

inCiência

Iniciação Científica
Embrapa



Anais da X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

Embrapa

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

Regina Caetano Quisen
Editora Técnica

Embrapa
Brasília, DF
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

69010-970

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

cpaa.sac@embrapa.br

Unidade responsável pelo conteúdo:

Embrapa Amazônia Ocidental

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *André Luiz Atroch, Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa e Maria Perpétua Beleza Pereira.*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

CD-ROM (2013): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Embrapa Amazônia Ocidental.

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (10. : 2013: Manaus, AM).

Anais... / X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental; editora: Regina Caetano Quisen. – Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013.

1 CD-ROM : color. ; 4 ¾ pol.

ISBN 978-85-7035-340-5

1. Comunicação científica. 2. Iniciação científica. 3. Anais. I. Quisen, Regina Caetano. II. Título.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais de Plantas Medicinais no Controle de Bactérias Isoladas de Peixes Cultivados

Antônia Valcléia Praia do Nascimento
Edsandra Campos Chagas
Cláudia Majolo
Francisco Célio Maia Chaves

Resumo

A criação intensiva de tambaqui (*Colossoma macropomum*) vem crescendo no Brasil. Com essa intensificação aumenta-se a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas, tornando frequente o uso de antibióticos no controle dessas doenças. Contudo, o uso indiscriminado desses produtos gera efeitos negativos nos peixes e ao meio ambiente, como o desenvolvimento de bactérias resistentes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum*, *Piper callosum* e *Curcuma longa* no controle de bactérias isoladas de peixes cultivados. Os óleos foram extraídos por hidrodestilação e caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas in vitro pelo método de microdiluição em placas com diluições de 2.500, 5.000, 10.000, 20.000, 40.000 e 80.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando-se as cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus* sp. Os resultados obtidos

mostram que os óleos essenciais de *C. longa*, *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. callosum* não foram capazes de inibir o crescimento de *A. hydrophila* e *Streptococcus* sp. nas concentrações avaliadas.

Termos para indexação: óleos essenciais, bactérias patogênicas, piscicultura.

Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential Oils from Medicinal Plants against Bacteria Isolated from Farmed Fish

Abstract

The fish culture has been growing in Brazil. The intensification of fish culture has permitted the increase of the parasitic and bacterial diseases, and the use of antibiotics has been frequent to control these diseases. However, the indiscriminate use of these products can be generate effects on the fish and the environment, such as the development of resistant bacteria. The aim of this study was evaluate the antimicrobial activity of essential oils of *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum*, *Piper callosum* and *Curcuma longa* on the bacteria isolated from farmed fish. The oils were extracted by steam distillation and characterized chemically by gas chromatography. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined in vitro by the microdilution method using strains of *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp. The results show that essential oils of *C. longa*, *P. aduncum*, *P. hispidinervum* and *P. callosum* were not able to inhibit growth of *A. hydrophila* and *Streptococcus* sp. in the evaluated concentrations.

Index terms: essential oils, pathogenic bacteria, fish culture.

Introdução

A aquicultura brasileira vem apresentando desenvolvimento significativo nos últimos anos, sendo o tambaqui (*C. macropomum*) a espécie mais criada da região Norte (BRASIL, 2012). No entanto, um dos principais problemas relacionados à sua criação é a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas. Dentre as espécies mais frequentes em peixes de água doce encontram-se as bactérias *A. hydrophila* e *Streptococcus* sp. (BELÉM-COSTA; CYRINO, 2006; FIGUEIREDO; LEAL, 2008; PILARSKI et al., 2008). Em função da elevada ocorrência de doenças, o uso de antibióticos tem sido constante (PILARSKI; SAKABE, 2009), levando a implicações negativas, como o desenvolvimento de bactérias resistentes e a presença de resíduos nos tecidos dos peixes comercializados (SMITH et al., 2003). Assim, a utilização de produtos naturais, como os óleos de plantas medicinais, é uma alternativa para reduzir o uso desses produtos, visto que proporcionaria melhores condições de higiene, maior biossegurança e sustentabilidade ao sistema de produção, bem como segurança alimentar aos consumidores.

Na aquicultura, os estudos com extratos e óleos essenciais têm mostrado resultados promissores. O extrato de amendoeira ou sete-copas (*Terminalia catappa*) mostrou eficácia no controle de ectoparasitas e da bactéria *A. hydrophila* (CHITMANAT et al., 2005). Em juvenis de garoupa (*Epinephelus tauvina*), os extratos de *Cynodon dactylon*, *Piper longum*, *Phyllanthus niruri*, *Tridax procumbens* e *Zingiber officinalis* foram efetivos contra a infecção por *Vibrio harveyi* (PUNITHA et al., 2008). Assim, em função dos bons resultados obtidos com emprego de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *P. aduncum*, *P. hispidinervum*, *P. callosum* e *C. longa* em bactérias isoladas de peixes cultivados.

Material e Métodos

Utilizaram-se folhas e inflorescências de plantas adultas de *P. aduncum*, *P. hispidinervum*, *P. callosum* e *C. longa* provenientes do setor de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental. Para a extração do óleo essencial utilizou-se a técnica de hidrodestilação por meio do aparelho Clevenger. Empregaram-se 500 g de amostras em 12 mil mL de água destilada; após duas horas de extração, o óleo foi obtido, pesado e armazenado em vidro âmbar, depois guardado em freezer. A análise do óleo, quanto à composição química por cromatografia gasosa, foi realizada na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando-se microplacas de 96 poços. Em cada poço da linha A até a F foram pipetados 200 μL do meio caldo caseína de soja (TSB) acrescido do inóculo, sendo a linha G destinada ao controle positivo (meio acrescido de inóculo) e a linha H, ao controle negativo (meio sem inóculo). Em cada placa foram adicionados, na primeira linha, 100 μL dos óleos avaliados, o antimicrobiano (cloranfenicol) e o diluente DMSO (dimetil sulfóxido), todos em três repetições. Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas, homogeneizando-se os primeiros poços e transferindo 100 μL da linha A até a linha F. Depois as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As concentrações avaliadas para o óleo essencial de *P. aduncum*, *P. hispidinervum*, *P. callosum* e *C. longa* foram: 80.000, 40.000, 20.000, 10.000, 5.000 e 2.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As bactérias utilizadas no estudo foram *A. hydrophila* e *Streptococcus* sp. de peixes cultivados.

Após incubação, realizou-se a leitura das placas. A confirmação de crescimento bacteriano nos poços ocorreu após aplicação de cloreto trifenil tetrazólio 0,5% (TTC), pelo desenvolvimento de coloração vermelha. A CIM corresponde ao primeiro poço, onde não se observou crescimento bacteriano.

Para determinação da CBM foram feitas semeaduras das amostras de todos os poços límpidos em placas de petri contendo ágar triptona de soja (TSA). Após incubação a 37 °C por 24 horas foi realizada a leitura das placas.

Resultados e Discussão

A análise do teor e composição química do óleo essencial de *C. longa*, *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. callosum* apresenta-se na Tabela 1. O teor dos óleos essenciais avaliados variou de 0,53 (*C. longa*) a 5,05% (*P. hispidinervum*). A análise da composição química permitiu identificar, para *P. aduncum*, 15 constituintes, representando 99,7% do óleo essencial. Para *P. callosum*, foram identificados 19 constituintes, 99,22% do óleo essencial. Para *P. hispidinervum*, 4 constituintes, representando 100% do óleo essencial, e para *C. longa* identificaram-se 19 constituintes, sendo 68,2 do óleo essencial.

Na Tabela 2 apresentam-se os valores de CIM dos óleos essenciais de *C. longa*, *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. callosum* testados nas bactérias *A. hydrophila* e *Streptococcus* sp. Os resultados obtidos evidenciaram que os óleos essenciais avaliados não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, mesmo nas maiores concentrações avaliadas, o que permite inferir que os valores de CIM para ambas as bactérias podem ser superiores a 80.000 µg mL⁻¹.

Outros óleos essenciais, como o de *Lippia alba*, têm apresentado atividade no controle da bactéria *A. hydrophila*, com valores de CIM de 5.720 µg mL⁻¹ e valores de CBM de 11.992 µg mL⁻¹ (SUTILI et al., 2011). Inibição do crescimento da bactéria *A. hydrophila* também pode ser alcançado com o emprego de extratos metanólicos de frutos de apuí (*Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia*), cuja CIM foi de 4.000 µg mL⁻¹ e CBM de 32.000 µg mL⁻¹, sendo o extrato considerado bacteriostático e bactericida (ANDRADE, 2009).

Tabela 1. Composição química e teor de óleo essencial de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Piper callosum*, nas condições de Manaus, AM, 2012.

Óleo essencial	Compostos (%)	Teor (%)
<i>Piper aduncum</i>	Dilapiol (82,6), alfa-pineno (0,8), beta-pineno (2,2), alfa-felandreno (0,4), (Z)-beta-ocimeno (1,1), (E)-beta-ocimeno (2,8), linalol (0,3), (E)-beta-cariofileno (2,1), alfa-humuleno (0,4), germacreno-D (0,6), bi-ciclo-germacreno (1,0), gama-cadineno (0,4), miristicina (3,1), elemicina (0,7), óxido de cariofileno (1,1).	4,52
<i>Piper callosum</i>	Safrol (72,34), alfa-pineno (2,41), canfeno (0,15), sabineno (0,57), beta-sabineno (7,7), mirceno (0,28), alfa-terpineno (0,6), limoneno (0,35), 1,8 cineol (0,74), gama-terpineno (1,55), alfa-terpineno (0,38), linalol (0,56), alfa-copaeno (0,06), metil-eugenol (9,11), trans-cariofileno (0,66), gama-muuroleno (0,14), germacreno-D (0,64), delta-cadineno (0,22), elimicina (0,74).	4,90
<i>Piper hispidinervum</i>	Safrol (93,5), (Z)-beta-ocimeno (1,5), (E)-beta-ocimeno (3,9), sarisan (1,1).	5,05
<i>Curcuma longa</i>	α -pineno (0,6), mirceno (0,5), α -felandreno (8,5), δ -3-careno (0,3), p-cimeno (2,1), limoneno + silvestrano (0,9), 1,8-cineol (14,2), γ -terpineno (0,4), terpinoleno (2,3), terpinen-4-ol (0,5), α -terpineol (0,8), ar-curcumeno (0,5), α -zingibereno (0,5), β -sesquifelandreno (0,6), ar-tumerol (1,7), β -atlantol (0,7), ar-tumerona (17,9), alfa-tumerona (14,6), 6S,7R-bisaboleno (0,6).	0,53

Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de plantas medicinais para bactérias isoladas de peixes.

Óleo essencial	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>Curcuma longa</i>	> 80.000	> 80.000
<i>Piper aduncum</i>	> 80.000	> 80.000
<i>Piper hispidinervum</i>	> 80.000	> 80.000
<i>Piper callosum</i>	> 80.000	> 80.000

Para *Streptococcus* sp., isolado do peixe *Lates calcarifer*, observou-se que a concentração inibitória mínima foi de 0,488 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com o emprego de óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (WEI;WEE, 2013). Extratos metanólicos de *Callyptranthes clusifolia* e *Merremia tomentosa* também foram efetivos para *Streptococcus agalactiae*, com valores de CIM de 1.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CASTRO et al., 2008).

Conclusões

Os óleos essenciais de *C. longa*, *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. callosum* não foram capazes de inibir o crescimento de *A. hydrophila* e *Streptococcus* sp. nas concentrações avaliadas.

Agradecimentos

À equipe de Plantas Medicinais e de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, pelo apoio durante o processamento do material vegetal e pelas análises microbiológicas. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), pela bolsa concedida.

Referências

ANDRADE, J. I. A. **Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *Magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do extrato metanólico.** 2009. 40 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Amazonas/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010.** Brasília, DF, 2012. 128 p.

BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J. C. P. Antibioticresistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 281-284, 2006.

CASTRO, S. B. R.; LEALI, C. A. G.; FREIRE, F. R.; CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA, D. F.; FIGUEIREDO, H. C. P. Antibacterial activity of plant extracts of Brazil against pathogenic bacteria of fish. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 39, p. 756-760, 2008.

CHITMANAT, C.; TONGDONMUAN, K.; KHANOM, P.; PACHONTIS, P.; NUNSONG, W. Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 678, p. 179-182, 2005.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 8-14, 2008.

PILARSKI, F.; SAKABE, R. Principais enfermidades diagnosticadas no Estado de São Paulo: profilaxia ou tratamento? In: PEZATTO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M.; CYRINO, J. E. P.; FERNANDES JÚNIOR, A. C. (Ed.). **Anais do 3º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes**. Botucatu, 2009. p. 101-130.

PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 2, p. 409-414, 2008.

PUNITHA, S. M. J.; BABU, M. M.; SIVARAM, V.; SHANKAR, V. S.; DHAS, S. A.; MAHESH, T. C.; IMMANUEL, G.; CITARASU, T. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelustauvina juvenile* against *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture International**, London, v. 16, p. 511-523, 2008.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 15, p. 71-90, 2003.

SUTILI, F.J. ; CUNHA, M.A.; ZIECH, R.E.; KREWER, C.C.; ZEPPENFELD, C.C.; HELDWEIN, C.; HEINZMANN, B.M.; VARGAS, A.C.; BALDISSEROTTO, B. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* contra *Aeromonas hydrophila* isoladas de jundiá (*Rhamdia quelen*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 38., 2011, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBMV, 2011. 1 CD-ROM.

WEI, L. S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus citronela* essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iranian Journal of Microbiology**, Tehran, v. 5, p. 147-152, 2013.