



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPONENTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE AOS PATÓGENOS *Aeromonas hydrophila* E *Streptococcus agalactiae*

Maria Carolina Bertolo **Bonin**¹; Ana Lucia **Penteado**²; Sonia Cláudia do Nascimento de **Queiroz**³;

Nº 20406

RESUMO – O consumo e cultivo de peixes contaminados com *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* podem ocasionar doenças infecciosas tanto em seres humanos como em animais. Para sanar este problema utilizam-se antibióticos, porém seu uso indiscriminado pode causar resistência microbiana, deixar resíduos no alimento e contaminar o meio ambiente. Então, têm sido realizadas buscas por novos antimicrobianos eficazes e que causem menor impacto ao meio ambiente, aos animais e consumidores finais. Neste trabalho foi avaliado o potencial antimicrobiano de carvacrol, carvona, citral, D-limoneno, nerolidol, terpineol, terpinoleno, timol, eucaliptol, eugenol, linalol, L-limoneno, α -pineno, β -cariofileno, β -pineno e γ -terpineno, através de difusão em ágar e pela concentração inibitória mínima (CIM) contra *A. hydrophila* e *S. agalactiae*. Os compostos carvacrol, citral, terpinoleno e timol foram os que apresentaram halos de inibições maiores que 32mm e 25,5mm, frente à *A. hydrophila* e à *S. agalactiae*, respectivamente. Os resultados indicam que esses compostos podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos com ação inibitória contra os patógenos estudados.

Palavras-chaves: Carvacrol; Citral; Bacterioses; Piscicultura; Terpinoleno; Timol.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Farmácia, UNIFAJ, Jaguariúna-SP; mariacarolinabertolo@gmail.com

2 Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP;

3 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; sonia.queiroz@embrapa.br



ABSTRACT – *The consumption and cultivation of fish contaminated with Aeromonas hydrophila and Streptococcus agalactiae can cause infectious diseases in both humans and animals. Antibiotics are used to solve these problems, but their indiscriminate use can cause microbial resistance, leave residues in the food, and contaminate the environment. In this context, studies have been carried out to find new antimicrobials that are effective and also have low impact on the environment, animals and consumers. In this work, the antimicrobial potential of carvacrol, carvone, citral, D-limonene, nerolidol, terpineol, terpinolene, thymol, eucalyptol, eugenol, linalool, L-limonene, α -pinene, β -caryophyllene, β -pinene and γ -terpinene, was evaluated through diffusion in agar and by the minimum inhibitory concentration (MIC) against A. hydrophila and S. agalactiae. The compounds carvacrol, citral, terpinolene and thymol presented inhibition diameter greater than 32mm and 25.5mm to A. hydrophila and S. agalactiae, respectively. The results indicate that these compounds can contribute to the development of new products with an inhibitory action against the studied pathogens.*

Keywords: Carvacrol; Citral; Bacteriosis; Fish-farming; Terpinolene; Thymol.

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em nível internacional apresentam como causa principal microrganismos patogênicos, em especial as bactérias (SILVA, 2010), as quais ocasionam toxidade alimentar em humanos, majoritariamente por não ter presença de alterações organolépticas aparentes (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2013). Alimentos com maior risco de contaminação no conceito microbiológico são os peixes e frutos do mar. Diversos fatores corroboram para essa transmissão, desde o cultivo desses animais, o processo de armazenamento, até o preparo do alimento pelo consumidor final, os quais são ingeridos geralmente crus ou malcozidos (SANTIAGO *et al.*, 2013).

Em 2018 foram produzidos mundialmente 179 milhões de toneladas de pescado e, destes, mais de 85% destinaram-se ao consumo humano (COLPANI, 2020). A alta demanda foi motivada pelo notável valor nutritivo dos pescados, posto que possui alto teor de vitaminas e proteínas importantes para saúde humana (CAMPOS, 2019; MENEZES, 2006). Assim, a aquicultura vem com o papel de produzir em larga escala esses organismos aquáticos (CARVALHO, 2012). Contudo, há fatores que alteram a sanidade nos viveiros, como as altas concentrações de animais, a qualidade da água, o acúmulo de materiais orgânicos, temperatura e salinidade do ambiente



(KUBITZA, 2005). O conjunto dessas condições torna o sistema de produção intensivo de pescados suscetível à contaminação por patógenos (CARVALHO, 2012; KUBITZA, 2005;), sendo a *Aeromonas hydrophila* e o *Streptococcus agalactiae* os patógenos mais comuns encontrados e os maiores causadores de mortalidade em peixes de água doce e salgada (MARTINS *et al.*, 2011).

A *Aeromonas hydrophila* é um bacilo Gram-negativo, patogênico para seres humanos e animais (CANGUSSU, 2019; SILVA, 2010), possui mobilidade, podendo ser encontrado no solo, na água (doce, salgada, potável e de reuso), no esgoto e em alimentos (LEIRA *et al.*, 2016). Quando presentes nos peixes causam nestes, diminuição do consumo de alimentos e manifestações por todo o corpo, incluindo ulcerações, hemorragias e septicemia dos seus órgãos internos (KUBITZA, 2005). Nos viveiros é causadora de elevada mortalidade, antes mesmo do desenvolvimento de sinais clínicos, ou entre 2 a 10 dias após a presença desta bactéria (LEIRA *et al.*, 2016). Esta bactéria pode produzir exotoxinas e multiplicar-se mesmo em temperaturas consideradas adequadas para refrigeração (CANGUSSU, 2019; PEIXOTO *et al.*, 2012).

Streptococcus agalactiae é um coco Gram-positivo, capaz de contaminar diversos hospedeiros, sendo considerado um patógeno emergente de peixes (TRABULSI *et al.*, 1989; FIGUEIREDO, 2006), podendo causar meningites e septicemias em humanos e animais (TRABULSI *et al.*, 1989). Nos peixes acarreta modificação da motilidade, lesões na pele, necrose do sistema nervoso e sinais como os ocasionados por *A. hydrophila*, tais manifestações ocasionam comumente mortalidade nesses animais (KUBITZA, 2005; MARCUSSO *et al.*, 2017).

O uso indiscriminado de antibióticos acarreta na seletividade de cepas bacterianas resistentes, colocando em risco a saúde humana e animal (PONTES, 2017). Por isso se faz necessário o fomento de novos compostos com ação antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2008), com menor toxicidade aos organismos aquáticos e de baixo impacto ambiental (SILVA *et al.*, 2012; TRAESEL, 2011), bem como a adoção de medidas preventivas e boas práticas de biossegurança no manejo aquícola, para redução de perdas e de contaminações (KUBITZA, 2005).

Óleos essenciais podem ser utilizados como uma alternativa ao uso de antibióticos, sendo eles uma mistura de compostos voláteis, lipofílicos e de odores característicos (FERREIRA, 2014). São oriundos de metabólitos secundários de todas as partes das plantas, com variações de função e concentração de acordo com fatores, como espécie vegetal, sazonalidade e métodos de extração (MORAIS, 2009). Estes compostos desempenham múltiplas funções, dentre elas a ação antibacteriana (RODRIGUES, 2017). Os compostos carvacrol, citral, timol e terpinoleno são componentes dos óleos essenciais, que desempenham funções antibacterianas comprovadas e utilizadas na indústria. Em temperatura ambiente, os três primeiros se apresentam na forma líquida



enquanto o último como cristais (ALMEIDA, 2015; AZAMBUJA, 2016; AZAMBUJA, 2017; OLIVEIRA, 2008). Possuem mecanismo de ação semelhante aos dos antibióticos, alterando a permeabilidade da membrana plasmática ou inibindo os sistemas enzimáticos das bactérias (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2007; FERREIRA, 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de compostos presentes em alguns óleos essenciais, frente aos patógenos de importância para a piscicultura: *A. hydrophila* e *S. agalactiae*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental – Raquel Ghini da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, no período de agosto de 2019 a março de 2020.

2.1 Patógenos bacterianos

Os patógenos de origem animal utilizados neste estudo foram o *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813) e a *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), doados pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia Andre Tosello.

2.2 Preparo das culturas bacterianas

As culturas de *S. agalactiae* e *A. hydrophila* foram ativadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de TSA inclinado, com auxílio de uma alça estéril, e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o crescimento destes microrganismos, com auxílio de uma alça esterilizada, as colônias foram repicadas, separadamente, para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril, para os testes de “screening” e em 5 mL de Trypticase Soy Broth (TSB) estéril para os testes de concentração inibitória (CIM). As concentrações das suspensões bacterianas foram ajustadas para aproximadamente 1×10^8 UFC/mL, na escala MacFarland, com auxílio do equipamento densimat (Biomerieux).

Para controle da concentração de bactéria inoculada nos testes foram realizadas contagens destes microrganismos para cada experimento por meio de diluições do inóculo inicial em água peptonada. Sendo elas a diluição inicial a solução salina para o “screening” e TSB para CIM, sendo transferidas para soluções seriadas de 1 a 6. E então, realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das diluições representadas pelos números 5 e 6, sendo 1 mL de cada diluição repicadas para toda a superfície das placas de Petri contendo meio TSA fundido à



45⁰C. Em seguida, foi realizada a homogeneização do meio com o inóculo, seguido de resfriamento dentro da câmara e incubação em estufa bacteriológica à 35 ± 2°C por 24 horas.

2.3 “Screening” dos compostos isolados de óleos essenciais

Utilizou-se para a avaliação da atividade antimicrobiana o método de difusão em ágar por disco, realizado conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019), para avaliar o potencial antibacteriano de 16 compostos puros, presentes em alguns óleos essenciais, e sua concentração conforme mostra a Tabela 1.

Para avaliação do potencial antibacteriano desses compostos foram utilizadas 16 placas de Petri descartáveis estéreis de 9 cm, uma para cada composto testado. A solução salina descrita no item anterior contendo o patógeno foi transferida com auxílio do SWAB, para o meio Tryptic Soy Agar (TSA), previamente vertido na placa de Petri. Em seguida, foi depositado no centro destas placas, com o auxílio de uma pinça esterilizada, um disco de papel de filtro estéril, contendo 5µL de cada composto descritos na Tabela 1. Os compostos estavam na forma líquida, exceto o timol, que por estar na forma de cristais, foi necessário realizar sua diluição. Os compostos foram utilizados sem diluição (puros) e com diluição utilizando o solvente hexano (timol) em concentração de 250mg/ml. As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 ± 2°C por 24 horas. Após esse período, foi feita a medição do halo de inibição com régua milimétrica e a classificação de acordo com a reatividade de 0 a 4 para teste de difusão em ágar, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019). O critério para seleção dos compostos para os testes de CIM e CBM foi a apresentação de halo de inibição bem delimitados e igual ou maior que o controle Florfenicol®. Cada experimento foi executado em triplicata, sendo cada repetição uma placa de Petri. Foram realizadas contagens dos patógenos estudados para controle do inóculo inicial destes microrganismos, conforme o item anterior. Para controle positivo foi utilizado disco de Florfenicol®, que é um dos poucos antibióticos aprovados para tratamento de peixes, e o controle negativo foi utilizado o solvente hexano, por ter sido utilizado para diluir o timol.



Tabela 1. Compostos encontrados em alguns óleos essenciais e as concentrações testadas contra os patógenos *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.

Nome do composto	Concentração (mg/ml)	Nome do composto	Concentração (mg/ml)
Carvacrol	Puro	Nerolidol	Puro
Carvona	Puro	Terpeneol	Puro
Citral	Puro	Terpinoleno	Puro
D-Limoneno	Puro	Timol	250mg/ml
Eucaliptol	Puro	α -Pineno	Puro
Eugenol	Puro	β -Cariofileno	Puro
Linalol	Puro	β -Pineno	Puro
L-Limoneno	Puro	γ -terpineno	Puro

Substâncias testadas em diferentes concentrações: com diluição em hexano (timol) e sem diluição (forma pura, conforme adquirida comercialmente).

2.4 Determinação das Concentrações Inibitória e Bactericida Mínima

Foi realizada a pesagem individual de 0,1g de cada um dos compostos em um balão volumétrico de 1ml, estéril e, em seguida foi adicionado a esse balão o meio de cultura TSB, previamente preparado e estéril acrescido de Tween 80 a uma concentração de 1%, formando a solução mãe. Em seguida, foi realizada agitação manual para homogeneização do composto com o meio. Posteriormente foi feita a diluição seriada desta solução mãe (A) para 11 *ependorfs*, previamente esterilizados, nomeados pelas letras do alfabeto de B a L, nas concentrações detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração (mg/ml) dos compostos da diluição seriada em seus respectivos tubos.

Tubo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Concentração (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,05

Para avaliação da concentração inibitória mínima foram utilizadas microplacas de 96 poços descartáveis e estéreis. Em cada poço foi adicionado 100 μ l de cada diluição seriada de A L de cada composto, em triplicata, conforme descrito anteriormente. Em seguida foi adicionado separadamente em cada poço 100 μ l de suspensão bacteriana (1×10^8 UFC/mL de *A. hydrophila* ou *S. agalactiae*) em caldo TSB, resultando em 200 μ l de volume final. Foi realizada leitura após a inoculação das bactérias (0 horas) de cada placa em espectrofotômetro a 620nm, previamente agitada por 20s, para não ocorrer precipitação dos compostos e do patógeno. Em seguida a placa foi incubada em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e realizada a observação de crescimento e uma nova leitura em espectrofotômetro em 620nm e agitação de 20s.



Após 24 horas da incubação das microplacas de 96 poços com as diluições dos compostos puros e o inóculo de cada microrganismo foi realizado o teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Para isso, foram retirados 10µl de cada poço da microplaca utilizada para o teste de CIM e transferido para placas de Petri previamente vertidas contendo o meio de cultura Mueller Hinton. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e após esse período foi realizada a leitura quanto à presença ou ausência em UFC. Logo após a realização da CBM foi adicionado a cada um dos poços das microplacas de 96 poços, uma solução reveladora de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio a 0,5% para confirmação visual da inibição. O composto em presença de célula apresenta coloração vermelha.

Cada experimento foi realizado em triplicata, utilizados como controles negativos o Cloranfenicol® com patógeno e o meio de cultura sem inóculo. Como controle positivo foi inoculado o patógeno ao seu meio de crescimento TSB.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de “screening” dos compostos puros

As atividades antibacterianas dos 16 compostos testados contra *A. hydrophila* e *S. agalactiae* é apresentada na Tabela 3. Os compostos nerolidol e β -cariofileno não mostraram zona de inibição detectável para *A. hydrophila*. Carvacrol, citral, timol e terpinoleno foram os que apresentaram os maiores halos de inibição, reatividade 4 (conforme descrito no item 2.3), classificada como forte, apresentando zonas de inibição \geq a 32mm contra *A. hydrophila*. Memar *et al.* (2017) descreveram Carvacrol e timol como inibidores do crescimento de bactérias Gram positivas e negativas, pela alteração da membrana celular desses microrganismos. A utilização de óleos essenciais vem sendo estudada para substituição de antibióticos na indústria e carvacrol tem demonstrado atividade antimicrobiana efetiva em diversos estudos, como o realizado por Liu *et al.* (2020), em que seu uso evitou o surgimento de cepas resistentes de *A. hydrophila* aos antibióticos usuais.

Carvacrol, citral, timol e terpinoleno apresentaram atividade inibitória para *S. agalactiae* com inibição \geq 26,5mm. Os compostos timol e terpinoleno apresentaram halos bem definidos, como ilustra a Figura 1. Para esse patógeno foi possível verificar que um número de compostos (cinco) não apresentou nenhum efeito antibacteriano (Tabela 3), sendo eles D-limoneno, eucaliptol, L-limoneno, β -Pineno e γ -terpineno. Esse número de compostos sem atividade talvez ocorra devido à diferenciação na composição da membrana plasmática das bactérias Gram positivas e Gram negativas, conforme descrito por Oliveira (2008) que observou que os óleos essenciais inibem com

maior frequência as bactérias Gram negativas, conforme observado no presente trabalho com a *A. hydrophila*.

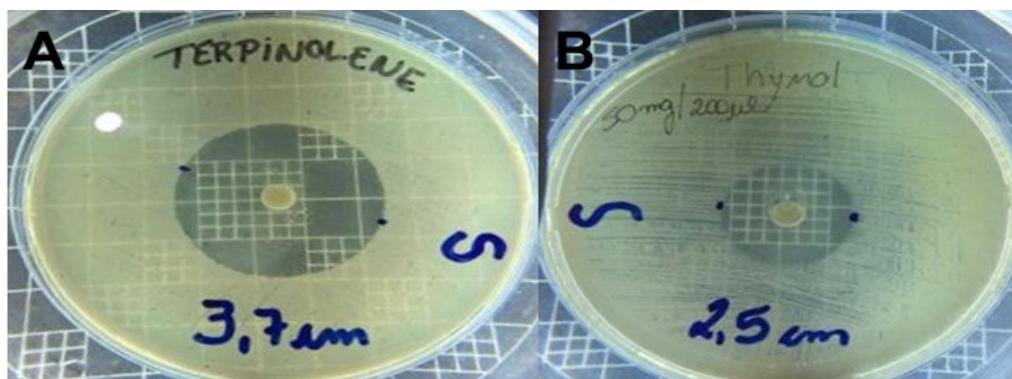


Figura 1: Halos de inibição A- Terpinoleno e B- Timol (250 mg/ml), frente *Streptococcus agalactiae* (Fonte: Maria Carolina Bertolo Bonin).

Tabela 3. Média do halo de inibição (mm) formado pelos compostos avaliados frente à *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.

Composto	<i>A. hydrophila</i> (mm) ⁱ	<i>S. agalactiae</i> (mm) ⁱ
Carvacrol	53,7 ± 7,0	50,0 ± 10,0
Carvona	33,3 ± 7,3	12,0 ± 1,0
Citral	48 ± 24,5	44,3 ± 18,8
D-Limoneno	15,5 ± 0,7	0,0
Eucaliptol	12,3 ± 0,5	0,0
Eugenol	27 ± 2,65	18,0 ± 2,6
Linalol	20,0 ± 5,7	11,7 ± 1,5
L-Limoneno	16,0 ± 5,7	0,0
Nerolidol	0,0	5,3 ± 4,7
Terpeneol	35,3 ± 9,9	18,3 ± 5,9
Terpinoleno	32,0 ± 3,5	32,7 ± 4,0
Timol	52,3 ± 14,8	26,5 ± 2,1
α-Pineno	21,5 ± 9,2	13 ± 14,7
β-Cariofileno	0,0	3,3 ± 5,8
β-Pineno	11,5 ± 0,7	0,0
γ terpineno	9,7 ± 0,6	0,0
Controle (Florfenicol®)	39,7 ± 3,5	33 ± 4,0
Controle (Hexano)	0,0	0,0

ⁱn=3 ± desvio padrão.

Com base nesses resultados, os compostos carvacrol, citral, timol e terpinoleno foram escolhidos para o teste CIM, por apresentarem atividade antibacteriana para ambos os patógenos.

O número de pesquisas relacionadas às funções dos óleos essenciais e seus compostos isolados são crescentes, tais compostos são descritos como antimicrobianos promissores frente importantes bactérias patogênicas de origem alimentar, tais como *Staphylococcus aureus*,



Escherichia coli, dentre outros (MEMAR *et al.*, 2017). Contudo não foram encontrados estudos suficientes para comparação dos resultados obtidos no presente estudo, frente às mesmas bactérias avaliadas, *A. hydrophila* e *S. agalactiae*.

3.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Os resultados dos testes CIM, que avalia se o micro-organismo foi inibido e CBM se o organismo foi eliminado, dos quatro compostos selecionados frente aos patógenos estudados estão descritos na Tabela 4. Os compostos avaliados apresentaram inibição das bactérias em baixas concentrações ($\leq 12,5\mu\text{g/ml}$), sendo que o carvacrol foi o que apresentou melhor atividade para ambos os patógenos, em concentrações em torno de $0,8\mu\text{g/ml}$ nos testes CIM e CBM para *A. hydrophila* e em concentrações de $0,39\mu\text{g/ml}$ e $1,5\mu\text{g/ml}$, respectivamente para CIM e CBM contra *S. agalactiae*. Tais resultados podem ser visualizados na Figura 2, com a presença ou ausência de células bacterianas pela solução reveladora de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio a 0,5%, que revela uma coloração vermelha na presença de cepas bacterianas vivas.

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g/ml}$ de carvacrol, citral, terpinoleno e timol para *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.

Composto	Concentração Inibitória Mínima (CIM)		Concentração Bactericida Mínima (CBM)	
	<i>A. hydrophila</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>S. agalactiae</i>
Carvacrol	0,78125	0,390625	0,78125	1,5625
Citral	3,125	1,5625	3,125	1,5625
Terpinoleno	3,125	6,25	6,25	12,5
Timol	6,25	1,5625	12,5	6,25

O potencial antimicrobiano dos compostos carvacrol e timol foi demonstrado por DU *et al.* (2015) frente a importantes bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, bactéria Gram negativa de alta patogenicidade, em concentrações entre 187 e $375\mu\text{g/ml}$ para testes CIM e de 375 a $750\mu\text{g/ml}$ para testes CBM. Tais compostos foram utilizados conjuntamente com antibióticos no cultivo *in vivo* de frangos para corte. Comparativamente, observou-se no presente estudo que doses bem inferiores de carvacrol e timol mostraram efeito bactericida para *A. hydrophila* e *S. agalactiae* do que a observada para *E. coli*, que apresentou menor sensibilidade para os compostos. Marinelli *et al.* (2019) realizaram estudo da ação antibacteriana do carvacrol para bactérias Gram positivas e negativas e observaram um aumento de 50 a 90% na inibição do crescimento de *S. agalactiae*, com concentrações entre 256 e $512\mu\text{g/ml}$. A grande diferença encontrada é provavelmente devido ao uso de cepas isoladas de origens diferentes.

Citral apresentou atividade para *S. agalactiae* em concentrações menores que 1,6µg/ml no teste CIM e no teste de CBM. Contra *A. hydrophila* os valores foram menores que 3,2µg/ml para CIM e CBM. Saddiq e Khayyat (2010) descreveram o Citral como agente promissor para redução do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus*.

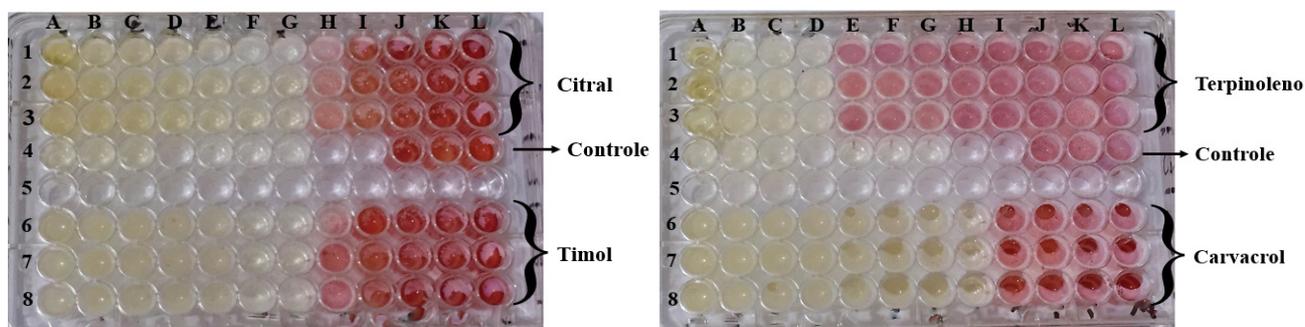


Figura 2: Placa de 96 poços, contendo os compostos: Citral (inibição de A-G), Timol 250mg/ml (inibição de A-G), Terpinoleno (inibição de A-D) e Carvacrol (inibição de A-H) respectivamente, todos com a presença do patógeno *S. agalactiae*. Sendo a linha 4 os controles, de A a C controle negativo, e de J a L controle positivo (Fonte: Maria Carolina Bertolo Bonin).

4 CONCLUSÃO

Concluiu-se que carvacrol, citral, terpinoleno e timol apresentaram atividade antibacteriana para *A. hydrophila* e *S. agalactiae*, em baixas concentrações nos testes CIM e CBM. O composto carvacrol, apresentou atividade antimicrobiana em menor concentração (0,78µg/ml) frente aos dois patógenos. Esses compostos têm potencial para serem utilizadas como substitutos aos antibióticos atuais, contra os patógenos estudados, podendo contribuir assim tanto para a saúde dos animais quanto para a segurança da alimentação humana.

5 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida. Ao projeto BRS Aqua (01.17.02.001.03.08), parceria celebrada entre o BNDES, FEA e Embrapa, com apoio financeiro do BNDES, SAP/MAPA, e contrapartida da Embrapa.

6 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019. 874 p.

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 26 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei, 2015.

AZAMBUJA, W. **Carvacrol**. Paraná, 2016. Disponível em: <<https://www.oleosessenciais.org/carvacrol/>>. Acesso em: 27 jul. 2020.



AZAMBUJA, W. **Citral**. Paraná, 2017. Disponível em: <<https://www.oleosessenciais.org/citral/>>. Acesso em: 27 jul. 2020.

CAMPOS, E. **Consumo de peixes nunca foi tão alto no Brasil, 2018**. Disponível em: <<https://canalrural.uol.com.br/programas/consumo-peixes-nunca-foi-cao-alto-brasil-71704/>>. Acesso em: 8 maio 2019.

CANGUSSU, L. **Aeromonas ssp**: atlas microbiologia da água. Disponível em: <<https://www.luciacangussu.bio.br/atlas/aeromonas-spp/>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

CARVALHO, E. C. **Identificação fenotípica e molecular de bactérias patogênicas associadas à criação de peixes amazônicos**. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

COLPANI. **O protagonismo do Brasil na produção mundial de pescado**. 2020. Disponível em: <<https://www.grupoaguasclaras.com.br/o-protagonismo-do-brasil-na-producao-mundial-de-pescado>>. Acesso em: 15 jul.2020.

DU, E. *et al.* In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 58, dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente, **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 193-206, jun. 2007.

FERREIRA, A. R. A. **Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

FIGUEIREDO, H.C.P. *et al.* *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.4, p.678-680, ago. 2006.

KUBITZA, F. **Antecipando-se às doenças na tilapicultura**. Panorama da Aquicultura, v. 15, n. 89, p. 15-23, jun. 2005.

LEIRA, M. H. *et al.* Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil – uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 44-59, 1 set. 2016.

LIU, W. *et al.* Carvacrol promotes intestinal health in Pengze crucian carp, enhancing resistance to *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 17, n. 100325, p. 1-9, jul. 2020.

MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; MARINHO-NETO, F.; Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.

MARINELLI, L. *et al.* Carvacrol prodrugs as novel antimicrobial agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 178, n. 0, p. 515-529, set. 2019.

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; HIPOLIOTO, M.; CATROXO, M.H.B. **A importância da piscicultura e algumas doenças virais e bacterianas pisceas**. Campinas-SP, 2011. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2011_2/psicultura/index.htm>. Acesso em: 20 jul. 2020.

MEMAR, M. Y. *et al.* Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents. **Reviews In Medical Microbiology**, United States, v. 28, n. 2, p. 63-68, abr. 2017.



MENEZES, M. E. da S. **Valor nutricional de espécies de peixes (água salgada e estuário) do Estado de Alagoas**. 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia). Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, ago. 2009.

OLIVEIRA, A. B. A. de *et al.* Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista Hcpa**, v. 30, n. 3, p. 279-285, jun. 2010.

OLIVEIRA, F. F. de. **Caracterização físico-química de amostras de óleo pinho e estudo da ação de sistemas tensoativos na atividade antimicrobiana de ativos fenólicos**. 2008. 194 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PEIXOTO, L. J. S. *et al.* *Aeromonas spp.*: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 3, p. 453-461, 2012.

PONTES, M. A. N. de. **Investigação da ação antibacteriana do monoterpene Citral frente as cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL**. 2017. 49 f. TCC (Graduação em Farmácia) - Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – PB.

RODRIGUES, J. A. *et al.* A versatilidade no uso dos óleos essenciais. In: VIANNA, U. R.; CARVALHO, J. de O.; CARVALHO, J. R. de (Org.). **Tópicos especiais em Ciência Animal VI**. Espírito Santo: [S.n.], 2017. Cap. 29. p. 1-413.

SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 1, p. 89-93, set. 2010.

SANTIAGO, J. de A. S. *et al.* **Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados: revisão**. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 2, p. 92-103, dez. 2013.

SILVA, P. R. S. **Manual das doenças transmitidas por alimentos**. 2010. 73 f. Monografia (Especialização em Alimentos) - Etec Benedito Storani, Jundiaí-SP.

SILVA, S. R. *et al.* Influência de óleos essenciais na inibição do desenvolvimento microbiano em alimentos. In: CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 7., 2012, Palmas, Tocantins. **Anais**. Tocantins: CONNEPI, 2012. v. 5, p. 1-6.

SMITH, P. R. *et al.* Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to antimicrobial use in animals**. Oxford: WilleyBlackwell, 2008. p. 207-216.

TRABULSI, L. R. *et al.* **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1989. p. 157, 164-165.

TRAESEL, C. K. *et al.* Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 278-284, fevereiro, 2011.