

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE JUREMA PRETA (*Mimosa tenuiflora*) SOBRE CEPAS DE *Aeromonas* ISOLADAS DE PEIXES

AURA LACERDA CREPALDI

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
NOVEMBRO – 2018**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE JUREMA PRETA
(*Mimosa tenuiflora*) SOBRE CEPAS DE *Aeromonas* ISOLADAS DE
PEIXES**

AURA LACERDA CREPALDI

Engenheira de pesca

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Norma Suely Evangelista-Barreto

Co-orientadora: Floricéa Magalhães Araújo

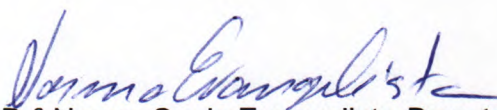
**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
NOVEMBRO – 2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

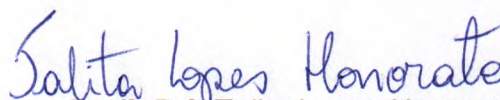
C917a	<p>Crepaldi, Aura Lacerda Atividade antimicrobiana do extrato de jurema preta (<i>Mimosa tenuiflora</i>) sobre cepas de <i>Aeromonas</i> isoladas de peixes / Aura Lacerda Crepaldi._Cruz das Almas, BA, 2021. 60.; il.</p> <p>Orientador: Profª. Drª. Norma Suely Evangelista Barreto Co-Orientador: Profª. Drª. Floricéa Magalhães Araújo</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Microbiologia Agrícola.</p> <p>1. Piscicultura 2. Peixe - Doenças 3. Peixes Ornamentais. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 639.3</p>
-------	---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

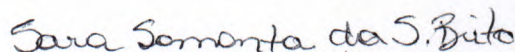
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
AURA LACERDA CREPALDI



Prof^a. Dr^a Norma Suely Evangelista-Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Talita Lopes Honorato
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB



Dr^a. Sara Samanta da Silva Brito
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola em _____”

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha família, em especial à minha mãe, irmãs e tia pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora professora Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto pela confiança, paciência e por todos os seus ensinamentos que contribuíram para minha formação.

À minha co-orientadora Dr^a. Floricéa Magalhães Araújo pelos ensinamentos e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental e do Laboratório de Química Orgânica da UFRB, especialmente Jéssica, Milena, Mariana, Saraí, Thúlio, Thailany e Lucas pelas colaborações na minha pesquisa, amizade e por trazerem leveza ao meu dia a dia.

À Dr^a Aline Simões da Rocha Bispo e a Dr^a Mariza Alves Ferreira pelas contribuições, companheirismo e amizade.

À colega Dennifier Costa Brandão Cruz por toda ajuda dada na identificação molecular.

Ao professor Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach e a Jackeline Pereira Andrade pela amizade, pelo enorme incentivo, acolhimento e pelas colaborações no meu trabalho.

Ao técnico Washington Luiz Gomes Tavechio pela colaboração e incentivo, fundamentais ao meu trabalho.

Ao técnico Fabrício Mendes Miranda pela dedicação incansável e por ser um exemplo de profissional.

Ao professor Dr. Márcio Lacerda Lopes Martins pela identificação da espécie vegetal estudada.

Ao professor Dr. Moacyr Serafim Junior pela disponibilidade de equipamentos e laboratório para execução desse trabalho.

Ao professor Dr. Leopoldo Melo Barreto pelos ensinamentos, equipamentos e disponibilidade.

A todos os professores e a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola que auxiliaram na minha formação.

Ao Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura da UFRB.

À CAPES pela concessão da bolsa.

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	11
-----------------	----

CAPÍTULO 1

Tratamentos alternativos para infecções bacterianas em pisciculturas: uma revisão	13
Resumo	14
Abstract.....	15
Piscicultura no Brasil e no mundo	16
Doenças bacterianas na aquicultura	16
<i>Aeromonas</i> spp.....	18
Uso de antimicrobianos na aquicultura e o aumento da resistência antimicrobiana	19
Compostos bioativos presentes em plantas	23
REFERÊNCIAS	26

CAPÍTULO 2

Resumo	35
Introdução	36
Material e Métodos	37
Resultados	43
Discussão	49
Conclusão	52
REFERÊNCIAS	53

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
----------------------------------	-----------

RESUMO

CREPALDI, A. L. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE JUREMA PRETA (*Mimosa tenuiflora*) SOBRE CEPAS DE *Aeromonas* ISOLADAS DE PEIXES

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Mimosa tenuiflora* frente a cepas de *Aeromonas* isoladas de peixes. Os microrganismos foram isolados a partir de peixes doentes oriundos de uma piscicultura ornamental no município de Dom Macedo Costa, Bahia, Brasil. O isolamento de cepas de *Aeromonas* spp. foi realizado utilizando meios de cultura seletivos (Glutamato Ágar *Pseudomonas/Aeromonas* (GSP), Ágar MacConkey e Ágar sangue enriquecido com 5% de sangue de ovino). Realizou-se a extração de DNA e foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar e sequenciar o gene RNAr 16S. Foi verificada a presença de fatores fenotípicos de virulência (amilase, fosfolipase, gelatinase, caseinase, lipase, hemolisina, urease e DNase) das cepas isoladas. O perfil de sensibilidade a antimicrobianos comerciais foi realizado por difusão em disco ágar Mueller-Hinton. Para testar a sensibilidade a *M. tenuiflora*, foram coletadas cascas do caule que foram submetidas a moagem e maceração a frio utilizando hexano, metanol e água para obtenção dos extratos brutos. A suscetibilidade aos extratos de *M. tenuiflora* foi obtida por microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os extratos foram caracterizados por triagem fitoquímica; quantificação de fenóis totais, taninos condensados e flavonoides totais; e toxicidade aguda (CL50) frente a alevinos de *Oreochromis niloticus*. As cepas foram identificadas genotipicamente como *A. caviae* e *A. veronii* bv. *veronii* e apresentaram, pelo menos, 75% dos fatores de virulência pesquisados. As duas cepas bacterianas apresentaram resistência a dois dos seis antimicrobianos testados e resistência intermediária a, pelo menos, um antimicrobiano. As duas cepas foram sensíveis aos extratos metanólico e aquoso de *M. tenuiflora*, com CIM igual a CBM (250 µg/mL). O conteúdo de fenóis totais dos extratos metanólico e aquoso foi de 2,20 e 1,42 g de EAG/100 g de extrato,

respectivamente; o teor de taninos condensados foi de 69,25 (extrato metanólico) e 59,10 (extrato aquoso) g EC/100 g de extrato e ambos apresentaram traços de flavonoides (>1%). O extrato metanólico obteve CL50 frente a *O. niloticus* igual a 40 µg/mL. A presente pesquisa mostrou que a *M. tenuiflora* é eficiente quanto à sua atividade antimicrobiana in vitro sugerindo a investigação quanto à sua utilização in vivo.

Palavras-chave: Piscicultura. *Oreochromis niloticus*. Resistência bacteriana. Saúde pública. Antimicrobianos naturais.

ABSTRACT

CREPALDI, A. L. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE BLACK JUREMA EXTRACT (*Mimosa tenuiflora*) ON STRAINS OF *Aeromonas* ISOLATED FROM FISHES

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the *Mimosa tenuiflora* extract on strains of *Aeromonas* isolated from fishes. The microorganisms were isolated from sick fishes coming from an ornamental pisciculture in the municipality of Dom Macedo Costa, Bahia, Brasil. The strains of *Aeromonas* spp. were isolated in selective culture media (GSP Agar (*Pseudomonas/Aeromonas* Selective Agar Base), MacConkey agar and blood agar enriched with 5% sheep blood). DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) were carried out in order to amplify and sequence the 16S rRNA gene. Phenotypic virulence factors (amylase, phospholipase, gelatinase, caseinase, lipase, hemolysin, urease, DNase) were found in the isolated strains. The sensitivity profile to commercial antimicrobials was performed in Mueller-Hinton agar plates. To test the sensitivity to *M. tenuiflora*, the experiment collected barks of the trunk that were grinded and cold macerated with hexane, methanol and water to obtain crude extracts. Susceptibility to *M. tenuiflora* extracts were obtained by broth microdilution to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Extracts were characterized by phytochemical screening, quantification of total phenols, condensed tannins and total flavonoids, and acute toxicity (CL50) to *Oreochromis niloticus* fries. The strains were genotypically identified as *A. caviae* and *A. veronii* bv. *veronii* and they presented at least 75% of the virulence factors investigated. The two bacterial strains presented resistance to two out of six tested antimicrobials and medium resistance to at least one antimicrobial. The two strains were sensitive to the methanolic and aqueous extracts of *M. tenuiflora*, with a MIC equal to the MBC (250 µg/mL). The content of total phenols from the methanolic and aqueous extracts were respectively 2,20 g and 1,42 g of an EAG/100g extract; the concentrations of condensed tannins were 69,25 g (methanolic extract) and 59,10 g (aqueous extract) of an EC/100 g extract; both had traces of flavonoids (>1%). The methanolic extract had CL50 to *O. niloticus*

equal to 40 µg/mL. The present study has showed that *M. tenuiflora* is efficient in regard to its in vitro antimicrobial activity – its in vivo use should be further investigated.

Keywords: Pisciculture. *Oreochromis niloticus*. Bacterial resistance. Public Health. Natural antimicrobials.

INTRODUÇÃO

A produção pesqueira mundial vem aumentando de forma constante nas últimas décadas, com taxa anual de incremento de 3,2%, sendo este aumento ocasionado, principalmente, pelo aumento populacional, crescimento da renda da população e pela expansão da produção de pescado (FAO, 2018). No Brasil, a piscicultura apresentou um aumento de 4,4% na produção de 2016 (IBGE, 2016).

O desenvolvimento da atividade aquícola, em sistemas de cultivo com maiores densidades de estocagem ocasiona o favorecimento do estresse animal pela disputa de espaço e alimento, além do comprometimento das condições da qualidade da água. Estas condições são suficientes para o aumento do risco de doenças e, conseqüentemente, para o aumento da utilização de antimicrobianos (GARCIA et al., 2013).

A ocorrência de doenças na aquicultura está diretamente relacionada ao estresse animal por bactérias encontradas naturalmente nos organismos aquáticos e no ambiente de cultivo (TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015). Entre os microrganismos que causam doenças em organismos aquáticos, as espécies do gênero *Aeromonas* são as de maior relevância para a aquicultura pois se trata de microrganismos naturais do ambiente aquático (DEVI et al., 2016).

Dentre os tratamentos usados para o controle de patógenos nos sistemas de cultivo no Brasil, tem-se a utilização dos antimicrobianos florfenicol e oxitetraciclina que são licenciados para utilização na aquicultura (SINDAN, 2014). Embora somente seja permitido a utilização destes fármacos, sabe-se que os produtores fazem a utilização de vários outros antimicrobianos nos cultivos de peixes (FIGUEIREDO; GODOY; LEAL, 2008).

A ampla utilização de antimicrobianos, quer seja no tratamento de enfermidades na saúde humana como na produção animal, tem contribuído para o surgimento de microrganismos resistentes e a bioacumulação de seus resíduos no ambiente aquático e músculo do pescado (CABELLO, 2006; FIGUEIREDO; GODOY; LEAL, 2008; MONTEIRO et al., 2015).

No Brasil, 40% dos remédios consumidos são antimicrobianos e, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 50% das prescrições

de antimicrobianos no mundo são inapropriadas (REIS, 2010). Assim, para tentar controlar a utilização indiscriminada dos antimicrobianos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu a venda controlada de antimicrobianos com retenção e prazo de validade das receitas em sua resolução RDC de no. 44 de 26 de outubro de 2010 (ANVISA, 2010). Por outro lado, diante das consequências causadas ao meio ambiente e a saúde pública, novas formas de controle de enfermidades na aquicultura vêm sendo estudadas para diminuir a utilização dos antimicrobianos. Uma dessas alternativas tem sido a investigação de novas substâncias que apresentam ação antimicrobiana a partir de fontes naturais. Entre essas substâncias podem ser citadas as substâncias de origem animal e vegetal, em que se destacam as substâncias vegetais, presentes em seus extratos brutos (SALEEM et al., 2010; MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2014).

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática que ocorre há décadas, porém a realização de estudos a fim de se obter a comprovação científica tem sido mais recente. O estudo das substâncias fitoquímicas de interesse farmacológico vem sendo amplamente explorado com finalidade de conhecer suas especificidades (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

A jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) é largamente encontrada na caatinga, com distribuição no Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (DUTRA; MORIM, 2015). O interesse pela pesquisa dessa espécie é dado, principalmente, pela presença de alcaloides indólicos e taninos em sua composição química (SOUZA et al., 2008), os quais são descritos como os principais responsáveis pela sua alta atividade antimicrobiana devido a complexação de proteínas e íons metálicos, inibindo enzimas microbianas (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005; MONTEIRO et al., 2005; BEZERRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009).

A partir do conhecimento da presença de substâncias com ação biológica em fontes vegetais e dos riscos relacionados a utilização de drogas antimicrobianas aliados às perdas por doenças no cultivo de pescados, é importante explorar a investigação da atividade antibacteriana de substâncias de origem vegetal frente a patógenos na aquicultura como forma alternativa de tratamento.

CAPÍTULO 1

Tratamentos alternativos para infecções bacterianas em pisciculturas: uma revisão

RESUMO

CREPALDI, A. L. Tratamentos alternativos para infecções bacterianas em pisciculturas: uma revisão

A aquicultura é uma atividade em ascensão no Brasil e no mundo. Um dos fatores para o aumento dessa atividade é a diminuição dos estoques pesqueiros. O desenvolvimento da atividade aquícola possui como uma das suas implicações, a utilização indiscriminada de antimicrobianos no tratamento de enfermidades ou como medida profilática. O aumento da ocorrência de enfermidades advém, principalmente, por microrganismos que habitam o ambiente aquático naturalmente, tornando-se patogênicos aos indivíduos devido ao estresse dos animais, gerado por grandes densidades de estocagens. Na piscicultura, as bactérias oportunistas do gênero *Aeromonas* são responsáveis por grandes perdas de produção. Assim, a utilização de antimicrobianos como forma de tratamento e prevenção de infecções bacterianas é comum em pisciculturas. Apesar da variedade de antimicrobianos utilizados na aquicultura, o Brasil possui registro apenas para o uso do florfenicol e oxitetraciclina. A utilização dessas drogas é fundamental para o tratamento das infecções ocorrentes, porém o seu uso inadequado está diretamente relacionado ao surgimento de resistência microbiana, fazendo-se necessária a investigação de novas substâncias antimicrobianas de fonte natural. Um dos grandes interesses no estudo de antimicrobianos naturais está na aplicação alimentícia para inibição ou redução do crescimento de patógenos de origem alimentar. O aumento dos estudos referentes a utilização de antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais e extratos vegetais são de grande importância como substitutos de antimicrobianos convencionais, pois apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana, causando menos impacto à saúde pública e ao meio ambiente.

Palavras-chave: Piscicultura. Bacteriose. Resistência bacteriana. Saúde pública. Antimicrobianos naturais.

ABSTRACT

CREPALDI, A. L. Alternative treatments for bacterial infections in fish farms: a review

Fish farming is an activity on the rise both in Brazil and worldwide. One of the factors to this rise is the decrease in fish stocks. The development of the aquaculture entails the indiscriminate use of antimicrobials for treating diseases or as a prophylactic measure. The increase in the incidence of diseases derives mainly from microorganisms that inhabit the aquatic environment naturally and they become pathogenic to the individuals due to animal stress caused by great density of stocks. In pisciculture opportunistic bacteria of the genus *Aeromonas* are responsible for great production losses. Therefore use of antimicrobials as a form of treatment and prevention of bacterial infections is common in pisciculture. In spite of the variety of antimicrobials used in aquaculture, Brazil only has registration to use florfenicol and oxytetracycline. The use of these drugs is paramount to the treatment of occurring infections, but its inadequate use is directly related to the emergence of microbial resistance, making it necessary to investigate new antimicrobial substances from natural sources. An interest of the study of natural antimicrobials is its alimentary applicability to inhibit or reduce increase in food-borne pathogens. The increase in studies concerning the use of natural antimicrobials, such as essential oils and vegetable extracts, are of great importance as substitutes of conventional antimicrobials, because they present wide range in antimicrobial action at the same as they cause less damage to the public health and the environment.

KEYWORDS: Pisciculture. Bacteriosis. Bacterial resistance. Public Health. Natural antimicrobials.

Piscicultura no Brasil e no mundo

A produção mundial de pescado em 2016 foi estimada em torno de 170,9 milhões de toneladas, sendo 90,9 milhões de toneladas referentes à pesca extrativa, enquanto a aquicultura contribuiu com 80,0 milhões de toneladas. A piscicultura por sua vez obteve uma produção de 54,1 milhões de toneladas (FAO, 2018).

No Brasil, a piscicultura obteve um crescimento de 4,4% em 2016, em relação ao ano anterior, com uma produção total de 507,1 mil toneladas. O Estado de Rondônia teve uma contribuição na produção de 17,9% (90,1 mil toneladas), seguida do Paraná com 15% (76,0 mil toneladas) e São Paulo com 9,5% (48,3 mil toneladas). A Bahia ocupou o 13º lugar no *ranking* nacional com produção de 10,7 mil toneladas (2,1%) (IBGE, 2016).

Em escala mundial, as espécies mais produzidas são: carpa-capim (11%), carpa prateada (10%), carpa comum (8%) e tilápia do Nilo (8%) (FAO, 2018). No Brasil, a espécie mais produzida é a tilápia (47,1%), seguida do tambaqui (27%), tambacu e tambatinga (8,9%) (IBGE, 2016). A Bahia se destaca na produção de tilápia, sendo o 7º maior produtor nacional em 2016 com produção superior a 26,6 mil toneladas. O maior produtor nacional de tilápia em 2016 foi o Paraná com 69,9 mil toneladas (IBGE, 2016).

Doenças bacterianas na aquicultura

As doenças causadas por bactérias são responsáveis por grandes perdas na produção aquícola. As infecções bacterianas em sistemas aquícolas ocorrem, principalmente, pela predisposição destes organismos ao estresse devido às condições de cultivo (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002). Dentre os principais fatores para o desencadeamento de estresse nos organismos cultivados se destacam o manejo inadequado e o desequilíbrio ambiental. O controle das condições de cultivo é essencial para evitar o surgimento de enfermidades, visto que, a maioria das doenças por bactérias em organismos aquáticos são ocasionados por microrganismos oportunistas (TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015).

A doenças podem ocorrer devido a variações na qualidade da água, deficiências nutricionais, alimentação excessiva, temperatura da água elevada, estresse durante o manuseio e altas densidades de estocagem nos tanques (KUBITZA, 2008). As principais doenças bacterianas em organismos aquáticos são causadas por bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Edwardsiella*, *Streptococcus*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Enterococcus* (MARCUSO et al., 2015; TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015; JATOBÁ; KLIPP; HOPPE, 2016).

Estudos demonstraram que há uma maior prevalência de bactérias Gram negativas do que Gram positivas relacionadas a doenças em tilápias, sendo os gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas* os de maior importância (TIAMIYU et al., 2015; LIMA-JUNIOR et al., 2016; SILVA et al., 2016).

Entre as bactérias causadoras de enfermidades em peixes, o gênero *Aeromonas* apresenta grande relevância para a aquicultura (DEVI et al., 2016), possivelmente pelo seu potencial patogênico relacionado a fatores de virulência como a excreção de enzimas extracelulares (YOUNES; AWAD; GAAFAR, 2015; SILVA et al., 2016). *Aeromonas* spp. são responsáveis por causar erosão das nadadeiras, hemorragia difusa pelo corpo e nadadeiras, abdômen distendido, sangramento nas brânquias e acometer órgãos internos como fígado e rins em peixes (KUBITZA, 2005; BARCELLOS et al., 2008).

Hirsch et al. (2006) em um estudo realizado em Minas Gerais, no Brasil, isolaram 75 cepas em tilápias e em água de cultivo pertencentes a 10 diferentes espécies de *Aeromonas* das quais 70 apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Em uma pesquisa sobre a microbiota aquática em cultivo de tilápias associado a bioflocos e perifíton, no Ceará, dez cepas de *Aeromonas* spp. foram isoladas apresentando, pelo menos, seis fatores de virulência (SILVA et al., 2016). Younes et al. (2015) isolaram onze cepas de *A. hydrophila* em uma piscicultura no Egito, expressando pelo menos um gene de virulência. Além do isolamento de cepas potencialmente patogênicas e resistentes a antimicrobianos, um caso de coinfeção de Tilápia Lake Vírus (TiLV) e *A. veronii* na Malásia ocorrido em 2017 foi reportado (AMAL et al., 2018).

***Aeromonas* spp.**

As bactérias do gênero *Aeromonas* são bastonetes Gram-negativas, não formadores de esporos, fermentadores e anaeróbios facultativos. Inicialmente este gênero foi classificado na família *Vibrionaceae* e posteriormente reclassificado na família *Aeromonadaceae* (GHENGESH et al., 2008). O gênero possui taxonomia complexa com 36 espécies e 12 subespécies relacionadas no LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) (PARTE, 2017).

Apresentam-se morfológicamente em células retas cocobacilares a bacilares, a maioria das espécies possui apenas um flagelo, mas culturas jovens podem formar flagelos peritriquios em meio sólido. Geralmente são oxidase e catalase positiva e podem crescer a temperaturas de 0 a 45 °C, com temperatura ótima variando de 22 a 37 °C. Podem ocorrer em água doce, salobra, água clorada, biosólidos e em esgotos (MARTIN-CARNAHAN; JOSEPH, 2015).

Bactérias autóctones de ambientes aquáticos, são consideradas patógenos para vários animais de sangue quente e sangue frio, como peixes de água doce e salgada, anfíbios, invertebrados, animais domésticos e humanos. Também são consideradas oportunistas pois estão naturalmente presentes em ambiente e organismos aquáticos, mas só se manifestam em situações de estresse, como aumento da temperatura da água, baixa qualidade da água, manuseio inadequado e altas densidades de estocagem (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002).

De acordo com Dong et al. (2017), as ocorrências de doenças em peixes por patógenos do gênero *Aeromonas* eram constantemente relacionadas com *A. hydrophila* mas, em sua maioria, a identificação taxonômica não era confiável por se tratar de identificação bioquímica. Assim, com o avanço das pesquisas a nível molecular deste gênero, um número elevado de espécies de *Aeromonas* foram relacionadas a casos de doenças em peixes, como *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. media*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. encheleia*, *A. dhakensis*, *A. jandaei*, *A. schubertii* (CHEN et al., 2012; DONG et al., 2017; DUMAN et al., 2018).

A dose infectante de *Aeromonas* spp. é variável de acordo com a espécie do patógeno, do hospedeiro e das condições ambientais. De acordo com um estudo realizado na China por Chen et al. (2012), $1,4 \times 10^4$ UFC/g de uma cepa de *A. schubertii* é o suficiente para causar mortalidade de 50% de *Channa maculata*,

enquanto Liu et al. (2018) demonstrou que uma dose de $3,75 \times 10^6$ UFC/g foi responsável por causar 100% de mortalidade para tilápia em dois dias e a dose de 10^7 UFC/g matou 100% de *zebrafish* em apenas um dia de experimento.

As espécies *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii* são reconhecidas como patogênicas ao homem, causando gastroenterite, diarreia, infecções cutâneas, infecções respiratórias, infecções urinárias, peritonites e septicemia (JANDA; ABBOTT, 2010; PARKER; SHAW, 2011).

A capacidade de causar doenças está relacionado a fatores de virulência presentes nas células bacterianas, como adesinas, camada S, lipopolissacarídeos, produção de biofilme, enterotoxinas, hemolisinas, proteases, lipases, hidrolases, proteínas de membrana externa, flagelo e pili (BARNETT; KIROV, 1999; CASABIANCA et al., 2015; MIYAGI; HIRAI; SANO, 2016; IGBINOSA et al., 2017).

A virulência de *Aeromonas* spp. pode ser atribuída a componentes estruturais (adesinas) ou pela excreção de produtos extracelulares. As adesinas são proteínas responsáveis pelo primeiro contato entre o patógeno e a célula hospedeira que podem ser divididas em filamentosas (flagelo e pili) e não filamentosas: lipopolissacarídeos (LPS), proteínas de membrana (OMPs) e cápsula. Entre os produtos extracelulares de maior importância para *Aeromonas* spp. estão as hemolisinas, proteases e lipases (BEAZ-HIDALGO; FIGUEIRAS, 2013).

As hemolisinas são toxinas capazes de lisar as células hospedeiras e criar poros nas membranas; as proteases degradam o muco dos peixes e causa danos aos tecidos, favorecendo a invasão bacteriana na célula hospedeira e; as lipases hidrolisam os lipídeos de membrana, e estão relacionadas a danos intestinais (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013).

Uso de antimicrobianos na aquicultura e o aumento da resistência antimicrobiana

Devido as grandes perdas de produção por bacterioses, a utilização de antimicrobianos na aquicultura é uma prática recorrente como forma de controlar a qualidade microbiológica dos ambientes de cultivo. Na aquicultura, além da utilização dos antimicrobianos no tratamento de doenças, estes medicamentos

também são utilizados como medida profilática (CABELLO, 2006; HSIEH, 2007; FIGUEIREDO; GODOY; LEAL, 2008).

O uso indiscriminado de antimicrobianos na aquicultura tem sido responsável por danos ao meio ambiente e na saúde pública. Apesar da grande utilização de antimicrobianos na aquicultura, o Brasil só possui registro para o uso de florfenicol e oxitetraciclina, o que implica na falta de especificidade e eficácia da sua atividade, pois não apresentam informações dos fabricantes quanto a dose, período de carência e o modo de administração (ZANOLO, 2006; SINDAN, 2014; SHIOGIRI; CRUZ; FERNANDES, 2015).

A administração de antimicrobianos na aquicultura pode ser feita por meio de banhos de imersão, injeção ou pode ser misturado na ração. Destas, a injeção é a forma mais eficiente, porém a mais trabalhosa e impraticável nas fases de recria e engorda, sendo feita em alguns países em peixes reprodutores (FIGUEIREDO; GODOY; LEAL, 2008; HEUER et al., 2009).

Os banhos de imersão com antimicrobianos precisam de maiores doses para atingir a concentração necessária. Assim, o seu uso também se torna limitado e sua utilização ocorre com mais frequência no transporte de alevinos ou na larvicultura e em laboratório, onde o volume de água utilizado é menor (FIGUEIREDO; GODOY; LEAL, 2008).

A forma mais utilizada para administração de antimicrobianos na aquicultura é através da sua incorporação na ração. Essa incorporação pode ser feita diretamente na fábrica ou pelo produtor na propriedade. No Brasil, apenas uma empresa é licenciada para fabricar ração com antimicrobiano que, só pode ser comercializada com receita de um médico veterinário. Assim, uma alternativa encontrada é a mistura desses medicamentos diretamente na ração. Essa mistura é realizada na própria propriedade por pulverização do antimicrobiano misturado a um óleo vegetal (FIGUEIREDO; GODOY; LEAL, 2008).

Uma das preocupações geradas pelo uso de antimicrobianos na produção animal destinada ao consumo humano são os resíduos que se acumulam no ambiente e nos tecidos dos animais que serão consumidos. Em virtude disso, foi estabelecido pelas autoridades Limites Máximos de Resíduos (LMR) para medicamentos veterinários utilizados na produção de animais destinados ao consumo humano (FIGUEIREDO; GODOY; LEAL, 2008).

Apesar de essencial para combater infecções e diminuição drástica de mortalidade por microrganismos patogênicos, o uso recorrente de antimicrobianos na aquicultura tem contribuído para o aumento da pressão seletiva da microbiota no ambiente, promovendo o desenvolvimento de bactérias resistentes a infecções oportunistas. A resistência dessas bactérias pode ser disseminada através de transferência horizontal de genes, podendo ser transferidos para bactérias patogênicas ao homem (SMITH, 2008; HEUER et al., 2009; HOA et al., 2011). Desta forma, a pesquisa sobre novos agentes antimicrobianos é de suma importância para a saúde pública (SALEEM et al., 2010; MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2014).

A resistência microbiana aos fármacos consiste na capacidade adquirida dos microrganismos em resistir aos efeitos dos quimioterápicos que normalmente são suscetíveis. A capacidade em resistir aos antimicrobianos é inerente aos microrganismos, uma vez que estes são produtores naturais de antimicrobianos e necessitam desenvolver mecanismos de resistência para inativar ou destruir seu próprio antimicrobiano (MADIGAN et al., 2010).

A resistência aos antimicrobianos pode ser evidenciada por meio de diversas pesquisas já realizadas em áreas de cultivo de organismos aquáticos e em pescado comercializado em diversas regiões. Em água de tanques de cultivo e organismos de uma aquicultura na Austrália, 41% das cepas de *Aeromonas* isoladas apresentaram resistência a tetraciclina, 45% a oxitetraciclina e menos de 5% ao florfenicol (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006).

Resistência antimicrobiana também foi relatada em *Plesiomonas shigelloides* e *A. hydrophila* isolados de tanques tratados com antimicrobianos. Foi evidenciado que as bactérias dos tanques contendo os medicamentos apresentaram maior resistência em relação aos isolados dos rios não tratados, ou seja, tetraciclina, oxitetraciclina, clorafenicol, ampicilina e nitrofurantoína, ficando evidente a relação da resistência aos antimicrobianos e a utilização destes nos ambientes de cultivo (SAPKOTA et al., 2008).

Em água e sedimento também foi relatada resistência a antimicrobianos em cepas dos gêneros *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas* e *Aeromonas* com resistência a várias classes de antimicrobianos de uso clínico como, norfloxacin,

ciprofloxacina, tetraciclina, amoxicilina, lincomicina, novobiocina, oxacilina, penicilina + trimetopim + sulfametaxozol, ampicilina, clorafenicol, ácido nalidíxico, eritromicina, espiramicina e colistina (BELÉM-COSTA; CYRINO, 2006; BARCELLOS et al., 2008; MONTEIRO et al., 2015).

Cepas de *Aeromonas* também estão relacionadas a casos de resistência antimicrobiana, visto a sua importância em casos de doenças na aquicultura (KUBITZA, 2005; DEVI et al., 2016). Foram descritos casos de resistência para as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. salmonicida* e *A. jandaei* isoladas de água de cultivo e de peixes a drogas antimicrobianas como gentamicina, amoxicilina, tetraciclina, estreptomicina, lincomicina, neomicina, eritromicina, sulfazotrim, enroflaxacina, ácido nalidíxico, norflaxacina e nitrofurantoina (SUHET; SCHOCKEN-ITURRINO; AMARAL, 2011; SANTOS, 2014). Além de cepas resistentes, também já foram encontrados resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e florfenicol na água de cultivo; oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em amostras de sedimentos e, oxitetraciclina e florfenicol em amostras de peixes, apesar de que em nenhuma amostra os valores estivessem acima dos valores estabelecidos (MONTEIRO et al., 2015).

A partir dos danos causados ao meio ambiente e a saúde pública devido ao surgimento de bactérias resistente, novas formas de controle de enfermidades na aquicultura estão sendo estudadas para diminuir a utilização dos fármacos. Uma das alternativas é a utilização de probióticos que é uma alternativa sustentável, com capacidade de melhorar a qualidade da água de cultivo, controlar patógenos, melhorando a saúde do organismo aquático cultivado (DECAMP; MORIARTY; LAVENS, 2006; VINE; LEUKES; KAISER, 2006; LAZADO; CAIPANG, 2014).

Os probióticos podem ser utilizados por meio de sua adição na ração ou diretamente na água dos tanques de cultivo. Quando incorporados a ração, agem modificando a microbiota intestinal pela competição com microrganismos patogênicos e pela produção de substâncias antibacterianas e enzimas. Quando são adicionados aos tanques, agem reduzindo a carga patogênica pela modificação da microbiota natural (CYRINO et al., 2010).

Compostos bioativos presentes em plantas

Uma das alternativas encontradas para combater a resistência à fármacos, é a investigação de novas substâncias que apresentam ação antimicrobiana a partir de fontes naturais. Entre essas substâncias podem ser citadas as substâncias de origem animal e vegetal, em que se destacam as substâncias vegetais, presentes em seus extratos brutos e óleos essenciais (NASCIMENTO et al., 2007; MOHANA; SATISH; RAVEESHA, 2008; SALEEM et al., 2010; MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2014).

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática que ocorre a décadas, porém a realização de estudos a fim de se obter a comprovação científica é mais recente. O estudo das substâncias fitoquímicas de interesse farmacológico vem sendo amplamente explorado com finalidade de conhecer suas especificidades (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

Um dos grandes interesses no estudo de antimicrobianos naturais diz respeito a aplicação alimentícia para inibição ou redução do crescimento de patógenos de origem alimentar (MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2014). Muitas espécies vegetais, comumente utilizadas como especiarias, têm sido estudadas quanto à função antimicrobiana na conservação de alimentos, como por exemplo o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), hortelã (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgares*), canela (*Cinnamomum zeylanicum Blume*), cravo (*Eugenia caryophyllata*), gengibre (*Zingiber officinalis*), entre outros (TRAJANO et al., 2009; MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2014).

Os extratos de Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e de Neem (*Azadiracta indica*) também foram estudados demonstrando que o extrato da jurema preta apresentou maior atividade antimicrobiana em relação ao extrato de Neem sobre *Staphylococcus coagulase negativa* (PEREIRA et al., 2009).

Além da composição química, a ação antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos vegetais também depende de outros fatores como variações genéticas intraespecíficas da espécie, clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, técnica de extração e localização geográfica (NASCIMENTO et al., 2007).

A *Mimosa tenuiflora* é uma espécie arbustiva, conhecida popularmente como jurema ou jurema-preta, pertencente à família Fabaceae. Espécie nativa do Brasil é largamente encontrada na caatinga, com distribuição no Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (DUTRA; MORIM, 2015). A Fabaceae Lindl. é uma família nativa, não endêmica no Brasil que ocorre em todas as regiões brasileiras, possui 222 gêneros e 2850 espécies aceitas (LIMA et al., 2015).

O interesse pela pesquisa da espécie é dado, principalmente, pela presença de alcaloides indólicos e taninos em sua composição química (SOUZA et al., 2008). *M. tenuiflora* é utilizada popularmente como cicatrizante desde o terremoto ocorrido em 1985, no México, que começou a explorar sua utilização com a formulação de produtos comerciais para aplicação direta em feridas e queimaduras, gargarejo e ingestão em casos de infecções bucais, gastrointestinais e uterinas (DOMINGUEZ et al., 1989; CAMARGO-RICALDE et al., 2004). Esta espécie também apresenta alto potencial forrageiro, sendo uma das espécies mais utilizadas para alimentação de ovinos, caprinos e bovinos em períodos de seca. Apesar dos benefícios anti-helmínticos observados em ovinos, sua utilização precisa ser controlada em virtude da grande quantidade de taninos presentes em seus ramos que ocasionam efeito embriotóxico e fetotóxico em cabras gestantes (DANTAS et al., 2012).

Já a atividade antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* foi comprovada em isolados de *Staphylococcus aureus* a partir de animais com mastite bovina (BEZERRA et al., 2009) e em *S. aureus* isolados de mastite bubalina (PEREIRA et al., 2009). Outros autores também relataram a atividade antimicrobiana de *M. tenuiflora* frente a cepas de *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *A. caviae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *S. aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005; GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2006; BEZERRA, 2009; PEREIRA et al., 2009).

Segundo Bezerra (2009), dentre os compostos presentes em *M. tenuiflora* estão presentes taninos, flavonas, catequinas leucoantocianinas, saponinas, triterpenóides e alcaloides, onde sua ação antimicrobiana se deve, principalmente, aos taninos.

O tanino é um composto fenólico altamente reativo quimicamente, sendo solúvel em água e solventes orgânicos formando ligações de hidrogênio, e utilizado no curtimento de couro e tratamento de águas residuais. Biologicamente os taninos possuem ação cicatrizante, anti-inflamatória, antimicrobianas, inibidoras de radicais livres e da transcriptase em HIV. A atividade antimicrobiana dos taninos está ligada a alta capacidade de ligar-se a proteínas, outras macromoléculas e íons metálicos das quais são essenciais para a fisiologia microbiana. Pelo mesmo motivo, os taninos também foram descritos como tóxicos para insetos e roedores (MONTEIRO et al., 2005; AZEVÊDO et al., 2017).

REFERÊNCIAS

AKINBOWALE, O. I.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 100, n. 5, p.1103-1113, maio 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02812.x>.

AMAL, M. N. A. et al. A case of natural co-infection of Tilapia Lake Virus and *Aeromonas veronii* in a Malaysian red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality. **Aquaculture**, [s.l.], v. 485, p.12-16, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.019>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010**. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências [portaria na internet]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0044_26_10_2010.html

AZEVÊDO, T. K. B. et al. Teor de taninos condensados presente na casca de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) em função das fenofases. *Floresta e Ambiente*, [s.l.], v. 24, p.1-7, 13 jul. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.026613>.

BARCELLOS, L. J. G. et al. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 355-363, 2008.

BARNETT, T. C.; KIROV, S. M. The type IV *Aeromonas pilus* (Tap) gene cluster is widely conserved in *Aeromonas* species. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.77-84, fev. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.1998.0252>.

BEAZ-HIDALGO, R; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Diseases**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.371-388, 11 jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12025>.

BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J. E. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 63, n. 3, p.281-

284, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162006000300011>.

BEZERRA, D. A. C. et al. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.814-817, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2009000600002>.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 7, p.1137-1144, jul. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>.

CAMARGO-RICALDE, S. L.; DHILLION, S. S.; GARCÍA-GARCÍA, V. Phenology, and seed production and germination of seven endemic *Mimosa* species (Fabaceae-Mimosoideae) of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. **Journal of Arid Environments**, [s.l.], v. 58, n. 4, p.423-437, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2003.11.007>

CASABIANCA, A. et al. Effect of starvation on survival and virulence expression of *Aeromonas hydrophila* from different sources. **Archives of Microbiology**, [s.l.], v. 197, n. 3, p.431-438, 23 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1074-z>.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 131, n. 2, p.326-342, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.003>

CHEN, Y.F. et al. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède). **Journal of Fish Diseases**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.421-430, 23 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01362.x>.

CYRINO, J. E. P. et al. A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 39, p.68-87, jul. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982010001300009>.

DANTAS, A. F. M. et al. Embryonic death in goats caused by the ingestion of *Mimosa tenuiflora*. *Toxicon*, [s.l.], v. 59, n. 5, p.555-557, abr. 2012. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.020>.

DECAMP, O.; MORIARTY, D. J.; LAVENS, P. Selected bacillus strains as feed additive for aquaculture. **Feed Technology**. Septiembre, v. 2006, p. 1-5, 2006.

DEVI, K. R. et al. In vitro and in vivo efficacy of rosmarinic acid on quorum sensing mediated biofilm formation and virulence factor production in *Aeromonas hydrophila*. **Biofouling**, [s.l.], v. 32, n. 10, p.1171-1183, 14 out. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2016.1237220>.

DOMINGUEZ, X. A. et al. Kukulkanins A and B, New Chalcones from *Mimosa tenuifolia*. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.864-867, jul. 1989. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np50064a035>.

DONG, H. T. et al. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, [s.l.], v. 40, n. 10, p.1395-1403, 6 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12617>.

DUMAN, M. et al. The determination of the infectious status and prevalence of motile *Aeromonas* species isolated from disease cases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and aquarium fish. **Journal of Fish Diseases**, [s.l.], v. 41, n. 12, p.1843-1857, 21 set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12896>.

DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. *Mimosa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18874>>.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. 250 pp. 2018.

FIGUEIREDO, H. C. P.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G. Sanidade aquícola: antibióticos na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**. n. 105, p. 42-49, 2008.

GARCIA, F. et al. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, [s.l.], v. 410-411, p.51-56, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.010>.

GHENGHESH, K. S. et al. Aeromonas-Associated Infections in Developing Countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, [s.l.], v. 2, n. 02, p.81-98, 1 abr. 2008. **Journal of Infection in Developing Countries**. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.277>.

GONÇALVES, A. L; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 72, n. 3, p.353-358, 2005.

GONÇALVES, A. L; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Efeitos antimicrobianos de algumas árvores medicinais nativas nas conjuntivites infecciosas. **O Biológico**. v. 68, 2006.

HIRSCH, D. et al. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.1211-1217, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-70542006e000600026>.

HEUER, Ole e. et al. Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 49, n. 8, p.1248-1253, 15 out. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/605667>.

HOA, P. T. P. et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 409, n. 15, p.2894-2901, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.030>.

HSIEH, C. et al. PCR and *in situ* hybridization for the detection and localization of a new pathogen *Francisella*-like bacterium (FLB) in ornamental cichlids. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s.l.], v. 75, p.29-36, 29 mar. 2007. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/dao075029>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 44, 53 p. 2016.

IGBINOSA, I. H. et al. Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 107, p.185-192, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.037>.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.35-73, 1 jan. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00039-09>.

JATOBÁ, A.; KLIPP, S. P.; HOPPE, R. Primeiro relato de *Francisella noatunensis* subespécie *orientalis* no sul do Brasil – relato de caso. **Acta Veterinaria Brasilica**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.172-176, 15 abr. 2016. Editora da Universidade Federal Rural do Semi-Arido - EdUFERSA. <http://dx.doi.org/10.21708/avb.2016.10.2.5512>.

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

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. **Aquaculture**, [s.l.], v. 424-425, p.53-62, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.040>.

LIMA, H.C. et al. *Fabaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>.

LIMA-JUNIOR, E. M. et al. Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*. **Journal of Health & Biological Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.193-197, 28 set. 2016. Instituto para o Desenvolvimento da Educação. <http://dx.doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v4i3.767.p193-197.2016>.

LIU, C et al. *Aeromonas shuberti* as a cause of multi-organ necrosis in internal organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Diseases**, [s.l.], v. 41, n. 10, p.1529-1538, 24 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12848>.

MACHADO, B. A. S.; RIBEIRO, D. S.; DRUZIAN, J. I. Estudo prospectivo relativo à atividade antimicrobiana de algumas plantas aromáticas. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 1, p. 97-105, 2014. <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v6i1.11433>

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MARCUSSO, P. F. et al. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede.

Bioscience Journal. Uberlândia: Universidade Federal Uberlândia, v. 31, n. 2, p. 549-554, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/129139>>

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. *Aeromonas*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, [s.l.], p.1-44, 14 set. 2015. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01081>.

MIYAGI, K.; HIRAI, I.; SANO, K. Distribution of *Aeromonas* species in environmental water used in daily life in Okinawa Prefecture, Japan. **Environmental Health and Preventive Medicine**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.287-294, 13 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12199-016-0528-0>.

MOHANA, D. C.; SATISH, S.; RAVEESHA, K. A. Antibacterial evaluation of some plant extracts against some human pathogenic bacteria. **Advances Biological Research**, v. 2, p. 49-55, 2008.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.892-896, out. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000500029>.

MONTEIRO, S. H. et al. Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Aquaculture**, [s.l.], v. 447, p.37-43, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.002>.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.108-113, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2007000100020>.

PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.109-118, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2010.12.003>.

PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [s.l.], v. 68, n. 6, p.1825-1829, 1 jun. 2018. **Microbiology Society**. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. In: **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2002. p. 305-305.

PEREIRA, A. V. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de jurema preta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 341-346, 2009.

REIS, F. **Especial RDC 44/2010**: antibióticos. Disponível em: <http://pfarma.com.br/noticiasetor-farmaceutico/legislacao-farmaceutica/387-rdc-44-2010antibioticos.html>

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports*, [s.l.], v. 27, n. 2, p.238-254, 2010. **Royal Society of Chemistry (RSC)**. <http://dx.doi.org/10.1039/b916096e>.

SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.1215-1226, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.04.009>.

SHIOGIRI, N. S; CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. **Antimicrobianos utilizados no controle de peixes em sistemas de cultivo**. In: Tavares-Dias, M, Mariano, WS. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Pedro e João Editores; p. 245-262, 2015.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. *Compêndio de produtos veterinários*. São Paulo: 2014.

SILVA, J. L. S. et al. Aquatic microbiota diversity in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bioflocs or periphyton: virulence factors and biofilm formation. **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, Maringá, v. 38, n. 3, p. 233-241, Sept. 2016. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v38i3.31910>.

SMITH, P. R. et al. Guidelines for Antimicrobial Use in Aquaculture. *Guide To Antimicrobial Use in Animals*, [s.l.], p.207-218, 30 jan. 2009. **Blackwell Publishing, Ltd.** <http://dx.doi.org/10.1002/9781444302639.ch12>.

SOUZA, R. S. O. de et al. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.937-947, out. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132008000500010>.

SUHET, M. I.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; AMARAL, L. A. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de Tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). **Ars Veterinaria**, v. 27, n. 1, p. 036-044, 2011.

TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. São Carlos: **Pedro & João Editores**, 2015. p. 245-262.

TIAMIYU, A. M. et al. Occurrence and Antibiotic Sensitivity of Bacterial Strains Isolated from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* onogabttained in Ibadan, Southwest Nigeria. **Journal of Biosciences and Medicines**, [s.l.], v. 03, n. 05, p.19-26, 2015. Scientific Research Publishing, Inc,. <http://dx.doi.org/10.4236/jbm.2015.35003>.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.542-545, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612009000300014>.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.404-427, maio 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x>.

ZANOLO, R. Enfermidades na aquicultura: perspectivas e importância do uso de produtos veterinários registrados para a atividade. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**. v. 8, n.2, p, 42-44, 2006.

YOUNES, A. M.; AWAD, E.; GAAFAR, A. Virulence Determinants and Plasmid Profile of *Aeromonas hydrophila* Strains Isolated from *Oreochromis niloticus*. **Global Veterinaria**, Dokki, Giza, Egypt, v. 15, n. 6, p.613-617, jan. 2015. DOI: 10.5829/idosi.gv.2015.15.06.10213}.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE JUREMA PRETA (*Mimosa tenuiflora*) FRENTE a *Aeromonas*

Artigo a ser submetido a revista *Microbial Pathogens*

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE JUREMA PRETA (*Mimosa tenuiflora*) FRENTE a *Aeromonas*

Aura Lacerda Crepaldi ^a, Thúlio Victor Silva Rocha ^a, Saraí Aparecida Santiago de Sena^b, Dennifier Costa Brandão Cruz ^a, Washington Luiz Gomes Tavechio ^a, Floricéa Magalhães Araújo ^c, Norma Suely Evangelista-Barreto ^a

^a Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

^b Universidade Estadual de Feira de Santana.

^c Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Mimosa tenuiflora* frente a cepas de *Aeromonas* isoladas de peixes. Os microrganismos foram isolados a partir de peixes doentes oriundos de uma piscicultura ornamental no município de Dom Macedo Costa, Bahia, Brasil. O isolamento de cepas de *Aeromonas* spp. foi realizado utilizando meios de cultura seletivos (Glutamato Ágar *Pseudomonas/Aeromonas* (GSP), Ágar MacConkey e Ágar sangue enriquecido com 5% de sangue de ovino). Realizou-se a extração de DNA e foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar e sequenciar o gene RNAr 16S. Foi verificada a presença de fatores fenotípicos de virulência (amilase, fosfolipase, gelatinase, caseinase, lipase, hemolisina, urease e DNase) das cepas isoladas. O perfil de sensibilidade a antimicrobianos comerciais foi realizado por difusão em disco ágar Mueller-Hinton. Para testar a sensibilidade a *M. tenuiflora*, foram coletadas cascas do caule que foram submetidas a moagem e maceração a frio utilizando hexano, metanol e água para obtenção dos extratos brutos. A suscetibilidade aos extratos de *M. tenuiflora* foi obtida por microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os extratos foram caracterizados por triagem fitoquímica; quantificação de fenóis totais, taninos condensados e flavonoides totais; e toxicidade aguda (CL50) frente a alevinos de *Oreochromis niloticus*. As cepas foram identificadas genotipicamente como *A. caviae* e *A. veronii*

bv. *veronii* e apresentaram, pelo menos, 75% dos fatores de virulência pesquisados. As duas cepas bacterianas apresentaram resistência a dois dos seis antimicrobianos testados e resistência intermediária a, pelo menos, um antimicrobiano. As duas cepas foram sensíveis aos extratos metanólico e aquoso de *M. tenuiflora*, com CIM igual a CBM (250 µg/mL). O conteúdo de fenóis totais dos extratos metanólico e aquoso foi de 2,20 e 1,42 g de EAG/100 g de extrato, respectivamente; o teor de taninos condensados foi de 69,25 (extrato metanólico) e 59,10 (extrato aquoso) g EC/100 g de extrato e ambos apresentaram traços de flavonoides (>1%). O extrato metanólico obteve CL50 frente a *O. niloticus* igual a 40 µg/mL. A presente pesquisa mostrou que a *M. tenuiflora* é eficiente quanto à sua atividade antimicrobiana in vitro sugerindo a investigação quanto à sua utilização in vivo.

Palavras-chave: Piscicultura. *Oreochromis niloticus*. Resistência bacteriana. Saúde pública. Antimicrobianos naturais.

1. INTRODUÇÃO

A produção pesqueira mundial vem aumentando de forma constante nas últimas décadas com taxa anual de incremento de 3,2% (FAO, 2018). No Brasil em 2016, a produção total da piscicultura foi de 507,12 milhões de toneladas representando um incremento de 4,4% em relação a 2015 (IBGE, 2016).

O desenvolvimento da atividade aquícola acarreta em sistemas de cultivo com maior densidade de estocagem favorecendo o aumento do estresse animal pela disputa de alimento e espaço, além de alterações na qualidade da água. Estas condições são suficientes para o aumento da ocorrência de doenças e, conseqüentemente, medidas de controle com a utilização de antimicrobianos (GARCIA et al., 2013).

Os antimicrobianos são utilizados com frequência no ciclo de produção aquícola para o tratamento de infecções bacterianas, como medidas profiláticas e

promotores de crescimento. O uso excessivo destas drogas tem causado preocupações quanto ao acúmulo dos seus resíduos no ambiente e na cadeia alimentar. Estes resíduos podem contribuir para o surgimento de microrganismos resistentes a infecções oportunistas, podem ser diretamente tóxicos ou causar reações alérgicas para indivíduos sensíveis (SALEEM et al., 2010; MACHADO et al., 2014; MONTEIRO et al., 2015).

No Brasil, apenas os antimicrobianos florfenicol e oxitetraciclina são licenciados para utilização na aquicultura (SINDAN, 2014). Mesmo assim percebe-se a utilização de vários outros antimicrobianos pelos produtores como amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e estreptomicina (HEUER et al., 2009).

O aumento da resistência antimicrobiana nos últimos anos tem incentivado os pesquisadores a buscarem medidas alternativas para o controle de patógenos. Dentre estas medidas tem-se o uso de compostos bioativos presentes em extratos vegetais e que apresentam amplo espectro de ação antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2009; BEZERRA et al., 2009; LEITE et al., 2015).

A jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) é uma planta arbustiva largamente encontrada na Caatinga, com ampla distribuição no nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 1999). Essa espécie é conhecida popularmente por apresentar características anti-inflamatórias (AGRA et al., 2008), cicatrizante e antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BEZERRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2015; BORGES et al., 2017).

Baseado nisso, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de jurema preta frente a cepas de *Aeromonas* isoladas de peixes doentes como alternativa ao uso de antimicrobianos sintéticos no tratamento de infecções em pisciculturas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi executada mediante a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) registrada com o número 23007.027506/2017-58.

2.1. Coleta e caracterização dos microrganismos

Peixes mortos com sintomas de infecção bacteriana foram coletados de tanques de uma piscicultura ornamental no município de Dom Macedo Costa, Bahia, Brasil. Os peixes com sintomas como lesões ocular, na superfície do corpo e cauda e natação errática foram transportados em caixas isotérmicas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (LABMAA), na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Com auxílio de *swabs* estéreis foram feitos esfregaços nas lesões dos animais coletados e inoculados em placas de Petri contendo os meios de cultura Glutamato Ágar *Pseudomonas/Aeromonas* (GSP) (30 °C/24 h), Ágar MacConkey (30 °C/24 h) e Ágar sangue enriquecido com 5% de sangue de ovino (35 °C/24 h) (ALEXANDRINO et al., 1999; SALVADOR et al., 2005; SILVA et al., 2010). Após o período de incubação, foram retiradas colônias do crescimento predominante e semeadas em tubos contendo Ágar Tripitico de Soja (TSA) para caracterização fenotípica e morfológica.

As colônias foram selecionadas de acordo com as características típicas para o gênero *Aeromonas* (amarelada com halo transparente para ágar GSP; incolores a verde café para o MacConkey e; acinzentadas com atividade hemolítica para ágar sangue). Foram realizados testes de oxidase, catalase e coloração de Gram.

2.1.1. Testes fenotípicos de virulência

Para a presenças de exoenzimas foram realizados testes a partir da semeadura dos isolados em Ágar TSA e Ágar nutriente enriquecidos com 0,1% de amido (amilase), 1% de gema de ovo (fosfolipase), 0,5% de gelatina (gelatinase), 5% de leite em pó desnatado (caseinase), 1% de Twen 80 (lipase), 5% de sangue de ovinos (hemolisina), caldo ureia (uréase) e Ágar DNase com 0,01% de azul de toluidina (DNase). A positividade dos testes foi verificada pela formação de halos (amilase, fosfolipase, gelatinase, caseinase, lipase e hemolisina) ou mudança da coloração (uréase e DNase) (HONGPING et al., 2011; PEREIRA et al., 2004; CABRERA-RODRÍGUEZ et al., 2008).

2.1.2. Suscetibilidade antimicrobiana

A partir das culturas crescidas *over night* em TSA, uma alçada da cultura foi suspensa em solução salina 0,85% até encontrar a absorbância de 0,08 a 0,10 em espectrofotômetro ($\lambda = 625 \text{ nm}$), indicando densidade bacteriana de 10^8 UFC/ml. Cada isolado foi espalhado com auxílio de um *swab* estéril em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton para posterior adição dos discos contendo antimicrobianos e incubação das placas a 37° C por 24 horas (CLSI, 2010). Foram testados os antimicrobianos, amoxicilina (10 μg), tetraciclina (30 μg), ampicilina (10 μg), cloranfenicol (30 μg), estreptomicina (10 μg) e eritromicina (15 μg). Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com paquímetro digital e classificados como sensíveis ($\geq 18 \text{ mm}$), intermediários (13–17 mm) e resistentes ($\leq 13 \text{ mm}$) (OKONKO et al., 2009; ODEYEMI; AHMAD, 2017). O índice de múltipla resistência antimicrobiana (índice MAR) foi calculado como o número de antimicrobianos ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de antimicrobianos testados, multiplicando-se o valor final por 100 para obtenção dos resultados em percentual (KRUMPERMAN, 1983).

2.1.3. Identificação dos isolados

Para a extração de DNA, os isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura caldo nutriente por 24 horas. Após esse período, a extração foi realizada como descrita por Lee et al (2003), com algumas modificações. Foi retirado polivinilpirrolidona e 2-mercaptoetanol da solução de lise e após a etapa de lise, foi acrescentado acetato de potássio. Para precipitar o DNA foi adicionado junto com o isopropanol, acetato de amônio. Os *primers* 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (MIYASHITA et al., 2009) foram utilizados para amplificar e sequenciar o gene RNAr 16S como descrito por Leite et al (2012). Os produtos da PCR foram sequenciados na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda, utilizando o sequenciador AB 3500 de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems). As sequências foram editadas no programa Sequencher v. 5. 4. 6. Em seguida foram comparadas por meio do programa BLASTn (ALTSCHUL et al. 1997) com outras sequências depositadas em bancos de dados públicos. As sequências

das espécies tipo do RNAr 16S foram recuperadas da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) em agosto de 2018 (EUZÉBY, 1997). O programa MEGA v. 6.0 (TAMURA et al., 2013) foi utilizado para alinhar e realizar a análise filogenética das sequências com o método máxima verossimilhança e com análises de bootstraps com 1000 repetições. O modelo Hasegawa-Kishino-Yano com distribuição gamma e sítios invariáveis foi selecionado como o melhor modelo de substituição de nucleotídeo.

2.2. Obtenção dos extratos

Cascas do caule de *M. tenuiflora* foram coletadas no município de Cruz das Almas, Bahia (12°39'13.0"S 39°05'06.1"O) e encaminhadas para o Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Após a confirmação e deposição da espécie vegetal em exsicatas (HURB 18333), no Herbário do Recôncavo da Bahia, todo o material foi seco a temperatura ambiente (25° C) e triturado em moinho de facas tipo Willey. O material triturado foi submetido à maceração (1:2) em dois solventes em ordem crescente de polaridade, a saber: hexano e metanol. A maceração ocorreu por três vezes para cada solvente, a temperatura ambiente (25° C ± 2° C). As soluções extrativas foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura de 30° C.

Para obtenção do extrato aquoso foi adicionado água destilada estéril a temperatura ambiente ao material vegetal (2:1). O extrato ficou em maceração por 24 horas sob refrigeração. Após o período de maceração o material foi filtrado em filtro de papel e armazenado sob refrigeração para evitar contaminação. Uma parte do extrato aquoso foi liofilizado para realização da triagem fitoquímica.

2.3. Triagem fitoquímica

Foram realizadas análises qualitativas de acordo com Matos (1997). Para as análises qualitativas foram realizadas técnicas para detecção de fenóis totais, taninos, flavonoides, esteroides e triterpenoides, alcaloides e saponinas nos extratos hexânico, metanólico e aquoso.

2.4. *Quantificação de fenóis totais*

Os compostos fenólicos dos extratos metanólico e aquoso foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu. Uma alíquota de 100 µL de cada um dos extratos dissolvidos em metanol foi agitada com 500 µL de Folin-Ciocalteu, 6 mL de água destilada e 2 mL de Na₂CO₃ (20%) e avolumado com água destilada em balão volumétrico de 10 mL. Após 2 horas de repouso ao abrigo de luz, as absorbâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro a 750 nm (BONOLI et al., 2004). Todas as análises foram feitas em triplicata e o teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação das absorbâncias das amostras contra uma curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão (0,9 a 6,3 mg/L) e expressos em g equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato.

A equação da curva de calibração do ácido gálico foi:

$$y = 0,0983x + 0,0355$$

Onde, y é a absorbância a 750 nm e x é a concentração de ácido gálico e o coeficiente de correlação R=0,992.

2.5. *Quantificação de taninos condensados*

Uma alíquota de 1 mL dos extratos aquoso e metanólico diluídos em metanol foram adicionados a 5 mL de solução de vanilina 1% e HCl 8% (1:1). As absorbâncias foram lidas a 500 nm após o repouso de 20 minutos em banho-maria a 30 °C. Todas as análises foram feitas em triplicata e o teor de taninos condensados foi determinado pela interpolação das absorbâncias de uma curva de calibração com a catequina como padrão (200 a 1000 mg/L), expresso em g de equivalente a catequina/100 g de extrato (ARYOUE-GRAND et al., 1994).

A equação da curva de calibração da catequina foi:

$$y = 0,0004x + 0,0128$$

Onde, y é a absorbância a 500 nm e x a concentração de catequina e o coeficiente de correlação R= 0,998.

2.6. Quantificação de flavonoides

Para a determinação do teor de flavonoides totais, uma alíquota de 5 mL de AlCl_3 (2%) foi adicionada à 5 mL de cada extrato diluídos em metanol (50 $\mu\text{g/mL}$). Após 30 minutos, as absorvâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro a 415 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata e o teor de flavonoides totais foi determinado por interpolação da curva de calibração utilizando a rutina como padrão (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) e expressos em porcentagem (ARYOUE-GRAND et al., 1994).

A equação da curva de calibração da rutina foi:

$$y = 0,0146x + 0,2147$$

Onde, y é a absorvância a 415 nm e x é a concentração da rutina e o coeficiente de correlação $R=0,999$.

2.7. Suscetibilidade antimicrobiana frente ao extrato de *Mimosa tenuiflora*

2.7.1. Atividade antimicrobiana in vitro

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada em placas de microtitulação de poliestireno contendo 96 poços (CLSI, 2012). Foram testados extratos hexânico, metanólico e aquoso, diluídos em DMSO 10% nas concentrações decrescendo de 1000 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$. Com controles de esterilidade do meio e dos extratos e controles positivos com duas cepas padrão Gram positiva e Gram negativa (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Após incubação a 35 ° C por 24 horas, foi adicionada uma alíquota de resazurina sódica 0,01% em todos os poços e reincubada por mais duas horas. A CIM foi determinada pela menor concentração em que não houve crescimento bacteriano.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), uma alíquota de 5 μL dos poços que apresentaram inibição foi inoculada em placas de Petri contendo o meio sólido *Plate Count Agar* (PCA) e incubadas a 35 °C por 24 horas. As placas que apresentaram crescimento foram consideradas com atividade bacteriostática e as placas que não apresentaram crescimento, bactericida.

2.7.2. Teste de toxicidade aguda (CL_{50})

Foi determinada a concentração mínima do extrato metanólico de *M. tenuiflora* responsável por causar mortalidade a 50% de alevinos de *O. niloticus*. Os peixes foram expostos a cinco tratamentos com diferentes concentrações (T1=250 mg/L, T2=75 mg/L, T3=50 mg/L, T4=25 mg/L e T5=10 mg/L) do extrato metanólico diluído em DMSO 10%, um controle com DMSO 10% (T6) e um controle negativo (T7), com três repetições e cinco peixes por repetição em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). O experimento foi realizado em aquários contendo 5 L de água, aeração leve constante, em laboratório devidamente climatizado, com indivíduos pesando 1 g, respeitando a densidade máxima de 1 g/L (IBAMA, 1998). A mortalidade foi avaliada diariamente com a retirada dos peixes mortos dos recipientes e as variáveis físicas e químicas da água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica) foram verificadas de cada aquário com auxílio de sonda multiparâmetro Hanna e teste para amônia tóxica. Os valores de CL_{50} 48 horas foram calculados com o auxílio do programa Trimmed Spearman-Kärber Method (HAMILTON et al. 1977).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização genotípica

A análise da sequência parcial do gene 16S RNAr revelou 100% de semelhança para *Aeromonas veronii* bv. *Veronii* (E5) e *A. caviae* (A4). A árvore filogenética foi construída com base em sequências genéticas no banco de dados LPSN (Figura 1).

A análise genética utilizando o gene 16 RNAr mostrou que as cepas A4 e E5 são estritamente relacionadas a *A. caviae* (ATCC15468) e *A. veronii* bv *veronii* (ATCC 35624) com 100% de homologia.

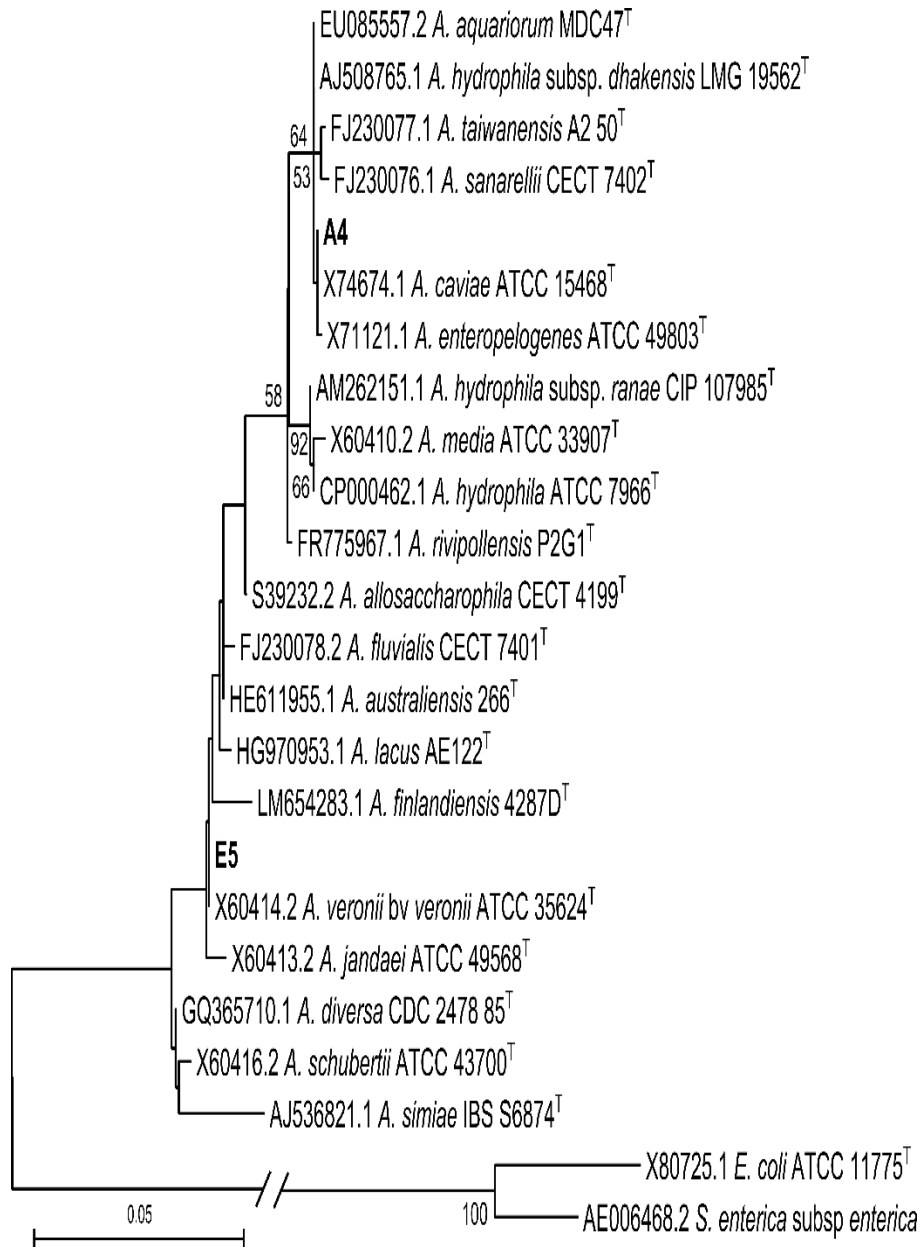


Figura 1. Árvore filogenética mostrando a relação dos isolados bacterianos obtidos com as espécies do gênero *Aeromonas*. Os isolados obtidos nesse estudo estão em **negrito**. Apenas valores de bootstrap acima de 50 foram mostrados. *E. coli* (X80725) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (AE006468) foram utilizados como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio.

3.2. Testes fenotípicos de virulência

A cepa *A. caviae* apresentou sete (87,5%) dos oito fatores fenotípicos de virulência, enquanto a cepa *A. veronii* bv. *veronii* apresentou 6 (75%) destes (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de virulência fenotípico de duas cepas isoladas de peixes doentes.

Exoenzimas	Cepas	
	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>
Lipase	+	+
DNase	+	-
Urease	-	-
Amilase	+	+
Gelatinase	+	+
Fosfolipase	+	+
Caseinase	+	+
β-hemólise	+	+

(+) presença; (-): ausência.

3.3. Suscetibilidade antimicrobiana

De acordo com o teste de suscetibilidade antimicrobiana as cepas apresentaram resistência a ampicilina. *A. veronii* bv. *veronii* apresentou resistência a amoxicilina e resistência intermediária a tetraciclina, enquanto *A. caviae* apresentou resistência a eritromicina e resistência intermediária a amoxicilina e tetraciclina. As bactérias apresentaram sensibilidade ao cloranfenicol e estreptomicina e, apenas *A. veronii* bv. *veronii* foi sensível a eritromicina.

Tabela 2. Perfil de resistência antimicrobiana em isolados de *Aeromonas* isolados de peixes.

Antimicrobianos	Bactérias	
	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>
Amoxicilina	15,83 (I)	11,44 (R)
Tetraciclina	15,12 (I)	15,76 (I)
Ampicilina	5,91 (R)	6,93 (R)
Cloranfenicol	29,4 (S)	45,68 (S)
Estreptomicina	23,88 (S)	22,09 (S)
Eritromicina	12,03 (R)	18,82 (S)

(R)= resistente; (I): intermediário; (S): sensível

3.4. Análise fitoquímica do extrato de *M. tenuiflora*

Na Tabela 3 são apresentados os metabólitos presentes nos diferentes extratos obtidos da casca do caule da jurema preta. Verifica-se que o extrato hexânico difere dos extratos metanólico e aquoso em três metabólitos e os extratos metanólico e aquoso diferem em apenas um metabólito.

Tabela 3. Triagem fitoquímica dos três extratos obtidos da casca do caule de *M. tenuiflora*.

Testes fitoquímicos	EJH	EJM	EJAL
Flavonoides	-	+	+
Taninos	-	+	+
Saponinas	+	+	-
Alcaloides	+	+	+
Esteroides/triterpenoides	+	-	-

EJH: extrato hexânico; *EJM*: extrato metanólico; *EJAL*: extrato aquoso liofilizado; (+): presença; (-): ausência.

3.5. Conteúdo de fenóis totais, taninos e flavonoides

Dos dois extratos testados, o extrato metanólico apresentou maior quantidade para todos os metabólitos secundários avaliados em relação ao extrato aquoso (Tabela 4). O conteúdo de fenóis totais variou de 1,42 a 2,20 g de EAG

entre os extratos aquoso e metanólico. Os dois extratos apresentaram mais de 50% de taninos condensados em sua composição e traços de flavonoides.

Tabela 4. Quantificação de fenóis totais, taninos e flavonoides nos extratos aquoso e metanólico de *M. tenuiflora*.

Extratos	Fenóis totais (g de EAG/100g de extrato)	Taninos (g de EC/100g de extrato)	Flavonoides (% de ER)
EJA	1,42	59,10	0,47
EJM	2,20	69,25	0,72

EJA: extrato de jurema preta aquoso; EJM: extrato de jurema preta metanólico; EAG: equivalente a ácido gálico; EC: equivalente a catequina; ER: equivalente a rutina.

3.6. Suscetibilidade antimicrobiana e toxicidade aguda do extrato de *M. tenuiflora*

Os extratos metanólico e aquoso apresentaram valores de CIM iguais para as cepas *A. caviae* e *A. veronii* *bv. veronii*, enquanto o extrato hexânico não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas no presente experimento. A CIM foi igual a CBM para ambas as bactérias (Tabela 5).

Os extratos metanólico e aquoso apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente as cepas *A. caviae* e *A. veronii* *bv. veronii* do que para as cepas padrão utilizadas como controle, porém a cepa padrão de *P. aeruginosa* apresentou valor de CIM superior que a cepa de *S. aureus*.

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de *Mimosa tenuiflora* frente a cepas de *Aeromonas* isoladas de peixes doentes.

Cepas	Extratos (µg/mL)					
	EJH		EJM		EJA	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>A. caviae</i>	>1000	>1000	250	250	250	250
<i>A. veronii</i> bv. <i>Veronii</i>	>1000	>1000	250	250	250	250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>1000	>1000	500	500	500	>1000

EJH: extrato hexânico; EJM: extrato metanólico; EJA: extrato aquoso.

No teste de toxicidade verificou-se que as concentrações de 250 mg/L (T1) e 75 mg/L (T2) apresentaram mortalidade de 100% nos alevinos de *O. niloticus*, enquanto a concentração 50 mg/L (T3) causou mortalidade de 60%. Apesar da concentração 25 mg/L (T4) não ter apresentado mortalidade, a concentração de 10 mg/L (T5) apresentou uma mortalidade de 6,66% dos indivíduos. O DMSO não influenciou na mortalidade dos alevinos, visto que não houve mortalidade no tratamento 6 (Tabela 6). A concentração letal 50% (CL₅₀) do extrato metanólico de *M. tenuiflora* para alevinos de *O. niloticus* foi de 40 mg/L.

Tabela 6. Taxa de mortalidade de alevinos de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações do extrato metanólico de *M. tenuiflora*.

Tratamentos	Concentração do extrato (mg/L)	Mortalidade (nº de indivíduos)
T1	250	15
T2	75	15
T3	50	9
T4	25	0
T5	10	1
T6	25	0
T7	0	0

T1 a T5: extrato metanólico; T6: controle com DMSO; T7: controle negativo.

DISCUSSÃO

O crescimento do cultivo de pescado no mundo, tem acarretado o aumento do surgimento de doenças e perdas na produção, em virtude da presença de microrganismos oportunistas no sistema de produção decorrentes do estresse dos animais cultivados em grandes densidades de estocagem, juntamente com um manejo inadequado (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002). A principal bactéria responsável por perdas em pisciculturas é a do gênero *Aeromonas* que apresenta patogenicidade complexa relacionada a múltiplos fatores, como a produção de enzimas e toxinas extracelulares (STARLIPER et al., 2015).

Um dos indicativos do potencial virulento dos microrganismos é a produção de exoenzimas (ASTEN; DIJK, 2005). Isto porque as exoenzimas promovem a destruição tecidual, atingindo membranas biológicas e lisando células do sistema imune, disponibilizando nutrientes necessários para o seu crescimento e invasão das células hospedeiras (OTTO, 2014). Este fato demonstra a hipótese de que as bactérias *A. caviae* e *A. veronii* *bv. veronii* foram as responsáveis pela infecção que provocou a mortalidade na piscicultura de estudo. Entre os múltiplos fatores de virulência encontrados nas cepas *A. caviae* e *A. veronii* *bv. veronii* acredita-se que a β -hemólise seja o mais importante para o processo de patogenicidade em peixes (RODRÍGUEZ et al., 2005), uma vez que as hemolisinas são proteínas extracelulares citolíticas com capacidade de destruir as barreiras de permeabilidade da membrana pela sua inserção na bicamada lipídica, destruindo as hemácias (GALINDO et al., 2006). Embora Silva et al. (2016) tenham relatado que é impossível ordenar os fatores de virulência, uma vez que todos apresentam importância nos processos de doenças.

As cepas de *Aeromonas* estudadas se mostraram resistentes a três dos seis antimicrobianos comerciais testados, sendo dois (amoxicilina e ampicilina) do grupo dos β -lactâmicos e um (eritromicina) do grupo dos macrolídeos (Tabela 2). A resistência intermediária de *A. veronii* a tetraciclina também foi observada por Suhel, Schocken-Iturrino e Amaral (2011). Além disso, foi observada resistência intermediária de *A. caviae* a amoxicilina e tetraciclina. A resistência intermediária dos isolados pode ser atribuída a facilidade dessas espécies em desenvolver resistência em baixas concentrações de antimicrobianos, bem como a utilização

imprudente desses (GONI-URRIZA et al., 2000) e já pode ser considerada motivo de alerta por se tratar de bactérias com grande capacidade patogênica.

Quando verificado a suscetibilidade antimicrobiana das cepas frente aos extratos metanólico e aquoso de *M. tenuiflora* verificou-se que uma concentração de 250 µg/mL é suficiente para inibir os patógenos, ou seja, o extrato de *M. tenuiflora* apresenta forte atividade antibacteriana para as cepas de *Aeromonas* e moderada atividade antibacteriana para as cepas padrão de *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Tabela 5).

Resultados inferiores foram relatados por Leite et al. (2015) ao investigarem a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *M. tenuiflora* e observarem uma CIM para duas cepas padrões de *S. aureus* de 128 e 512 µg/mL, 128 µg/mL para *P. aeruginosa* e 1024 µg/mL para *Escherichia coli*. A diferença encontrada por Leite et al. (2015) pode ter ocorrido devido a diferença do solvente para obtenção do extrato (etanol) bem como, por fatores como variações genéticas da espécie, clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, técnica de extração e localização geográfica (NASCIMENTO et al., 2007).

Geralmente, bactérias Gram positivas são mais sensíveis a antimicrobianos do que as Gram negativas. Este fato se deve a maior complexidade da parede celular Gram negativa que fornece barreira para a penetração de moléculas que poderiam causar danos a sua integridade, e o espaço periplasmático contém enzimas capazes de hidrolisar substâncias estranhas (MADIGAN et al., 2010).

A classificação da atividade antibacteriana do extrato de *M. tenuiflora* seguiu a recomendação de Sartoratto et al. (2004) que relataram que a atividade antibacteriana de extratos vegetais é classificada como forte (CIM ≤ 500 µg/mL), moderada (600 µg/mL < CIM < 1500 µg/mL) ou fraca (CIM > 1500 µg/mL). Assim, o extrato hexênico apresentou uma atividade antimicrobiana fraca e os extratos metanólico e aquoso apresentaram atividade antimicrobiana forte a moderada.

Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *M. tenuiflora* também já foi relatada para os microrganismos *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermitis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas cavie*, *Micrococcus luteus* e *Acinetobacter calcoaceticus* (LOZOYA et al, 1989 apud PEREIRA et al., 2009; BEZERRA et al., 2009) em concentrações maiores do que a relatada no presente estudo.

A atividade antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* tem sido associada a presença de taninos e flavonoides (MECKES-LOZOYA; LOZOYA; GONZÁLES, 1990). Apesar da triagem fitoquímica indicar a presença de flavonoides nos extratos metanólico e aquoso, a sua quantificação nos extratos apresentou apenas traços de flavonoides (0,72 e 0,42%, respectivamente), pela metodologia testada. Enquanto a presença de taninos variou de 59 a 69 EC/100 g (Tabela 3). Desta forma é possível inferir que a atividade antimicrobiana dos extratos de *M. tenuiflora* se deve a presença de grande quantidade de taninos presentes nos extratos, uma vez que foi detectada a ausência desse composto no extrato hexânico por triagem fitoquímica e este obteve baixa atividade antimicrobiana (CIM > 1000 µg/mL).

A presença de taninos nos extratos metanólico e aquoso e ausência no extrato hexânico advém da polaridade desses compostos. Os taninos são substâncias com características polares, com capacidade de formar ligações de hidrogênio (MONTEIRO et al., 2015) logo, possuem maior capacidade de se ligar a solventes polares como é o caso do metanol e da água, enquanto o hexano é um solvente de baixa polaridade.

Um dos mecanismos de ação dos taninos é a inibição de enzimas, ruptura da membrana e complexação com íons metálicos, reduzindo importantes elementos do metabolismo microbiano e afetando sua fisiologia (MONTEIRO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2014).

Um outro problema enfrentado com o uso de substâncias quimioterápicas no controle de doenças na piscicultura é o efeito tóxico aos peixes, além do lançamento de resíduos poluentes ao meio ambiente (MALHEIROS et al., 2016). Assim, a utilização de antimicrobianos de origem vegetal além de ser facilmente biodegradáveis e de baixo custo, acumula menos resíduos nos peixes. Acredita-se ainda que o uso de compostos bioativos promova o desenvolvimento mais lento de resistência microbiana, devendo-se atentar apenas para a toxicidade dos fitoterápicos (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009; HASHIMOTO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016).

Baseado nisso, o estudo da CL₅₀ do extrato metanólico de *M. tenuiflora* frente a alevinos de *O. niloticus* foi de 40 mg/L (ou µg/mL). Considerando o extrato de *M. tenuiflora* apresentou toxicidade aguda para *O. niloticus* em uma concentração seis vezes menor que a concentração inibitória mínima do extrato frente as cepas de *A.*

caviae e *A. veronii* bv. *veronii*, sugere-se que sejam testados períodos exposição dos peixes ao extrato menores que 48 horas, bem como sua atividade antimicrobiana in vivo.

4. CONCLUSÃO

Os extratos metanólico e aquoso de *Mimosa tenuiflora* apresentaram forte atividade antibacteriana in vitro frente aos isolados patogênicos de *Aeromonas caviae* e *A. veronii* bv. *veronii*, mostrando-se uma alternativa eficiente a ser investigada como forma de tratamento em peixes em quarentena em pisciculturas em substituição aos antimicrobianos convencionais.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.472-508, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000300023>.

ALEXANDRINO, A. C. et al. Occurrence of *Edwardsiella tarda* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under intensive culture system. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.121-123, 20 ago. 1999.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ARYOUE-GRAND, A. et al. Standardisation dun extra it de propolis at identification des prncipaux constituents. **Journal de pharmacie de Belgique**, v. 49, p. 462-8, 1994.

ASTEN, A. J. A. M.; DIJK, J. E. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.251-259, jun. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsim.2005.02.002>.

BEZERRA, D. A. C. et al. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.814-817, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2009000600002>.

BONOLI, M. et al. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 16, p.5195-5200, ago. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf040075c>.

BORGES, I. V. et al. Identificação da fração antimicrobiana do extrato da *Mimosa tenuiflora*. **Comunicata Scientiae**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.155-159, 6 abr. 2017. Lepidus Tecnologia. <http://dx.doi.org/10.14295/cs.v8i1.1493>.

CABRERA-RODRÍGUEZ, L. E. et al. Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. **Revista Biomedica**, v. 19, n. 3, p.138-144, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb081933.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2018.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory; Standards Institute; 2012.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.590-592, 1 abr. 1997. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. 250 pp. 2018.

GALINDO, C. et al. Host Immune Responses to *Aeromonas* Virulence Factors. **Current Immunology Reviews**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.13-26, 1 fev. 2006. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/157339506775471910>

GARCIA, F. et al. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, [s.l.], v. 410-411, p.51-56, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.010>.

GONI-URRIZA, M. et al. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.125-132, 1 jan. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.1.125-132.2000>

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HASHIMOTO, G. S. O. et al. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, [s.l.], v. 450, p.182-186, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>.

HEUER, O. e. et al. Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 49, n. 8, p.1248-1253, 15 out. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/605667>.

HONGPING, W. et al. Insufficiency of the Kanagawa hemolytic test for detecting pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai, China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.7-11, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.016>.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: **MANUAL de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, 1987. parte D. 3.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 44, 53 p. 2016.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983.

LEE, Y. K; KIM, H. W.; LIUL, C. L.; LEE, H. K. A simple method for DNA extration from marine bactéria that produce extracellular materials. **Journal of Microbiological Methods**. V. 52, p. 245-250, 2003.

LEITE, H. A. C. et al. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 97, n. 6, p.2639-2651, 5 dez. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4574-2>.

LEITE, S. C. M. et al. Antibacterial and hemolytic activities of *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir. (Mimosoidea). **African Journal of Microbiology Research**, (s.l.), v. 9, n. 42, p.2166-2171, out. 2015. DOI:10.5897/AJMR2015.7715.

MACHADO, B. A. S.; RIBEIRO, D. S.; DRUZIAN, J. I. Estudo prospectivo relativo à atividade antimicrobiana de algumas plantas aromáticas. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 1, p. 97-105, 2014. <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v6i1.11433>

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MALHEIROS, D. F. et al. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). **Aquaculture**, [s.l.], v. 455, p.81-86, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.018>.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. In: MATOS, Francisco José de Abreu. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: Ufc, 1997. Cap. 1. p. 1-150.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; GONZALEZ, J. L. Pharmacological properties in vitro of various extracts of *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). **Archivos de investigacion medica**, v. 21, n. 2, p. 163-169, 1990.

MIYASHITA, A. et al. Development of 16S rRNA gene-targeted primers for detection of archaeal anaerobic methanotrophs (ANMEs). **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 297, n. 1, p.31-37, ago. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01648.x>.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.892-896, out. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000500029>.

MONTEIRO, S.H. et al. Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Aquaculture**, [s.l.], v. 447, p.37-43, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.002>.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.108-113, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2007000100020>.

ODEYEMI, O. A.; AHMAD, A. Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.65-70, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.016>.

OKONKO, I. O. et al. Antibiotics Sensitivity and Resistance Patterns of Uropathogens to Nitrofurantoin and Nalidixic Acid in Pregnant Women with Urinary

Tract Infections in Ibadan, Nigeria. **Middle-east Journal of Scientific Research**, (s.l.), v. 4, n. 3, p.105-109, nov. 2009.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, [s.l.], v. 17, p.32-37, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. In: **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2002. p. 305-305.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.591-595, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612004000400019>.

PEREIRA, A. V. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de jurema preta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 341-346, 2009.

PEREIRA, A. V. et al. Análise da atividade antimicrobiana de taninos totais de plantas aromáticas do nordeste brasileiro. **Agrotec - Agropecuaria Técnica**, (s.l.), v. 36, n. 1, p.109-114, jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.25066/agrotec.v36i1.23009>.

RIBEIRO, S. C. et al. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.99-106, mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201501284>.

RODRIGUES, C. G. et al. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, [s.l.], v. 8, n. 35, p.1095-1100, set. 2014. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/jmpr2014.5500>.

RODRÍGUEZ, M. et al. Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophila* y sus efectos en tilapia roja (*Oreochromis* spp.) y cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). **Acta Biológica Colombiana**, (s.l.), v. 10, n. 2, p.75-93, jan. 2005.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.238-254, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b916096e>.

SALVADOR, R. 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**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.1374-1378, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782005000600023>.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.275-280, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822004000300001>.

SILVA N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água** 4ª ed. São Paulo: Varela; 2010.

SILVA, J. L. S. et al. Aquatic microbiota diversity in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bioflocs or periphyton: virulence factors and biofilm formation. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.233-241, 8 ago. 2016. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v38i3.31910>.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. **Compêndio de produtos veterinários**. São Paulo: 2014.

STARLIPER, C. E. et al. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. **Journal of Advanced Research**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.89-97, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007>.

SUHET, M. I.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; AMARAL, L. A. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de Tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). **Ars Veterinaria**, v. 27, n. 1, p. 036-044, 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, [s.l.], v. 30, n. 12, p.2725-2729, 16 out. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternatives for the prevention and control of pathogens in fish farming. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p.335-341, ago. 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Infecções por bactérias oportunistas em pisciculturas é decorrente, principalmente, da intensificação da produção. Desta forma, cada vez mais antimicrobianos são utilizados como tratamento e medida profilática com finalidade de evitar perdas econômicas para os produtores.

Pesquisar novas alternativas para a substituição de antimicrobianos sintéticos na aquicultura é fundamental, visto que sua utilização causa danos à saúde pública devido ao risco da ocorrência de resistência bacteriana pela contaminação dos corpos hídricos e pelos seus resíduos no pescado.

Os extratos vegetais têm sido investigados quanto a sua atividade antimicrobiana pela presença de metabólitos secundários nestes. O extrato de *M. tenuiflora* é um exemplo de antimicrobiano vegetal eficaz frente a *A. caviae* e *A. veronii* bv. *veronii* isoladas de peixes doentes resistentes a antimicrobianos sintéticos.

Apesar do extrato de *M. tenuiflora* ser tóxico para alevinos de *Oreochromis niloticus*, considerando sua forte atividade antimicrobiana, a investigação da sua utilização como tratamento alternativo de infecções bacterianas em peixes deve ser explorada a partir de doses subletais.