

Atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae e do timol frente à *Aeromonas hydrophila*

Cláudia Majolo¹, Ana Maria Souza Silva², Patrícia Castro Monteiro³, Franmir Rodrigues Brandão⁴, Francisco Célio Maia Chaves⁵, Edsandra Campos Chagas⁶

1. Química industrial (Universidade do Vale do Taquari, Brasil). Doutora em Ciências Veterinárias (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil). Analista da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, Brasil.

✉ claudia.majolo@embrapa.br

🌐 <http://lattes.cnpq.br/0518081964024688>

🏠 <http://orcid.org/0000-0001-7554-9514>

2. Bióloga (Centro Universitário Nilton Lins, Brasil). Mestranda em Ciências Pesqueiras nos Trópicos (Universidade Federal do Amazonas, Brasil).

✉ juliana-lester@hotmail.com

🌐 <http://lattes.cnpq.br/7683564639198867>

🏠 <http://orcid.org/0000-0002-4043-9777>

3. Bióloga (Centro Universitário Nilton Lins, Brasil). Doutora em Ciências Pesqueiras nos Trópicos (Universidade Federal do Amazonas, Brasil).

✉ pcmonteiro17@gmail.com

🌐 <http://lattes.cnpq.br/6225188225246386>

🏠 <http://orcid.org/0000-0003-1569-2436>

4. Biólogo (Centro Universitário Nilton Lins, Brasil). Doutor em Ciências Pesqueiras nos Trópicos (Universidade Federal do Amazonas, Brasil).

✉ franmirbrandao@hotmail.com

🌐 <http://lattes.cnpq.br/1956971778761011>

🏠 <http://orcid.org/0000-0002-1753-8742>

5. Agrônomo (Universidade Federal do Ceará, Brasil). Doutor em Horticultura (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil). Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil.

✉ celio.chaves@embrapa.br

🌐 <http://lattes.cnpq.br/1859956031845736>

🏠 <http://orcid.org/0000-0002-4164-8511>

6. Engenheira de Pesca (Universidade Federal do Amazonas, Brasil). Doutora em Aqüicultura (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil). Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil.

✉ edsandra.chagas@embrapa.br

🌐 <http://lattes.cnpq.br/5384445167700495>

🏠 <http://orcid.org/0000-0001-9170-9725>

RESUMO

Dentre os agentes etiológicos envolvidos com doenças bacterianas na piscicultura destaca-se a *Aeromonas hydrophila*, sendo o emprego de plantas com potencial bioativo uma alternativa para o seu controle em substituição ao uso de antibióticos. Várias propriedades biológicas têm sido atribuídas ao óleo essencial e extratos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial, extrato aquoso e etanólico de *L. sidoides*, bem como de seu componente majoritário frente à *A. hydrophila*. Para isso, o extrato etanólico foi obtido através do contato das folhas trituradas com álcool etílico e posterior filtração a vácuo e remoção do solvente. O extrato aquoso por maceração com água destilada e filtração a vácuo, e o óleo essencial por hidrodestilação. Posteriormente, a atividade antibacteriana foi avaliada determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) através da técnica de microdiluição. Os resultados deste estudo permitiram evidenciar a atividade antibacteriana tanto dos dois tipos de extratos de *L. sidoides*, bem como de seu óleo essencial e do timol frente à *A. hydrophila*. Entretanto, verificou-se maior atividade do timol, seguida do extrato etanólico, óleo essencial e extrato aquoso. A CIM e a CBM para o timol foram de: 78,13 µg mL⁻¹ e 104,17 µg mL⁻¹, para o extrato etanólico: 520 µg mL⁻¹ e 625 µg mL⁻¹, para o óleo essencial e extrato aquoso: 1.250 µg mL⁻¹ para CIM e CBM. Evidenciou-se neste estudo forte atividade antibacteriana do timol e extrato etanólico.

Palavras-chave: Concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima, alecrim-pimenta, terpeno.

Antibacterial activity of essential oil and extracts of *Lippia sidoides* and thymol against *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT

Among the aetiological agents involved in bacterial diseases in fish culture, *Aeromonas hydrophila* stands out, with the use of bioactive potential plants as an alternative for its control, replacing the use of antibiotics. Several biological properties have been attributed to the essential oil and extracts of *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. Thus, the objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of the essential oil, aqueous and ethanolic extract of *L. sidoides*, as well as its major component against *A. hydrophila*. For this, the ethanolic extract was obtained by contacting the crushed leaves with Ethyl alcohol and subsequent vacuum filtration and solvent removal. The aqueous extract by maceration with distilled water and vacuum filtration, and the essential oil by hydrodistillation. Subsequently, the antibacterial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) by the microdilution technique. The results of this study allowed to demonstrate the antibacterial activity of both types of *L. sidoides* extracts, as well as of its essential oil and the thymol against *A. hydrophila*. However, thymol activity was higher, followed by ethanolic extract, essential oil and aqueous extract. The MIC and MBC for thymol were: 78.13 µg mL⁻¹ and 104.17 µg mL⁻¹ for the ethanolic extract: 520 µg mL⁻¹ and 625 µg mL⁻¹ for the essential oil and for the aqueous extract were: 1,250 µg mL⁻¹ for MIC and MBC. A strong antibacterial activity of thymol compound and ethanolic extract was evidenced in this study.

Keywords: Minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration; alecrim-pimenta; terpen.

Introdução

As bacterioses destacam-se como importantes fatores limitadores da produtividade em piscicultura, provocando atraso no crescimento dos peixes e muitas vezes, sendo responsáveis por elevadas taxas de mortalidade (CARRASCHI et al., 2011).

O gênero *Aeromonas* sp. compreende bactérias ubíquas que são conhecidas por desempenhar vários papéis no meio ambiente, sendo descritas pela primeira vez como patógenos de peixes (MARTINO et al., 2015). As infecções causadas por *Aeromonas* estão entre as doenças mais comuns na criação de peixes, sendo as infecções por *Aeromonas* móveis, como a

espécie *Aeromonas hydrophila*, de ocorrência mundial (NOGA, 2010; SAAVEDRA et al., 2004).

As aeromonoses têm ampla gama de hospedeiros e podem causar alta mortalidade. Os tratamentos de populações criadas em cativeiro usando antibacteriano são limitados e geram preocupações com o desenvolvimento da resistência bacteriana e disseminação ambiental (STARLIPER et al., 2015). Essa resistência aos antibióticos convencionais é um problema que constitui uma grave preocupação global. O maior risco para a saúde do consumidor que envolve a utilização de antibióticos em animais não é dada pelos resíduos, mas pelo desenvolvimento de resistência em bactérias dos mesmos animais, e pode

levar a falhas na terapêutica veterinária, bem como o risco de transferência de bactérias resistentes dos animais ao homem ou genes portadores de informação que codificam esta resistência (ERRECALDE, 2004).

Diante dessa situação, o uso de produtos naturais vem ganhando destaque na sanidade animal, pois podem ser fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitos e microrganismos. Além disso, tais produtos não são prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do homem, com relação aos resíduos farmacológicos presentes nos alimentos de origem animal. Por isso, espécies da família Verbenaceae especialmente o gênero *Lippia* L. vêm sendo exploradas também na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu uso potencial e facilidade de produção agrônômica em escala (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013).

Diversas espécies desse gênero, têm sido utilizadas na aquicultura devido ao seu potencial bioativo para o tratamento de doenças parasitárias e bacterianas (HASHIMOTO et al., 2016; SOARES et al., 2016; SUTILI et al., 2016). Dentre as espécies, a *L. sidoides* se destaca em razão da sua forte atividade antibacteriana frente à *A. hydrophila* registrada por Majolo et al (2017).

O efeito terapêutico de *L. sidoides* se deve principalmente à presença de timol, uma substância com forte atividade antimicrobiana, que é o principal componente no óleo essencial e extratos da planta (MATOS; OLIVEIRA, 1998; MAJOLO et al., 2017). Dentre os micro-organismos sensíveis aos extratos ou óleo essencial de *L. sidoides*, destacam-se a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *A. hydrophila* (SILVA et al., 2010; CASTRO et al., 2011; FABRI et al., 2011; VERAS et al., 2014; MAJOLO et al., 2017).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar através de testes *in vitro* com extratos e óleo essencial de *L. sidoides* e seu componente majoritário timol frente à *A. hydrophila*.

Material e Métodos

Localização

O estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Piscicultura e no de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Amazônia Ocidental, localizada em Manaus, Estado do Amazonas.

Óleos essenciais e extratos

Partes aéreas de *L. sidoides* foram coletadas de plantas adultas pertencentes à Coleção de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental, onde as condições de cultivo são controladas e padronizadas de modo a produzir matéria prima utilizada em estudos fitoterápicos. A planta foi identificada e depositada no Instituto Agrônomo do Norte (IAN Herbarium), com Voucher n° 191733, de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae depositado no Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental, localizado em Belém do Pará, estado do Pará, com data de entrada em 04 de outubro de 2013 e Localidade de coleta: Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

Após as coletas dos materiais vegetais, foram realizadas as extrações dos óleos essenciais pelo método de hidrodestilação a vapor, em aparelho tipo Clevenger (Amitel). Em cada extração foram colocadas amostras de 500 g de folhas e inflorescências em balão volumétrico de 12.000 mL acoplado a uma manta aquecedora, sendo adicionada água destilada até a imersão das folhas. O tempo de extração foi de 2 horas, contado do momento em que a água no balão começou a ferver. Ao final da extra-

ção, o óleo essencial foi coletado e armazenado a 4 °C para posterior uso nos ensaios “*in vitro*”. Uma alíquota do óleo essencial foi utilizada para caracterização química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Para o extrato etanólico, como solvente foi utilizando álcool etílico 90%. Foram adicionados 100 g de folhas trituradas em 900 mL de solvente, acondicionado em um frasco âmbar e mantido em temperatura ambiente num período de 7 dias. Decorrido o período de extração, foi realizada a filtração a vácuo e posteriormente a remoção do solvente com auxílio de um rotaevaporador rotatório, em banho termostatizado em temperatura de 50 °C. Para eliminação dos resíduos de solvente o balão foi mantido por 24 h em estufa a 50 °C por 24 h. Após estufa, o extrato foi resuspenso com Dimetil sulfoxide (DMSO) (Dinâmica®) 1:1, e mantido sob refrigeração até o momento dos bioensaios.

Para o extrato aquoso, como solvente foi utilizada água destilada. Foram adicionados 100 g de folhas trituradas em 900 mL de solvente, agitadas durante 30 minutos. Após, o material foi filtrado à vácuo e acondicionado em um frasco âmbar e mantido sob refrigeração até o momento dos bioensaios.

Ensaios de atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos (etanólico e aquoso), óleo essencial e timol foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 poços, conforme NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003), sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada composto frente à *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) definida como a menor concentração que promove a inibição do crescimento bacteriano. A confirmação do crescimento bacteriano nos poços foi realizada por meio da aplicação da solução aquosa estéril de Cloreto de Trifeniltetrazólio-Êxodo® 0,5% (TTC), revelada pelo aparecimento de uma coloração avermelhada.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos etanólico e aquoso, óleo essencial e timol, foram realizadas semeaduras em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Müller Hinton (Difco®) a partir de todos os poços onde não houve revelação de crescimento bacteriano. Após o período de incubação foi realizada a leitura das placas, sendo a CBM correspondente à menor concentração onde não for evidenciado crescimento bacteriano.

Avaliação estatística

Os resultados obtidos são apresentados com média ± erro padrão da média. Os dados de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do óleo essencial, extrato aquoso e etanólico de *L. sidoides*, e do timol foram avaliados por análise de variância (one-way ANOVA) e teste de Tukey (P < 0.05) pelo software Sigmaplot 12.0.

Resultados e Discussão

Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial *L. sidoides* foram timol (76,6%), ortocimeno (6,3%) e betacariofileno (5,0%), como já relatado por Majolo et al (2017). Este perfil também foi confirmado em outros estudos, com variações apenas na proporção dos componentes, o que pode ter influência da condição climática, sazonalidade, estágio de desenvolvimento das plantas, entre outros fatores (SANTOS et al., 2004; ESPER et al., 2015; MARCIAL et al., 2016). Nos extratos etanólicos e aquoso tem sido descrito o componente timol como majoritário, conforme Matos; Oliveira (1998), além da presença majoritária de compostos fenólicos (GARMUS et al., 2015). A estes compostos fenólicos é atribuída a forte atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais; mas também

deve-se ressaltar a existência de efeito sinérgico dos compostos majoritários e minoritários (DIDRY et al., 1993; HYLDGAARD et al., 2012).

Neste estudo foi confirmada a atividade antimicrobiana do timol, extrato etanólico e aquoso e óleo essencial de *L. sidoides*, bem como do composto isolado timol frente à *Aeromonas hydrophila*. Os valores de concentração inibitória e bactericida mínima são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial e extratos de *Lippia sidoides* e do composto Timol / **Table 1.** Antibacterial activity of essential oil and extracts of *Lippia sidoides* and thymol against *Aeromonas hydrophila*.

Fração ou componente	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Timol	78,12 ^b	104,17 ^b
Extrato etanólico	520,83 ^b	625 ^b
Extrato aquoso	1250 ^a	1250 ^a
Óleo essencial	1250 ^a	1250 ^a

As médias de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CIM = Concentração Inibitória Mínima CBM = Concentração Bactericida Mínima / The mean of each column followed by the same letter do not differ by Tukey's test at 5% probability. MIC = Minimum Inhibitory Concentration MBC = Minimum Bactericidal Concentration

Avaliando-se as diferenças de atividades, verifica-se a maior atividade do timol e do extrato etanólico, seguida do extrato aquoso e óleo essencial de *L. sidoides*. A CIM e a CBM para o timol foram de 78,13 e 104,17 g mL^{-1} , para o extrato etanólico de 520 g mL^{-1} e 625 g mL^{-1} , para o extrato aquoso e óleo essencial de 1.250 g mL^{-1} tanto a CIM quanto a CBM. Apesar desta variação significativa dos resultados, todas as CIM's apresentam-se abaixo de 5000 g mL^{-1} , sendo consideradas, portanto, com forte atividade de inibição bacteriana (BUSSMANN et al., 2010).

O timol representa o componente majoritário tanto do óleo essencial, como do extrato hidro-alcoólico de *L. sidoides* (MATOS E OLIVEIRA, 1998), e sabe-se que o timol, assim como outros terpenos são capazes de causar a desintegração da membrana externa de bactérias Gram-negativas, como *A. hydrophila* liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade e a despolarização da membrana citoplasmática (BURT, 2004; XU et al., 2008). Klein et al. (2013) relatam um estudo onde o timol foi o componente mais efetivo frente a bactérias de origem alimentar como *A. hydrophila*, cuja CIM foi 40 g mL^{-1} e a CBM de 100 g mL^{-1} , já Veras et al. (2013) verificaram atividade similar entre o óleo essencial de *L. sidoides* e o timol contra *Pseudomonas aeruginosa* com valores de CIM de 512 g mL^{-1} .

Para os extratos de *L. sidoides*, as propriedades antimicrobianas já foram demonstradas por bioautografia, como dadas em seu extrato por flavonoides e terpenos, apresentando um MIC de 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Pseudomonas aeruginosa*, que também é Gram-negativa e oxidase positiva, assim como *A. hydrophila* (FABRI et al., 2011), sendo este resultado muito próximo ao obtido em nosso estudo para a CIM e CBM do extrato etanólico de *L. sidoides*. Apesar do extrato aquoso ter obtido desempenho inferior, assim como o óleo essencial, o mesmo possui a mais fácil e rápida forma de obtenção, utilizando apenas água como solvente, o que deve ser levado em consideração na possível aplicação "in vivo" deste extrato. Como observado em outros trabalhos, a associação entre óleos e extratos ou com o timol também poderia potencializar a atividade antibacteriana, sendo uma sugestão para novas avaliações.

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *L. sidoides* em paralelo ao timol frente a diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi relatada por Veras et al. (2017), que observaram valores de CIM variando de 128 a 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$, resultado esse, próximo ao obtido neste estudo para o timol. Já para o óleo essencial de *L. sidoides*, observou-se a atividade antibacteriana superior à apresentada neste estudo, e isto pode ser atribuída provavelmente ao maior percentual de timol em sua composição (84,9%) do que o obtido neste estudo que foi

de 76,6%. Esses autores observaram também que a associação do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol com antibióticos convencionais melhora sua ação antibacteriana.

O óleo essencial de *Origanum vulgare* assim como o de *L. sidoides* apresenta como componente majoritário o timol, apresentando forte atividade antibacteriana frente a *Aeromonas* sp., e o timol quando avaliado de forma isolada, potencializou ainda mais a sua atividade com valores de CIM variando de 10 a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente à *Aeromonas salmonicida* (HEO et al., 2012).

Atualmente, a maioria dos antibióticos não é mais eficaz no controle de doenças na aquicultura, especialmente em doenças bacterianas sistêmicas de peixes, devido ao aumento da incidência de resistência a antibióticos entre bactérias patogênicas. Além disso, muitos países proibiram antibióticos no uso da aquicultura devido a preocupações com a saúde pública e riscos ambientais (LEE et al., 2009), e já que produtos derivados de plantas não são prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do homem, no que refere-se aos resíduos farmacológicos presentes nos alimentos de origem animal (SOARES; TAVARES DIAS, 2013), os resultados do presente estudo indicam que o timol, extratos (etanólico e aquoso) e óleo essencial de *L. sidoides* apresentam um forte potencial para substituir antibióticos comerciais como agentes antibacterianos para uso aquícola no controle de *A. hydrophila*.

Conclusões

O timol, extratos etanólico e aquoso de *Lippia sidoides*, bem como seu óleo essencial apresentaram forte atividade antibacteriana frente *Aeromonas hydrophila*. A maior atividade foi apresentada pelo timol e pelo extrato etanólico, seguida do óleo essencial e extrato aquoso, sugerindo futuras aplicações *in vivo* por meio de banhos ou aplicação em rações para avaliar a eficácia "in vivo" em peixes cultivados como método alternativo para o controle de *A. hydrophila*, considerando avaliações prévias de toxicidade para estabelecer limites seguros de uso comercial, visto que, muitas vezes, a dosagem terapêutica para o organismo-alvo pode ser próxima à dosagem letal para o organismo não-alvo ou ainda causar alterações no crescimento e desenvolvimento, na reprodução, nas respostas patológicas, fisiológicas e comportamentais.

Agradecimentos

Agradecemos à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (MP2 - 02.12.01.020.00.00) e ao CNPq (Processo: 485993/2013-9) pelo suporte financeiro e à FAPEAM pela bolsa concedida.

Referências bibliográficas

- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BUSSMANN, R. W.; MALCA-GARCÍA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; CHAIT, G.; DÍAZ, D.; POURMAND, K.; JONAT, B.; SOMOGY, S.; GUARDADO, G. AGUIRRE, C.; CHAN, R.; MEYER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A.; EFFIO-CARBAJAL, J.; FRÍAS-FERNANDEZ, F.; BENITO, M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 132, n. 1, p. 101-108, 2010.
- CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; CASTRO, M. P.; BORTOLUZZI, N. L.; GÍRIO, A. C. F. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 3, p. 579-583, 2011.
- CASTRO, C. E.; RIBEIRO, J. M.; DINIZ, T. T.; ALMEIDA, A. C.; FERREIRA, L. C.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n. 3, p. 293-297, 2011.
- DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*, v. 48, p. 301-304, 1993.
- ERRECALDE, J. O. *Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública*. Roma: FAO (FAO Producción y Sanidad Animal. Estudio, 162), 61p. 2004.

- ESPER, R. H.; GONCALEZ, E.; FELICIO, R. C.; FELICIO, J. D. Fungicidal activity and constituents of *Ageratum conyzoides* essential oil from three regions in São Paulo state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-4, 2015.
- FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 13, p. 183-189, 2011. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000200009>
- GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 68-75, 2015.
- HASHIMOTO, G. S. O.; MARINHO NETO, F.; RUIZ, M.L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; MARTINS, M. L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 450, p. 182-186, 2016.
- HEO G. J.; KIM C. H.; PARK S. C.; ZOYZA M.; SHIM G. W. Antimicrobial activity of thimol against pathogenic Gram-negative bacteria of fishes. **The Philippine Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, p. 103-106, 2012.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, art. 12, p. 1-24, 2012.
- KLEIN, G.; RÜBEN, C.; UPMANN, M. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. **Current Microbiology**, v. 67, p. 200-208, 2013.
- LEE, S.; NAJIAH, M.; WENDY, W.; NADIRAH, M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. **Frontiers of Agricultura in China**, v. 3, n. 3, p. 332-336, 2009.
- MAJOLO, C.; ROCHA, S. I. B. da; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 5, p. 1-8, 2017.
- MARCIAL, G.; LAMPASONA, M. P.; VEJA, M. I.; LIZARRAGA, E.; VITURRO, C. I.; SLANIS, A.; JUÁRES, M. A.; ELECHOSA, M. A.; CATALÁN, C. A. N. Intraspecific variation in essential oil composition of the medicinal plant *Lippia integrifolia* (Verbenaceae). Evidence for five chemotypes. **Phytochemistry**, v. 122, p. 203-212, 2016.
- MARTINO, M. E.; FASOLATO, L.; CARDAZZO, B. *Aeromonas*. **Encyclopedia of Food and Health**, 2015, p. 61-67.
- MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 79, p. 84-87, 1998.
- NCCLS. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6.ed. Wayne, Pennsylvania, (NCCLS. Document, M7-A6, v23, n. 2.), 2003.
- NOGA, E. J. **Fish disease**. 2nd Ed. US: Wiley-Blackwell, 2010. p. 185-186.
- SAAVEDRA, M. J.; GUEDES-NOVAIS, S.; ALVES, A.; REMA, P.; TACÃO, M. Resistance to Beta-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Microbiology**, v.7, p.207-211, 2004.
- SANTOS, F. J. B.; LOPES, J. A. D.; CITO, A. M. G. L.; OLIVEIRA, E. H.; LIMA, S. G.; REIS, F. A. M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 504-506, 2004.
- SILVA, V. A.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, A. V.; HIGINO, J. S. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.
- SOARES, A. M. S.; PENHA, T. A.; ARAÚJO, S. A.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; COSTA-JUNIOR, L. M. Assessment of different *Lippia sidoides* genotypes regarding their acaricidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 401-406, 2016.
- SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.
- STARLIPER, C.; KETOLA, H.; NOYES, A.; SCHILL, W.; HENSON, F.; CHALUPNICKI, M.; DITTMAN, D. 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.
- SUTILLI, F. J.; VELASQUES, A.; PINHEIRO, C. G.; HEINZMANN, B. M.; GATLIN, D. M.3RD, BALDISSEROTTI, B. Evaluation of *Ocimum americanum* essential oil as an additive in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. **Fish Shellfish Immunology**, v. 56, p. 155-161, 2016.
- VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2013.
- VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and Thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the Bacterium isolated from root canals. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 2014, Article ID 471580, 5 p., 2014.
- VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. Enhancement of aminoglycosides and beta-lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 2790-2795, 2017.
- XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 174-179, 2008.