, que confere maior produção e menor probabilidade de doenças (EMBRAPA, 2011). Em cativeiro, a espécie apresenta crescimento rápido, alta produtividade e ótima adaptação aos sistemas de cultivo tradicionais, entretanto, apesar da prática da piscicultura ter substituído a pesca extrativista diminuindo, assim, o desequilíbrio ambiental, os criadouros ainda enfrentam um grande obstáculo que interfere diretamente na produção: a morte dos espécimes cultivados (MARQUES, et al., 2016; ARAUJO-LIMA e GOULDING, 1998; VAL et al., 2000).

Com a intensificação dos sistemas de criação surge a necessidade de maiores conhecimentos sobre o manejo adequado para prover melhoria nas condições de saúde dos peixes. Quando os peixes estão continuamente expostos às condições adversas e seu sistema imunológico ainda não responde adequadamente, tornam-se mais susceptíveis aos parasitos e doenças. O estresse de captura, transporte, manuseio, adensamento populacional e alterações na qualidade de água, são fatores que interferem no equilíbrio da relação peixe-parasito-ambiente, afetando os peixes e os agentes patogênicos (vírus, bactérias e parasitos), causando então surtos epizooticos. (TAVARES-DIAS, M. et al., 2013).

Conforme se intensifica a produção, aumenta-se a busca por uma produtividade máxima, promovendo a utilização de aditivos (antibióticos, vacinas e quimioterápicos) a fim de proporcionar um melhor desempenho zootécnico aos organismos aquáticos. No entanto, esses aditivos podem colocar em risco a saúde sanitária da produção, do ambiente aquático e do consumidor, devido à bioacumulação e a resistência a bactérias (GARCIA et al., 2013). Dentre os agentes infecciosos, bactérias do gênero *Aeromonas* são mundialmente conhecidas por sua capacidade de gerar processos deletérios em sistemas de cultivo de peixes e outros frutos do mar (GONÇALVES PESSOA et al., 2019).

2.1.1.1 *Aeromonas*

As bacterioses são uma das principais causas de perdas econômicas nos sistemas de piscicultura (W. Wang et. al. 2019). As doenças representam uma grande ameaça para a aquicultura e os surtos são geralmente desencadeados pela gestão agrícola intensiva. Dentre as bactérias causadoras de doenças em peixes, a *Aeromonas* destaca-se como uma das maiores causas de mortalidade de peixes pois trata-se de uma bactéria de natureza oportunista, causando a infecção quando um fator primário afeta as interações da tríade hospedeiro-patógeno-ambiente (RGB Pessoa, 2020; GALLANI et. al, 2020).

Acredita-se que os primeiros isolados foram relatados em 1890 e, desde então, foram mais de cem anos estruturando o gênero *Aeromonas* dentro do universo microbiológico. Ao longo da história, essas bactérias foram classificadas e reclassificadas entre os mais diversos gêneros, como *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia* e *Proteus*, entre outros (RGB Pessoa, 2019). Pertencente à família Aeromonadaceae, o gênero *Aeromonas* abrange 36 espécies de bactérias anaeróbicas facultativas, Gram-negativas, em forma de bastonete e não formadoras de esporos, conhecidas como habitantes naturais de ecossistemas aquáticos e um dos principais patógenos de animais transmitidos pela água (MJ Lynch et al. 2002; RGB Pessoa, 2023). O termo *Aeromonas* vem das palavras gregas “Aer” que significa gás de ar e “Mona” que significa unidades e foi proposto pela primeira vez em 1936 por Kluver e van Neil, para abranger bactérias produtoras de gases. No entanto, foi Stanier quem em 1943 usou oficialmente “*Aeromonas*” para denominar o gênero onde essas espécies bacterianas foram adicionadas (RGB Pessoa, 2019).

Aeromonas são patógenos emergentes capazes de colonizar e infectar vários hospedeiros e são amplamente conhecidos na aquicultura como organismos potencialmente infecciosos (N.Abu-Elala et. al, 2015). A virulência de *Aeromonas spp.* é complexa e de origem multifatorial, principalmente ligada aos componentes estruturais responsáveis pela adesão, motilidade, colonização bacteriana e escape do sistema imune do hospedeiro; produção de toxinas, citotoxinas e endotoxinas; proteínas extracelulares como amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e proteases; sistema de secreção e aquisição de íons

metálicos (BRAVO; FIGUERAS, 2020). Esses microrganismos são responsáveis por surtos infecciosos deletérios em sistemas de produção aquática, que levam a elevadas perdas econômicas para a indústria da aquicultura (RGB Pessoa, 2023). As principais infecções bacterianas que acometem os peixes são causadas por diversas espécies do gênero *Aeromonas*, como *A.caviae*, *A.veronii*, *A.hydrophila* e *A.salmonicida*.

Embora existam vários indícios de surtos bacterianos em tambaqui, a identificação do patógeno seguida pelo postulado de Koch para este peixe é escassa na literatura (GALLANI et al. 2020). Os processos patológicos gerados por essas bactérias são essencialmente mediados por situações ambientais tão estressantes nas fazendas como manuseio, transporte e má qualidade da água que podem causar surtos de mortalidade. Tais práticas impõem aos peixes cultivados um estado constante de estresse que afeta drasticamente o sistema imunológico e os torna suscetíveis a diversas patologias o que, geralmente, ocasiona a morte de peixes em sistemas de cultivo quando não rapidamente identificados e tratados (STARLIPER et al., 2015; RGB Pessoa 2020). Os surtos de mortalidade causados por *Aeromonas spp.* são considerados uma grande preocupação para a aquicultura mundial e são responsáveis por grandes perdas econômicas em diversas regiões. Além disso, a septicemia hemorrágica (Figura 2) é comum em peixes cultivados em tanques de terra (GALLANI et al. 2020).

FIGURA 2 - Sinais clínicos (hemorragia) de Tambaqui infectado por *Aeromonas spp.*



FONTE: GALLANI et al. 2020

As *Aeromonas* também são conhecidas por serem patogênicas aos humanos (RBG Pessoa, 2020). Vários relatos de casos envolvendo infecções por *Aeromonas* foram trazidos à diversidade de manifestações clínicas que essas bactérias podem provocar à saúde humana. Os sintomas variam de diarreia aguda autolimitada a sepse letal; no entanto, feridas, pele, ossos, coração, pulmões, olhos e outros órgãos podem ser potencialmente afetados (RBG Pessoa, 2022). Espécies de *Aeromonas* geralmente associadas a infecções humanas incluem *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. hydrophila*, *A. veronii* (biovars *veronii* e *sobria*) e *A. jandaei* (Lamy et al., 2010).

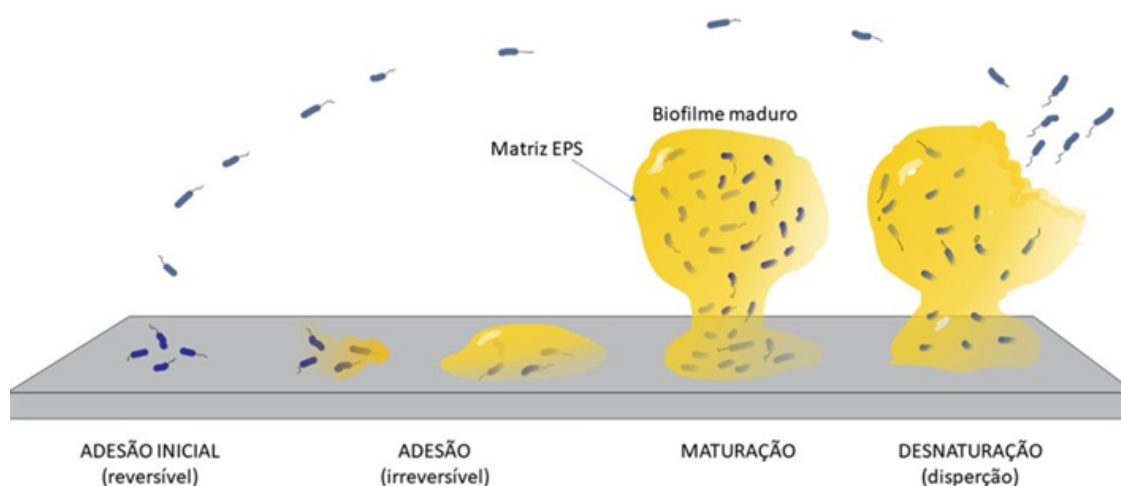
2.1.1.1.1 *Biofilme bacteriano*

Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, houve um avanço sem precedentes no tratamento de doenças bacterianas. Entretanto, o uso incorreto desses antibióticos tem minimizado a sua eficácia, já que isso favorece o aparecimento cada vez maior de cepas microbianas resistentes (Pavão, Moraes, Ribeiro et al.; 2021).

O primeiro estudo sobre biofilmes foi publicado por Zobell em 1943 e, desde aquela época, eles ainda são um fator preocupante nas áreas de alimentos, ambientais e biomédicas. O conceito de biofilme tem emergido gradualmente de estudos científicos durante longo período de tempo, porém, nas últimas duas décadas, essa concepção tem avançado consideravelmente (DE OLIVEIRA et al., 2013). Biofilmes são comunidades de células microbianas que se encontram envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares e associadas a superfícies bióticas ou abióticas (SAUER et al., 2007). As vantagens para que a célula bacteriana se encontre em biofilme são numerosas, nomeadamente no que diz respeito à proteção contra agentes agressivos como: radiação UV, desidratação (a matriz de EPS é altamente hidratada) estresse osmótico, inanição, detergentes ácidos, antibióticos, fagócitos, anticorpos e bacteriófagos (ELASRI; MILLER, 1999; XAVIER et al., 2003). Esta comunidade de células bacterianas fechadas, encerradas em uma matriz polimérica de produção própria e aderida a uma superfície viva ou inerte, constitui um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência em ambientes hostis (LEHNER et al., 2005)

As etapas envolvidas na formação do biofilme (Figura 3) são bastante discutidas em diversas teorias. Dentre todas elas, é consenso que na formação do biofilme, a primeira etapa corresponde ao processo de adesão inicial do microrganismo à superfície a ser colonizada, um processo que pode ser reversível. A etapa seguinte é a produção intracelular de moléculas de adesão, secreção de substâncias poliméricas extracelulares, fixação da estrutura e em seguida a liberação de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme (FARIA, 2013).

FIGURA 3 - Etapas evolutivas na formação do biofilme bacteriano.



FONTE: Pavão, Moraes, Ribeiro et al.; 2021

Um dos principais fatores envolvidos na preservação de biofilmes é o quórum-sensing, que se baseia na liberação de moléculas sinalizadoras e auto-indutores, cuja quantidade aumenta com o aumento da densidade da população bacteriana. As moléculas autoindutoras podem ser detectadas pelas bactérias, dependendo da concentração, levando a mudanças na expressão dos genes e, conseqüentemente, a alterações no comportamento. Isso permite que as bactérias que compõem o biofilme coordenem suas atividades, agindo de maneira semelhante a organismos multicelulares. (MARTIN, 2015).

No ambiente aquícola, as estruturas submersas possibilitam maior área disponível para agregação e adensamento da comunidade microbiana oferecendo um habitat favorável (WU 2017). Os grupos bacterianos autóctones encontrados nesses sistemas microbianos podem produzir compostos metabólicos secundários

com diferentes ações que podem agir sinergicamente ou antagonicamente com outros integrantes (YU et al. 2016; LI et al. 2017; THOMPSON et al. 2002).

A produção de substâncias com ação antimicrobiana pode reduzir a presença de patógenos, mantendo o equilíbrio do sistema e evitando o surgimento de doenças. Assim, a manipulação dessa comunidade expande possibilidades interessantes para a produção de organismos aquáticos com redução do uso de químicos e melhoria do desempenho zootécnico. (DA SILVA et al., 2021). Uma alternativa viável para substituir o uso de antibióticos é a utilização de aditivos fitogênicos como os extratos vegetais ou óleos essenciais, por possuírem propriedades antibióticas, antiparasitárias, imunoestimulantes, que aumentam a proteção contra doenças, atuam sobre o metabolismo imunológico e reduzem a mortalidade na produção animal (KOIYAMA et al., 2014).

2.1.1.1.1 Óleos essenciais

Entre as fragrâncias naturais, os óleos essenciais (OE) são os mais populares. Na natureza, os óleos essenciais desempenham papéis muito importantes na defesa e nos processos de sinalização das plantas contra insetos, herbívoros e microrganismos, incluindo a atração de insetos polinizadores e animais dispersores de frutas, na regulação da água e em interações alelopáticas (Sharmeen et al. 2021). A humanidade tem utilizado produtos naturais ao longo da história como recursos valiosos nas práticas das terapias naturais, com o objetivo de encontrar alívio e tratamento para doenças por meio do uso de plantas, possivelmente representando uma das primeiras maneiras de empregar esses produtos naturais (MUKHERJEE et al., 2010).

É crescente a utilização e a demanda de produtos naturais, em todo o mundo, especialmente devido aos problemas que são atribuídos a inúmeros produtos sintéticos (BANDONI; CZEPAK, 2008) pois são mais benéficos para a saúde humana e a segurança do meio ambiente. Uma grande quantidade de óleos essenciais têm sido amplamente utilizada na agricultura, medicina, indústria alimentícia e cosmética. (Zhao et al., 2018).

Os OE são compostos líquidos, complexos, bioativos, voláteis, com odor e cor característicos, formados a partir de metabólitos secundários de plantas, presentes em todos os órgãos desta, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas e cascas. Eles são formados principalmente por classes de ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, terpenos, fenilpropanonas e álcoois aldeidados. (DE ALMEIDA et al. 2020). Muitos estudos revelam que os óleos essenciais têm atividade contra bactérias tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas. Além disso, vários componentes de óleos essenciais, incluindo o eugenol, o carvacrol e o timol, demonstraram ser ativos contra diferentes espécies de bactérias (Xiao et al., 2020).

No que se diz respeito ao mecanismo de ação, os OE têm a capacidade de permeabilizar a membrana do microrganismo, causando a perda de componentes celulares vitais para o metabolismo bacteriano (PELLEGRINI et al., 2018). Em bactérias, é capaz de degradar a parede celular e romper a membrana citoplasmática, a hidrofobicidade destes afetam a saída de íons, moléculas e outros componentes celulares (BURT, 2004).

A *Melaleuca alternifolia*, comumente conhecida como “Tea tree” (Figura 4), é uma árvore pequena da família Myrtaceae nativa da Austrália (Borotova et al., 2022). Enquanto toda a estrutura acima do solo é colhida e transformada em biomassa, apenas as folhas contribuem para os constituintes no óleo de Tea tree, que são extraídos por destilação a vapor. O OE resultante possui mais de 100 componentes, onde o terpinen-4-ol é encontrado em maior concentração, e um odor medicinal único e distinto com aroma de cânfora (Groot; Smith 2016; Rhind, 2020).

Estudos relataram benefícios positivos do OEMA (Óleo de *Melaleuca alternifolia*) contra uma variedade de bactérias, fungos e protozoários. Evidências in vitro demonstraram que o óleo possui atividade antimicrobiana de amplo espectro, bem como ações antifúngicas e antivirais, e aumenta o fluxo sanguíneo periférico. Propõe-se que o OEMA altere a integridade e a permeabilidade da parede celular das bactérias, iniba a respiração celular e altere a capacidade das células de manter condições de equilíbrio, inibindo funções relacionadas ao crescimento e replicação

celular (Kairey, Lana et al., 2023). É bastante utilizado como rémedio para acometimentos na pele, bem como acne, eczema, picadas de inseto (GROOT; SCHMIDT, 2016).

FIGURA 4 - Visão geral da árvore da *Melaleuca alternifolia* (Tea tree).



FONTE: <https://www.gilistore.com.br/blog/aromaterapia-tea-tree-e-seus-beneficios>.
Acesso em 07/09/2023.

A *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) é uma planta perene que está amplamente distribuída pela região do Mediterrâneo e em regiões temperadas do mundo (HUSSAIN et al., 2010). A hortelã-pimenta (Figura 5), é uma planta da família Lamiaceae e a muito tempo é considerada economicamente importante pois é amplamente utilizada na indústria alimentícia e cosmética devido às suas propriedades aromatizantes (MOGOSAN et al., 2017). O OEMP (Óleo essencial de *Mentha piperita*) é composto principalmente por mentol, mentona, mentofurano, 1,8-cineol e acetato de mentila, porém fatores como condições fisiológicas e ambientais, genéticas e evolução, podem determinar a variabilidade química do óleo essencial de hortelã-pimenta. (Camele et al., 2021)

A Agência Europeia de Medicamentos (AEM) reconhece várias propriedades farmacológicas do óleo essencial de *Mentha piperita* L., incluindo o alívio de sintomas de tosse e resfriados, o tratamento de dores musculares e

neuralgias, bem como aqueles relacionados a distúrbios gastrointestinais (alívio de dor abdominal, flatulência, sensação de repleção, obstipação e diarreia). Outros efeitos biológicos identificados para *M. piperita* incluem atividades inseticidas, antibacterianas, antivirais, antialérgicas, antioxidantes e citotóxicas (Dolghi et al., 2022).

FIGURA 5 - Visão geral da *Mentha piperita* (Hortelã-Pimenta).



FONTE: <https://fitoterapiabrasil.com.br/planta-medicinal/mentha-x-piperita>.

Acesso em: 07/09/2023.

3 JUSTIFICATIVA

A piscicultura tem se modernizado a cada ano no Brasil. O aumento da demanda do Tambaqui fez com que os piscicultores passassem a produzir mais peixes, em seus cativeiros. Acometimentos por parasitos e patógenos são comuns em cativeiros devido ao estresse sofrido pelos espécimes em ambiente limitados e, por isso, os produtores optam pelo uso de quimioterápicos para frear a perda de espécimes.

O manejo inadequado gera estresse ao peixe, deixando-o ainda mais debilitado com possíveis resistências bacterianas. A fim de evitar tais perdas, os produtores usam, muitas vezes de forma indiscriminada, antibióticos nas águas como forma de tratamento podendo debilitar, ainda mais, a saúde do peixe e contaminar as águas. *Aeromonas* são citadas, na literatura, como responsáveis pela maior parte da perda de espécimes por infecção bacteriana e, também, responsáveis por infecções em humanos, consumidor da carne, sendo estas, geralmente, gastrointestinais podendo ser consideradas como um risco emergente à saúde pública.

Tendo em vista tais problemáticas, faz-se necessário a busca por métodos alternativos para o tratamento dos peixes. Os óleos essenciais são conhecidos mundialmente pelos seus usos distintos e são biodegradáveis, não oferecendo risco ao meio ambiente. A *Melaleuca alternifolia* e a *Mentha piperita* são conhecidas devido ao seu potencial antimicrobiano sendo estes um grande potencial no combate ao biofilme bacteriano.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a formação de biofilme de cepas de *Aeromonas spp.* isoladas do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e analisar a atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* no intuito de acrescentar, à futuros estudos científicos, possíveis técnicas terapêuticas para a produção de peixes.

4.1.1 Objetivos Específicos

1. Reativar as cepas de *Aeromonas spp.* previamente isoladas e preservadas em óleo mineral;
2. Avaliar a formação de biofilme de cepas de *A. caviae*, *A. dhakensis*, *A. hydrophila* e *A. veronii*;
3. Avaliar a atividade antibiofilme dos óleos essenciais *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita*.

5 METODOLOGIA

5.1 REATIVAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas, neste trabalho, 10 cepas bacterianas isoladas das brânquias de Tambaquis em estresse (*C. macropomum*) e previamente identificadas, por métodos bioquímicos e moleculares, como *Aeromonas spp.* (D.S.C Marques et.al 2016; R.B.G Pessoa et al. 2020). As cepas foram repicadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubadas em estufa agitadora a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, cada cepa foi semeada em Ágar Nutriente para obtenção de colônias puras e isoladas, incubadas a 37 °C por 24 horas. Após análise de características macroscópicas, as colônias obtidas foram semeadas em placas e tubos de ensaio contendo Ágar Nutriente para serem utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho.

A identificação em nível de gênero e espécie foi feita por DSC Marques (2015) e seguiu metodologia padrão de testes fisiológicos e bioquímicos.

5.1.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados

A formação do biofilme foi avaliada pela técnica descrita por Stepanovic et al. 2000. Os isolados de dez cepas de *Aeromonas spp.* isoladas do peixe tambaqui foram cultivados em caldo BHI por 24h a 37°C. Posteriormente, 200 uL de cada suspensão bacteriana foi aplicada em placas de 96 poços de fundo plano. O experimento foi realizado em triplicata utilizando também um controle negativo. As placas foram incubadas por 24h a 37°C, o conteúdo do poço foi removido e cada poço foi lavado com 250 uL de solução salina 0,9%. Posteriormente, foi realizada fixação com 200 uL de metanol absoluto por 15 min. O metanol foi removido e as placas secaram em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram coradas com 200 uL de cristal violeta durante 5 min. Novamente, cada poço foi lavado por três vezes com solução salina 0,9% e mantido à temperatura ambiente para secagem. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA, comprimento de onda 570 nm e as amostras foram classificadas de acordo com critérios

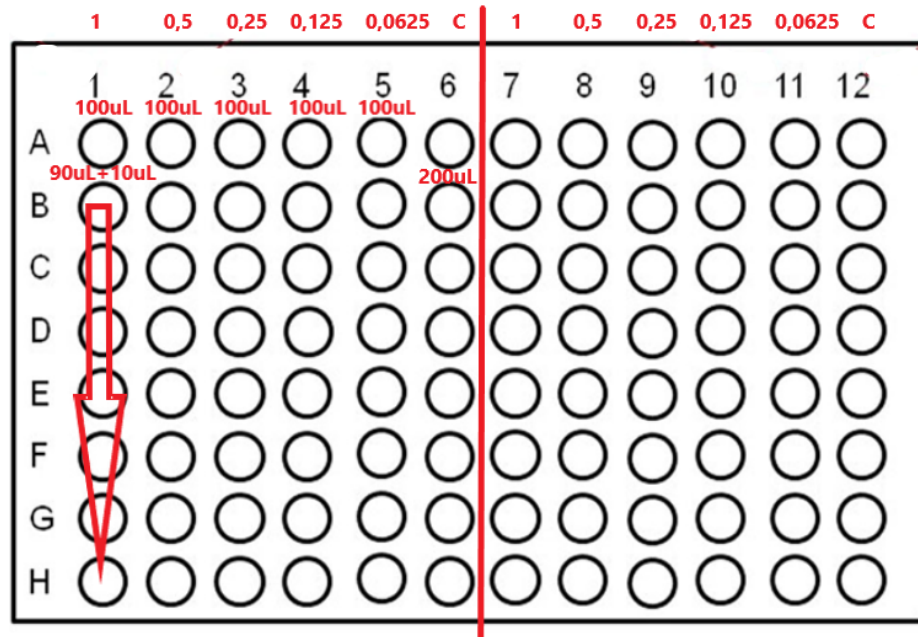
estabelecidos por Stepanovic et al. (2000). O valor da densidade ótica (DOi) foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DOc). Os isolados foram classificados em quatro categorias: não aderente ($DOi \leq DOc$); fracamente aderente (+) ($DOi < DOc \leq 2 \times DOc$); moderadamente aderente (++) ($2 \times DOc < DOi \leq 4 \times DOc$) ou fortemente aderente (+++) ($4 \times DOc < DOi$).

5.1.1.1 Ensaio antibiofilme

Para realização do ensaio de atividade de antibiofilme foi utilizado um protocolo adaptado de Antunes et al. (2010), que se baseia na utilização do cristal violeta em placas de microtitulação de 96 poços. Foi usado para diluição dos óleos Tween 80 a 1%. Neste ensaio foram adicionados em cada poço as suspensões de cada bactéria (concentração final 10^6 UFC/mL), 10µL dos óleos essenciais *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* (em diferentes concentrações baseados no CMI de cada microrganismo (1x mic, 2x mic e 4x mic) e 150µL de caldo Müller Hinton. Um poço foi reservado para o controle de esterilidade do meio de cultura e controle de crescimento do biofilme (controle positivo) como mostra a figura 6. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e o conteúdo dos poços foi removido. Posteriormente, cada poço foi lavado três vezes com solução salina esterilizada. As bactérias que permaneceram aderidas foram fixadas com metanol absoluto por 20 min, aquecidas a 50 °C durante 60 min, e então coradas com cristal violeta a 0,4 % por 25 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido com água destilada, o corante que se ligou ao biofilme foi solubilizado com etanol absoluto por 15 min e a absorbância medida com densidade ótica de 570 nm (Leitor de Elisa Polaris®). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição de formação de biofilme para cada concentração foi determinada de acordo com a fórmula descrita por Jadhav et al. 2013 :

$$\% \text{inibição} = 100 - \frac{\text{OD } 570 \text{ nm amostra}}{\text{OD } 570 \text{ nm controle}} \times 100$$

FIGURA 6 - Esquematização do ensaio antibiofilme.



FONTE: O autor.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas cepas de *A. dakhensis*, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* como mostra a tabela 1.

TABELA 1 - Cepas previamente isoladas do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e reativadas.

Cepas bacterianas
E2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)
E1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)
E1/26 (<i>Aeromonas caviae</i>)
E1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)
E3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)
E1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)
E2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)
E2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)
E2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)
E2/24 (<i>Aeromonas veronii</i>)

Segundo RGB Pessoa (2023), as espécies de *Aeromonas* mais frequentemente associadas a doenças em humanos são *A. hydrophila* (14,5%), *A. caviae* (37,6%), *A. veronii* bv. *Sobria* (27,2%) e *A. dhakensis* (16,5%), representando cerca de 96% dos casos de gastroenterite.

Os estudos apresentados sobre o fator de virulência das *Aeromonas* reiteram a importância da investigação da formação de biofilmes, por essas 10 cepas reativadas, nos tecidos do Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Seguindo o método de Stepanovic et al (2000), as cepas isoladas foram classificadas, como mostra a tabela 2, de acordo com sua capacidade de formação de biofilme.

TABELA 2 - Classificação das cepas de *Aeromonas spp.* quanto à formação de biofilme

Cepas bacterianas	Classificação
E2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)	Fracamente aderente
E1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)	Fracamente aderente
E1/26 (<i>Aeromonas caviae</i>)	Não aderente
E1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	Fracamente aderente
E3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	Fracamente aderente
E1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Fracamente aderente
E2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Moderadamente aderente
E2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Fracamente aderente
E2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Moderadamente aderente
E2/24 (<i>Aeromonas veronii</i>)	Não aderente

Beaz-Hidalgo (2013) relata que todas as espécies de *Aeromonas* móveis produzem um único flagelo polar, que permite que as bactérias nadem em ambientes líquidos. Quando as bactérias crescem em ambientes ou superfícies viscosas, desenvolvem múltiplos flagelos laterais que aumentam a aderência e a formação de biofilme. Esses dois sistemas flagelares foram estudados em várias cepas específicas, como *A. caviae* e *A. hydrophila*. Na tabela 2 pode-se observar que os resultados estão de acordo com o estudo citado.

Duas das três cepas de *A. caviae* (E2/17 e E1/18) se apresentaram como “fracamente aderente” e apenas a cepa E1/26 não apresentou aderência. *A. caviae* é citada em trabalhos como Lamy et al (2010) com uma das cepas capazes de interferir na saúde humana. Sua capacidade de produção de biofilme prova que a cepa apresenta um potencial de infecção e adesão a tecidos.

Gallani et al (2020) diz que entre as bactérias que causam doenças em peixes, a *Aeromonas hydrophila* se destaca como uma das principais causas de mortalidade de peixes na aquicultura. Na tabela, nota-se que todas as quatro cepas de *A. hydrophila* apresentam-se como “fracamente aderente” (E1/14 e E2/35) e “moderadamente aderente” (E2/2 e E2/15) o que corrobora com os resultados de Lynch (2002) de que *Aeromonas hydrophila* forma biofilmes em aço inoxidável com uma arquitetura característica. El-Hossary D et al (2023) diz que as cepas de *A. hydrophila* representam um sério risco para a saúde pública pois o potencial de

prever doenças está correlacionado com o número de genes de virulência presentes e a presença de genes de virulência está principalmente associada à patogenicidade da *A. hydrophila*. Adesinas, hemaglutininas e várias enzimas hidrolíticas estão envolvidas na patogênese das espécies de *Aeromonas*.

Nos últimos anos, cepas de *A. dhakensis* chamaram atenção de cientistas após o relato de duas mortes por bacteremia e fascíte necrosante em Taiwan. De acordo com a tabela 2, as cepas E1/45 e E3/36 foram classificadas como “fracamente aderente” porém trabalhos recentes como Tien-Tien Vicky Lau (2023) relatam que *A. dhakensis* é mais patogênica do que outras espécies de *Aeromonas*, pois tem um efeito citotóxico mais alto demonstrado danos rápidos aos tecidos.

A cepa de *Aeromonas veronii* (E2/24) não apresentou aderência, porém RGB Pessoa (2020) analisou que *A. veronii* é uma potencial produtora de hemolisinas e até foi a causa de uma pneumonia letal que culminou com a síndrome hemofagocítica em um paciente imunocompetente sem histórico de contato com fontes conhecidas de contaminação.

Depois de analisadas a capacidade de formação de biofilme dos isolados, as cepas que apresentaram aderência foram submetidas ao teste antibiofilme com os óleos essenciais *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita*. As cepas que não apresentaram aderência não foram submetidas ao teste.

Para essa etapa, foram utilizados os resultados da CMI (Concentração Mínima Inibitória) de cada óleo anteriormente testada por LIMA, Rennatha Orlayne (2019). Os valores da CMI obtidos nos testes estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3 - Concentração Mínima Inibitória (%) dos óleos essenciais frente *Aeromonas spp.*

Cepas bacterianas	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Mentha piperita</i>
E2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)	0,125	0,25
E1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)	0,125	0,25
E1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	0,125	0,125
E2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0,125	0,25
E3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	0,125	0,25
E1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0,25	0,25
E1/26 (<i>Aeromonas caviae</i>)	0,125	0,25
E2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0,5	0,5
E2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0,25	0,25
E2/24 (<i>Aeromonas veronii</i>)	0,125	0,125

FONTE: LIMA, Rennatha Orlayne 2019 (adaptado).

A tabela 4 e 5 mostrarão os resultados dos ensaios com a *Melaleuca alternifolia* e a *Mentha piperita* respectivamente.

Vários estudos indicam o terpinen-4-ol, presente em mais de 30% da composição do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, como o principal constituinte responsável pela atividade antimicrobiana em diferentes microrganismos, o que é reforçada em estudos como o de Francisconi RS (2020) que comprovou a inibição de biofilmes de *Candida albicans* pelo óleo essencial.

É notável a capacidade de inibição que OEMA apresenta sobre parte das cepas descritas na tabela 4. *A. dhakensis*, anteriormente dita como uma das mais citotóxicas, sofreu inibição. Vê-se que a E1/45 já sofre uma inibição importante com apenas 1x o CMI porém a cepa E3/36 apresenta um resultado intrigante pois o percentual de inibição cai de 22,4% (1x CMI) para 21,7% (2x CMI) e sobe de maneira discreta para 21,9% (4x CMI).

As duas cepas de *A. caviae* responderam ao teste de maneiras distintas. A cepa E2/17 teve uma inibição leve de apenas 23,3% em 1x CMI, caiu para 22,6% (2x CMI) e sobe, de maneira significativa, para 45,2% em 4x CMI. Já a cepa E1/18 não sofreu inibição.

As quatro cepas de *A. hydrophila* também apresentaram resultados diferentes. A cepa E2/2, que sofreu maior inibição, apresentou uma queda de 70,3%

(1x CMI) para 53,7% (2x CMI) e, em seguida, subiu para 86,6% (4x CMI). A cepa E1/14 teve um aumento expressivo de 44,4% (1x CMI) para 85,4% (2x CMI) porém caiu para 84,8% (4x CMI). Ambas as cepas apresentaram resultados satisfatórios. E2/35 não sofreu inibição em 1x CMI e apresentou uma discreta inibição de apenas 23,4% (2x CMI). E2/15 não sofreu inibição em 1x e 2x o CMI, mas sofreu uma leve inibição de 23,4% em 4x CMI.

TABELA 4 - Valores de inibição (%) de biofilmes pelo óleo essencial *Melaleuca alternifolia*.

VALORES DE INIBIÇÃO (%) - <i>Melaleuca alternifolia</i>			
CEPAS BACTERIANAS	1x CMI	2x CMI	4x CMI
E2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)	23,3	22,6	45,2
E1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)	S/A	S/A	S/A
E1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	78	82,9	85
E3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	22,4	21,7	21,9
E2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	70,3	53,7	86,6
E1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	44,4	85,4	84,8
E2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	S/A	23,4	N/T
E2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	S/A	S/A	23,4

LEGENDA - S/A: Sem atividade; N/T: Não testado.

O mentol, presente no OEMP, é um terpenóide que é o principal agente bioativo da família das mentas, possui propriedades antissépticas, antibacterianas, antitumorais e antialérgicas. Sua propriedade antibacteriana foi extensivamente estudada contra algumas cepas patogênicas e não patogênicas por vários autores.

Na tabela 5, pode-se ver que o OEMP apresenta atividade antibiofilme frente às cepas. Diferente dos valores apresentados com o OEMA, as cepas de *A. caviae* foram as que apresentaram o maior índice de inibição. E2/17 e E1/18 tiveram resultados parecidos em 1x CMI (65,3% e 65% respectivamente), 2x CMI (70,4% e 70% respectivamente) e uma pequena diferença em 4x CMI (72,7% e 82,3% respectivamente) demonstrando, assim, uma boa atividade do óleo.

As cepas de *A. dhakensis*, E1/45 e E3/36, sofreram inibição de maneira diferente. E1/45 apresentou uma crescente nos valores de inibição de acordo com o aumento da CMI (34,7%(1x); 46,6% (2x); 70,4%(4x)) apresentando resultados satisfatórios. A cepa E3/36 manteve-se em uma constante com pouca variação de

índice de inibição. Os resultados caíram, de maneira discreta, entre 1x e 2x (72,9% e 72,1% respectivamente) e aumento em 4x CMI (74,2%).

As cepas de *A. hydrophila* foram as que sofreram menos inibição porém se apresentam de maneiras diferentes. E2/2 sofreu apenas 12,6% de inibição na concentração 1x do CMI, porém apresentou um crescimento em 2x (43,3%) e 4x (46%). E1/14 também apresentou uma baixa inibição na concentração 1x (11,4%), teve um aumento em 2x (34,6%) mas caiu em 4x (31,7%). As cepas E2/35 e E2/15 obtiveram resultados não tão satisfatórios. E2/35 teve um decaimento de, pelo menos, 50% entre as concentrações 1x e 2x (11,1% e 5,5% respectivamente). E2/15 também houve queda de acordo com o aumento das concentrações (14,8% (1x); 8,9% (2x)) e não sofreu inibição na concentração 4x.

TABELA 5 - Valores de inibição (%) de biofilmes pelo óleo essencial *Mentha piperita*.

VALORES DE INIBIÇÃO (%) - <i>Mentha piperita</i>			
CEPAS BACTERIANAS	1x CMI	2x CMI	4x CMI
E2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)	65,3	70,4	72,7
E1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)	65	70	82,3
E1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	34,7	46,6	70,4
E3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	72,9	72,1	74,2
E2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	12,6	43,3	46
E1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	11,4	34,6	31,7
E2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	11,1	5,5	N/T
E2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	14,8	8,9	S/A

LEGENDA - S/A: Sem atividade; N/T: Não testado.

Analisando os resultados, vê-se que em algumas cepas inibidas pelo OEMA, houve queda na porcentagem de inibição na concentração 2x (E2/17, E2/2 e E3/36). Mesmo apresentando uma queda na concentração 2x, essas três cepas na voltam a apresentar aumento na inibição concentração 4x elas. El-Hossary D (2023), diz que as bactérias *Aeromonas* formam biofilmes como resposta a circunstâncias ambientais específicas, o que pode explicar tais quedas nas porcentagens em concentração 2x uma vez que é característico das *Aeromonas* spp. se adequarem ao ambiente em que estão inseridas.

É visto que cepas como E1/18, E2/15 e E2/35 não apresentaram a

inibição desejada pelo OEMA. A falta de atividade do óleo pode estar relacionada a fatores como a patogenicidade das cepas, mas também a questões de interação bioquímica entre o óleo e a cepa no processo de inibição. Outro caso de inatividade na inibição de biofilme pelo OEMA foi citado por CDS Silva et al (2019) que testou a inibição de *Listeria monocytogenes* pelo OEMA em carne moída. O estudo apontou que o OEMA não foi eficaz em amostras inoculadas com suspensão a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, independentemente do tempo de armazenamento. No entanto, com suspensões em menor concentração como de suspensão, como $4,6 \times 10^4$ UFC/mL, o número de células viáveis diminui sendo, assim, uma compensação entre a interação do óleo com a matriz e o espaço livre para atuar contra o menor número de cepas inoculadas na amostra.

No caso do OEMP os resultados foram mais consistentes. O óleo apresentou uma inibição satisfatória sobre as oito cepas com destaques para E2/17 e E1/18 (*Aeromonas caviae*). EJAZ et al (2020) avaliou a atividade do mentol, componente antimicrobiano presente no OEMP, frente às cepas de *P. aeruginosa* e *B. subtilis* e concluiu que o mentol, presente no óleo, apresentou uma inibição razoável do biofilme, enquanto a inibição máxima de 99,5% foi alcançada pelo extrato bruto de mentol. Esse resultado ilustra que o OEMP pode ser usado para alterar a resistência aos antibióticos de muitos micróbios causadores de doenças. Mesmo como uma baixa porcentagem de inibição, o OEMP também mostra potencial para inibição das cepas de *A. hydrophyla*.

7 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* apresentaram resultados satisfatórios de inibição das cepas, porém estudos são necessários para entender, de uma forma mais clara, a relação dos óleos com a inibição dos biofilmes. Testes bioquímicos, genéticos e microscopia eletrônica, por exemplo, podem ajudar a entender como os óleos essenciais escolhidos atuam na estrutura da bactéria e os danos causados ao biofilme.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. M. DE; FRANCO, M. R. B. Influência da dieta alimentar na composição de ácidos graxos em pescado: aspectos nutricionais e benefícios à saúde humana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 7–14, mar. 2006.
- ANTUNES, Ana Lúcia Souza et al. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. **Apmis**, v. 118, n. 11, p. 873-877, 2010.
- ARAUJO-LIMA C. A. R. M.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. **Sociedade Civil Mimirauá**; Brasília: CNPq., 1998, 186 pp.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.446-475, fev. 2008.
- BALLICK, M.; COX, P. Plants, people and culture: the science of ethnobotany. New York. **Scientific American Library**, 1997.
- BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: **Edufes**, 2008. 624p
- BARÇANTE, Bruna; DE SOUSA, Alexandre Benvindo. Características zootécnicas e potenciais do tambaqui (*Colossoma macropomum*) para a piscicultura brasileira. **PubVet**, v. 9, p. 287-347, 2015.
- BARONY, G. M. et al. New hosts and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from Brazilian native species and Nile tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 117, n. 1, p. 1-11, 2015.
- BOROTOVÁ, Petra et al. Chemical and biological characterization of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Plants**, v. 11, n. 4, p. 558, 2022.
- BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A.. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 50, n. 1-2, p.33-44, 15 set. 1999.
- BURT, Sara. 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.
- CAMELE, Ippolito; GRULOVÁ, Daniela; ELSHAFIE, Hazem S. Chemical composition and antimicrobial properties of *Mentha× piperita* cv. 'Kristinka' essential oil. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1567, 2021.
- CARVALHO, E. V. M. M. et al. Physiological and biotechnological approaches of the

amazonian tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). **Marine biology series. Nova Science, New York**, v. 50, 2014.

CARVALHO, Elba Verônica Matoso Maciel et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Fisheries science**, v. 78, n. 4, p. 879-887, 2012.

CLUTTERBUCK, A. I. et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v. 121, n. 1-2, p.1-17, mar. 2007.

DA SILVA, Jéssica Lucinda Saldanha et al. Avaliação quantitativa e bioatividade de um biofilme perifítico oriundo de piscicultura. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 20, n. 2, p. 175-179, 2021.

DE ALMEIDA, Jhenyfer Caroliny; DE ALMEIDA, Priscilla Prates; GHERARDI, Sandra Regina Marcolino. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutr. Time**, v. 17, n. 01, p. 8623-8633, 2020.

DE CARVALHO, Carolina Tavares; JUNIOR, Robélio Mascoli; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê. O uso indiscriminado de antibióticos e os impactos nos ambientes aquáticos. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 12, n. 2, 2016.

DE JESUS, Cícera Maria; BEZERRA, Katia Santos; SANTOS, Elton Lima. Estudo das espécies de peixes cultivadas no Núcleo de Piscicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 1, p. 137-162, 2021.

DE OLIVEIRA, Maíra MM; BRUGNERA, Danilo F.; PICCOLI, Roberta H. Biofilmes em indústrias de laticínios: Aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 390, p. 65-73, 2013.

DOLGHI, Alina et al. Chemical and antimicrobial characterization of *Mentha piperita* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils and in vitro potential cytotoxic effect in human colorectal carcinoma cells. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 6106, 2022.

EJAZ, R. et al. Anti-biofilm potential of menthol purified from *Mentha piperita* L.(Mint). **Biological and Clinical Sciences Research Journal**, v. 2020, n. 1, 2020.

ELASRI, Mohamed O.; MILLER, Robert V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2025-2031, 1999.

EL-HOSSARY, Dalia et al. Antibiotic Resistance, Virulence Gene Detection, and

Biofilm Formation in *Aeromonas* spp. Isolated from Fish and Humans in Egypt. **Biology**, v. 12, n. 3, p. 421, 2023.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária –**Exigências Nutricionais do Tambaqui**. 2011.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.(2022). In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

FARIA, Raimundo Nonato. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) LP Queiroz (Caesalpinioideae) e da inibição de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos. 2013.

FERNÁNDEZ-BRAVO, Ana FIGUERAS, Maria José. An Update on the Genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. **Microorganisms**,[S.L.],v. 8, n. 1, p. 129, 17 janeiro 2020.

FRANCISCONI, Renata Serignoli et al. Antibiofilm efficacy of tea tree oil and of its main component terpinen-4-ol against *Candida albicans*. **Brazilian oral research**, v. 34, 2020.

FUJIMOTO, Rodrigo Y.; COSTA, Helrik C. da; RAMOS, Fabrício M. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 5-10, 2012.

GALLANI, Sílvia Umeda et al. Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104512, 2020.

GARCIA, Fabiana et al. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, v. 410, p. 51-56, 2013.

GASTALHO, Soraia et al. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, [s.l.]centro de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GONÇALVES Pessoa RB, et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p.81-94, maio 2019.

GROOT, Anton C.; SCHMIDT, Erich. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. **Contact dermatitis**, v. 75, n. 3, p. 129-143, 2016.

HERNÁNDEZ, Félix et al. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 466-485, 2007.

HILSDORF, Alexandre Wagner Silva et al. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, n. 2, p. 993-1027, 2022.

HU, M. et al. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. **Letters in applied microbiology**, v. 55, n.3, p. 224-233, 2012.

HUSSAIN, Abdullah I. et al. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1827- 1836, 2010.

IGBINOSA, Isoken H. et al. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

JACOMETO, Carolina Bessalho et al. Genetic variability of tambaqui (Teleostei: Characidae) from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 5, p. 481-487, 2010.

JADHAV, Snehal et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 125-130, 2013.

KAIREY, Lana et al. Efficacy and safety of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for human health—A systematic review of randomized controlled trials. **Frontiers in pharmacology**, v. 14, p. 1116077, 2023.

KOIYAMA, Natália Thaís Gonçalves et al. Desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com mistura de aditivos fitogênicos na dieta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 225-231, 2014.

KUBITZA, F. Os caminhos para uma piscicultura sustentável. **Panorama da Aquicultura**, v. 20, n. 119, p. 16-23, 2010.

KULKARNI, Roshan R. et al. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfttcephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal Of Pest Science**, [s.l.], Springer Nature. v. 86, n. 4, p.713-718, 5 maio 2013.

KUMAR, Saurav et al. Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 2, p. 564-573, 2013.

LAMY, Brigitte et al. Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 67, n. 1, p. 9-14, 2010.

LAU, Tien-Tien Vicky et al. Flagellar motility mediates biofilm formation in *Aeromonas dhakensis*. **Microbial pathogenesis**, v. 177, p. 106059, 2023.

LEHNER, Angelika et al. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of food protection**, v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005.

LEITE, M. C.; CROZARA, M. A.. Fitoterapia e o uso indiscriminado do chá de *Cannabis sativa*. **Simpósio**. São Camilo: S/e. p. 1 – 3, 2015

LI Z et al. 2017. Microbial succession in biofilms growing on artificial substratum in subtropical freshwater aquaculture ponds. **FEMS Microbiology Letters** 364: 1-7.

LIMA, Rennatha Orlayne Henrique Albuquerque. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Aeromonas* spp. isoladas do peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*), 2019.

MARQUES, Diego Santa Clara. Isolamento e Identificação Taxonômica de *Aeromonas* sp. em Tambaquis (*Colossoma macropomum*) e Análise do Perfil de Lectinas Séricas Frente a um Desafio com os Isolados Endógenos, 2015.

MARQUES, Diego SC et al. Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge. **Environmental technology**, v. 37, n. 23, p. 3030-3035, 2016.

MARTIN, Claire et al. Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 1, p. 43-66, 2015.

MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J.; DORIA, C. R. C.; MENEZES JR, J. B. "Avaliação espermática pós descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)." **Acta Amazônica**, 38.2, 365-368, 2008.

MOGOSAN, Cristina et al. A comparative analysis of the chemical composition, anti-inflammatory, and antinociceptive effects of the essential oils from three species of *Mentha* cultivated in Romania. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 263, 2017.

MUKHERJEE, P. K.; VENKATESH, M.; GANTAIT, A. MANDER, L.; LIU, HUNG-WEN. Ayurveda in modern medicine: development and modification of bioactivity. In: Comprehensive natural products II. Hardbound: **Elsevier**, 2010. Chap. 3.14, p. 479507.

ABU-ELALA, N. et al. Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and *gyrB*-based phylogeny of motile *Aeromonas* species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. **Letters in applied microbiology**, v. 61, n. 5, p. 429-436, 2015.

PAVÃO, Danilo Pavão et al. Capacidade de formação de biofilme por cepas

bacterianas e ação antibiofilme do extrato de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). 2021.

PEDROZA FILHO, Manoel Xavier et al. O mercado de peixes da piscicultura no Brasil: estudo do segmento de supermercados. **Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura**, 2020.

PEDROZA FILHO, Manoel Xavier et al. O mercado de peixes da piscicultura no Brasil: estudo do segmento de supermercados. **Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura**, 2020.

PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário 2020. Disponível em: < <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>> Acesso em 10 jun 2020.

PELLEGRINI, Marika et al. Characterization of essential oils obtained from Abruzzo autochthonous plants: Antioxidant and antimicrobial activities assessment for food application. **Foods**, v. 7, n. 2, p. 19, 2018.

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, p. 104273, 2020.

PESSOA, R. B. G. et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 130, p.81-94, maio 2019.

PESSOA, Rafael Bastos Gonçalves et al. *Aeromonas* and human health disorders: Clinical approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 13, p. 868890, 2022.

PESSOA, Rafael Bastos Gonçalves et al. Fluorescent nanoprobe based on quantum dots conjugated to Cramoll to assess surface carbohydrates of *Aeromonas* spp. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1867, n. 7, p. 130373, 2023.

PESSOA, Rafael Bastos Gonçalves et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. **Microbial pathogenesis**, v. 130, p. 81-94, 2019.

RHIND, Jennifer. **Essential Oils: A Comprehensive Handbook for Aromatic Therapy**. Singing Dragon, 2020.

SÁ, Marcelo. **Limnocultura: limnologia para aquicultura**. Editora Blucher, 2023.

SAHA, D.; PAL, J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 311-316, 2002.

SANTOS EF, Tavares-Dias M, Pinheiro DA, Neves LR, Marinho R das GB, Dias MKR. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. **Acta Amaz**

43(1):105–11.

SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, Washington, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SHARMEEN, Jugreet B. et al. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021.

SOARES, K. M. DE P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1–10, 2012.

SOUSA, Raniere Garcez Costa et al. AVALIAÇÃO DO GANHO DO PESO DE TAMBAQUI CULTIVADO COM DIFERENTES TAXAS DE PROTEÍNAS NA ALIMENTAÇÃO. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 6, n. 1, p. 40-45, 2016.

SOUSA, Raniere Garcez Costa et al. Avaliação do ganho do peso de tambaqui cultivado com diferentes taxas de proteínas na alimentação. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 6, n. 1, p. 40-45, 2016.

STARLIPER, Clifford 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.

STEPANOVIĆ, Srdjan et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

STRINGARO, Annarita; COLONE, Marisa; ANGIOLELLA, Letizia. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha* spp. Essential Oils. **Medicines**, v. 5, n. 4, p. 112, 2018.

TAVARES-DIAS, M. et al. **Sanidade do tambaqui *Colossoma macropomum* nas fases de larvicultura e alevinagem**. 2013.

TAVARES-DIAS, Marcos; MARIANO, W. S. **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015.

THOMPSON FL et al. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. **Aquaculture** 203: 263-278.

TROMBETA, Thiago Dias et al. Caracterização produtiva e análise do ambiente institucional da piscicultura em Monte Alegre–Pará. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 5473-5497, 2020.

VAL, Adalberto Luis; ROLIM, Paulo Ramos; RABELO, Hermógenes. Situação atual da aqüicultura na Região Norte. **Aqüicultura no Brasil: bases para um**

desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/MCT, p. 247-266, 2000.

VERÔNICA MATOSO MACIEL DE CARVALHO, Elba. Abordagens biotecnológicas do Tambaqui (*Colossoma macropomum*). 2007.

W.Wang, S.Tan, J.Luo, H.Shi, T.Zhou, Y.Yang, Y.Jin, X.Wang, D.Niu, Z.Yuan, D.Gao, R.Dunham, Z.Liu, GWAS analysis indicated importance of NF- κ B signaling pathway in host resistance against motile *Aeromonas* septicemia disease in catfish, **Mar.Biotechnol.**2019

WU Y. 2017. Periphyton: functions and application in environmental remediation. China: **Elsevier**.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de biotecnologia**, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2003.

XIAO, Shuzhen et al. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 20, p. 1-10, 2020.

YU E et al. 2016. Surface-attached and suspended bacterial community structure as affected by C/N ratios: relationship between bacteria and fish production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 32: 1-9.

ZHAO, Jianglin et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the flower volatile oils of *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum* and *Fagopyrum cymosum*. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 182, 2018.

ZOBELL, Claude E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 39-56, 1943.