

ÓLEOS ESSENCIAIS COMERCIAIS: COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM ISOLADO BACTERIANO DE ESPÉCIE AQUÍCOLA

COMMERCIAL ESSENTIAL OILS: COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN AQUACULTURE BACTERIAL ISOLATE

Saulo Abreu Almeida da Silva ¹

Tércio da Silva de Souza ²

RESUMO: A aquicultura cresce no Brasil, com tudo as bactérias limitam seu crescimento. Uma das alternativas para controle desses microrganismos são os óleos essenciais. O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar bactérias presentes em cultivo aquícola e avaliar os efeitos de antimicrobianos comerciais e óleos essenciais no controle *in vitro* das bactérias isoladas. Foi realizada a coleta de microrganismos em peixes doentes do setor de aquicultura no IFES Campus de Alegre. Posteriormente foi feita o envio e identificação do material coletado em laboratório particular. Em seguida foi realizado o teste Gram e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais comerciais, adquirido em loja virtual. Foi realizado o screen de morte microbiana e a caracterização cromatográfica dos óleos essenciais. Os óleos essenciais apresentaram potencial atividade antimicrobiana, principalmente quando utilizado a metodologia de macrodiluição em caldo.

Palavras-chave: Óleos essenciais; bactérias; peixe; antibiótico.

ABSTRACT: Aquaculture grows in Brazil, however bacteria limit its growth. One of the alternatives to control these microorganisms are essential oils. The objective of this work was to isolate and identify bacteria present in aquaculture and to evaluate the effects of commercial antimicrobials and essential oils in the *in vitro* control of isolated bacteria. The collection of microorganisms was carried out in sick fish from the aquaculture sector at IFES Campus de Alegre. Subsequently, the material collected in a private laboratory was sent and identified. Then the Gram test was performed and the antimicrobial activity of commercial essential oils, purchased in a virtual store. The microbial death screen and the chromatographic characterization of essential oils were performed. Essential oils showed potential antimicrobial activity, especially when using the broth macrodilution methodology.

Keywords: Essential oils; bacteria; fish; antibiotic.

1 INTRODUÇÃO/CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A aquicultura é um dos ramos da produção animal que mais cresce no mundo, contribuindo com mais da metade do pescado consumido, colaborando de forma significativa para geração de emprego e renda (FAO, 2020). O Brasil é um país com

¹ Bacharel em Engenharia de Aquicultura, Instituto Federal do Espírito Santo; sauloabreu1995@gmail.com.

² Professor orientador; Doutor, Instituto Federal do Espírito Santo; tssouza@ifes.edu.br.

potencial para produção de organismos aquáticos, devido sua disponibilidade hídrica para construção de açudes e uso de tanques redes, clima tropical na maior parte de seu território. Produzindo 802,930 toneladas de peixe, acumulando um crescimento de 45% desde 2014 (Peixe BR, 2021).

No entanto, um dos fatores limitantes para aumentar ainda mais a produtividade na aquicultura são as doenças, que implicam na hospedagem de um agente etiológico (LEIRA *et al.*, 2017). Entre as doenças destacam-se as bacterianas dentro de quaisquer sistemas de aquicultura. Mortalidade elevada, anomalias, taxas de fecundidade reduzidas e crescimento lento, representam uma ameaça à viabilidade comercial de um sistema de produção, pois implica em prejuízos financeiros e ambientais (ARMELIM, 2019). As Bactérias e vírus são os principais patógenos responsáveis por mais de 80% dos surtos de doenças na piscicultura, quando comparados a fungos e parasitas (FLEGEL, 2012; TASSANAKAJON *et al.*, 2018).

Para controlar o problema, existem dois antimicrobianos aprovados para uso na aquicultura no Brasil, a oxitetraciclina (OTC) e o florfenicol (FFC) (SINDAN, 2018). O antibiótico tem sido usado na aquicultura para prevenir e tratar doenças, entretanto é comum o relato de uso de antimicrobianos não liberados, o que tem contribuído principalmente para o desenvolvimento de resistência das cepas bacterianas, que culminam afetando a saúde e segurança da população e do ambiente (GASTALHO *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2019).

A evolução acelerada de patógenos bacterianos resistentes aos antibióticos e a concomitante circulação de genes resistentes, tem sido associada a pressão seletiva promovida pelo uso inadequado dos antibióticos nas medicina humana e principalmente veterinária, que vai desde o excesso ao mau uso, a doses subterapêuticas praticadas (SANTOS; RAMOS, 2018; FAO, 2016a).

Uma das alternativas ecológicas, destacam-se os óleos essenciais (OE) como forte opção, eles tem sido utilizados em diversas áreas, a fim de avaliar sua ação antimicrobiana e no isolamento dos seus princípios ativos (ARAÚJO *et al.*, 2004; BENKEBLIA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006), sendo comprovado sua ação antimicrobiana contra inúmeras bactérias, inclusive as espécies resistentes aos antibióticos (BETINI *et al.*, 2005; CARSON e RILEY, 1995).

Os óleos essenciais têm um mecanismo de ação específico e existem regiões na célula bacteriana que são suscetíveis a sua ação. É capaz de degradar a parede celular e romper a membrana citoplasmática, a hidrofobicidade destes afeta a saída de íons, moléculas e outros componentes celulares. Seus diferentes mecanismos de ação no organismo desfavorecem a geração de multirresistência e atenuam a “virulência” ajudando na resposta do sistema imune do hospedeiro a determinadas infecções (BURT, 2004).

A busca por agentes antimicrobianos que apresentem característica que melhor se apliquem a utilização no setor aquícola, torna-se um desafio para pesquisadores com intuito de alcançar alta eficiência no controle e prevenção de doenças, de forma a realizar o uso racional de antibióticos, levando em consideração toda a dinâmica entre os diferentes agentes etiológicos.

O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar bactérias presentes em cultivo aquícola e avaliar os efeitos de antimicrobianos comerciais e óleos essenciais no controle *in vitro* das bactérias isoladas.

2 METODOLOGIA

2.1 Identificação de peixes doentes em sistema de produção

Através de amostragem no Setor de Aquicultura do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, foram selecionados cinco peixes da espécie Lambari (*Astyanax sp.*), com os seguintes sinais: lesão avermelhada, com ponto branco no meio, nas regiões da calda, dorso, e olhos esbugalhados.

2.2 Coleta e envio do material coletado

O material de estudo foi obtido através de cinco *swabs* estéreis, aplicados nas áreas com as lesões, semeou em cinco tubos de ensaio estéreis com meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion Agar), em seguida foram encaminhados para Laboratório de Análises Clínicas (LABCENTER®) onde foram realizados os procedimentos de crescimento, isolamento, subcultivo e antibiograma de acordo com metodologia preconizada pela CLSI (2008) e NCCLS (2003).

2.3 Atividade antimicrobiana com óleos essenciais

A atividade antimicrobiana foi realizada nas cepas bacterianas isoladas dos peixes infectados. As cepas isoladas foram reativadas em meio TSB (Tryptic Soy Broth) e cultivada até atingir à concentração de 10^8 UFC mL⁻¹. O número de células por mL foram quantificado utilizando-se curva padrão de crescimento, obtida por espectrofotometria de UV/VIS (AGILENT CARY60 UV-VIS) contra um branco contendo o caldo TSB a 600 nm.

2.4 Teste de Coloração Gram

O teste de coloração Gram foi realizado com espalhamento do material sobre uma lâmina limpa e desengordurada, seguido de secagem ao ar e fixação sobre chama (LABORCLIN, 2018). O material espalhado foi coberto com solução de violeta genciana Gram a 1% (m v⁻¹) por um minuto, em seguida lavado com água corrente; Após a lâmina foi adicionado lugol fraco Gram a 0,3% (v v⁻¹) por um minuto; O excesso de lugol foi removido com solução descolorante Gram 30%. A lâmina foi adicionado solução de fucsina Gram 0,0009% (m v⁻¹), deixando atuar por um minuto; O sistema foi lavado com água, seca na temperatura ambiente e observadas ao microscópio usando a objetiva de imersão (100x) LABORCLIN (2018).

2.5 Aquisição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais comerciais: goiaba (*Psidium guajava*); aroeira (*Schinus terebinthifolius*); eucalipto (*Corymbia citriodora*); foram adquiridos em uma loja virtual, Harmonia Natural, especializada em óleos naturais, localizada em Canelinha/SC.

2.6 Screen de morte microbiana

A avaliação foi feita por difusão em disco (NCCLS, 2000; CLSI, 2008), no qual o meio Ágar Mueller Hinton (MHA) foi inoculado com suspensão bacteriana contendo 10^8 UFC mL⁻¹, e depositado em placas de Petri estéreis com diâmetro de 140 mm. Após a inoculação, discos de papel filtro estéreis, com 6 mm de diâmetro e impregnados com 10 mg do OE utilizando etanol absoluto como solvente, os discos foram posicionados sobre o meio da placa. Após o período de incubação de 24

horas a 37°C foi medido o halo de inibição ao redor dos discos (SAPKOTA et al, 2012; MAZUMDER *et al.*, 2006). Os testes foram realizados em triplicatas por bactéria isolada.

2.7 Caracterização cromatográfica dos óleos essenciais

Os constituintes do óleo essencial foram analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID) (Shimadzu GC-2010 Plus). Foram empregadas as condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase estacionária RTX-5MS (0,25 µm de espessura do filme); N₂ (em análise de GC/FID) ou He (em análises de CG/MS) como gás de arraste com fluxo de 3,0 mL min⁻¹, a temperatura do forno seguiu a programação em que permanece por 1 minuto a 60°C e em seguida aumenta gradativamente 5°C min⁻¹ até atingir 220°C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos; temperatura do injetor de 240 °C; temperatura do detector de 240°C; razão de split de 1:30. Foi injetado um volume de 1,0 µL de uma solução de 3% (v v⁻¹) de óleo essencial dissolvido em etanol PA 96% (SOUZA, 2018).

A identificação dos componentes foi realizada pelos índices de Retenção (LTPRI) (ADAMS, 2007) ajustados pela equação de Van Den Dool, Kratz (1963). O IR calculado para cada composto foi comparado com valores da literatura obtidos da biblioteca NIST - National Institute of Standards and Technology (NIST, 2011) e ADAMS (2007).

$$\text{LTPRI} = 100n + 100 \left(\frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \right)$$

Onde: *i*, é o composto de interesse; *n*, é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de *i*; *t_{R(i)}*, é o tempo de retenção ajustado de *n*; *t_{R(n)}*, é o tempo de retenção ajustado de *Z*; *t_{R(n+1)}*, é o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de *i*.

O percentual relativo de cada composto do óleo essencial foi calculado através da razão entre a área integral de seus respectivos picos e a área total de todos os constituintes da amostra, dados estes obtidos pelas análises realizadas no

cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (FID) e ajustados pela Simulação de Fatores de Resposta Relativa (RRF) (TISSOT *et al.*, 2012), sendo considerados os compostos com área relativa acima de 4% para a definição de compostos majoritários.

$$RRF_i = 10^3 \times (MW_i / MW_{ISTD}) \times [1/(-61,5 + 88,8 nC + 18,7 nH - 41,3 nO + 3,8 nN + 64,0 nS - 20,2 nF - 23,5 nCl - 10,2 nBr - 1,07 nI + 127 nBENZ)]$$

Onde: nC, nH, nO, nN, nS, nF, nCl, nBr, nI e nbenz são respectivamente o número de carbonos, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, flúor, bromo, iodo, e anéis benzílicos encontrados na estrutura do composto. M_{Wi} e M_{WISTD} são os pesos moleculares das substâncias de interesse e do padrão interno (ISTD, methyl octanoate).

2.8 Cinética de morte microbiana e concentração eficaz (CE₅₀ e CE₁₀₀)

A cinética de morte microbiana foi obtida por macrodiluição em caldo, onde as suspensões bacterianas (20 µL) contendo 10⁸ UFC mL⁻¹ foram inoculadas em tubo de ensaio, meio de crescimento TSB (3mL) ou MHB (Caldo Mueller Hinton) e as concentrações desejadas do OE foram de (1 g mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹, 8 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹) emulsionados com 100 µL de DMSO. Como controle positivo foi utilizado tubo de ensaio contendo TSB (3mL) ou MHB (Caldo Mueller Hinton) e 100 µL de DMSO e o controle negativo tubo de ensaio contendo TSB (3 mL) ou MHB (Caldo Mueller Hinton) e 100 µL de DMSO e suspensão bacteriana (20 µL) contendo 10⁸ UFC mL⁻¹.

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, seguidos de três repetições experimentais. Com seis mensurações da densidade óptica em espectrofotômetro de UV/VIS (AGILENT CARY60 UV-VIS) a 600 nm nos tempos (0h, 2h, 4h, 6h, 8h e 20h) submetidos a incubação a 37 ± 1°C. A leitura às 20h foi utilizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), seguindo a metodologia NCCLS (2003) adaptada de (KLANCNIK *et al.* 2010; ZENGIN e BAYSAL, 2014).

3 RESULTADOS

3.1. Caracterização cromatográfica dos óleos essenciais

Tabela 1. Caracterização pelo índice LTPRI do óleo essencial de *Psidium guajava*, *Schinus terebinthifolius*, *Corymbia citriodora*.

Pico	Tempo de retenção	Índice de retenção calculado ^[b]	Índice de retenção tabelado ^[c]	Nome	Área corrigida% ^[d]
<i>Psidium guajava</i>					
1	18,611	1420	1418	trans-Caryophyllene	5,76
2	19,477	1454	1452	α -Humulene	10,60
3	20,312	1486	1486	β -Selinene	18,38
4	20,512	1495	1494	α -Selinene	7,77
5	22,032	1560	1561	trans-Nerolidol	4,80
6	22,666	1585	1583	Caryophyllene oxide	20,71
7	23,274	-	-	N.i. ^[e]	16,74
8	23,761	1637	1638	epi- α -Cadinol	5,28
9	24,291	1661	1660	14-Hydroxycaryophyllene	9,91
<i>Schinus terebinthifolius</i>					
10	14,113	1050	1050	β -phellandrene	10,31
11	15,907	1089	1086	α -terpinolene	14,40
12	17,452	1122	1121	methyl octanoate	8,63
13	17,927	1133	-	N.i. ^[e]	8,13
14	19,417	1165	1166	Borneol	9,67
15	20,592	1190	1190	Dihydrocarveol	7,74
16	21,154	1203	1202	Carveol	16,22
17	22,501	1232	-	N.i. ^[e]	12,92
18	22,641	1236	1235	Neral	11,94
<i>Corymbia citriodora</i>					
19	11,146	984	981	β -pinene	9,12
20	11,364	990	990	Myrcene	67,33
21	11,475	992	-	N.i. ^[e]	5,66
22	13,414	1035	1033	Eucalyptol	9,92
23	29,982	1404	1405	Sesquithujene	7,94

[a] Compostos identificados pelo índice LTPRI e por CG-DIC usando uma coluna Rtx®-5MS.[b] Calculado usando uma mistura de n-alcanos saturados (C7 a C40). [c] Índices tabelados com base em ADAMS, 2007 e

NIST, 2011 [d] Área relativa com base no cromatograma da Figura 1, identificados apenas compostos com área relativa > 4%. [e] Não identificados.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

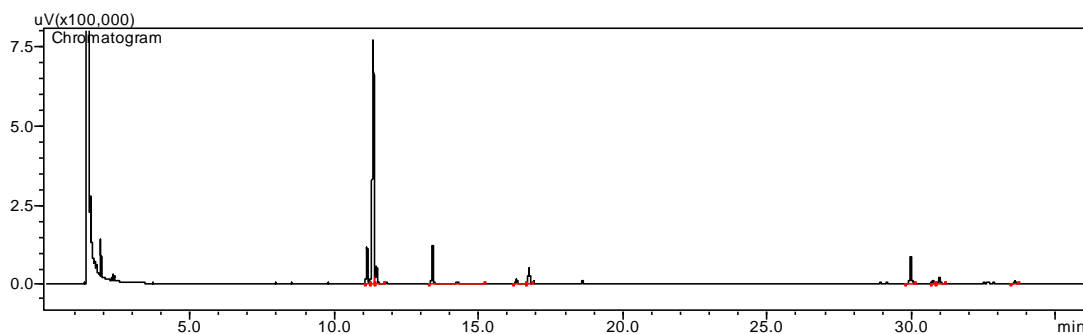
A identificação dos componentes significativos dos óleos essenciais analisados, foram realizados por Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID) com área relativa superior a 4% para identificação do perfil cromatográfico antes dos ajustes realizados por Simulação de Fatores de Resposta Relativa (RRF), Tissot et al., (2012).

As análises cromatográficas dos óleos essenciais: eucalipto, goiaba e aroeira com o fator de correção, permitiu a observação de 23 compostos, dos quais 19 foram identificados, **Figuras (1a, 1b, 1c) e (Tabela 1)**.

Os compostos e suas porcentagens presentes nos OE's variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo os compostos fenólicos (Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2011).

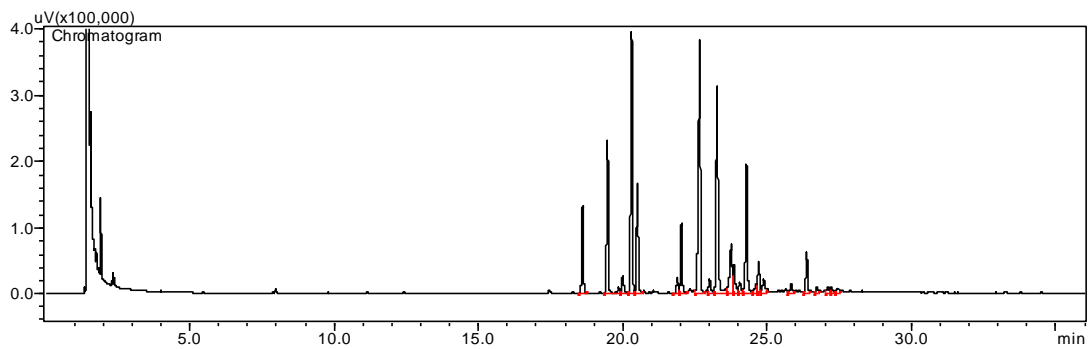
De acordo com as partes utilizadas na extração de óleo essencial, os compostos majoritários se alteram (cânfora da casca de raízes, eugenol das folhas, e cinamaldeído da casca), sugerindo diferentes perfis de atividade (Gruenwald et al., 2010).

Figura 1a: Perfil cromatográfico do óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*).



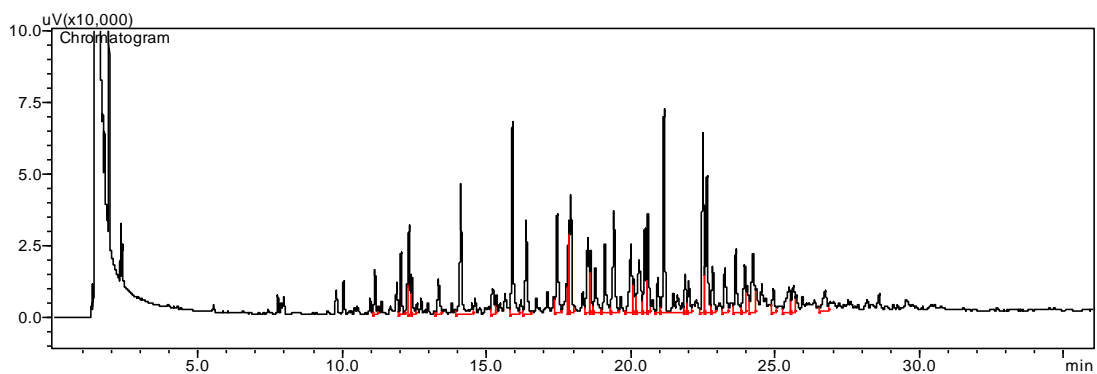
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 1b: Perfil cromatográfico do óleo essencial de goiaba (*Psidium guajava*).



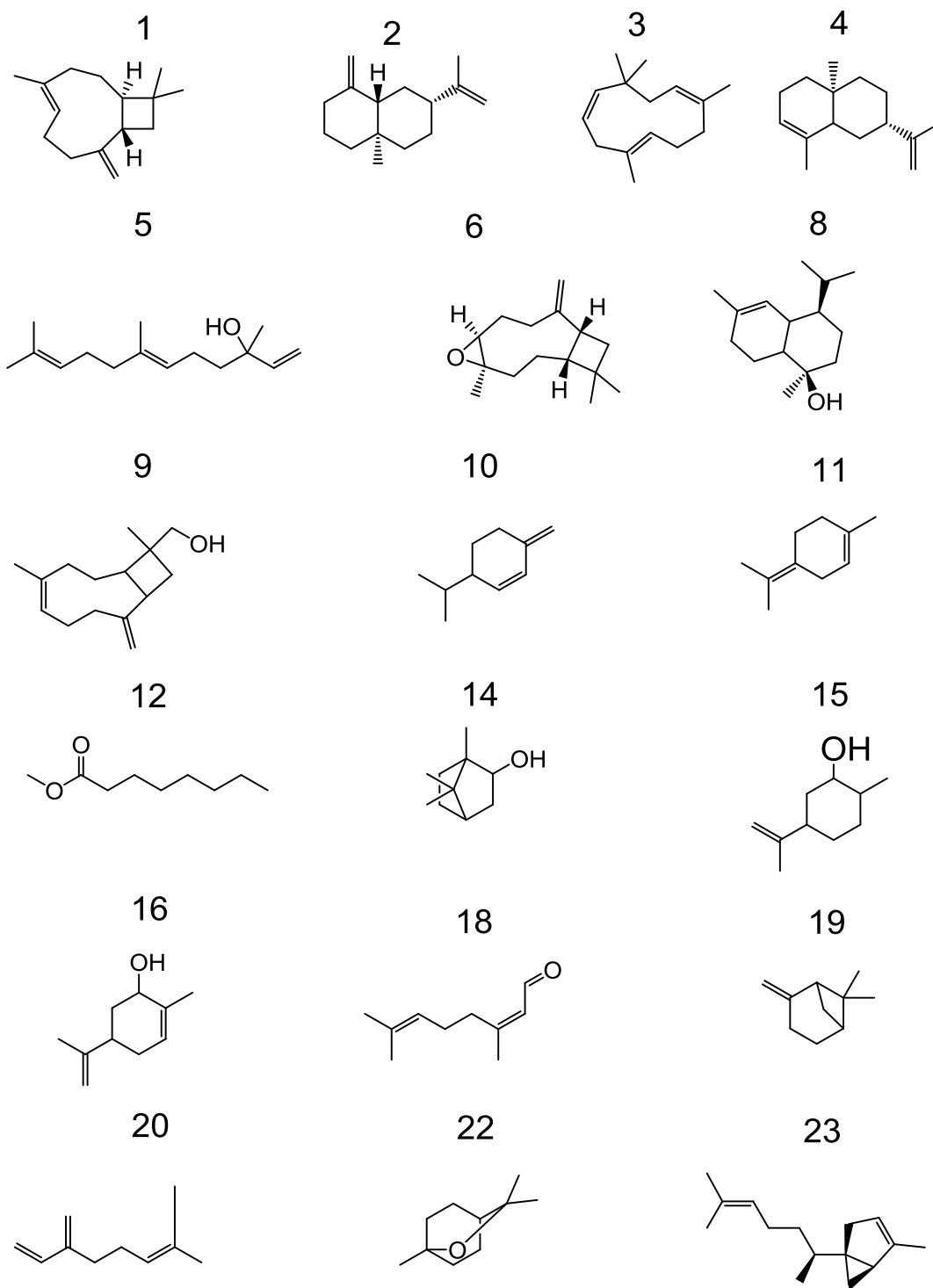
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 1c: Perfil cromatográfico do óleo essencial de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 2: Estruturas químicas dos 19 compostos (área relativa >4%) encontrados nos óleos essenciais.



1 trans-Caryophyllene; **2** β -Selinene; **3** α -Humulene; **4** α -Selinene; **5** trans-Nerolidol; **6** Caryophyllene oxide; **8** epi- α -Cadinol; **9** 14-Hydroxycaryophyllene; **10** β -phellandrene; **11** α -terpinolene; **12** methyl octanoate; **14** Borneol; **15** dihydrocarveol; **16** carveol; **18** Neral; **19** β -pinene; **20** Myrcene; **22** Eucalyptol; **23** Sesquithujene.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 2: Tabela com os compostos na ordem crescente de majoritário.

<i>Psidium guajava</i>		
	Compostos	Área relativa
1	Caryophyllene oxide	20,71%
2	β -Selinene	18,38%
3	α -Humulene	10,60%
4	14-Hydroxycaryophyllene	9,91%
5	α -Selinene	7,77%
6	trans-Caryophyllene	5,76%
7	epi- α -Cadinol	5,28%
8	trans-Nerolidol	4,80%

<i>Schinus terebinthifolius</i>		
	Compostos	Área relativa
1	Carveol	16,22%
2	α -terpinolene	14,40%
3	Neral	11,94%
4	β -phellandrene	10,31%
5	Borneol	9,67%
6	methyl octanoate	8,63%
7	Dihydrocarveol	7,74%

<i>Corymbia citriodora</i>		
	Compostos	Área relativa
1	Myrcene	67,33%
2	Eucalyptol	9,92%
3	β -pinene	9,12%
4	Sesquithujene	7,94%

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os compostos com a maior porcentagem são chamados de compostos majoritários, como podemos observar no OE de (*Psidium guajava*) o composto majoritário é caryophyllene oxide com 20,71%, já para o OE de (*Schinus terebinthifolius*) com o composto majoritário Carveol com 16,22% e para o OE de (*Corymbia citriodora*) o

majoritário é *Mycene* com 67,33%. Destaca-se que os compostos podem variar dependendo do tipo de solo, do clima, das práticas agrícolas, da variedade genética da planta e do processo de extração (ARAUJO, 2016).

3.2. Cinética de crescimento bacteriano

Os resultados obtidos da cinética de crescimento da bactéria *Bacillus*.sp, *Leveduras* sp, *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp, através da metodologia de macrodiluição em caldo, quando submetidos a diferentes concentrações de OE: eucalipto, goiaba e aroeira, são demonstrados nas figuras 6, 7, 8, 9 e 10.

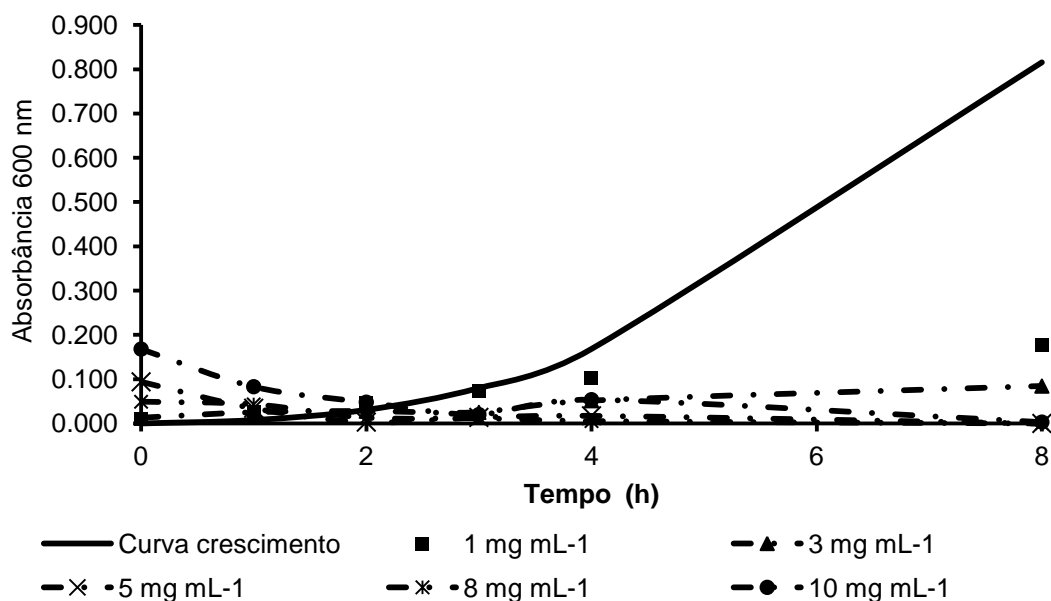
A caracterização do crescimento bacteriano é dado pelo aumento da densidade óptica em função do tempo e a diminuição da densidade óptica indica inibição da atividade microbiana. Nos resultados alcançados, foi possível observar que em todas as análises houve o aumento da densidade óptica em relação ao controle negativo, indicando o crescimento normal da bactéria sem a exposição dos OE. Não houve crescimento bacteriano no Controle Positivo (TSB E DMSO) em nenhuma das análises.

A literatura revela que as bactérias gram positivas são mais susceptíveis a ação dos óleos essenciais (OEs) do que bactérias gram negativas (NASCIMENTO *et al.*, 2014; SANTOYO *et al.*, 2005; TRAJANO *et al.*, 2009). Isso ocorre porque as bactérias gram negativas possuem uma superfície hidrofílica na membrana externa rica em lipopolissacarídeos que formam uma barreira que impedem as macromoléculas hidrofóbicas presentes em alguns óleos essenciais penetrarem em sua membrana. Já em bactérias gram positivas ocorre a ação dos OEs, que destroem a parede celular e a membrana citoplasmática, resultando em um vazamento do citoplasma e sua coagulação, ocasionando assim, a interrupção de processos vitais da célula levando a morte celular (KALEMBA e KUNICKA, 2003). Outros estudos apontam que ocorre a danificação de proteínas no citoplasma (ULTEE *et al.*, 1999) e a saída de íons (CARSON *et al.*, 2006).

Os mecanismos de ação dos OEs são muito complexos e pouco discutidos. De acordo com Carson, Mee e Riley (2002), devido a grande quantidade e variação dos

compostos químicos presentes nesses óleos essenciais é improvável que exista apenas um mecanismo de ação responsável pela atividade antimicrobiana.

Figura 3: Cinética de crescimento da bactéria *Bacillus.sp.* quando submetida a concentrações do OE de eucalipto (*Corymbia citriodora*).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

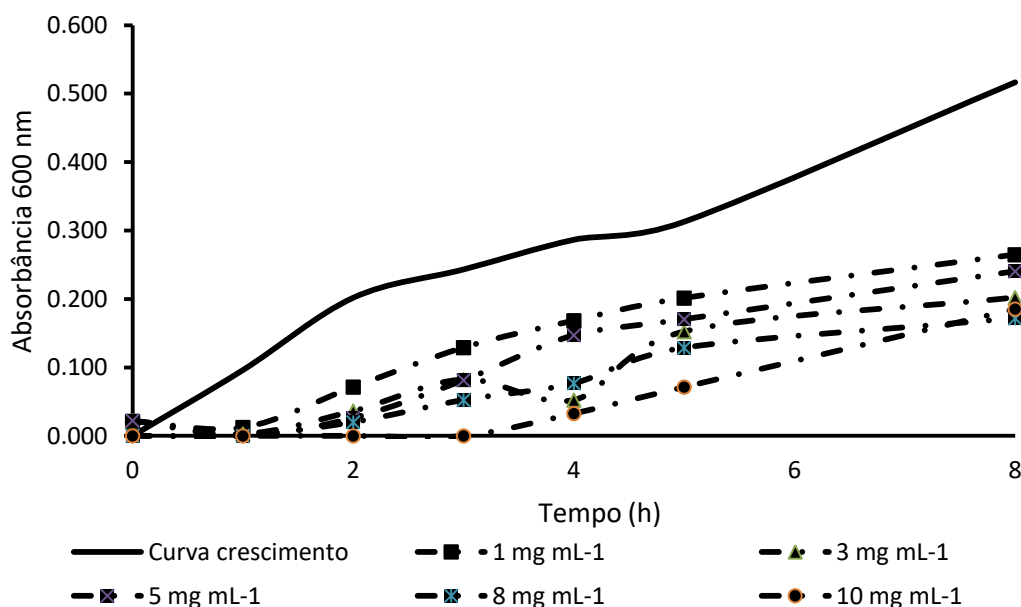
A figura 3 mostra a influência do óleo essencial de eucalipto sobre o crescimento bacteriano. Observa-se que as menores concentrações testadas (1 g mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹), apresentaram uma baixa ação microbiana, ou seja, o óleo essencial não teve a ação de inibição de crescimento dessa bactéria. Em relação às outras concentrações testadas (5 mg mL⁻¹, 8 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹) como foi observado, essas concentrações foram capazes de inibir o crescimento da *Bacillus.sp.* evidenciado pela regressão da densidade óptica.

Resultados positivos também foram encontrados no trabalho de Estanislau *et al.*, (2001) em que o óleo essencial apresentou atividades inibitórias contra bactérias GRAM positivas e GRAM negativas. Por outro lado, no estudo de Amorim *et al.* (2011) o OE não apresentou atividade antimicrobiana eficaz.

A atividade antibacteriana do óleo essencial de eucalipto pode ser possível devido à presença do citronelal na sua composição. Alguns estudos mostram que esse monoterpeno é um dos responsáveis pelas atividades antimicrobianas, tendo como mecanismos de ação a perda de componentes celulares inibindo a respiração bacteriana (TOSCAN, 2010). A literatura traz poucas informações sobre a potencialidade antimicrobiana desse óleo essencial.

Os resultados nessas análises revelam a ação antimicrobiana dos óleos essenciais em diferentes magnitudes sendo a bactéria *Bacillus.sp.* sensível a ação desses óleos. A adição do emulsificante DMSO ao meio não causou a inibição do crescimento bacteriano, o controle negativo apresentou crescimento normal da bactéria.

Figura 4: Cinética de crescimento da bactéria *Enterobacter.sp.* quando submetida a concentrações do OE goiaba (*Psidium guajava*).



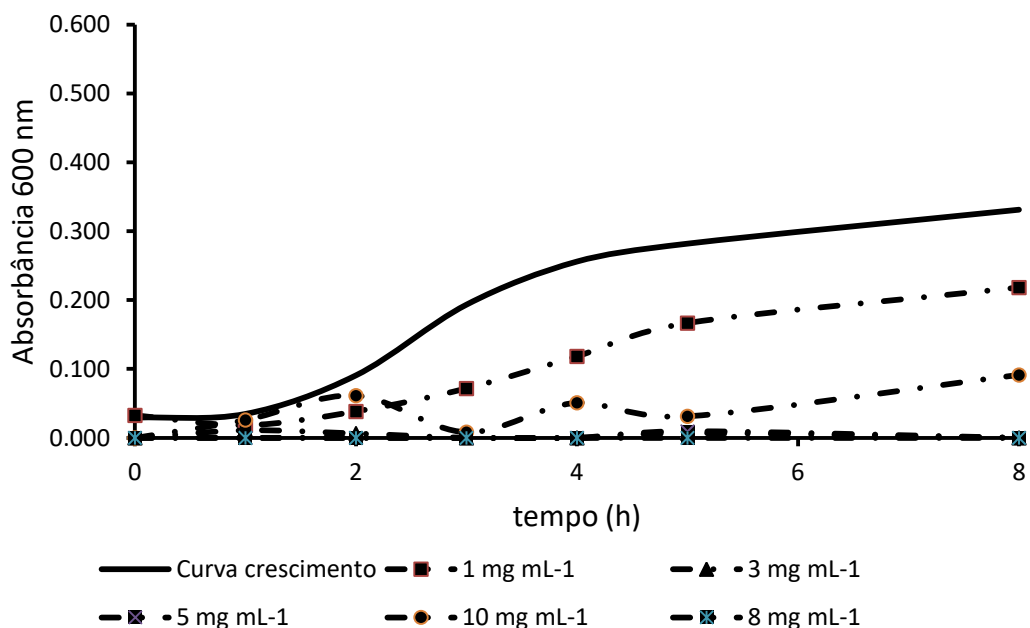
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O óleo essencial de goiaba apresentou baixa ação microbiana frente a cepas de *Enterobacter.sp.*, nas concentrações de (1 mg mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹, 8 mg mL⁻¹, (10 mg mL⁻¹).

Diversos autores reportaram que as bactérias gram positivas são mais susceptíveis a ação dos óleos essenciais do que bactérias gram negativas (NASCIMENTO *et al.*, 2014; SANTOYO *et al.*, 2005; TRAJANO *et al.*, 2009). Isso ocorre porque as bactérias gram negativas possuem uma superfície hidrofílica na membrana externa rica em lipopolissacarídeos que impedem as macromoléculas hidrofóbicas presentes em alguns óleos essenciais, em contraste as gram positivas tem a estrutura mais simples da parede celular (KALEMBA e KUNICKA, 2003).

Segundo Wang *et al.* (2017) observaram significativa ação antimicrobiana do OE obtido das folhas da goiabeira principalmente contra as bactérias gram positivas, indicando a utilização desse óleo como antibiótico natural empregado para tratamento de doenças infecciosas.

Figura 5: Cinética de crescimento medio da bactéria *Klebsiella.sp.* quando submetida a concentrações do OE aroeira (*Schinus terebinthifolius*).



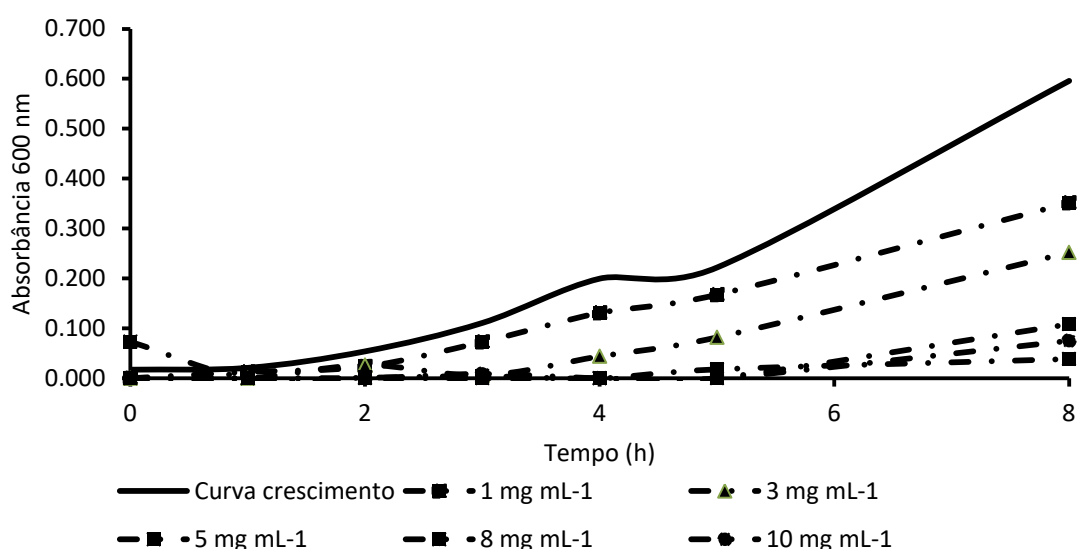
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A figura 5 mostra a influência do óleo essencial de aroeira sobre o crescimento da bactéria *Klebsiella.sp.* Observa-se que as concentrações de (3mg mL⁻¹, 5mg mL⁻¹ e 8mg mL⁻¹), essas concentrações foram capazes de inibir o crescimento bacteriano,

acima dessa concentração podemos observar que quanto maior a concentração do óleo, ocorre um aumento no sinergismo entre os compostos dos óleos, conseqüentemente isso pode tanto aumentar ou diminuir a atividade bactericida.

Greay & Hammer (2011) cita alguns dos mecanismos por meio dos quais estes compostos atuam sobre células bacterianas. Monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória.

Figura 6: Cinética de crescimento da bactéria *Bacillus.sp.*+ *Leveduras.sp.* quando submetida a concentrações do OE aroeira (*Schinus terebinthifolius*).



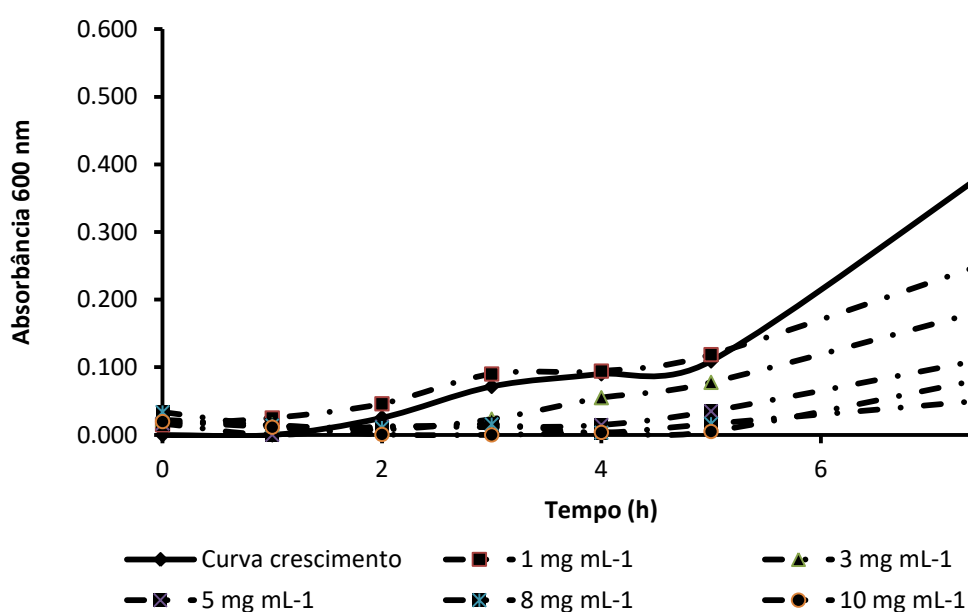
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O óleo essencial de aroeira nas concentrações de (1 mg mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹) apresentou baixa inibição frente a cepas de *Bacillus.sp.* + *Leveduras.sp.* Já nas concentrações (5 mg mL⁻¹, 8 mg mL⁻¹, 10 mg mL⁻¹), tiveram um resultado melhor, mas não foi o suficiente para a inibição total da cepa microbiana.

De acordo com Levinson & Jawetz (2007) as bactérias podem crescer novamente quando a droga é suprimida e os mecanismos de defesa do hospedeiro, como a fagocitose, são necessários para matar a bactéria. Já as drogas bactericidas são

úteis apenas em certas infecções, em geral, naquelas que há risco de vida e quando as drogas bacteriostáticas não produzem a cura.

Figura 7: Cinética de crescimento da bactéria *Enterobacter.sp.* quando submetida a concentrações do OE aroeira (*Schinus terebinthifolius*).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

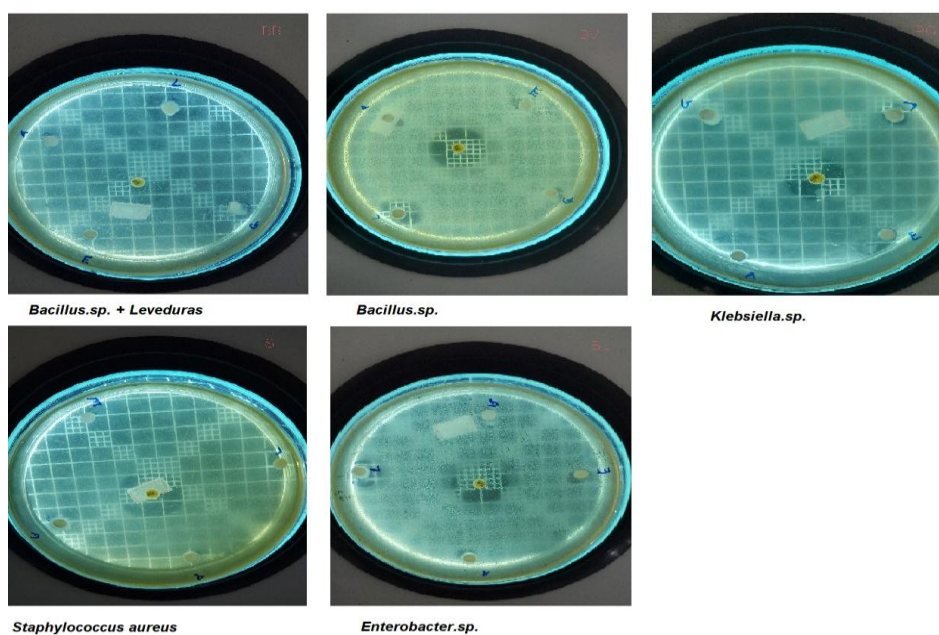
O resultado apresentado nas figuras 6 e 7 se aproximam, nas concentrações de (1 mg mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹) apresentaram uma baixa inibição de crescimento frente a cepas de *Enterobacter.sp.* Já as concentrações, (5 mg mL⁻¹, 8 mg mL⁻¹, 10 mg mL⁻¹) apresentaram um resultado melhor, tendo uma melhor inibição microbiana, mas mesmo assim não foi o suficiente para inibir 100% do crescimento da bactéria.

Embora os antimicrobianos sejam divididos nas duas categorias, algumas drogas, normalmente bactericidas podem ser bacteriostáticas ou vice-versa. Por exemplo, o cloranfenicol é bacteriostático por excelência, mas funciona como bactericida para o *Haemophilus influenzae* 10 e o *Streptococcus pneumoniae*, já as penicilinas são bactericidas típicas que também funcionam como bacteriostáticas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

3.3 Avaliação qualitativa da eficácia dos óleos essenciais nas atividades antimicrobianas

A avaliação qualitativa dos óleos essenciais testados, foram realizadas através da metodologia de difusão em disco. As placas que apresentaram halos de inibição, são apresentadas na figura 8, e os valores com os halos formados encontra-se na tabela 3. Os óleos essenciais analisados nos testes anteriores, apresentaram potencial atividade antimicrobiana contra as bactérias (*Bacillus.sp*; *Enterobacter.sp*; *Klebsiella.sp*; *Bacillus.sp.* + *Leveduras.sp.*). Visto os resultados positivos das análises em caldo, foi realizada uma análise comparativa com os antibióticos convencionais para ver se realmente o óleo essencial tem um efeito positivo comparado aos antibióticos. Nos resultados mostrados na figura 8, observa-se que em todas as amostras contendo os óleos essenciais, houve formação de halo de inibição, juntamente com o controle de Tetraciclina com halo inibitório de 20,8 mm que a bactéria apresentou sensibilidade. Na tentativa de potencializar a ação dos óleos essenciais.

Figura 8: Placa de halo de inibição dos óleos essenciais como antimicrobiano nas concentração de 10 mg mL^{-1} , controle Tetraciclina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Pode-se observar na figura a cima o pré-teste (teste em disco) dos óleos essenciais testados nas concentrações máxima, comparado ao disco de antibiótico de tetraciclina que está localizado no meio da placa, os óleos apresentaram halos de inibição, com isso foi visto que cada óleo essencial tem ação sobre determinada bactéria, com isso foi testes e determinada as concentrações para fazer os teste microbiológico.

Tabela 3: Valores médios de halos de inibição (mm) formados pela ação dos OEs na concentração de 10 mg mL⁻¹.

Diâmetro halo de inibição média ± desvio padrão (mm)					
Antibióticos	Concentração (µg disco ⁻¹)	Cepas Microbianas Isoladas			
		Bacterias Gram (+)		Bacterias Gram (-)	
		<i>Bacillus sp</i> <i>Leveduras sp.</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>
OE Aroeira	10000	7,5 ± 7,3	4,5 ± 4,0	5,2 ± 4,8	4,0 ± 3,5
OE Goiaba	10000	7,0 ± 6,4	5,7 ± 5,1	5,5 ± 4,8	4,7 ± 4,0
OE Eucalipto	10000	5,5 ± 5,0	6,2 ± 6,8	2,3 ± 4,0	5,7 ± 5,5
Amicacina	30	24,0 ± 1,0	30,3 ± 0,6	24,0 ± 0,0	25,3 ± 0,6
Amoxicilina + clavulanato	(20/10)	8,0 ± 1,0	41,3 ± 0,6		23,3 ± 0,6
Azitromicina	15	11,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	13,7 ± 0,6	15,0 ± 0,0
Cefalotina	30	8,0 ± 0,0	26,7 ± 0,6		24,3 ± 1,2
Ceftriaxona	30	24,0 ± 1,0	25,7 ± 0,6	30,7 ± 0,6	33,3 ± 0,6
Ciprofloxacina	5	29,0 ± 1,0	25,3 ± 0,6	31,0 ± 1,0	30,7 ± 0,6
Doxiciclina	30	23,3 ± 0,6	36,0 ± 0,0	18,7 ± 0,6	19,0 ± 1,0
Gentamicina	10	21,0 ± 0,0	26,7 ± 0,6	21,7 ± 0,6	23,33 ± 0,6
Sulfametoxazol + Trimetopim	23,75/1,25		35,0 ± 1,0	25,7 ± 0,6	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Todos os óleos essenciais foram analisados com a mesma concentração (10 mg mL⁻¹). Observou-se a ação dos tratamentos sobre as bactérias (*Bacillus.sp*; *Enterobacter.sp*; *Klebsiella.sp*; *Bacillus.sp.* + *Leveduras.sp.*), tendo resultados positivos frente aos microrganismos.

4 CONCLUSÃO

Foi possível coletar e identificar as bactérias presentes em um cultivo aquícola, as bactérias gram positivas encontradas foram, *Bacillus.sp* + *Leveduras*, *Bacillus.sp* já as gram negativas foram, *Enterobacter.sp* e *Klebsiella.sp*.

Os óleos essenciais apresentaram potencial atividade antimicrobiana, principalmente quando utilizado a metodologia de macrodiluição em caldo. Com as concentrações testadas foram de 5 mg mL⁻¹, 8 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹ para o OE eucalipto (*Corymbia citriodora*), frente a bactéria *Bacillus.sp* inibiu em 100% o crescimento. OE de aroeira (*Schinus terebinthifolius*), com as concentrações de 3 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹ e 8 mg mL⁻¹, foram suficientes para inibir em 100% do crescimento da bactéria *Klebsiella.sp*, enquanto para o OE de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) frente a bactéria (*Enterobacter.sp.*), (*Bacillus.sp.+ Leveduras.sp.*), não apresentou um resultado satisfatório, o mesmo ocorreu no OE de goiaba (*Psidium guajava*), frente a bactéria (*Enterobacter.sp.*).

A utilização dos OE que teve uma melhor ação, poderia se utilizado não com a finalidade de tratamento em si, mais sim poderia ser usados como profilático, com isso exige um estudo melhor para aplicação em corpos d'água.

REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert P. et al. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured publishing corporation, 2007.

AMORIM, Edna Peixoto da Rocha et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia Solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 392-398, 2011.

ARAUJO, Márcio Martins de; LONGO, Priscila Larcher. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016.

ARMELIM, Jose Maurício. **Ocorrência de antibióticos em fazendas de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) no estado do Rio Grande do Norte-Brasil**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ASSIS, G. B. N. et al. Natural coinfection by *Streptococcus agalactiae* and *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Journal of fish diseases**, v. 40, n. 1, p. 51-63, 2017.

BERTINI, Luciana Medeiros et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.

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.

CARSON, Christine F.; HAMMER, Katherine A.; RILEY, Thomas V. Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CARSON, Christine F.; MEE, Brian J.; RILEY, Thomas V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

DE ARAUJO, José Carlos LV et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.

DE SOUZA, Tercio da Silva et al. Chemotype diversity of *Psidium guajava* L. **Phytochemistry**, v. 153, p. 129-137, 2018.

ESTANISLAU, A. A. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 95-100, 2001.

FAO - The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>. Acesso em: 16 jun. 2020.

FAO. The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016–2020. **Roma: FAO**, 2016.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of fish diseases**, v. 28, n. 4, p. 199-204, 2005.

FISHSTATJ, F. A. O. FishStatJ-Software for fishery and aquaculture statistical time series. **FAO Fisheries Division [online]. Rome. Updated**, v. 22, 2020.

FLEGEL, Timothy W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 2, p. 166-173, 2012.

FUKUSHIMA, H. C. S. et al. Lactococcus garvieae outbreaks in Brazilian farms Lactococcosis in Pseudoplatystoma sp.–development of an autogenous vaccine as a control strategy. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 2, p. 263-272, 2017.

GRUENWALD, Joerg; FREDER, Janine; ARMBRUESTER, Nicole. Cinnamon and health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 9, p. 822-834, 2010.

JAWETZ, Ernest; LEVINSON, Warren. Microbiologia médica e imunologia. **Porto Alegre**, 2005.

Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 110, p. 166-173, 2012.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

LEIRA, Matheus Hernandez et al. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura: Nutritime Revista Eletrônica. [S.I.] v. 14, n. 2, p. 4982-4996, 2017.

LEMMON, E. W. et al. NIST chemistry webbook: NIST standard reference database. [S.I.]n. 69, p. 20899, 2011.

LIMA, Igara de Oliveira et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 197-201, 2006.

MAZUMDER, Avijit; MAHATO, Arun; MAZUMDER, Rupa. Antimicrobial potentiality of Phyllanthus amarus against drug resistant pathogens. **Natural product research**, v. 20, n. 04, p. 323-326, 2006.

NASCIMENTO, Jorge Messias Leal et al. Ação antimicrobiana de óleo essencial frente a cepas bacterianas contaminantes de alimentos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 3, p. 221-225, 2014.

PEIXE, B. R. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário PeixeBr de Piscicultura**, 2021.

PERES, G. T.; AIROLDI, F. P. D. S.; REYES, F. G. R. Veterinary Drugs On The Apiculture: Commercial, Regulatory And Consumer Health Aspects [medicamentos Veterinários E A Apicultura: Aspectos Comerciais, Regulatórios E De Saúde Do Consumidor].

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

RAJENDRA, Sapkota et al. Antibacterial effects of plants extracts on human microbial pathogens & microbial limit tests. **International journal of research in pharmacy and chemistry**, v. 2, n. 4, p. 926-936, 2012.

SALAMA, N. K. G. et al. Using fish mortality data to assess reporting thresholds as a tool for detection of potential disease concerns in the Scottish farmed salmon industry. **Aquaculture**, v. 450, p. 283-288, 2016.

SALVADOR, Rogério et al. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1374-1378, 2005.

SANTOS, Lúcia; RAMOS, Fernando. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 2, p. 135-143, 2018.

SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of food protection**, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005.

SEBASTIÃO, F. A. et al. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 06, p. 409, 2015.

SEBASTIÃO, F. A. et al. Molecular detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in three Brazilian states. **Journal of fish diseases**, v. 40, n. 11, p. 1731-1735, 2017.

SOLÓRZANO-SANTOS, Fortino; MIRANDA-NOVALES, Maria Guadalupe. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

SOMBOONWIWAT, K.; CHAROENSAPSRI, W.; TANG, S. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, Elmsford, v. 80, p. 81-93, 2018.

TASSANAKAJON, Anchalee et al. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 80, p. 81-93, 2018.

TISSOT, E. et al. Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors. **Flavour and fragrance journal**, v. 27, n. 4, p. 290-296, 2012.

TOSCAN, Cristiane Menegotto. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides. 2014.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ed. p. 175-182. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAJANO, Vinicius Nogueira et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 542-545, 2009.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

WANG, L. et al. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Psidium guajava* L. Leaves from different geographic regions in China. *Chemistry & biodiversity*, v. 14, n. 9, p. e1700114, 2017.

WIKLER, Matthew A. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. **CLSI (NCCLS)**, v. 26, p. M7-A7, 2006.

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – TCC

Às oito horas e trinta minutos do dia vinte e um de julho de dois mil e vinte e dois, na sala virtual (<https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/tercio-da-silva-de-souza>), compareceu para defesa pública do Trabalho de Conclusão de Curso, requisito obrigatório para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Aquicultura, o acadêmico Saulo Abreu Almeida da Silva, tendo como título do TCC **“Óleos essenciais comerciais: composição e atividade antimicrobiana em isolado bacteriano de espécie aquícola”**.

Constituirão a Banca Examinadora:

Professor orientador: Tércio da Silva de Souza

Professor examinador: Luciano Menini

Professor examinador: Pedro Pierro Mendonça

Resultado final do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado:

- Aprovado sem restrições.
- Aprovado com recomendações e correções.
- Aprovado, mas deve refazer e reapresentar o TCC. Reprovado.

OBSERVAÇÕES: O discente deverá corrigir seu TCC, conforme solicitação feita pelos membros da banca examinadora, junto ao seu orientador.

Eu, Tércio da Silva de Souza, Presidente da Banca Examinadora, lavrei a presente ata, assinada por mim, pelos demais membros da Banca Examinadora e pelo candidato.



Emitido em 12/08/2022

ATA DE DEFESA Nº 9/2022 - ALE-CCEA (11.02.15.01.08.02.03.05)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 16/08/2022 09:30)

LUCIANO MENINI
PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO
ALE-DPPGE (11.02.15.05)
Matrícula: 1535967

(Assinado digitalmente em 16/08/2022 13:47)

PEDRO PIERRO MENDONCA
PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO
ALE-CCEA (11.02.15.01.08.02.03.05)
Matrícula: 2659195

(Assinado digitalmente em 12/08/2022 16:32)

TERCIO DA SILVA DE SOUZA
PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO
ALE-CCEA (11.02.15.01.08.02.03.05)
Matrícula: 1642833

(Assinado digitalmente em 15/08/2022 08:06)

SAULO ABREU ALMEIDA DA SILVA
DISCENTE
Matrícula: 9999244045

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ifes.edu.br/documentos/> informando seu número: **9**, ano: **2022**, tipo: **ATA DE DEFESA**, data de emissão: **12/08/2022** e o código de verificação: **e1496492b9**