




Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de fitobióticos contra bactérias patogênicas na piscicultura continental

In vitro evaluation of antibacterial activity of phytobiotics against pathogenic bacteria in continental aquaculture

Nathalia Cristina Soares Sarges¹, Adriano Silva¹, Igor Roberlando Alves dos Santos¹, Wildysson Borel Barros¹, Yllana Ferreira Marinho¹, Yuri Vinicius de Andrade Lopes¹, Adilson Matheus Borges Machado¹, Joel Artur Rodrigues Dias^{1*}

1 Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Pinheiro, Maranhão, Brasil. 

*Autor correspondente: joelarturds@hotmail.com

Recebido: 22 de abril, 2024. Aceito: 31 de outubro, 2024. Publicado: 13 de fevereiro, 2025. Editor: Rondineli P. Barbero

Resumo: O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o potencial fitobiótico dos óleos de *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Carapa guianensis* (andiroba), *Attalea speciosa* (babaçu), *Mauritia flexuosa* (buriti) e *Caryocar brasiliense* (pequi), além de dois tipos de extrato aquoso de *Terminalia catappa* (amendoeira), como alternativas ao uso de antibióticos com princípios ativos em enrofloxacino ou oxitetraciclina na piscicultura continental. Para isso, foram selecionados cinco patógenos espécie-específicos de elevada ocorrência e disseminação em sistemas de produção piscícola continental. O potencial de virulência das cepas foi avaliado por meio de testes de Gram, catalase e atividade hemolítica, seguido de teste de halo de inibição para os potenciais fitobióticos. Todas as cepas selecionadas apresentaram atividade de virulência *in vitro* e prosseguiram para a avaliação de inibição, na qual foram mensuradas as zonas inibitórias dos produtos testados, além de analisar seus efeitos bactericida ou bacteriostáticos. Dos produtos avaliados, apenas *A. speciosa* não apresentou halo inibitório frente aos patógenos analisados, já os óleos de *C. brasiliense*, *M. flexuosa*, *C. guianensis*, *C. langsdorffii* e o extrato a quente de *T. catappa* apresentaram efeito bactericida, com resultados superiores ($P > 0,05$) em comparação ao controle positivo com oxitetraciclina. Os óleos de *M. flexuosa* e *C. langsdorffii* mostraram-se competitivos *in vitro* em comparação ao uso dos antibióticos com princípio ativo de enrofloxacino ou oxitetraciclina, demonstrando ação antibactericida contra *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei* e *Streptococcus agalactiae*.

Palavras-chave: antibiograma; extrato; óleo natural; patógeno.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the phytobiotic potential of the oils from *Copaifera langsdorffii* (copaiba), *Carapa guianensis* (andiroba), *Attalea speciosa* (babassu), *Mauritia flexuosa* (buriti), and *Caryocar brasiliense* (pequi), as well as two types of aqueous extracts from *Terminalia catappa* (tropical almond), as alternatives to antibiotics containing enrofloxacin or oxytetracycline as active ingredients in continental aquaculture. Five species-specific pathogens with high prevalence and dissemination in continental fish farming systems were selected for the study. The virulence potential of the strains was assessed using Gram staining, catalase, and



hemolytic activity tests, followed by inhibition halo assays to evaluate the phytobiotic potential. All selected strains exhibited *in vitro* virulence activity and were subjected to inhibition evaluations, where the inhibitory zones of the tested products were measured, along with their bactericidal or bacteriostatic effects. Among the evaluated products, only *A. speciosa* did not exhibit an inhibitory halo against the analyzed pathogens. Conversely, the oils from *C. brasiliense*, *M. flexuosa*, *C. guianensis*, *C. langsdorffii*, and the hot extract of *T. catappa* demonstrated bactericidal effects, yielding superior results ($P > 0.05$) compared to the positive control with oxytetracycline. The oils from *M. flexuosa* and *C. langsdorffii* proved to be competitive *in vitro* compared to antibiotics containing enrofloxacin or oxytetracycline as active ingredients, showing antibacterial action against *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei*, and *Streptococcus agalactiae*.

Keywords: antibiogram; extract; natural oil; pathogen.

1. Introdução

A aquicultura emerge como uma das principais atividades agropecuárias nos últimos anos, desempenhando um papel crucial para o abastecimento de proteína animal. Nesse contexto, a produção de pescado mundial cresceu significativamente, aumentando em 49% e prevendo-se um crescimento adicional de 53% até 2030, cenário que desempenha um papel vital na segurança alimentar e nutricional do século XXI ⁽¹⁾. No Brasil, apesar do avanço em 860.355 toneladas de peixes oriundos da piscicultura continental em 2022 ⁽²⁾, a intensificação das práticas aquícolas tornou os animais mais vulneráveis a doenças, devido as condições estressoras do ambiente de produção que comprometem o equilíbrio da tríade patógeno-ambiente-hospedeiro a partir das errôneas técnicas de criação como inadequadas densidade de estocagem, dieta desequilibrada, mudanças na qualidade de água, mudanças climáticas, sistemas de produção superintensivos com reuso da água e uso indiscriminado de antibióticos e antimicrobiano ^(3,4).

Apesar do uso recomendado de oxitetraciclina e florfenicol na piscicultura nacional⁽⁵⁾, observa-se um aumento frequente e indiscriminado no uso de antibióticos, independentemente do sistema de produção adotado. Essa prática gera uma situação emergente de controle, marcada pela falta de conhecimento sobre os agentes infecciosos, a dosagem adequada e a duração do tratamento. Conseqüentemente, há um risco elevado de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, disseminação de genes de virulência e acúmulo de substâncias químicas nos peixes, no meio ambiente e para a saúde humana⁽⁶⁾.

Na produção de peixes, as bacteriose causadas pelo gênero *Aeromonas* (como a *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. bestiarum*, *A. dhakensis*, *A. schubertii*), bem como por estirpes de *Streptococcus agalactiae* e *Micrococcus luteus*, têm sido responsáveis por surtos de doenças com taxas de mortalidade que podem variar de 50 a 100% do lote ^(7,8,9). Esse fenômeno é principalmente atribuído à intensificação da produção, caracterizada por alta densidade de estocagem, manejo inadequado e resistência bacteriana ^(3,9).

Nesse contexto, como medida alternativa e segura ao uso dos antibióticos na piscicultura, os fitobióticos podem desempenhar como promissora estratégia em profilaxia e tratamento as enfermidades bacterianas, a partir da atuação dos seus compostos bioativos vegetais, segurança ambiental na biodegradação residual, além de contribuírem de forma sinérgica aos índices de ganho zootécnico e respostas imunomoduladoras das espécies alvo produzidas (10,11,12).

Exemplos de fitobióticos que apresentam propriedades antiparasitárias contra fungos, bactérias e vírus, devido a seus princípios bioativos funcionais, incluem extratos de *T. catappa*, que é atribuído principalmente as atividades biológicas dos extratos de suas folhas que contém punicalina, punicalagina, terfluvina A, ácido quebulico, ácido benzoico e ácido cumárico (13,14) e aos óleos vegetais que apresentam em sua composição relevantes componentes químicos como flavonoides, alcaloides, glucosinolatos, antocianinas, terpenos e cumarinas, como os óleos de *C. langsdorffii*(15), *C. guianensis* (16), *A. speciosa* (17), *M. flexuosa* (18) e *C. brasiliense* (19,20). Embora estudos anteriores tenham explorado o potencial desses produtos na melhoria do crescimento, eficiência da utilização dos alimentos, atividades antioxidantes e resposta imunitária em diversas espécies de peixes (21–22), existe uma lacuna significativa em investigações sobre o tratamento de doenças bacterianas específicas utilizando extratos de amendoeira, e óleos de andiroba, copaíba, babaçu, buriti e pequi na piscicultura continental.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial fitobiótico de óleos e extratos de fácil obtenção nacional por meio de ensaios *in vitro*, utilizando cepas patogênicas espécie-específico da piscicultura brasileira. Essa abordagem visa contribuir significativamente para a promoção de uma piscicultura mais sustentável, além de desenvolver um protocolo inovador de medidas profiláticas e terapêuticas para o cenário da aquicultura nacional.

2. Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa (n° 0033/2020).

2.1 Aquisição e preparo dos fitobióticos

Foram utilizados cinco óleos naturais: *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Carapa guianensis* (andiroba), *Attalea speciosa* (babaçu), *Mauritia flexuosa* (buriti) e *Caryocar brasiliense* (pequi), adquiridos de forma comercial na feira livre do mercado ver-o-peso, localizado na cidade de Belém, Pará, Brasil. Os óleos foram extraídos artesanalmente por meio da perfuração do tronco das árvores, permitindo a coleta do exsudado através de um tubo de PVC conectado a uma mangueira que levava até o recipiente coletor. Após a coleta do óleo-resina, este foi diluído em álcool a 70% na proporção 1:10 (v/v) e então armazenado em garrafas de polietileno tereftalato, refrigerado a 4 °C, até a comercialização.

No caso dos extratos aquosos de *T. catappa*, foram aplicados dois métodos adaptados da metodologia de Meneses et al. (23). Inicialmente, foram coletadas em solo as folhas secas amareladas recém desprendidas do vegetal, localizado na área de recreação da cidade de

Pinheiro-MA (02° 31' 15" S; 045° 04' 58" O) (Figura 1), e encaminhadas para o Laboratório de Desenvolvimento Aquícola da Amazônia Maranhense (L'AQUAM) da Universidade Federal do Maranhão, Campus Pinheiro.

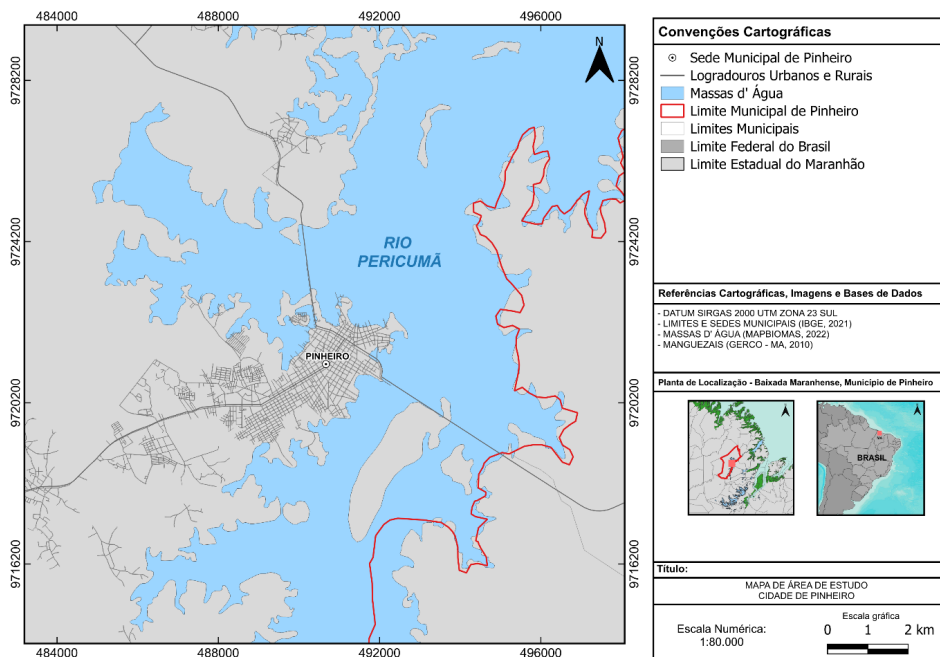


Figura 1. Mapa de localização do município de Pinheiro, Maranhão-Brasil.

As folhas foram higienizadas com água corrente, água destilada esterilizada e secas em estufa de circulação de ar forçada a 50 °C até a perda de umidade de acordo com a metodologia de Meneses et al. ⁽²³⁾. Após a secagem, as folhas foram trituradas e pesadas, dividindo-se em dois grupos para extrações, a quente e a frio. Na extração a quente, 25g de *T. catappa* foram submetidas a duas frações de extração, no qual, na primeira etapa o material vegetal foi envolvido em papel filtro n°1 e imersos em 500 mL de água destilada, em banho maria (SolidSteel, com circulação) 80 °C por uma hora. O filtrado resultante foi armazenado em recipiente de vidro vedado e protegido da luz e o resíduo sólido foi submetido a segunda fração de extração a quente ^(23,24). Ao final desses processos, os dois filtrados foram combinados para formar o extrato a quente e armazenados em refrigeração a 4 °C, em um recipiente de vidro vedado e protegido da luz. A extração a frio foi conduzida em temperatura ambiente (28°C), seguindo as mesmas condições de extração anteriormente descritas ⁽²³⁾.

2.2 Antibióticos

Foram utilizados dois antibióticos com princípios ativos em oxitetraciclina (Terramicina, 5,5 oxitetraciclina, Zoetis) e enrofloxacino (Enrofloxacina 150mg, Dechra), amplamente empregados em sistemas de piscicultura continental. Todavia, até o momento, apenas a oxitetraciclina é utilizada na atividade aquícola dos Estados Unidos e no Brasil. Embora o enrofloxacino não seja reconhecido pelo Ministério da Agricultura e Pecuária-MAPA, esse

antibiótico é comumente utilizado na produção de peixes continentais para tratamento e profilaxia bacteriana ⁽²⁵⁾. Para as análises in vitro, os antibióticos foram empregados de acordo com os padrões de sensibilidade e resistência pelo método de difusão em disco, adaptado para as bactérias patogênicas isoladas de peixes sintomáticos ^(26,27). Os antibióticos foram preparados a partir da diluição química em água destilada esterilizada até atingirem as concentrações terapêuticas de 10 mg.L⁻¹ para a oxitetraciclina ⁽²⁸⁾ e 15 mg.L⁻¹ para o enrofloxacino ⁽²⁹⁾, respectivamente.

2.3 Aquisição dos patógenos

Os patógenos (*Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *Streptococcus agalactiae* e *Micrococcus luteus*) foram isolados de animais sintomáticos das espécies de *Colossoma macropomum* e *Oreochromis niloticus*, principais espécies continentais produzidas no território nacional, oriundos de uma fazenda piscícola no município de Propriá, Sergipe, Brasil. Para isso, os patógenos foram isolados a partir de *swabs* coletados nos locais de infecção no dorso dos animais. Os *swabs* foram cultivados em meio de cultura caldo Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi), incubados a 37 °C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram inoculadas em meio de cultura Agar Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi) pelo método de estrias, visando o crescimento e o isolamento de colônias, com incubação a 37 °C por 48 horas, de acordo com o método de Jatobá e Mourinho ⁽³⁰⁾.

As cepas isoladas foram avaliadas quanto ao morfótipo celular pelo método de Gram e posteriormente identificadas até o nível de espécie realizado pelo método MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization and Time-of-Flight, Bruker Biotyper), com score superior a 2.0. Cada cepa isolada foi incubada em um novo meio de cultura Agar Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi), nas condições de 37 °C por 48 h. Após o crescimento microbiano, cada colônia de cada uma das cepas, foram sobrepostas por esfregação direto no alvo da placa de aço inoxidável do MALDI-TOF (Bruker Biotyper). Em seguida, foi adicionado de forma direta em cada alvo com a cepa, 1 µL de ácido fórmico 100%, que foi seco ao ar, para em seguida se adicionar 1 µL de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico, Bruker Daltonics), que se aguardou secagem total na placa em temperatura ambiente. Por fim, as leituras foram realizadas no aparelho utilizando o sistema operacional MALDI Biotyper flexControl, software Bruker Biotyper 3.0 e a biblioteca de taxonomia ^(31,32).

A análise MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper) foi realizada no modo automático, com 240 disparos de laser para cada cepa isolada. O padrão de teste bacteriano (BTS) (número da peça 255343, Bruker Daltonics) foi usado em cada execução como um calibrador e para controle de qualidade ^(31,32). Após identificação, as cepas foram conservadas em glicerina e meio de cultura semi-sólido Brain Heart Infusion-BHI (Kasvi) adicionados ao banco de cepas do Laboratório de Aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiro, na cidade de Aracaju, Sergipe ^(26,27), e cedidas ao Laboratório de Desenvolvimento Aquícola da Amazônia Maranhense (L'AQUAM) da Universidade Federal do Maranhão, Campus Pinheiro.

2.4 Preparo microbiológico

As cepas patogênicas foram ativadas a partir do crescimento microbiológico em meio de cultura caldo BHI (Kasvi). O preparo do meio de cultura foi conduzido de acordo com as recomendações do fabricante e esterilizado em autoclave a 120 °C, 1 atm, durante 20 min. As culturas patogênicas foram ativadas na solução, utilizando uma alça de platina estéril de 10 µL, para crescimento microbiológico em 10 mL de BHI, nas condições de 37 °C, durante 48 h ^(26,30).

Após o crescimento microbiológico, as cepas foram purificadas em placa contendo meio de cultura Agar BHI (Kasvi). Foram coletados 10 µL da cultura microbiana em meio líquido e aplicadas no meio de cultura em placa pelo método de estrias para posterior crescimento a 37 °C, durante 48 h. As colônias foram coletadas e submetidas ao método de coloração de Gram, para confirmar o morfótipo celular e grau de pureza microbiológico e, posteriormente, prosseguiram para os testes de catalase e atividade hemolítica com o objetivo de avaliar a virulência dos microrganismos. Para isso, foi utilizado do meio de cultura Agar BHI (Kasvi) enriquecido com sangue de peixe (1:10) ^(26,30) (Figura 2).

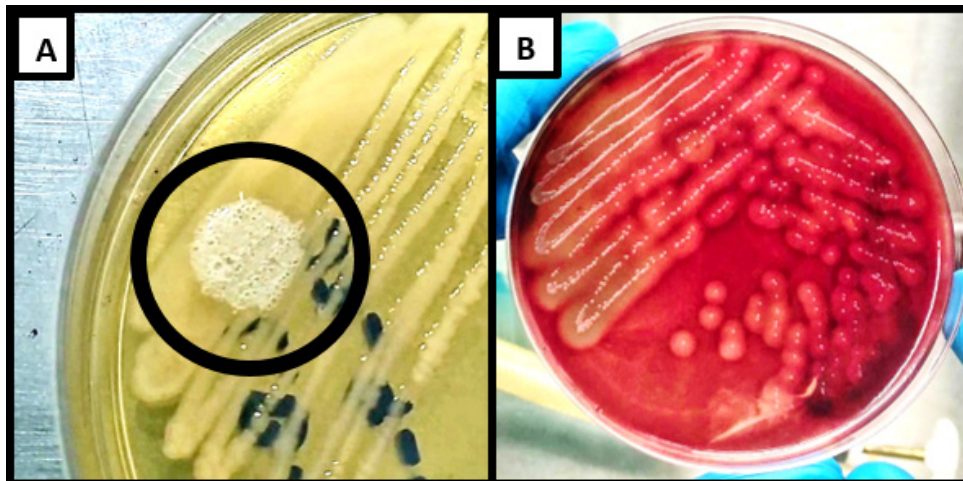


Figura 2. A- Atividade de catalase dos patógenos isolados; B- Hemólise positiva dos patógenos isolados.

Posteriormente as premissas microbiológicas patogênicas, as cepas foram inoculadas em um novo meio caldo BHI (Kasvi) para o crescimento microbiológico logarítmico até atingirem as concentrações infectantes de 10^9 UFC.mL⁻¹ ⁽²⁶⁾, conforme a escala McFarland nº 4, com a densidade bacteriana confirmada em placa pelo método de diluição em série para posterior uso nos testes bacteriológicos.

2.5 Desafio microbiológico

O teste foi conduzido em meio de cultura não seletivo Mueller Hinton Agar (Himedia)⁽²⁶⁾, no qual 100 µL de cada patógeno foi semeado em placas e homogeneizados com alça de drigalski estéril. Posteriormente, discos de papel filtro qualy estéreis (25 µm de porosidade), de 6mm de diâmetro, embebidos com 10 µL de cada produto (óleo, extrato ou antibióticos), foram sobrepostos nas placas de Agar, com quatro repetições cada. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 48h, e a ocorrência de halos inibitórios foram medidos pela zona de inibição utilizando de um paquímetro digital e avaliado quanto ao efeito bactericida ou bacteriostático dos produtos testados ^(23,28) (Figura 3).

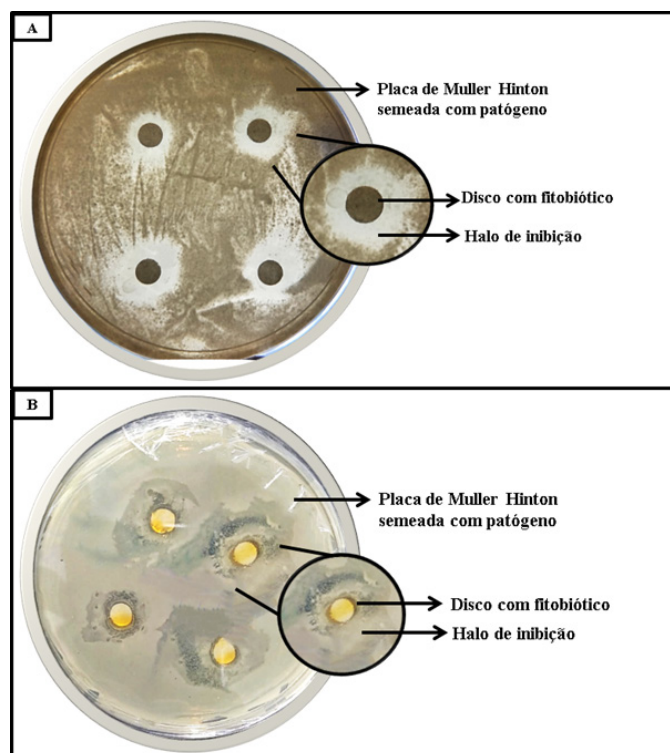


Figura 3. A- Halo de inibição de efeito bactericida; B- Halo inibitório de efeito bacteriostático.

2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade, pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Em caso de heterogeneidade da variância, os dados foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$ e seguida a Análise de Variância (ANOVA), para valores de F significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. Resultados

Os patógenos apresentaram morfologia compatíveis com as espécies identificadas pelo MALDI-TOF e a atividade de virulência foram evidenciadas pelos testes de catalase e atividade hemolítica (Tabela 1).

Tabela 1. Morfologia bacteriana e teste de catalase.

Cepas	Gram		Catalase		Atividade hemolítica		Morfologia	
	+	-	+	-	+	-	Cocos	Bastonete
<i>Aeromonas hydrophila</i>		*	*		*			*
<i>Aeromonas caviae</i>		*	*		*			*
<i>Aeromonas jandaei</i>		*	*		*			*
<i>Streptococcus agalactiae</i>	*			*	*		*	
<i>Micrococcus luteus</i>	*		*		*		*	

(+) Positivo; (-) Negativo; (*) Ocorrência microbiológica.

No teste de antagonismo, os fitobióticos oleosos de buriti e pequi, demonstraram uma zona inibitória satisfatória contra o patógeno *A. hydrophila*, com respostas de até 49,77% superiores ao controle positivo com oxitetraciclina. Além disso, observou-se efeito semelhante ($P>0,05$) na zona inibitória dos patógenos quando comparados a eficácia do controle positivo com enrofloxacino (Tabela 2).

Tabela 2. Halo inibitório (mm) dos fitobióticos de óleo de *C. brasiliense*, *M. flexuosa*, *C. langsdorffii*, *A. speciosa* e *C. guianensis*, extrato a quente de *T. catappa* (EQ), extrato a frio de *T. catappa* (EF), enrofloxacino e oxitetraciclina, contra os patógenos *A. hydrophila*, *A. cavie*, *A. jandaei*, *S. agalactiae* e *M. luteus*.

Tratamento	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. cavie</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>M. luteus</i>
Pequi	24,22±4,77a	6,42±0,42b	0,00±0,00d	7,43±0,50c	10,03±2,24c
Buriti	23,39±4,30a	12,60±2,40b	9,90±2,00b	6,90±4,73c	16,54±2,26b
Babaçu	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d
Copaiba	11,57±1,19c	9,39±0,41b	10,56±4,43b	10,58±0,88bc	9,96±2,76c
Andiroba	0,00±0,00d	0,00±0,00d	10,61±7,19b	14,74±1,45b	0,00±0,00d
EQ	17,29±2,03b	7,03±1,12b	5,07±3,57bc	7,09±0,69c	6,80±1,36c
EF	0,00±0,00d	5,46±3,67b	0,00±0,00c	7,70±0,80c	0,00±0,00d
Enrofloxacino	23,92±0,00a	19,04±1,52a	22,40±1,28a	22,30±3,59a	21,44±1,21a
Oxitetraciclina	11,85±0,00c	7,73±1,16c	5,79±0,88bc	7,24±1,80c	7,70±0,85c

Valores médios ± desvio padrão, seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tanto para a inibição de patógenos Gram-positivos quanto para os Gram-negativos, os fitobióticos oleosos de *M. flexuosa*, *C. brasiliense*, *C. langsdorffii*, *C. guianensis* e o extrato a quente de *T. catappa*, apresentaram zonas inibitórias iguais ou superiores em comparação ao controle positivo com oxitetraciclina (Tabela 2). Essas respostas são complementadas pelo efeito inibidor contra as bactérias (Tabela 3), que indicaram para os fitobióticos de *M. flexuosa* e *C. langsdorffii* uma eficácia bactericida para a maioria dos microrganismos testados, com promissoras respostas quando comparado ao efeito bacteriostático do fármaco com o princípio ativo da oxitetraciclina (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação bactericida e/ou bacteriostática do halo inibitório para os tratamentos com óleo de *Caryocar brasiliense* (pequi), *Mauritia flexuosa* (buriti), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Attalea speciosa* (babaçu) e *Carapa guianensis* (andiroba), extrato a quente de *Terminalia catappa* (EQ), extrato a frio de *Terminalia catappa* (EF), em comparação aos antibióticos com enrofloxacino e oxitetracina.

Tratamentos	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Pequi	BC	BT	-	BT	BT
Buriti	BC	BC	BT	BT	BC
Babaçu	-	-	-	-	-
Copaíba	BT	BC	BC	BC	BT
Andiroba	-	-	BC	BC	-
EQ	BC	BT	BT	BT	BT
EF	-	BT	-	BT	-
Enrofloxacino	BC	BC	BC	BC	BC
Terramicina	BT	BT	BT	BT	BT

(BC) Bactericida; (BT) Bacteriostático; (-) Sem inibição.

4. Discussão

O uso de medidas naturais para a prevenção e controle de doenças na produção de organismos aquáticos faz parte do plano de gestão da aquicultura sustentável mundial e tem o objetivo em atingir o modelo da União Europeia de comércio aquícola isento de químicos (23, 33). Dessa forma, como estratégia segura e natural para o combate a enfermidades bacteriológicas que afetam a piscicultura nacional, o efeito inibitório bactericida do óleo de *M. flexuosa* contra *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *Micrococcus luteus* demonstrou um espectro de ação promissor, devido à sua composição antimicrobiana rica em ácidos graxos, tocoferóis e carotenoides (34). Em comparação com os antibióticos, principalmente a oxitetraciclina, esse óleo pode ser considerado um produto alternativo promissor no combate às bacterioses na piscicultura continental.

Considerando a observação na Tabela 3, o efeito bacteriostático da oxitetraciclina pode ter sido prejudicado pelo seu uso indiscriminado, resultando na disseminação de genes de resistência ao antibiótico e comprometendo sua eficácia. Embora o segundo antibiótico, enrofloxacino, tenha apresentado um halo inibitório satisfatório contra os patógenos testados, seu uso deve ser realizado de forma consciente, em concentração e tempo adequados. O uso indiscriminado deste medicamento deve ser evitado para prevenir a resistência de genes de virulência bacteriológica, que pode levar ao surgimento de superbactérias. Além disso, é importante considerar a redução da bioacumulação química na musculatura e no bioma de produção dos organismos aquáticos em criação (7).

Os resultados obtidos no presente estudo, com o óleo de *M. flexuosa* aplicado como fitobiótico contra estirpes de *Aeromonas* e *M. luteus*, corroboram com os encontrados de Santos-Morais et al. (18) contra as variedades de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus subtilis*. Eles atribuíram os efeitos dos tocoferóis obtidos em

seu óleo, como princípio ativo de maior atuação contra os patógenos Gram positivos, e os carotenoides obtidos do processo de extração demonstraram um efeito de inibição mais pronunciado contra a microbiota patogênica Gram-negativa.

Já Silveira et al. ⁽³⁴⁾ associou o efeito bactericida do óleo de *M. flexuosa*, tanto a microbiota Gram positiva quanto a Gram negativa, aos compostos de seus ácidos graxos, como observado ao efeito inibidor contra *Staphylococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dessa forma, podemos inferir que o efeito inibidor do fitobiótico de *M. flexuosa* pode estar associado ao sinergismo de seus compostos antimicrobianos, que ainda precisam ser elucidados, assim como a concentração de aplicação, como observados por Carvalho et al. ⁽³⁵⁾ e Chaves et al. ⁽³⁶⁾ ao utilizarem de concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo de *M. flexuosa*, obtiveram efeito bactericida contra estirpes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Cândida albicans*, e *S. aureus* multirresistentes.

O fitobiótico de *C. brasiliense* apresentou efeito bactericida apenas para *Aeromonas hydrophila*, mostrando uma resposta competitiva quando comparado aos antibióticos utilizados, sendo essa atuação como antimicrobiano podendo ser alterada de acordo com a origem do vegetal extraído. Para Sousa et al. ⁽³⁷⁾, na avaliação bactericida de *C. brasiliense* contra os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, foram obtidos resultados promissores com halos de inibição médios de 33mm. Esses extratos, obtidos das flores de *C. brasiliense*, apresentaram a maior concentração de flavonoides e terpenoides, o que pode ter contribuído para sua eficácia.

Para o extrato de *Terminalia catappa* a quente, o efeito foi similar ao observado com o óleo de *C. brasiliense* para *A. hydrophila*, mas com diferente efeito de atuação quando comparado ao extrato a frio. Esse resultado pode ser referente a atuação de altas temperaturas durante o processo de extração que pode resultar em alterações químicas de biomoléculas extraídas ⁽¹³⁾. Meneses et al. ⁽²³⁾ comprovou ao realizar a análise cromatográfica de alta precisão em extratos de *Terminalia catappa* que a temperatura de 80 °C apresentou maior pico de ácido gálico, ácido elágico e fenóis responsáveis pelo efeito antimicrobiano ^(13,23).

Os fitobióticos de *C. guianensis* e *C. langsdorffii* apresentaram espectro de inibição bactericida para dois ou mais patógenos testados. Esses resultados devem ser considerados e investigados para outros patógenos que acometem a piscicultura continental. É descrito na literatura que os halos de inibição obtidos pelo óleo de *C. guianensis* são devido ao princípio ativo de limonóides ⁽³⁸⁾, composto de ação bactericida. Todavia, a origem de seu óleo, período de extração e região de coleta podem interferir na concentração de limonóides e não ser observado a ação bactericida. Esse fato foi observado por Lacerda et al. ⁽³⁹⁾ frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

O óleo de *C. langsdorffii* é composto por princípios ativos que tem atuação anti-inflamatória e analgésica devido a presença de β -bisaboleno, e efeito bacteriológico e insetívoro devido a presença de β -cariofileno ⁽⁴⁰⁾. Masson et al. ⁽⁴¹⁾, verificou a ação antimicrobiana de *C. langsdorffii* comercializado em feira livre, corroborando com as respostas obtidas na presente pesquisa,

obtendo efeito bactericida frente aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

5. Conclusão

Os fitobióticos a base de óleos de *Caryocar brasiliense* (pequi), *Mauritia flexuosa* (burtiti), *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e *Carapa guianensis* (andiroba), juntamente com o extrato a quente de *Terminalia catappa*, apresentaram promissores efeitos bactericidas no controle patogênico de *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *Streptococcus agalactiae* e *Micrococcus luteus*. Destacam-se os óleos de *M. flexuosa* e *C. langsdorffii*, que apresentaram atuação competitiva *in vitro* em relação aos antibióticos enrofloxacino e/ou oxitetraciclina frente aos patógenos *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei* e *Streptococcus agalactiae*. Todavia, são necessários ensaios futuros para elucidar a especificidade de cada princípio ativo dos fitobióticos analisados frente as espécies patogênicas piscícolas, além do desenvolvimento de protocolos de biossegurança a longo prazo, que garantam a segurança alimentar do consumidor. Ensaios *in vivo* também são imprescindíveis para avaliar a toxicologia, eficácia e possíveis efeitos sinérgicos nos organismos aquáticos em produção.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

Contribuições do autor

Conceituação: J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, A. Silva e Y. F. Marinho. Curadoria de dados: J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, A. Silva, A. M. B. Machado e Y. F. Marinho. Análise formal: J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, Y. V. A. Lopes, A. M. B. Machado e Y. F. Marinho. Aquisição de financiamento: J. A R. Dias e Y. F. Marinho. Administração do projeto: J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, I. R. A. Dos Santos, W. B. Barros e Y. F. Marinho. Metodologia: J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, I. R. A. Dos Santos, W. B. Barros e Y. F. Marinho. Supervisão: J. A R. Dias e Y. F. Marinho. Investigação: J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, I. R. A. Dos Santos, W. B. Barros e Y. F. Marinho. Visualização: J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, A. Silva, I. R. A. Dos Santos, W. B. Barros, Y. V. A. Lopes, A. M. B. Machado e Y. F. Marinho. Redação (rascunho original): J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, A. Silva, I. R. A. Dos Santos, W. B. Barros, Y. V. A. Lopes, A. M. B. Machado e Y. F. Marinho. Redação (revisão e edição): J. A R. Dias, N. C. S. Sarges, A. Silva, I. R. A. Dos Santos, W. B. Barros, Y. V. A. Lopes, A. M. B. Machado e Y. F. Marinho.

Referências

1. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. FAO; 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
2. Peixe B. R. A força do peixe brasileiro. Anuário 2023 - Peixe BR da Piscic. 2023;1-65.
3. Delphino MKVC, Leal CAG, Gardner IA, Assis GBN, Roriz GD, Ferreira F, et al. Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. *Aquaculture*. 2019;498y:100-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.023>
4. Dayana Senthamarai M, Rajan MR, Bharathi PV. Current risks of microbial infections in fish and their prevention methods: A review. *Microb Pathog*. 2023;185:106400. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106400>

5. de Abreu Reis Ferreira D, Assane IM, Vaneci-Silva D, do Vale Oliveira A, Tamashiro GD, Hashimoto DT, et al. Morpho-molecular identification, pathogenicity for *Piaractus mesopotamicus*, and antimicrobial susceptibility of a virulent *Flavobacterium columnare* isolated from Nile tilapia cultured in Brazil. *Aquaculture*. 2022;560. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738486>
6. Schar D, Klein EY, Laxminarayan R, Gilbert M, Van Boeckel TP. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>
7. Dien LT, Ngo TPH, Nguyen T V., Kayansamruaj P, Salin KR, Mohan CV, et al. Non-antibiotic approaches to combat motile *Aeromonas* infections in aquaculture: Current state of knowledge and future perspectives. *Rev Aquac*. 2023;15(1):333–66. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/raq.12721>
8. Phuoc NN, Linh NTH, Crestani C, Zadoks RN. Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*. 2021;534:736256. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736256>
9. Pękala A, Paździor E, Antychowicz J, Bernad A, Głowacka H, Więcek B, et al. *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture*. 2018;486:285–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.028>
10. Abdul Kari Z, Wee W, Mohamad Sukri SA, Che Harun H, Hanif Reduan MF, Irwan Khoo M, et al. Role of phytobiotics in relieving the impacts of *Aeromonas hydrophila* infection on aquatic animals: A mini-review. *Front Vet Sci*. 2022;9(5). Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1023784>
11. Kari ZA, Wee W, Hamid NKA, Mat K, Rusli ND, Khalid HNM, et al. Recent Advances of Phytobiotic Utilization in Carp Farming: A Review. *Aquac Nutr*. 2022;2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/7626675>
12. Abdel-Latif HMR, Yilmaz S, Kucharczyk D. Editorial: Functionality and applications of phytochemicals in aquaculture nutrition. *Front Vet Sci*. 2023;10(4). Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1218542>
13. Terças AG, Monteiro A de S, Moffa EB, dos Santos JRA, de Sousa EM, Pinto ARB, et al. Phytochemical characterization of *Terminalia catappa* Linn. extracts and their antifungal activities against *Candida* spp. *Front Microbiol*. 2017;8:1–13. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00595>
14. Chen OS, Li JH. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett*. 2006;163:44–53. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.09.026>
15. Santos M de O, Camilo CJ, Macedo JGF, Lacerda MNS de, Lopes CMU, Rodrigues AYP, et al. *Copaifera langsdorffii* Desf.: A chemical and pharmacological review. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2022;39. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102262>
16. Pereira VS, Brito LC, Marques AM, Camillo FC, Figueiredo MR. Bioactive limonoids from *Carapa guianensis* seeds oil and the sustainable use of its by-products. *Curr Res Toxicol*. 2023;4. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crtcx.2023.100104>
17. Lima RC, Carvalho APA de, da Silva BD, Torres Neto L, de Figueiredo MR da S, Chaves PHT, et al. Green ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds of babassu (*Attalea speciosa*) mesocarp: Effects of solid-liquid ratio extraction, antioxidant capacity, and antimicrobial activity. *Appl Food Res*. 2023;3(2). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100331>
18. Santos Morais N, Passos TS, Ramos GR, Ferreira VAF, Moreira SMG, Filho GPC, et al. Nanoencapsulation of buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.f.) in porcine gelatin enhances the antioxidant potential and improves the effect on the antibiotic activity modulation. *PLoS One*. 2022;17:1–24. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265649>
19. Carneiro CR, Alhaji AM, da Silva CAS, de Sousa R de CS, Monteiro S, Coimbra JS dos R. Potential Challenges of the Extraction of Carotenoids and Fatty Acids from Pequi (*Caryocar brasiliense*). *Oil. Foods*. 2023;12(9):1–21. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12091907>
20. Diniz LA, Ferreira L de AQ, Ribeiro R de B, de Jesus SLG, Anestino TA, Caldeira ASP, et al. Exploring the association between a standardized extract of pequi peels (*Caryocar brasiliense* Cambess) and blue light as a

photodynamic therapy for treating superficial wounds. *Photochem Photobiol.* 2023;1–13. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/php.13874>

21. Abd-elaziz RA, Shukry M, Abdel-Latif HMR, Saleh RM. Growth-promoting and immunostimulatory effects of phytobiotics as dietary supplements for *Pangasianodon hypophthalmus* fingerlings. *Fish Shellfish Immunol.* 2023;133:108531. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108531>

22. Meneses JO, do Couto MVS, Sousa NC, Cunha F dos S, Abe HA, Ramos FM, et al. Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus* tilapiae gill parasite of Nile tilapia. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2018;70(2):497–504. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9667>

23. Meneses JO, dos Santos Cunha F, Dias JAR, da Cunha AFS, dos Santos FJ, da Costa Sousa N, et al. Acute toxicity of hot aqueous extract from leaves of the *Terminalia catappa* in juvenile fish *Colossoma macropomum*. *Aquac Int.* 2020;28(6):2379–96. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00596-z>

24. Nadirah M, Wee TL, Najiah M. Differential responses of *Vibrio* sp. To young and mature leaves extracts of *Terminalia catappa* L. *Int Food Res J.* 2013;20(2):961–6.

25. Macmillan JR, Schnick R, Fornshell G. Stakeholder position paper: Aquaculture. *Prev Vet Med.* 2006;73(2-3):197-202. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.09.013>

26. Dias JAR, Alves LL, Barros FAL, Cordeiro CAM, Meneses JO, Santos TBR, et al. Comparative effects of autochthonous single-strain and multi-strain probiotics on the productive performance and disease resistance in *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquac Res.* 2022;53(11):4141–54. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.15916>

27. Dias JAR, Abe HA, Sousa NC, Silva RDF, Cordeiro CAM, Gomes GFE, et al. *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). *Aquac Int.* 2019;27(2):463–74. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00339-9>

28. Júnior DJP, Figueiredo HCP, Carneiro DO, Leal CAG. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. *Ciênc. agrotec.* 2006;30(6):1190-1195. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000600023>

29. Teles JA, Castello Branco LC, Del Bianchi M, Pilarski F, Reyes FGR. Pharmacokinetic study of enrofloxacin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after a single oral administration in medicated feed. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2015;39: 205-208. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jvp.12257>

30. Jatobá A, Mouriño JLP. Efeito do *Lactobacillus plantarum* no trato intestinal de alevinos de *Oreochromis niloticus*. *Ciênc. Anim. Bras.* 2015;16:45–53. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1089-68916i127789>

31. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J. Microbiol. methods.* 2017;138: 20–29. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>

32. Cardoso EB, Ferreira D, Moreira GM, Pfenning LH, Rodrigues-Filho E, Abreu LM. MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of Eurotiales from different substrates and locations in Brazil. *Mycol Prog.* 2021;20(4):539–48. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01691-y>

33. Lima MRF de, Ximenes ECPA, Luna JS, Sant’Ana AEG. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras Farmacogn.* 2006;16(3):300–6. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300004>

34. Silveira CS, Pessanha CM, Lourenço MCS, Neves-Junior I, Menezes FS, Kaplan MAC. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. *Rev Bras Farmacognosia.* 2005; 15(2): 143–148. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200013>

35. Carvalho CO, Scudeller VV, Sargentini EJR, Fernandes OCC, Bolson, M.A . Características físicas, químicas e rendimento do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.f. – Arecaceae). In: Santos-Silva, E.N.; Scudeller, V.V. & Cavalcanti, M.. (Org.). *BioTupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central*; 2011. Vol. 03. 123-134p.

36. Chaves TP, Gama GSP, Silva SB, Pinheiro REE, Souza JSN. Potencial de *Mauritia flexuosa* mart. como antimicrobiano e modulador de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus*. *Engenharia Florestal: Desafios, Limites e Potencialidade.* 2020; 630–638. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.37885/200801133>

37. Sousa MAA, de Sousa FCB, de Castro SAD, Reis LC, Monteiro AL, Silva FL. Atividade Antimicrobiana do extrato bruto de *Caryocar brasiliense*, *Morinda citrifolia*, *Annona muricata* e *Morus nigra* sobre cepas de bactérias

de importância clínica. Res Soc Dev. 2022; 11(9):e2311931411. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i9.931411>

38. Lira GB, Lopes ASC, Nascimento FCA, Conceição GS, Brasil DSB. Processos de extração e usos industriais de óleos de andiroba e açai: uma revisão. Res Soc Dev. 2021; 10(12):e229101220227. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20227>

39. Lacerda GM, Monteiro AB, Tintino SR, Delmondes GA, Fernandes CN, Lemos ICS, Nascimento EP, Carvalho TB, Coutinho HDM, Menezes IRA, Kerntopf MR. Atividade moduladora sobre antibióticos pelo extrato aquoso das folhas de *Bauhinia unguolata* L. Rev Cubana Plant Med. 2016; 21(3):309-317. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000300006&lng=es&nrm=iso

40. Veiga-Junior VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. Quim Nova. 2002. 25(2):273-286. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016>

41. Masson DS, Salvador SL, Polizello ACM, Frade MAC. Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. Ver Bras Pl Med. 2013;15(4):664-669. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500006>