



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

Monique Monteiro Pinto Mariz

**AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Hymenaea martiana* NA PRODUÇÃO DE  
BIOFILME E ADERÊNCIA DE *Aeromonas* spp.**

Recife, PE

2018

MONIQUE MONTEIRO PINTO MARIZ

**Ação do extrato etanólico da *Hymenaea martiana* na produção de biofilme e aderência de *Aeromonas spp.***

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Recife, PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M343a Mariz, Monique Monteiro Pinto  
Ação do extrato etanólico da *Hymenaea martiana* na produção de biofilme e aderência de *Aeromonas* spp. / Monique Monteiro Pinto Mariz. – 2018.  
86 f. : il.

Orientador: Mateus Matiuzzi da Costa.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Jatobá 2. Antibiofilme 3. Fatores de virulência I. Costa, Mateus Matiuzzi da, orient. II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL-**  
**PPGCAT**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta Universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.”

**Atividade antibiofilme do extrato etanólico bruto da folha de *Hymenaea martiana*  
sobre *Aeromonas* spp. isoladas de *Oreochromis niloticus***

---

Monique Monteiro Pinto Mariz

**Ação do extrato etanólico bruto da folha de *Hymenaea martiana* sobre aderência  
de *Aeromonas* spp. em epitélio de *Oreochromis niloticus ex vivo***

---

Monique Monteiro Pinto Mariz

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa (UNIVASF)

Orientador – Presidente

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros (UFRPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Emiko Shinozaki Mendes (UFRPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Anamélia Sales de Assis (UAG/UFRPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Keila Aparecida Moreira (UAG/UFRPE)

Recife-PE

2018

*Este trabalho e todo amor aplicado durante esses anos de pesquisa dedico a minha vó Sebastiana Monteiro, aos meus pais Jorge José e Tolanda Monteiro, ao meu marido, amigo e companheiro Jobisson Lira e ao meu filho amado Francisco Monteiro.*

*Obrigada!*

## **Agradecimento**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meus passos e fortalecer minha caminhada com seu amor. Agradeço a Ele também por manter a minha mãe e minha Vó ao meu lado, com a saúde que elas estão hoje.

A minha família, meus pais, marido, filho, meus irmãos e minhas cunhas por todo o apoio, compreensão, dedicação e acima de tudo amor durante essa jornada.

Agradeço ao meu orientador, Professor Mateus Matiuzzi por acreditar na ciência e trabalhar em prol de causas como educação de qualidade, ciência para todos e principalmente pelas trocas de conhecimento. Obrigada, o senhor é simplesmente admirável.

Agradeço a minha grande mestra Professora Emiko Shinozaki, por não me faltar na minha caminhada acadêmica assim como na vida, a professora Andréa Paiva pelo grande auxílio no laboratório assim como as palavras de conforto e força, a Professora Andrea Alice, Professor Waldomiro Júnior, Professor Evêncio pela grande ajuda nas dúvidas e contribuições para o trabalho; ao Professores Romano e Gisele Veneroni pela disposição nas trocas de conhecimento e grande contribuição para execução da pesquisa. A todos os professores que se doaram pela Educação de seres humanos com valores éticos. Muito obrigada aos docentes a quem pude desfrutar de trocas científicas e pedagógicas importantes para minha vida profissional e pessoal.

Agradeço ao Programa PGCAT em nome do seu coordenador Professor Anísio pela incansável dedicação a esse curso, pela disponibilidade em ajudar.

Com muito carinho que agradeço aos companheiros do laboratório da UNIVASF que contribuíram efetivamente para essa pesquisa: Dielson, Danilo, Micheline, Naiana, Samily, Ana Paula e David e as minhas dedicadas compas do Lasaq, minha primeira casa de pesquisa acadêmica, Juliana Cachinho, Rejane Luna e Laelia.

A minha querida amiga Virginia Pedrosa pela sua dedicação e grande contribuição científica a essa pesquisa, além de estar sempre disposta a ajudar cedendo seu tempo, conhecimento e sua amizade.

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade do Vale do São Francisco e todos os integrantes dessa rede de educação que mantém as universidades em ordem, agradeço a Cleidinha e Dona Guiomar.

Por fim agradeço as pessoas que estão presentes em nossas vidas como anjos que nos guiam e nos auxiliam para o caminho de luz: Maria (Ia), minhas primas Grasielle Pinto, Ana Theodora e Juliana Monteiro; minha sogra e sogro Dona Josefa e Senhor José e meus amigos de sempre Erik Valença, Marta Barroca, Camila Domingues, João, Kettyne, Paloma, Renata Serpa, Fábio Brito, Marcelo Falcão, Petronio, Renata Cristina, Sílvia Carla e Lourdinha meu muito obrigada!

## Sumário

Lista de Figuras.....	10
Lista de tabelas.....	11
Resumo.....	12
Abstract.....	13
1. Introdução.....	14
2. Revisão de literatura.....	15
2.1. Tilapicultura: Aspectos gerais.....	15
2.1.1. Modelos de cultivo (Tilapia do Nilo).....	16
2.2. Enfermidades por Patógenos aquáticos.....	19
2.2.1. Bacterioses.....	21
2.2.2. Aeromonas: <i>Aeromonas</i> spp. em cultivos aquáticos.....	23
2.3. Fatores de virulência.....	25
2.3.1. Fatores de virulência relacionados ao gênero <i>Aeromonas</i> .....	28
2.4. Formação de biofilme.....	30
2.5. Uso de fitoterápicos.....	32
2.5.1. Gênero <i>Hymenaea</i> .....	33
2.5.1.1. <i>Hymenaea martiana</i> .....	34
2.6. Metodologias: Modelo <i>ex vivo</i> .....	37
3. Objetivos.....	40
3.1. Objetivo geral.....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
4. Referências.....	41
5. Capítulo 1.....	57
5.1. Artigo 1 Atividade antibiofilme do extrato etanólico bruto da folha da <i>Hymenaea martiana</i> <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	58
6. Capítulo 2.....	71
6.1. Artigo 2 Ação do extrato etanólico bruto da folha de <i>Hymenaea martiana</i> sobre aderência de <i>Aeromonas</i> spp. em epitélio de <i>Oreochromis niloticus ex vivo</i> .....	72
7. Anexo.....	87

## **Lista de Figuras (Anexo)**

### Figura

1. Tecido epitelial de tilápia do Nilo do grupo B. Imagem obtida ao microscópio de luz. HE. Objetiva de 40x (550x).
2. Tecido epitelial de tilápia do Nilo do grupo C. Imagem obtida ao microscópio de luz. HE. Objetiva de 40x (550x).
3. Tecido epitelial de tilápia do Nilo do grupo A. Imagem obtida ao microscópio de luz. HE. Objetiva de 40x (550x).

## **Lista de tabelas**

### Tabelas

1. Revisão dos principais fitoterápicos utilizados no tratamento de bacterioses em peixe.

## **Lista de tabelas (Anexo)**

### Tabelas

2. *Primers* utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes de virulência nos isolados.

## Resumo

O uso de fitoterápicos na produção animal tem se mostrado promissor por serem produtos naturais, biodegradáveis e com atividade antimicrobiana contra diversos patógenos, inclusive de peixes. Objetivou-se testar a ação do extrato etanólico bruto (EEB) da folha de *Hymenaea martiana* na formação e consolidação do biofilme *in vitro*, sua atuação quanto fatores de aderência produzida por *Aeromonas* spp. e avaliar sua toxicidade, propondo um modelo *ex vivo*, utilizando como substrato epitélio de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). As amostras bacterianas foram submetidas a teste molecular para determinação de seu potencial patogênico pela detecção de cinco genes (*aer*-aerolisina, *lip*-lipase, *ahy*-elastase, *fla*- flagelina e *ast*-enterotoxinas) envolvidos na produção de fatores de virulência e na formação de biofilmes pelo micro-organismo estudado. Os isolados foram quantificados em forte, moderado e fraco formadores de biofilme através de leitor de microplacas do tipo ELISA, após coloração com violeta de genciana. Foram analisados *in vitro* quanto a ação bactericida e em seguida quanto ao seu potencial na formação e consolidação do biofilme. Fatores importantes como produção de cápsula e motilidade dos isolados foram observados em testes como vermelho congo e ensaio de motilidade em meio semi-sólido respectivamente para a compreensão da relação de fatores genotípicos com as respostas fenotípicas. Na avaliação *ex vivo* foi observado a olho nu e microscópio óptico a ação do extrato quanto a sua toxicidade, presença da *A. spp.* aderida a pele de tilápia e possíveis modificações morfológicas. Os isolados apresentaram 17 combinações genéticas, sendo ausente em 3 isolados dos genes pesquisados, não interferindo na produção do biofilme em nenhum dos 30 isolados testados, onde 100% foram formadores de biofilme, com 16,6% como fortes aderentes. Os resultados foram relevantes *in vitro*, inibindo a ação do biofilme em formação e consolidado, além de inibir a motilidade, produzindo zonas de migração menores que as amostras controle, sem extrato. No modelo *ex vivo* não ficou demonstrada toxicidade no grupo exposto somente ao extrato. No grupo onde as amostras foram submetidas ao EEB+Inóculo houve ação degradante no epitélio, porém em menor amplitude quando comparada com o Grupo B, apenas com a presença do inóculo no epitélio. O uso fitoterápico se apresentou promissor contra a formação e consolidação do biofilme e aderência bacteriana, além de não ter se mostrado tóxico no modelo *ex vivo*.

**Palavras chave:** modelo *ex vivo*, fitoterápico, patógenos aquáticos e fatores de virulência.

**Abstract:** The use of herbal products in animal production has shown to be promising because they are natural products, biodegradable and with antimicrobial activity against several pathogens, including fish. The objective of this work was to test the action of the crude ethanolic extract (CEE) of the *Hymenaea martiana* leaf on the formation and consolidation of the *in vitro* biofilm, its performance on the adhesion factors produced by *Aeromonas spp.* and to evaluate its toxicity, proposing an *ex vivo* model, using as substrate Nile Tilapia epithelium (*Oreochromis niloticus*) cultivated. The bacterial samples were submitted to a molecular test to detect five possible genes (*aer*-aerolysin, *lip*-lipase, *ahy*-elastase, *fla*- flagellin and *ast*-enterotoxins) involved in the production of virulence factors and in the formation of biofilms by the microorganism studied. The isolates were classified in strong, moderate and weak biofilm formers through the Elisa reader, after staining of gentian violet. They were analyzed *in vitro* against the bactericidal action of the extract and then to test the potential of the extract in the formation and consolidation of the biofilm of the aeromonas. Important factors such as capsule production and motility of the isolates were observed in tests such as red congo and motility assay respectively to understand the relation of genotypic factors to phenotypic responses. In the *ex vivo* evaluation, the action of the extract on its toxicity was observed with naked eye and optical microscope, presence of *A. spp.* adhered to the skin of tilapia. and possible morphological changes occurred. Regarding the results: The isolates presented seventeen different genetic combinations besides absence, in three isolates of the studied genes. This did not interfere in the biofilm production in any of the thirty isolates tested, where 100% were biofilm formers, with 13.3% as strong adherents. The extract obtained relevant results *in vitro*, inhibiting the action of the biofilm in formation and consolidation, besides inhibiting the motility, producing migration zones smaller than the control samples, without extract. In the *ex vivo* model the extract showed no toxicity in the group exposed only to it. In the group where the samples were submitted to the action of BSE + Inoculum there was degrading action of the bacterium on the epithelium, but in a smaller amplitude when compared with Group B, only with the presence of the inoculum in the epithelium. The phytotherapic presented promising in the fight against factors such as biofilm and bacterial adherence that increases the microbial pathogenicity, besides not being toxic in the *ex vivo* model.

**Keywords:** *ex vivo* model, phytotherapic, aquatic pathogens and virulence factors.

## 1. Introdução

A aquicultura é uma das atividades do setor pecuário que mais tem crescido mundialmente nos últimos anos. Em média a oferta de peixe aumenta anualmente 3,2% (FAO, 2014). Além disso, a procura por alimentos mais saudáveis tem influenciado na demanda por organismos aquáticos (Jensen et al., 2014). No grupo de espécies criadas no Brasil, a Tilápia do Nilo ocupa o primeiro lugar na lista, correspondendo a 43,1% da produção (IBGE, 2014).

O crescimento deste setor produtivo é influenciado pela grande aceitação de seu produto, entretanto o setor é prejudicado pela ocorrência de diversas doenças, principalmente as provocadas por patógenos que possuem como ambiente de proliferação o meio aquático, tanto de corpos d'água lacustres quanto ribeirinhos. As principais causadoras de infecções são as bactérias, destacando as aeromonas, isoladas frequentemente em surtos de mortalidade em organismos aquáticos, se apresentam como importantes formadoras de biofilme e outros fatores de virulência (Moraes e Martins, 2004; Hirsch et al., 2006; Wu et al., 2014).

Os biofilmes são aglomerados de bactérias envolvidas por uma membrana espessa de exopolissacarídeos (EPS), que facilitam a fixação, adesão, colonização e muitas vezes conferem certa resistência à ação de antibióticos. A adesão e fixação são importantes fatores de virulência e imprescindíveis para que ocorra a infecção no hospedeiro (Hall-Stoodley et al., 2005). Espécies como *Aeromonas* spp. são potenciais produtoras e se utilizam desses fatores para protegesse e contribuir para sua patogênese (Monterrey-Quintero e Sobral, 2000).

Apresentando resultados importantes em terapia de doenças humanas e em cultivos terrestres de animais, os fitoterápicos se destacam atuando como antimicrobiano, antiinflamatório ou mesmo para melhorar o desempenho produtivo dos animais (BurrIDGE et al., 2010; Kulkarni et al., 2013). Essa terapia provém de produtos derivados de plantas medicinais, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (Brasil, 2011). Seus Princípios ativo, segundo Valladão e Pilarsky, (2015) como os óleos essenciais e os extratos vegetais também tem sido utilizado recentemente para prevenir doenças em cultivos aquáticos.

A *Hymenaea martiana* é uma árvore comum do cerrado que têm demonstrado atividades anestésica, analgésica e antiinflamatória relacionadas com o sùber do seu

caule e relatos da atividade antifúngica e bactericida do seu extrato hidroetanólico bruto (Aleixo et al., 2013; Silva et al., 2012; Yunes e Carneiro, 2012; Souza, 2008).

É nesse contexto de novas descobertas frente ao uso dos fitoterápicos em ambientes e organismos aquáticos que a pesquisa propõe-se em investigar a ação do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* na produção do biofilme *in vitro* e através de um modelo *ex vivo*, utilizando como substrato epitélio de tilápia, avaliar sua ação toxicológica e frente a importantes fatores de virulência envolvidos no processo infeccioso da *Aeromonas* spp. isoladas de Tilápia do Nilo cultivadas.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Tilapicultura: aspectos gerais**

A carne de peixe é uma importante fonte de proteína, com alto valor nutritivo para consumo humano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um consumo anual de 12 kg/habitante. Em uma década (2003 a 2013) o consumo nacional de pescado aumentou mais de 100%, atingindo um consumo médio de 14,5 kg habitante/ano em 2013. Ademais não só o consumo interno, mas também o mundial continuam a crescer, tornando a carne cada vez mais procurada pelos consumidores (MPA, 2014).

Esse aumento no consumo de peixes, que surgiu no final da década de noventa, trouxe à necessidade de se cultivar animais em quantidade, mas com qualidade de venda (Figuereido e Valente, 2008). A tilapicultura é a nomenclatura dada à produção de Tilápias, peixes de origem africana do vale do rio Nilo, no Egito, que apresenta como espécie mais cultivada a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Com as expansões comerciais e a exportação, a tilápia hoje está presente em todo o mundo como um dos animais aquático, de cultivo terrestre, de maior valor econômico, disputando a liderança com a carpa (Furuya et al., 2010).

Já totalmente difundida em quase todo território brasileiro é o peixe mais criado no Brasil e isso se deve a uma série de características da espécie e do mercado consumidor que viabilizam e consolidam economicamente sua produção. A espécie, por ser pouco exigente, apresenta uma grande capacidade de adaptação em diversas condições ambientais, além de pontos importantes como pouca susceptibilidade a doenças parasitárias, suporta grandes variações

de temperatura, reproduzem-se facilmente e sobrevive em águas com baixos níveis de oxigênio dissolvidos o que facilita seu cultivo. Para consolidar a viabilidade da sua criação a Tilápia também apresenta excelente conversão alimentar, rápido crescimento e baixo custo de produção (Figueiredo e Valente, 2008; Fitzsimmons; Martinez-Garcia; Gonzales-Alanis, 2011).

A criação desse peixe é realizada principalmente em viveiros escavados e tanques-rede. O primeiro sistema é caracterizado por menor densidade de estocagem comparada com o sistema em tanques-rede, onde a biomassa por unidade de volume é alta. Em sistema intensivo a Tilápia, em comparação com outras espécies cultivadas no Brasil, tem um ritmo de crescimento rápido (Furuya et al., 2010).

### **2.1.1. Modelos de cultivo (Tilápia do Nilo)**

O modelo de cultivo influencia muito na ocorrência de doenças e no controle destas (Kubitza, 2011). Há hoje quatro modelos de cultivo utilizados: extensivo, semi-intensivo, intensivo e o super-intensivo (Figueiredo e valente, 2008).

O modelo extensivo, ou natural, é regido pelo principio da autonomia, em que os corpos d'água, em sua maioria, pequenos lagos, são acondicionados para receber os primeiros animais, chamados de matrizes, pois darão início ao cultivo por meio de reprodução sem auxílio ou emprego de técnicas e tecnologias (Mansour e Esteban, 2017).

A alimentação é composta de cultivo de micro algas, também de maneira extensiva, e a produção é contabilizada pela retirada do excesso de animais na fase adulta, evitando a superpopulação e os efeitos negativos que isso acarreta (Garcia et al., 2013). Este modelo é caracterizado pela baixa frequência de infecções bacterianas, baixa produtividade, a contaminação do solo é irrisória, e as atividades de manejo do cultivo são o acompanhamento da qualidade da água, apenas para se evitar níveis tóxicos dos compostos diluídos no ambiente, controle de ervas daninhas nas margens e de predadores, como anfíbios e aves de rapina, que predam os alevinos e os adultos, respectivamente (Figueiredo e Leal, 2008; Mansour e Esteban, 2017).

Com a inclusão de ração específica para os animais e suas diversas fases, aumento da densidade populacional e aeradores, o cultivo passa a ser

denominado de semi-intensivo, neste sistema os animais já são o foco dos pecuaristas, passando a elevar o cuidado com os animais, e incrementar o investimento (Cyrino et al., 2004).

As atividades dos tratadores agora, além dos já citados no sistema extensivo, incluem a alimentação com ração comercial dos peixes, que apresentam diferentes tamanhos de pellets e concentração de proteína, permitem um aumento na população confinada, que podem ser ainda cultivados em pequenos lagos ou em tanques escavados, e a presença de aeradores, que se tornam recomendados tanto pelo aumento do número de animais presentes por metro quadrado de lâmina d'água, quanto pelo aumento da matéria orgânica, promovida pelos excrementos dos animais ali contidos, quanto pela própria sobra de ração, cuja quantidade ofertada deve ser regulada com base na biomassa de cada tanque, oxigênio dissolvido e temperatura no momento da oferta (Scorvo et al., 2010; Kubitzka, 2011; Garcia et al., 2013; Figueiredo e Valente, 2008).

Este sistema de cultivo possui uma maior frequência da incidência de doenças, principalmente por bactérias que formam o biofilme bacteriano, quanto por parasitas, pois o aumento da densidade populacional promove a colonização bacteriana e o surgimento de animais doentes e contaminantes (Pavanelli et al., 2008; Figueiredo e Leal, 2008; Jimenez, 2007; Leira, 2017).

Já o sistema intensivo, além do já exposto acima, inclui renovação da água de cultivo ou o uso de filtros biológicos, masculinização dos animais, berçário para uma melhor performance dos recém-nascidos, matrizes separadas dos juvenis, tanques de alvenaria e biometria periódica dos animais destinados ao comércio (Cyrino et al., 2004; Kubitzka, 2011; Mansour e Esteban, 2017) . Este sistema é o mais utilizado atualmente, por permitir, até então, que o local de cultivo possa ser o mesmo, do extensivo e do semi-intensivo, alterações estruturais significativas (Mansour e Esteban, 2017).

Este sistema, por possuir um manuseio mais constante dos animais, que são os que ocorrem logo após a eclosão dos ovos (caracterizado pela formação da “nuvem” de alevinos), divisão do plantel em tanques com menor população por ocasião do crescimento e as biometrias para acompanhamento do desenvolvimento dos animais, sua população mais densa e o estresse do manejo citado anteriormente aumenta as ocorrências de bacterioses, principalmente das

provocadas por aeromonas, que neste sistema uma infecção bacteriana pode levar à perda da população de um tanque inteiro (Scorvo-filho et al., 2010).

Uma das alternativas ao sistema de cultivo tradicional, que também é considerado intensivo é o uso de tanques rede. Constitui-se de gaiolas de material resistente que fica mergulhado em corpos d'água, de preferência em rios largos cujo fluxo de água seja lento e constante. Este método facilita as trocas periódicas de água, que ocorrem o tempo todo, melhorando o desenvolvimento do animal, pois a água está sempre limpa, nova, e oxigenada (Mansour e Esteban, 2017; Scorvo-filho et al., 2010; Garcia et al., 2014).

Mas alguns cuidados devem ser tomados, o local de ancoragem dos tanques não deve ser próximo de saída de dejetos urbanos, nem ser instalada próximo a nascentes ou estações de tratamento (Figueiredo e Leal, 2008). O uso de antimicrobianos convencionais deve ser evitado ao máximo, e a quantidade de ração ofertada deve ser o suficiente para os animais consumirem imediatamente, evitando deposição de sobras no leito do rio. Quanto às infecções, principalmente bacterianas, os animais estão expostos a qualquer surto, apesar disso o risco é baixo por conta da renovação constante de água, o que impede o acúmulo de bactérias por água parada (Trang et al., 2017).

Por fim, o sistema denominado de super-intensivo é caracterizado pelo acréscimo de técnicas no cultivo, como a reprodução assistida e de tecnologias como os tanques de bioflocos e a necessidade vital de um controle biológico, modificando a aparência da planta de cultivo que deixa de se assemelhar com um complexo rural para se parecer mais com um laboratório (Trang et al., 2017). Neste nível de cultivo os tanques usados na fase de crescimento deixam de ser os escavados, ou de ser a céu aberto, e são colocados dentro de um laboratório, que possui ventilação controlada e iluminação por meio de telhas translúcidas ou uma iluminação totalmente artificial. O controle biológico exige limpeza constante das instalações e asseio por parte dos profissionais envolvidos, além de matrizes, quando obtidas externamente, de linhagens selecionadas geneticamente e sanitariamente (Kubitza, 2011; Figueiredo e Leal, 2008; Leira, 2017).

A reprodução assistida é feita por meio de indução hormonal e inseminação artificial. Os tanques de cultivo são adaptados para o processo de bioflocos, que utiliza filmes bacterianos, formados por bactérias probióticas,

micro-algas e microcrustáceos cultivados nas próprias instalações de cultivo. Este sistema é mais sensível a presença de bactérias patogênicas, que quando conseguem se infiltrar nos tanques e iniciar sua colonização, competindo com as bactérias do biofilme ocasionam a perda total dos tanques, que por este perigo, são separadas em salas individuais e com alto controle biológico (Kubitza, 2011).

Os sistemas de cultivo, à medida que necessitam de maiores investimentos tecnológicos, técnicos e financeiros, também possuem retorno condizente, apesar de terem riscos crescentes, pois o investimento pode ser perdido sem o controle da estocagem em densidades elevadas, má qualidade de água, diminuição da oferta de alimentos e conversão alimentar, produzindo um ambiente hostil e de estresse aos animais (Scorvo-filho et al., 2010; Garcia et al., 2013).

Estes fatores refletem na homeostasia e baixa de imunidade dos peixes, predispondo-os ao ataque de organismos patogênicos (Telli et al., 2014). Esse efeito deletério na Tilápia resulta em peixes mais susceptíveis a infecções e mortalidades (Garcia et al., 2014; Pavanelli et al., 2008). As enfermidades são parte integrante da existência de todos os animais, incluindo as populações de peixes de um ambiente natural ou cultivado (Jimenez 2007).

## **2.2. Enfermidades por patógenos aquáticos**

Jimenez (2007) define que as enfermidades são processos cuja característica é a interferência que modifica o estado normal do organismo, por conta de fatores bióticos (organismos próximos), abióticos (água, gases, compostos orgânicos), genéticos (predisposição ou deficiências) ou nutricionais (má alimentação, deficiências ou má qualidade do alimento).

Nos fatores bióticos estão inclusos os patógenos, ou agentes infecciosos, que podem ser caracterizados pela obrigatoriedade ou não da infecção no hospedeiro como parte do seu ciclo de vida. Outro aspecto pertinente aos patógenos é a virulência, capacidade do organismo infectante de causar enfermidades. Os fatores que definem essa virulência dependem da genética do agente, pois a espécie, a cepa, a sorologia e o genótipo definem as capacidades do organismo em questão (Noga, 2000).

Muitos patógenos habitam os ecossistemas, vírus, bactérias, fungos e protozoários, que são caracterizados como patógenos por infectar o hospedeiro, se beneficiando dos produtos do metabolismo deste e causando problemas de saúde, levando a morte do hospedeiro (Sharma et al., 2003).

Esses e outros patógenos podem ser divididos em 2 grandes grupos: macroscópicos e microscópicos. Os macroscópicos são representados, dentre outros, pelos nemátodos, cestodos e copépodos. E os microrganismos pelos vírus, bactérias, rickettsias e protozoários (Noga, 2000).

As enfermidades sendo uma disfunção causada por patógenos, é necessário umnexo causal para que o agente infeccioso se infiltre no hospedeiro, que envolvem as condições ambientais, fatores nutricionais e de estresse do animal e a resposta do sistema imune, Reno (1998) mostra que estes aspectos estão envolvidos no processo de enfermidade e infecções.

Os macroparasitas mais comuns em peixes são os copépodo, sendo o gênero *Lernaea* o mais encontrado parasitando as brânquias e em sistemas de cultivo de alta densidade onde consegue se multiplicar em abundancia, seu diagnóstico é realizado pela presença de fêmeas adultas nos peixes, os estágios anteriores a este são de difícil detecção e o tratamento é baseado em alterações dos parâmetros da água de cultivo, como o aumento da salinidade ou pelo uso de organofosforados (Jímenez, 2007).

Os microparasitas, como vírus e bactérias, em especial, possuem um ciclo de vida menor que a do hospedeiro. As enfermidades por elas causadas são caracterizadas pelo local da infecção no hospedeiro, as localizadas nas brânquias, epitélio, músculos e trato gastro-intestinal são as mais comuns. Algumas bactérias são mais comumente encontradas em determinadas regiões, mas há bactérias que possuem capacidade de se instalar em todo o corpo do peixe. Seus sintomas, alguns mais específicos que outros, incluem granulomas, hemorragias, necroses, disfunções sistêmicas, alterações comportamentais e no aspecto do animal infectado (Inglis et al., 1993).

O ambiente aquático é bem propício para o desenvolvimento destes patógenos, pois todos os organismos vivos necessitam de água para viver. E são nestes ambientes que os patógenos bacterianos são bem variados, com diversos gêneros compondo o seu perfil, como os gêneros *Cryptosporidio*,

Campylobacter, Pseudomonas e Aeromonas difundidos nos corpos d'água (Sharma et al., 2003).

Os vírus também estão presentes na água, mesmo potável, como o Norovírus, encontrado por Tian et al. (2017) em água utilizada na agricultura.

As identificações dos agentes infecciosos bacterianos, são feitas por meio de exames laboratoriais, como cultura *in vitro*, histopatologia e histoquímico (Luna, 1968) e com mais precisão os exames genéticos como a reação em cadeia de polimerase, PCR (Mauel et al., 1996).

Entretanto as bactérias, segundo Telli et al. (2014) ainda são os organismos que mais causam infecção e mortalidade em ambientes de cultivo de animais com grande demanda populacional.

### **2.2.1. Bacterioses**

A presença de bactérias nos mais diversos ambientes é constante, encontram-se bactérias nas regiões mais gélidas do planeta, em ambientes vulcânicos, nas porções mais rarefeitas da atmosfera e nas profundezas abissais dos oceanos, obviamente que cada ambiente específico possui sua população bacteriana específica e adaptada para as condições ali encontradas (Leira et al., 2017). Apesar desta presença constante nos ambientes, poucas são as bactérias que causam efetivamente doenças, ou cujo efeito seja negativo para um ou outro ser vivo que também ocupe aquele ambiente (Ben-Jacob, 2009).

O contato com bactérias patogênicas é constante nos ambiente, sendo observado que animais com sistema imune deprimido adoecem mais constantemente (Telli et al., 2014; Pavanelli et al., 2008). O que faz com que todos os animais não adoçam ao mesmo tempo e pelas mesmas bactérias é o sistema imune que impede surtos constantes de bactérias (Leira et al., 2017). Mas quando a concentração de determinada bactéria aumenta de maneira significativa e tem contato com um hospedeiro susceptível o surgimento da enfermidade aumenta (Telli et al., 2014; Jimenez, 2007; Burridge et al., 2010). Quando um animal fica doente por determinada bactéria, é natural que haja uma resposta imune, que quando suficiente sobrepuja a infecção, restaurando a condição sanitária do hospedeiro e em alguns casos possui um mecanismo de memória que quando a mesma bactéria volta a agredir o hospedeiro a resposta

deste é mais rápida e eficiente que a resposta anterior (Guo et al., 2015; Hirsch et al., 2006).

Não só a concentração bacteriana promove o desenvolvimento de doenças, mas o aumento da concentração de uma única espécie bacteriana, pois em ambientes em que diversas cepas de bactérias estão presentes, dificilmente uma cepa consegue infectar o hospedeiro não-susceptível, pois a competição entre as bactérias por sítios de adesão, nutrientes e espaço reduz sua virulência frente ao hospedeiro (Leira et al., 2017; Guo et al., 2015; Jingjing et al., 2016).

As bacterioses são infecções causadas por bactérias, em muitos casos de uma única cepa, que ao conseguir se sobressair frente às outras bactérias competidoras, consegue espaço e recursos nutricionais para se multiplicar exacerbadamente, com este aumento de sua densidade consegue se infiltrar nos organismos hospedeiros, por meio de rupturas do tecido epitelial, por ingestão ou aspiração, entretanto outras formas de infecção são menos comuns mas possíveis, como intra-auricular, intra-ocular e sexualmente (Jingjing et al., 2016; Costa et al., 2010; Basson et al., 2007).

Ainda para estabelecer a bacteriose, o microrganismo em questão deve superar outros obstáculos, como o sistema imune, quando a infecção é por invasão cutânea e sanguínea, a acidez estomacal nos casos de ingestão e o muco pulmonar, no caso de aspiração por animais terrestres, os animais aquáticos são mais vulneráveis, por estarem em contato constante com a água, que pode estar e neste caso o tempo de exposição influencia no êxito da infecção (Leira et al., 2017; Pavanelli et al., 2008; Tavechio et al., 2009 ).

O objetivo da infecção é se aproveitar do ambiente com menor número de competidores e mais nutrientes, como músculo, sangue e órgãos. A temperatura corpórea do hospedeiro também influencia no sucesso de colonização da bactéria, e conseqüente enfermidade caracterizada genericamente de bacteriose (Leira et al., 2017). As bacterioses mais comuns em ambientes aquáticos são provocadas por bactérias existentes em demasia em cada corpo d'água (Telli et al., 2014). Em ambientes marinhos e estuarinos bactérias do gênero *Vibrio* são comumente isoladas de peixes e crustáceos e capazes de se multiplicar sem hospedeiro, estando na lista das espécies mais comuns o *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* e *V. fluvialis* (Tall et al., 2013; Penduka, 2011). Já em corpos dulcícolas, a presença maior é de bactérias do

gênero *Aeromonas* e *Pseudomonas*, outras bactérias também vivem nestes ambientes, mas são menos frequentes como agentes infecciosos e por isso é dada menos importância a elas (Jimenez, 2007; Valladão e Pilarski, 2015).

As infecções provocadas pelas aeromonas e pseudomonas provocam sintomas semelhantes, mas necessitam ser identificadas para orientar o piscicultor na escolha do antimicrobiano e protocolo de tratamento mais recomendado (Jimenez, 2007).

Dentre os sintomas mais comuns estão formação de abscessos subcutâneos, gastrites, enterites, hemorragia interna, necrose de partes do peixe, levando o animal à morte. Quando as infecções são menos intensas e o animal consegue responder à infecção em curso, os cuidados não podem ser reduzidos, pois o sistema imune do animal, já se apresenta estressado, abrindo portas para outras infecções bacterianas e ao aparecimento de fungos, muito comum em baixas temperaturas, associado ao apetite reduzido do animal, induzido também pela infecção bacteriana primária (Janda e Abbott, 2010; Leira et al., 2017).

### **2.2.2. *Aeromonas*: *Aeromonas* spp. em cultivos aquáticos**

A presença de espécies do gênero *Aeromonas* é comum nos ambientes aquáticos, principalmente dulcícola, mas encontrados também no solo, aves e animais de sangue frio (Ribeiro, 2001). Impressionam pela sua patogenicidade e assim possibilidade de causarem infecções severas nos animais acometidos (Onaka, 2009). Pertencem à família *Aeromonadaceae* que engloba microrganismos fermentadores da glicose, anaeróbios facultativos e oxidase positiva (Tavares et al., 2011).

Santos (1981) verificou a microbiota de peixes de água doce em diferentes países e relatou que animais provenientes de água frias há uma predominância de espécies bacterianas gram-negativas sobre as gram-positivas, e que nos peixes capturados em regiões tropicais existia um equilíbrio entre as duas. Ressaltou que a microbiota predominante em peixes de água doce é composta por: *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias coliformes. Na Venezuela Alvarez e Agurto (2000) identificaram a microbiota predominante das Tilápias pesquisadas e encontraram os gêneros *Aeromonas* e *Plesiomonas*.

As aeromonas são gram-negativas e conforme descrito por Garcia-Lopez et al. (2004) e Palumbo et al. (2001), são distribuídas em dois distintos grupos: um composto pela espécie não móvel e psicrotróficas (exemplo: *A. salmonicida*) e o outro pela linhagem móvel e mesofílica (exemplo: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*). São anaeróbios facultativos, produtores de enzimas catalase e oxidase e fermentadores de glicose. Os valores do Ph para crescimento oscilam entre 5,5 e 9,0. As *Aeromonas* spp. possuem diferentes morfologias celulares com variações na forma e tamanho. Algumas linhagens se apresentam na forma de filamentos, mas comumente podem se apresentar cocoide a bacilares, retos ou curvos com extremidades arredondadas, medindo de 1 a 3,5µm. A motilidade deve-se a presença de flagelos, que dependendo da linhagem podem ser únicos ou múltiplos e laterais. A temperatura mínima de crescimento varia entre 0 e 5 ° C, a máxima entre 38 e 41 ° C , sendo a ótima entre 22 e 28 ° C (Delamare et al., 2002 e Martin-Carnahan e Joseph, 2005) .Garcia-Lopez et al. (2004) também citaram em pesquisa a temperatura ideal para o desenvolvimento das aeromonas, sendo esta à 28° C, in vitro, onde Palumbo et al. (2001) confirmaram verificando que em várias reações bioquímicas de diversas estirpes de aeromonas móveis isoladas de peixes, mostraram resultados negativos a temperatura de incubação à 37° C e positivos à 28° C.

A presença, em grandes concentrações, de bactérias patogênicas, dentre elas as do gênero *Aeromonas*, é justificada pela sua alta competitividade em relação a outras bactérias, sendo incluídas dentre os mecanismos de competitividade, os fatores de virulência, os mecanismos de defesa, e capacidade de reprodução, o que confere, em grande parte, a alta capacidade de colonização por parte dessas bactérias (Starliper et al., 2015).

Em virtude de sua grande presença em águas doce, infecções em peixes causadas por *Aeromonas* spp. são comuns, apresentam uma ampla gama de hospedeiros e altas mortalidades (Starliper et al., 2015). Jimenez (2007) em seu livro “enfermidades de Tilápias cultivadas” afirma que as infecções por *Aeromonas* spp. são provavelmente as mais comuns em peixes de água doce e que todos os organismos vivos presentes na água são susceptíveis a esta doença. Gowda Tanuja et al. (2015) citam também a presença e bom desenvolvimento das aeromonas móveis em águas salobras.

Dentre as espécies de aeromonas mais encontradas associada às infecções em peixes estão a *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* e *A. veronii*. Estas bactérias têm sido isoladas de órgãos internos e de mucosas, sua incidência é maior em águas contaminadas. Fatores importantes que predispoem a proliferação destas bactérias são as altas temperaturas e variações súbitas de temperatura, alta densidade de peixes no ambiente, seja ela de cultivo ao não, contaminação orgânica e hipóxia (Tavares et al., 2012).

Esses microrganismos podem invadir a pele dos peixes por lesões muitas vezes causadas por ectoparasitos presentes na água (Pavanelli et al., 2008). Dentro da patogenia da aeromonas são registradas as lesões desde superficiais até profundas na pele, originando uma septicemia típica de bactérias gram-negativas. Essas lesões incluem hemorragias, necroses que podem vir a se tornar úlceras de coloração avermelhadas, estendendo-se ao músculo (Zago, 2012). Em alevinos de Tilápia do Nilo cultivadas a infecção por aeromonas atinge o músculo estriado dos raios da nadadeira dorsal, caudal e ventral. Estas bactérias proliferam nestes tecidos, resultando em processos hemorrágicos avançados, laceração e perda parcial ou total das nadadeiras (Jimenez, 2007).

É importante ressaltar que a *Aeromonas* são patógenos emergentes com infecções locais e sistêmicas em hospedeiros tanto imunologicamente suprimidos como competentes (Palú et al., 2006; Seshadri et al., 2006).

### **2.3. Fatores de virulência bacterianos**

O grau de patogenicidade dentro de um determinado gênero ou espécie é chamado de virulência. A virulência não está atribuída a um único fator, e sim, a vários fatores relacionados com o microrganismo, ao hospedeiro e à interação entre os dois, podendo ser definida como a habilidade de uma cepa provocar a doença em um ponto final específico. A virulência envolve duas características de um microrganismo patogênico: infecciosidade (capacidade de poder iniciar uma infecção) e a gravidade de condição da infecção. Podemos caracterizar as cepas em: com alto grau de virulência, médio grau de virulência ou sem virulência (avirulentas), dentro de um gênero ou espécies de microrganismos que na maioria das vezes são considerados patogênicos (Nogueira e Miguel, 2012). Para a bactéria isso pode ser medido de várias formas, tais como estudo de letalidade (dose letal 50% (LD<sub>50</sub>)), força de patogenicidade (grau de

invasividade ou produção de toxinas), ou outros atributos (Janda e Abbott, 2010).

Alguns fatores de virulência são conhecidos e comuns de muitas bactérias como a adesão, capacidade dos microrganismos de se fixarem nas células e tecidos hospedeiros; invasão, onde a penetração bacteriana nas células do organismo se dá pela fagocitose e toxinas, substâncias de origem bacteriana capazes de causar danos no organismo (Yu et al., 2005). Entre esses fatores, alguns estão relacionados com a colonização do microrganismo e outros com as lesões do organismo (Li et al., 2011).

As bactérias de um modo geral possuem mecanismos de colonização, infecção, competitividade e sobrevivência, que são expressos por compostos produzidos em determinadas circunstâncias e formas de adesão aos substratos presentes no ambiente. As bactérias possuem características em comum, mas são todas diferentes, por conta dos processos evolutivos, possuindo adaptações que foram sendo incorporadas a si por conta da variabilidade ambiental, também chamada de pressão da variação ambiente, e que hoje vemos apenas as bactérias que obtiveram êxito no processo evolutivo ao longo dos tempos (Hidalgo e Figueira, 2012; Costa et al., 2010; Basson et al., 2007).

Atualmente as bactérias possuem uma grande variedade de fatores de virulência, apesar de cada bactéria possuir os fatores de virulência que fizeram ela sobreviver ao processo evolutivo, o que leva a concluir que as bactérias que não estão presentes hoje no ambiente não possuíam tais fatores (Wilson et al., 2002).

Os fatores de virulência são expressos fenotipicamente pela produção de compostos que atuam no sentido de agredir as bactérias competidoras pelos sítios de adesão ou pelos fatores de nutrição dispersos no ambiente em que vivem, manutenção do ambiente em que está inserido, motilidade para locomoção para ambientes mais propícios ao seu desenvolvimento e formação dos biofilmes, que auxiliam na sua sobrevivência e perpetuação (Nogueira e Miguel, 2012; Hall- Stoodley et al., 2005).

Geneticamente, os fatores de virulência são expressos pela presença dos genes que produzem as substâncias encontradas no biofilme, nas colônias e na formação de flagelos e pili, que determinam ainda o tamanho do flagelo, seu

número e posição, bem como dos pili (Rutherford e Bassler, 2012; Merino et al., 1997; Gavín et al., 2003).

A virulência de uma bactéria, ou força de sua virulência, está ligada a presença dos genes de virulência, mas condicionada á expressividade deste gene, não bastando a bactéria possuir o código genético para tal fator, mas esse código estar ativo. Contudo força de sua virulência é de difícil mensuração, pois não há relação direta entre a expressividade fenotípica do fator de virulência, em quantidade e qualidade, e sua capacidade de desenvolvimento e capacidade de produzir enfermidades (Ben-Jacob, 2009; Scoaris et al., 2008).

Dentre os fatores de virulência, há cinco que são destacados pela literatura: formação de biofilme; formação de flagelo e pili; produção de proteínas estruturais, fosfolipídeos e polissacarídeos; produção de hemolisina; produção de colagenase, protease sérica, metalloprotease, enolase e lipase (Rasmussen-Ivey et al., 2016).

A formação de biofilme é a formação, em conjunto ou não com outras bactérias, de um filme gelatinoso que agrega nutrientes próximos á colônia bacteriana e mantém um ambiente com maior estabilidade, em comparação com o ambiente sem o biofilme, impedindo variações bruscas nas características ambientais, e auxiliando na adesão da bactéria ao substrato que pode ser epitélio animal (Pavithra e Doble, 2008).

A produção de flagelo e pili se refere á produção de mecanismos de motilidade celular, sem os quais a bactéria não consegue se locomover para locais mais propícios ao seu desenvolvimento. Os flagelos são usados como grandes “remos” fazendo movimentos que promovam seu deslocamento em meios aquosos e semi-aquosos, desta maneira a bactéria consegue se afastar da população que já ocupa uma determinada localização e até “caçar” nutrientes por si só. Os pili se assemelham a pelos curtos, por toda a extensão da bactéria, permitindo o mesmo processo do flagelo, mas atuando como pequenos ”remos”, que movimentam a bactéria e podem ajudar na aderência aos substratos (Rasmussen-Ivey et al., 2016; Wilson et al., 2002 Gavín et al., 2003).

A produção de proteínas estruturais, fosfolipídeos e polissacarídeos são para a bactéria se proteger das defesas do hospedeiro, impedindo que as células de defesa a fagocitem e permitindo uma maior sobrevivência das bactérias que

possuam este fator de virulência, pois garante um maior alcance de suas infecções em hospedeiros não imuno-suprimidos (Janda e Abbott, 2010).

A hemolisina produzida pelas bactérias confere a capacidade de destruir componentes do sangue do animal, sendo classificado como componente hemolítico, citotônico e citotóxico, levando a infecções hemofílicas a um grande agravamento das infecções, quando estas atingem a corrente sanguínea (Rasmussen-Ivey et al., 2016; Trabulsi e Alterthum, 2005).

Colagenase, protease sérica, matelloprotease, enolase e lipase, produzida pelas bactérias, são usadas como agentes de degradação dos tecidos dos animais infectados, levando os hospedeiros a quadros de sepse sistêmica, o que dificilmente consegue ser tratado com eficiência nos animais doentes, levando-os rapidamente à morte, o que dependendo do sistema de cultivo, pode levar a perda de todo o lote cultivado (Rasmussen-Ivey et al., 2016).

### **2.3.1. Fatores de virulência relacionados à aeromonas.**

O mecanismo de patogenicidade de *Aeromonas* spp. é complexo e ainda não foi muito bem esclarecido. A virulência é considerada multifatorial. As aeromonas produzem vários produtos extracelulares biologicamente ativos, tais como: hemolisinas (aerolisinas), citotoxinas, enterotoxinas, proteases, leucocidinas, fosfolipases, elastases, DNAses, adesinas e, ainda, colinesterases e endotoxinas. A capacidade de produzir diversos fatores de virulência contribui para a patogênese da doença ocasionada por esse grupo bacteriano (Trabulsi e Alterthum, 2005).

Os fatores de virulência produzidos por aeromonas podem ser classificados em: produtos extracelulares e estruturas associadas a células. Entre os fatores extracelulares mais relatados estão as hemolisinas, enterotoxinas, proteases, amilases e quinases e em relação às estruturas associadas às células, podem ser descritos: pili, flagelos, proteínas de membrana externa, lipopolissacarídeos e cápsulas (Janda e Abbott, 2010; Epa, 2006).

Murray et al. (2000) e Garcia-Lopez et al. (2004) também relatam os principais fatores de virulência associados à *Aeromonas* spp. e entre alguns eles destacam as lipases, que são patogênicas para peixes, principalmente a glicerofosfolípideo-colesterol-aciltransferase (CGAT) que causa lise de membranas celulares e eritrócitos e as proteases que são capazes de causar danos

tissulares, invadindo o hospedeiro, permitindo desta forma o aporte de nutrientes necessários ao desenvolvimento do microrganismo.

Em estudos realizados, foram identificados três tipos de proteases produzidas por *Aeromonas* spp. as da serina termoestáveis, as termolábeis e as sensíveis ao EDTA (Jensen et al., 2014). Corroborando com os relatos citados, Falgás (2003) afirmou que as espécies de *Aeromonas* spp. aparecem também associadas nas infecções de feridas e enfatiza que os fatores de virulência atribuídos à *Aeromonas* spp. são as lipases, proteases, fímbrias, cápsulas de polissacarídeos, entre outros.

A aderência é um importante fator para o gênero *Aeromonas*, que tanto se apresentam como bactérias oportunistas como emergentes e primárias causadoras de infecções (Huang et al., 2015). Dois sistemas de aderência são bem conhecidos: os mediados por fímbrias e os mediados por cápsulas. Enquanto as fímbrias mediam a adesão e são importantes durante o estágio inicial de colonização, a motilidade e quimiotaxia do flagelo bacteriano permitem a disseminação para novos sítios (Rutherford e Bassler, 2012; Jandar e Abbott, 2010).

Segundo Merino et al. (1997) as fímbrias também foram identificadas em dois grupos: pequenas e rígidas, que ocorrem em um grande número de bactérias, e as fímbrias longas e flexíveis, que ocorrem em um pequeno número de células bacterianas e são estas estruturas que possibilitam a adesão da *Aeromonas* spp. à diferentes tipos de células. As aeromonas possuem capacidade de adesão às células teciduais, causando diversos graus de injúria nos tecidos, e a severidade da doença depende diretamente dos tipos de fatores de virulência envolvidos e do estado imunológico do paciente (Albert et al., 2000; Sinha et al., 2004; Sen e Rodgers, 2004).

A movimentação de espécies de aeromonas em um ambiente fica sob responsabilidade, entre outros fatores, de dois tipos de flagelos, o polar que permite que o microrganismo nade em ambientes líquidos e o flagelo lateral capaz de impulsionar a célula, aumentando a adesão (Shimada et al., 1985). Estudos observaram que o flagelo polar é essencial na invasão das células de peixes, na adesão em epitélio de células humanas, além de estar estritamente envolvida na produção de biofilme por aeromonas (Huang et al., 2015; Wu et al., 2014; Merino et al., 1997; Jingjing et al., 2016).

Na década de noventa, Eley et al. (1993) e Franco e Landgral (1996) encontraram duas enterotoxinas em *Aeromonas* spp., as citotônicas e as citotóxicas, essas comumente são mais produzidas pelas *Aeromonas* spp. e são fatores de virulência importantes para processo infeccioso. De acordo com Martins et al. (2002), a enterotoxina citotóxica, também conhecida como “aerolisina” com atividade enterotóxica, citotóxica e hemolítica, tem sido descrita como o mais poderoso fator de virulência associado a doenças gastrintestinais, em humanos, causadas por aeromonas. A espécie *A. hydrophila* é potencial produtora de exoenzimas termorresistentes, como lipases e proteases, e esses produtos, mesmo tendo sua estrutura terciária danificada durante o processo de pasteurização, são capazes de reorganizar a estrutura tridimensional, tornando-se novamente ativos e passíveis de deteriorar os produtos posteriormente obtidos (Chen, et al., 2003; Braun e Sutherland, 2005). Ainda a despeito da relação entre potencial patogênico de aeromonas e produção de toxinas hemolíticas, amostras não hemolíticas têm sido isoladas em infecções humanas (Namdari e Bottone, 1990).

As bactérias têm necessidades de regular a expressão de seus genes de virulência para se adaptarem aos microambientes onde são obrigados a sobreviver (Santos et al., 2010). O gênero *Aeromonas* apresenta uma gama de genes relacionados com os fatores de virulência citados acima. Contudo essas características genotípicas não compreendem uma espécie bacteriana, pois podemos encontrar diferenças genéticas em uma mesma estirpe (Jingjing et al., 2016). Em sua maioria das vezes a relação da bactéria com o hospedeiro e o ambiente é o que irá estabelecer a característica necessária para que o microrganismo sobreviva e se desenvolva em um dado ambiente (Santos et al., 2010).

#### **2.4. Formação de biofilme**

A formação de biofilme não é apenas uma etapa da patogenicidade dos organismos, mas o seu estabelecimento em tecido do hospedeiro (biótico) ou inanimado (abiótico), inibe a eficácia das terapêuticas antimicrobianas e proporciona proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, facilita a comunicação entre bactérias, à expressão de virulência, que cria um nicho ecológico para microrganismos promoverem epizootias ou infecções

recorrentes na aquicultura (Basson et al., 2007). O biofilme é o principal mecanismo patogênico que leva à cronicidade e irreduzibilidade das infecções (Arciola et al., 2015).

A produção de biofilme é um complexo equilíbrio de produção de substâncias poliméricas extracelulares, incluindo fibrilas amilóides e modulinas polimerizadas solúveis em fenol (PSMs), e o seu catabolismo determinado pela expressão de enzimas tais como a protease, nuclease e peptídeos (PSM) (Schwartz et al. 2012). O mecanismo de formação do biofilme provavelmente pode ser ativado em diferentes fases da patogênese da infecção, adaptando as características do biofilme extracelular em resposta a estímulos externos (Houston et al., 2011). Seus componentes protéicos intervêm em diferentes estágios da sua formação: com certas proteínas contribuindo para a acumulação de biofilmes e outras a mediar a ligação primária às superfícies (Speziale et al., 2014).

Alguns exopolissacarídeos (EPS) desempenham funções fundamentais como na mediação da adesão de células bacterianas e a agregação entre as células bacterianas. Eles também apresentam funções estruturais na arquitetura da matriz do biofilme, na adesão bacteriana às superfícies, bem como na invasão ao hospedeiro (Arciola et al. 2015; Veiong et al. 2004). Os EPS também contribuem para a estabilidade mecânica, permitindo ao biofilme suportar cisalhamento de considerável força e que bactérias de vida livre possam se aderir e colonizar superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam (Costerton et al., 1999; Sutherland, 2001). Membranas de células EPS também proporcionam proteção contra stress ambiental e devido à natureza iônica das cápsulas, podem ajudar a acumular minerais e nutrientes perto de bactérias (Weiner et al., 1995).

Os numerosos estudos sobre o controle genético da produção de biofilme bacteriano têm levado a considerar muito complexa a expressão fenotípica de formação de biofilme. Esta complexidade é em parte devido a uma multiplicidade de fatores que contribuem para a matriz extracelular do biofilme, variando com as espécies bacterianas (Houston et al., 2011). Portanto uma série de estímulos ambientais e em relação à densidade bacteriana é detectada pelas células dos microrganismos para a expressão fenotípica da formação de biofilme (Arciola et al., 2015).

Na medicina humana os estudos já foram além da procura de combinações de antibióticos convencionais para erradicar as bactérias produtoras do biofilme, a atenção crescente está sendo dada para identificar novas substâncias antibiofilme. Existe um grande interesse em contrariar o biomaterial associado ao biofilme, com a utilização de compostos que variam de extrato de plantas, peptídeos a moléculas de microrganismos sintéticos (Arciola et al., 2015). A intenção tornou-se não apenas de tratamento, mas também de prevenção do biofilme e segundo Campoccia et al. (2013) esse objetivo pode ser alcançado através dos mecanismos moleculares de produção do biofilme que é controlado pelo desenvolvimento de biomaterial antibiofilme na superfícies. Assim a abordagem multidisciplinar para o tratamento e controle de biofilmes tem resultado na valorização crescente do papel que ele desempenha na saúde.

## **2.5. Uso de fitoterápicos**

Fitoterápicos é a denominação de produtos de plantas com ação biológica favorável à manutenção da sanidade ou inibição e eliminação de condições desfavoráveis à saúde do organismo (Kijlstra e Eijck, 2006). De acordo com a ANVISA, através da RDC nº 14 de 31/03/2010 (Brasil, 2010), é toda espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada como propósito terapêutico. Plantas com características medicinais são utilizadas em muitas culturas a milhares de anos para diferentes fins. Estima-se que no mercado mundial, cerca de 50% das plantas são usadas na alimentação, 25% em cosméticos, 20% pela indústria farmacêutica e 5% em outras atividades (Embrapa, 2011; Silva, 2012).

Os óleos essenciais, óleos derivados, extratos alcóolicos, extratos aquosos, dentre outros, que possuem um ou mais substâncias produzidas pelas plantas e que possuem atividade bioquímica de interesse sanitário, nutricional ou medicinal apresentam-se como propósito fitoterápico (Kijlstra e Eijck, 2006).

No que diz ao uso com fins terapêuticos de plantas em animais, Oliveira et al. (2009) entrevistaram tratadores e gerentes de propriedades rurais em uma feira de animais na cidade de Itapetinga – Goiás e identificaram que 59,3% utilizam plantas medicinais para tratar enfermidades nos animais. De acordo com Santos e Alves (2012), segundo o levantamento bibliográfico realizado, observaram que entre trinta espécies de plantas estudadas, onze apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro*.

Os fitoterápicos, em geral, possuem uma característica em comum que é a presença de compostos aromáticos e presença na estrutura química de anéis de benzeno, o que confere à planta e aos extratos odores característicos, como os presentes no alho, óleo de cravo, canela e tantas outras, cuja descoberta se deve ao saber popular, que com o tempo foi descobrindo e agregando estas plantas medicinais como temperos e especiarias, sem o devido conhecimento científico, que foi sendo pesquisado ao longo dos anos (Peixoto e Caetano, 2005).

Os produtos naturais derivados de plantas medicinais têm provado ser uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais têm sido a base para o desenvolvimento de novas substâncias químicas e de produtos farmacêuticos. Estas plantas já estão sendo introduzidas nas propriedades agrícolas, como alternativa para o controle de pragas e parasitas, uma vez que em sua maioria são biodegradáveis e de baixa ou nenhuma toxicidade (Kulkarni et al., 2013; Palombo, 2009 e Corrêa e Salgado, 2011).

Os óleos essenciais de plantas, por exemplo, (mistura complexa de diferentes compostos aromáticos) estão entre os principais compostos naturais a serem estudada em peixes, pela sua vasta atividade antimicrobiana (Lang e Buchbauer, 2012).

Muitos dos produtos naturais derivados de plantas apresentam efeito citotóxico, caracterizado por serem lipofílicos, desta forma, eles ultrapassam a parede celular e membrana citoplasmática, podendo afetar a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídio, causando a permeabilização da célula. Em bactérias, a permeabilização das membranas está associada à perda de íons e de redução do potencial de membrana, colapso da bomba de próton e ao esgotamento do pool de ATP (Bakkali et al., 2008).

### **2.5.1. Gênero *Hymenaea***

Caesalpinioideae é a subfamília onde encontramos 64 diferentes gêneros e 790 espécies nativas, entre árvores, arbusto e lianas (Barroso, 1991; Lewis, 2005). Entre os seus gêneros está o *Hymenaea*, considerado predominantemente neotropical e constituído por um total de 16 espécies, onde 13 são encontradas no Brasil (Kodama et al., 2007), ocorrendo com maior frequência na Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pantanal (Ribeiro, 2010).

Dentre as espécies deste gênero de maior importância econômica e medicinal estão a *Hymenaea courbaril*, *Hymenaea stigonocarpa* e *Hymenaea martiana*, encontradas principalmente em vegetação de cerrado (Judd et al., 2009).

A *Hymenaea*, popularmente conhecida como “jatobá”, são árvores de troncos retos e cilíndricos, de súber liso e de coloração cinza. As folhas são compostas, bifolioladas, de filotaxia alterna com estipulas e pecíolo livre do lado interno. A floração e a frutificação tem início entre oito e doze anos de idade da planta, e não são necessariamente anuais. No Brasil, florescem durante os meses de dezembro a fevereiro e os frutos amadurecem entre os meses de agosto e setembro (Barroso, 1991).

O perfil fitoquímico da casca do caule de *H. stigonocarpa* mostrou a presença de flavonóides e taninos condensados no extrato etanólico, os flavonoides possuem funções antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, dentre outros, e os taninos, também encontrado no extrato, possui função adstringente, cicatrizante e anti-séptico (Dimech et al., 2013), no súber observou-se a presença de amidos, açúcares, terpenos e taninos e terpenos em suas folhas (Pinto et al. 2000 e Lorenzi e Matos, 2002). Na *H. courbaril* pode-se notar também a presença de flavonóides e ácido oleanólico (Rossi, 2008, Bezerra, 2013 e Cipriano et al., 2014).

Essas espécies citadas do gênero *Hymenaea* já são utilizadas no tratamento de processos inflamatórios e infecções bacterianas a muito tempo por populações antigas (Agra et al., 2007). Sá et al. (2011) ao realizarem ensaios de atividade antimicrobiana com uma variada gama de espécimes de plantas da caatinga, destaca que houve atividade do extrato etanólico bruto, do gênero *Hymenaea* diante do desafio em bactérias gram positivas e gram negativas.

Entretanto a maioria dos estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos de plantas têm sido restritas a análise da sua atividade bacteriostática e propriedades bactericidas *in vitro* (Peixoto et al., 2009, Marino et al., 2010, Lima et al., 2012 e Mendonça et al., 2014). Ainda sendo um desafio a identificação e o estabelecimento dos efeitos exercidos pelos compostos ativos presentes nessas plantas sobre o organismo animal, e de que forma realmente agem (Rizzo et al., 2010, Peixoto et al., 2015 e Silva et al., 2012).

### **2.5.1.1. *Hymenaea martiana***

A espécie *H. martiana*, conhecida popularmente como jatobé-vermelho, encontra-se distribuída por algumas regiões do Brasil, podendo ser encontrada com mais facilidade nos cerrados de Minas Gerais, Bahia, Goiás, Tocantins e na floresta Amazônica (Lorenzi, 2005).

É uma planta de grande valor econômico, sendo a sua madeira utilizada para a construção civil e naval. Além disso, pode ser empregada na arborização urbana e em programas de recuperação de áreas naturais degradadas (Lorenzi, 2005; Pestana, 2010). Estudos prévios têm demonstrado atividades anestésica, analgésica e anti-inflamatória relacionadas com os extratos do caule desta planta que é utilizada no tratamento de diversas enfermidades, em que o súber do seu caule, na forma de xarope e chá, são utilizados no tratamento de problemas respiratórios, inflamações, dores no estômago, no peito, e na coluna, enquanto a resina é utilizada como cicatrizante. Há relatos ainda de que o extrato hidroalcolico pode ser usado no tratamento de inflamações e de reumatismo (Silva et al., 2012; Yunes e Carneiro, 2012).

Como constituintes da casca da *H. martiana* Hayne, encontramos derivados antracênicos, as naftoquinonas e os flavonóides que se apresentam como produtos de composição dominante na planta (Braga et al. 2007, Zampini et al. 2009 e Peixoto et al. 2015) .

Em toda cadeia aquícola, extratos de plantas estão sendo consideradas terapias alternativas para infestações parasitárias, para diminuir o estresse nos transportes dos animais, para aumentar a atividade da lisozima, estimuladores de crescimento e ganho de peso, além de aumentar a atividade fagocítica e um ponto importante para o desenvolvimento dos cultivos que é a ação bactericida (Zhang et al., 2013; Kumar et al., 2013; Guo et al., 2015; Christyapita et al., 2007; Cao et al., 2014).

A substituição dos antimicrobianos atuais por produtos fitoterápicos na aquicultura não é utopia, pois diversas plantas medicinais apresentaram atividade contra importantes bactérias patogênicas de peixes, como *A. hydrophila* (Muniruzzaman e Chowdhury, 2008; Harikrishnan et al., 2009; Harikrishnan et al., 2010c), *S. iniae* (Abutbul et al., 2004; Zilberget et al., 2010), *Streptococcus agalactiae* (Zilberget et al., 2010), *Flavobacterium columnare* (Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn, 2010), *Pseudomonas fluorescens* e *Edwardsiella tarda* (Muniruzzaman e Chowdhury, 2008). A Tabela 1 mostra

uma revisão dos principais fitoterápicos utilizados no tratamento de bacterioses de peixes. (Ushimaru et al., 2012; Dal-Pozzo et al., 2011).

Tabela 1: Revisão dos principais fitoterápicos utilizados no tratamento de bacterioses de peixes

.Bactéria	Hospedeiro	Fitoterápicos		Tratamento mais eficaz			Resultados	Autores
		Tipo	Planta	Via	Período	Concentração		
<i>A. hydrophila</i>	<i>Channa punctatus</i>	Extrato acetato etílico	<i>Solanum nigrum</i>	Água	10min/dia por 30 dias	1g/L	Recuperação das lesões. Potencial tratamento	Rajendiran et al. (2008)
<i>A. hydrophila</i>	<i>Carassius auratus</i>	Extrato etanólico	<i>Azadirachta indica</i> + <i>Cucuma longa</i> + <i>Ocimum sanctum</i>	Administração oral	30 dias	2,5g/Kg	0% de mortalidade dos peixes tratados	Harikrishnan et al. (2009)
<i>A. hydrophila</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Extrato aquoso	<i>Azadirachta indica</i> + <i>Cucuma longa</i> + <i>Ocimum sanctum</i>	Administração oral	30 dias	0,1% em 2% PV	50% de mortalidade e 85% grupo controle	Harikrishnan et al. (2010)
<i>A. hydrophila</i>	<i>Carassius auratus</i>	Concocção	<i>Azadirachta indica</i> + <i>Cucuma longa</i> + <i>Ocimum sanctum</i>	Água	5 min/dia por 45 dias	1%	6,7% de mortalidade e grupo controle 33,3%	Harikrishnan et al. (2010)
<i>A. hydrophila</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Barbodes goniontus</i>	Extrato do bulbo	<i>Allium sativum</i>	Administração oral	10 dias SID	40% em 3% PV	100% recuperação ( <i>A. hydrophila</i> ) e 90% recuperação ( <i>P. fluorescens</i> )	Muniruzzaman e Chowdhury (2008)
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Decocção	<i>Calotropis gigantea</i>	Administração oral	10 dias SID	62,5% em 3% PV	96,67% dos peixes doentes se recuperaram	Muniruzzaman e Chowdhury (2008)
<i>Flavobacterium columnare</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Extrato aquoso	<i>Centella asiática</i>	Água	Único banho, 2 dias após desafio	100mg/L	0% de mortalidade dos peixes tratados	Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2010)

## 2.6. Metodologias: modelo *ex vivo*

O desenvolvimento e a utilização de metodologias alternativas aos estudos realizados com animais de laboratório é meta de longa data dentro da comunidade científica. Em 1876, na Grã-Bretanha, foi desenvolvida a primeira legislação especificamente para regulamentar a utilização de animais em experimentos (Stephens *et al.*, 2001). Porém, foi em 1954 que a Federação das Universidades para o Bem - estar Animal (*The Universities Federation for Animal Welfare – UFAW's*), elaborou um projeto de redução, refinamento e substituição (3Rs) do uso de animais de laboratório em experimentos científicos (Stephens *et al.*, 2001; Meyer, 2003; Stokes, 2002; Russel, 1992; Burch, 1992; Balls, 2000; Stephens *et al.*, 2001; Zurlo, 2002; Spielmann, 2002).

O programa 3Rs é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1) redução (*Reduction*), 2) refinamento (*Refinement*) e 3) substituição (*Replacement*), que de forma resumida significam a redução do número de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos, no sentido de reduzir o sofrimento ao mínimo possível, e a busca de métodos alternativos que, por fim, substituam os testes *in vivo*. Os dois primeiros representam os objetivos a curto-prazo e o último, a meta máxima a ser alcançada (Dipasquale, 2001; Hayes, 2001; Three, 2000). Segundo Cazarin *et al.* (2004) além dos objetivos de curto e longo prazo, existe um processo complexo que abrange desde o desenvolvimento da metodologia até sua aceitação e adoção por diversas organizações

Em uma última estimativa oficial dos Estados Unidos, realizada há mais de 15 anos, revelou a utilização de cerca de 20 milhões de animais (Stephens *et al.*, 2001). Esse uso disseminado de animais na pesquisa tem sido o grande motivo para a retomada dessa discussão, principalmente de caráter ético, em função do grande número de animais requerido e do sofrimento causado durante alguns tipos de experimento (White, 2001; Meyer, 2003). Por esta razão, a reavaliação da utilização de animais nos experimentos é tendência mundial, concretizada a partir da fundação de diversas Instituições, que objetivam desenvolver e validar novos métodos, e da implementação regulatória de testes alternativos em diversos países, a fim de legalizar e harmonizar o uso dos mesmos (Schechtman, 2002; Russel; Burch, 1992; Balls, 1994).

Em geral, o uso de animais em procedimentos científicos é voltado para o diagnóstico (<5%), para a educação, principalmente nas Universidades, incluindo a dissecação animal (25%), para o desenvolvimento e para os testes de toxicidade de medicamentos e de produtos biológicos (30 a 40%) e de novos produtos (10%) (Humane et al., 2003).

Pesquisas atuais sobre infecções de feridas humanas são conduzidas principalmente com modelos animais vivos, segundo Zhu et al. (2017) transferir essa metodologia para modelos *ex vivo* de peles humanas descartadas em cirurgias estéticas seria uma valiosa ferramenta para elucidar os mecanismos de infecção de feridas em geral, apresentando um intervalo interessante entre a possibilidade de modelos animais clássicos, *in vivo*, e as tentativas de criar pele sintética, *in vitro*, além de diminuir substancialmente o uso de animais nessas pesquisas. Schaudinn et al. (2017) cita que toda essa discussão ainda se torna mais relevante quando consideramos esse modelo, *ex vivo*, mais ético.

Pilecco et al. (2016) ressaltaram no objetivo a relevância de modelos *ex vivo* para estudos ortopédicos veterinários, colocando em prática novas técnicas ou aperfeiçoando já existentes e contribuindo, assim, para a evolução científica nessa área. Schaudinn et al. (2017) observaram que uso de modelos *ex vivo* é capaz de complementar atividades de pesquisa, tornando-se de suma importância, principalmente no âmbito evolutivo do setor clínico-cirúrgico.

Em relação aos estudos toxicológicos em animais, o programa 3Rs não é apenas uma abordagem atual, mas um desafio para se pensar a ciência de forma consciente em relação ao sacrifício desses animais para se obter resultados a todo custo (Cazarin et al., 2004).

A preocupação ética atual para utilização destes modelos é justificável, uma vez que, progressivamente, tem-se questionado o uso desnecessário de animais em experimentação científica. Os modelos *ex vivo* são alternativa para alguns estudos específicos ou irão complementar estudos científicos realizados em um número menor de animais vivos (Barman et al., 2011 e Pore et al., 2011). Inúmeros estudos que utilizam esses modelos são encontrados na bibliografia, tanto na medicina como na veterinária. Com base na premissa de que o treinamento é responsável pelas técnicas que são acuradas a cada dia, a utilização de modelos de animais *ex vivo* mostra-se promissora também para uma nova abordagem no campo didático e educacional, na qual futuros médicos

veterinários podem adquirir experiência e habilidade suficiente para o trabalho com animais *in vivo* (Pilecco et al., 2016).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

Testar a ação do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* através de modelos *in vitro* e *ex vivo*, sobre fatores de virulência, produzidos por *Aeromonas* spp. isoladas de *Oreochromis niloticus* cultivadas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana*;
- Quantificar a formação de biofilme nos isolados de *Aeromonas* spp.
- Analisar quanto ao potencial genético dos isolados para cinco genes de virulência;
- Verificar a ação do EEB frente à formação e consolidação de biofilme produzido pelos isolados de *Aeromonas* spp.;
- Testar se há produção de cápsulas pelos isolados;
- Avaliar a ação do EEB na motilidade dos isolados;
- Analisar a ação do EEB frente à fatores como aderência e fixação de *Aeromonas* spp. e toxicidade do extrato em epitélio de tilápia.

### 4. Referências

ABREU, RUAN E. F.; MAGALHÃES, THAÍS C; SOUZA, RENILDE C; OLIVEIRA, SAMIRA TL; IBELLI, ADRIANA MG; DEMARQUI, FÁBIO N; GOUVEIA, JOÃO

JS; COSTA, MATEUS M; GOUVEIA, GISELE V. Environmental factors on virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture International JCR**, 2017.

ABRAHAM, T.J. (2011) Food safety hazards related to emerging antibiotic resistant bacteria in cultured freshwater fishes of Kolkata, India. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 3(1):69-72.

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. (2007) Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacog.*, 17: p. 114-140.

AGUILERA-ARREOLA M.G., HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ C., ZÚÑIGA G., FIGUERAS M.J., GARDUÑO R.A. & CASTRO-ESCARPULLI G. 2007. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *A. veronii* and *A. hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: A comparative study. **Can. J. Microbiol.** 53:877-887.

ALBERT, M. J.; ANSARUZZAMAN, M.; TALUKDER, K. A.; CHOPRA, A. K.; KUHN, I.; FARUQUE, A. S. G.; ISLAM, M. S., SACK, R. B.; MOLBY, R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* sp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p. 3785-3790, 2000.

ALEIXO, A. A.; CAMARGOS, V. N.; ANDRADE, A. C. dos S. P.; SANTOS, M.; CARVALHO, R. S.; MIRANDA, V.C.; HERRERA, K.M.S.; MAGALHÃES, J. T.; LIMA, L.A.R.S.; FERREIRA, J. M. S. Propriedades antibióticas dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* E *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), frente ao isolado clínico meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2, p. 85-88, 2013.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J.W.(2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. [Biomaterials.](#), 33(26):5967-5982.

ASSERIN J, LATI. E, SHIOYA T, B, PRAWITT J. The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an

ex vivo model and randomized, placebo-controlled clinical trials. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 14, 291—301. 2015.

AYALA MD, I ABDEL, M SANTAELLA, C MARTÍNEZ, MJ PERIAGO, F GIL, A BLANCO, O ALBORS. 2010. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. **WT-Food Science and Technology** 43, 465-475.

BALLS, M.; VAN ZELLER, A.-M; HALDER, M.,eds. *Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation*. **Amsterdam: Elsevier**, 2000. 1795 p.

BARMAN S, SAHA DR, RAMAMURTHY T, KOLEY H (2011) Development of a new guinea-pig model of shigellosis. **FEMS Immunol Med Microbiol** 62: 304–314.

BARROS SB & DAVINO SC. Avaliação da toxicidade. In: Oga S, Camargo MMA & Batistuzzo JAO. (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BASSON A, FLEMMING LA, CHENIA HY (2007) Evaluation of adherence hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial Ecol* 55:1-14. Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol* 147:3-9.

BAYLES, K.W. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5; p. 721-726, 2007.

BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; BUJÁN, N.; ROMALDE, J.L. & FIGUERAS, M.J. (2010). Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Systematic and Applied Microbiology** 33, pp. 149-153.

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

BELÉM-COSTA, A. E CYRINO, J. E. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis*

*niloticus* (Linnaeus, 1758) Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.),v.63, n.3, p.281-284, May/June 2006.

BEN-JACOB E. Bacterial Complexity: More Is Different on All Levels. Systems Biology, pg.25-35, 2009.

BEZERRA, G.P. (2013) Estudo farmacocimico bioquímico guiado pela atividade miorelaxante do extrato etanólico das cascas e do caula da *Hymenaea coubaril* L. (jatobá). Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de pós graduação em ciências farmacêuticas da Universidade federal do ceara, Fortaleza.

BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 387, p. 409-414, 2007.

BRASIL. Ministério da Saude. Resolução nº14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário oficial da União, Brasília**, 29 março de 2010.

BRASIL. 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 126p.

BRAUN, P.; SUTHERLAND, J. P. Predictive modeling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of selected *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas hydrophila*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.125, p. 257-266, 2005.

BURRIDGE L, WEIS JS, CABELLO F, PIZARRO J, BOSTICK K. 2010. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306(1), 7-23.

CAO, H., OU, R., LI, G., YANG, X., ZHENG, W., LU, L., 2014. *Saprolegnia australis* RF Elliott 1968 infection in Prussian carp *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) eggs and its control with herb extracts. *Journal of Applied Ichthyology* 30, 145-150.

CAZARIN K. C. C, CORRÊA C. L., ZAMBRONE F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 40, n. 3, jul./set., 2004

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders. *International Dairy Journal*, Amsterdam, v.7, p.255-275, 2003.

CHRISTYBAPITA, D., DIVYAGNANESWARI, M. & MICHAEL, R.D. 2007. Oral administration of *Eclipta albaleaf* aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish & shellfish immunology*,23, 840-852.

CIPRIANO, J.; MARTINS, L.; DEUS, M. S. M.; PERON, A. P. (2014) O Gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. *Caderno De Pesquisa. Série Biologia*, 26 (2), p.41-51.

CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; TREVISAN, R.M.S. Avaliação do risco. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 1.6. p. 69-76.

CORREA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. (2011) Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Rev. Bras. de Plantas Medicinai*s, Botucatu, v.13, p.500-506.

COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. *Scientific American*, v. 238, p. 86-95, 1978.

\_\_\_\_\_ et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, p. 435-464, 1987.

COELHO, L.R. et al. agr RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, v. 154, p. 3480-3490, 2008.

COSTA M.M., DRESCHER G., MABONI F., MABONI F., WEBER S., SCHRANK A., VAINSTEIN M.H., SCHRANK I. & VARGAS A.C. (2010). Virulence factors,

antimicrobial resistance and plasmid content of clinical and environmental *Escheirichiacoli* swine isolates. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62:30-36.

CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p.343- 383, 2004.

DAVIES, D.G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, v. 280, p. 295-298, 1998.

DIMECH G.S., SOARES L.A.L., FERREIRA M.A., OLIVEIRA A.G.V., CARVALHO M.C. & XIMENES, E.A., Phytochemical And Antibacterial Investigations Of The Extracts And Fractions From The Stem Bark Of *Hymenaea Stigonocarpa* Mart. Ex Hayne And Effect On Ultrastructure Of *Staphylococcus Aureus* Induced By Hydroalcoholic Extract. *The Scientific World Journal*, pg 1-8, 2013.

DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A. W. *Principles and methods of toxicology*. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 18, p. 853-916.

DONE, H. Y., HALDEN, R. U., 2015. Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. *Journal of hazardous materials* 282, 10-17.

DORMAN, H. J. D. E DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, V. 88, N. 2, pg 308–316, 2000.

DUNNE JR., W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, p. 155-166, 2002.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 2016. *in press*.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. **Documentos, Embrapa Agroindústria tropical**, 2011.

EPA, Environmental Protection Agency. 2006. Aeromonas: human health criteria document. Washington, 2006.

FAO - Food Agriculture Organization of the United Nations. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Disponível em: [www.fao.org/3/a-i3720e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf)

FIGUEIREDO, C. A. Jr.; VALENTE, A. S. V. Jr. Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual. In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL**, XLVI, 2008, Rio Branco. Anais... Rio Branco: SOBER, 2008.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologia aplicada em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**.37, suplemento especial, 08-14, 2008.

FITZSIMMONS, K.; MARTINEZ-GARCIA, R.; GONZALES-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In: **International Symposium in Tilapia in Aquaculture**, 9th, 2011, China. Proceedings... China: Shanghai Ocean University, 2011.

FURUYA, W.M.F. 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias, GFM. 100.

GARCIA, F., KIMPARA, J., VALENTI, W. & AMBROSIO, L. 2014. Emergency assessment of tilapia cage farming in a hydroelectric reservoir. *Ecological Engineering*, 68, 72-79.

GARCIA, F., ROMERA, D.M., GOZI, K.S., ONAKA, E.M., FONSECA, F.S., SCHALCH, S.H., CANDEIRA, P.G., GUERRA, L.O., CARMO, F.J. & CARNEIRO, D.J. 2013. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. *Aquaculture*, 410, 51-56.

GARCIA, F., KIMPARA, J., VALENTI, W., AMBROSIO, L., 2014. Emergency assessment of tilapia cage farming in a hydroelectric reservoir. *Ecological Engineering* 68, 72-79.

GARCIA-LÓPEZ, M. L.; SANTOS, J. A.; OTERO A. M. (2004). Aeromonas spp. Food Info Online Features, United King: IFIS Publishin. Disponível (online): <http://WWW.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/13366> (25 de setembro).

GOWDA TANUJA, K. G. M.; REDDY VISHWANATHA, R. A. P.; DEVLEESSCHAUWER BRECHT, Z. N. N.; CHAUDHARI SANDEEP, P.; KHAN WAQAR, A.; SHINDE SHILPA, V. et al. Isolation and Seroprevalence of *Aeromonas* spp. among common food animals slaughtered in Nagpur, Central India. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 12, n. 7, p. 1–5, 2015. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2014.1922>

GUO, J., KUO, C., HONG, J., CHOU, R., LEE, Y. & CHEN, T. 2015. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in Cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 435, 111-115.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 95- 108, 2004.

\_\_\_\_\_; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology*, v. 13, p. 7-10, 2005.

HEUER OE, KRUSE H, GRAVE K, COLLIGNON P, KARUNASAGAR I, ANGULO FJ. 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Food Saf*, 29, 1248–1253

HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; PICCOLI, R. H.; LOGATO, P. V. R.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.6, p.1211-1217, 2006.

HODGKINSON, J.T.; WELCH, M.; SPRING, D.R. Learning the language of bacteria. *ACS Chemical Biology*, v. 2, p. 715-717, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Produção da pecuária municipal 2013. 41.

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, p. 35–73, 2010.

JENSEN, F., NIELSEN, M. & NIELSEN, R. 2014. Increased competition for aquaculture from fisheries: Does improved fisheries management limit aquaculture growth? *Fisheries Research*, 159, 25-33.

JÍMENEZ, R. Enfermedades de tilapia en cultivo, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, 108pg., 2007

JINGJING, S., ZHANG, X., GAO, X., JIAN, Q., WEN, Y. AND LIN, L. Characterization of Virulence Properties of *Aeromonas veronii* isolated from diseased Gibel Carp (*Carassius gibelio*). *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17, 496;

KIJLSTRA, A. E EIJCK, I.A.J.M. Animal health in organic livestock production systems: a review, *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, V. 54, N. 1, pg. 77-94, 2006.

KROVACEC, K., PASQUALE, V., BALODA, S. B., SOPRANO, V., CONTE, M., DUMONTET, S. Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from marine environment and human diarrhoeal cases in south Italy. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, n.60, p. 1379-1382,1994.

KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial, 316p, 2011.

KUBITZA, F. Tilápia na bola de cristal. *Panorama da Aquicultura* vol. 17, nº 99, janeiro/ fevereiro 2007.

KULKARNI RR, PAWAR PV, JOSEPH MP, AKULWAD AK, SEN A, JOSHI SP. 2013. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfttephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J Pest Sci*, 86(4), 713-718.

KUMAR, S., RAMAN, R., PANDEY, P., MOHANTY, S., KUMAR, A. & KUMAR, K. 2013. Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 34, 564-573.

LEIRA, M. H. et al., As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura, Nutri-time, V. 14, N.2, 2017.

LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. Handbook of Experimental Pharmacology, v. 211, p. 121-133, 2012.

LI J., NI X.D., LIU Y.J. & LU C.P. 2011. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. J. Appl. Microbiol. 110 (3):823-830.

LINHARES, L.A.; XIMENES, E.C.P.A. (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne frente a *Staphylococcus aureus* multirresistente. In: **XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFPE**, 2010, Recife. XVII Conic UFPE, 2010.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 2, p. 1-11, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. (2002) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LOVE DC, RODMAN S, NEFF RA, NACHMAN KE. 2011. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. Environ Sci Technol, 45 (17), 7232–7240.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Instituto Plantarum de estudo da flora LTDA: São Paulo, 2002. 512p.

MADSEN, J.S. et al. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 65, p. 183-195, 2012.

MANSOUR, A. T. E ESTEBAN, M. A. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Fish & Shellfish Immunology, V. 64, pg. 202-209, 2017

MARTINS, C. V.; VAZ, S. K. Aspectos sanitários de pescados comercializados em pesque pagues de Toledo- Pr. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, n. 16, p. 51-56, 2002.

MERINO, S., RUBIRES, X., AGUILAR, A. AND TOMÁS, J.M. (1997) The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* sero group O:34 strains. FEMS Microbiol. Lett. 151, 213 – 217

MERINO N., TOLEDO-ARANA A., VERGARA-IRIGARAY M., VALLE J., SOLANO C., CALVO E., LOPEZ J.A., FOSTER T.J., PENADÉS J.R. & LASA I. 2009. Proteína A- Mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 191(3):832-843.

MILLEZI, F. M., PEREIRA, M. O., BATISTA, N. N., CAMARGOS N., AUAD I., CARDOSO, M. D. G. AND PICCOLI, R. H. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. Journal of Food Safety, 32, 351–359, 2012.

**MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA.** 2014. Potencial brasileiro. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>. Acesso em: 09 de agosto de 2015.

MONTERREY-QUINTERO, E. S. e SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa agropecuária brasileira.** V.35, N.1, pg. 179-189, 2000.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleostéos em piscicultura intensiva. In: POSSEBON, et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo: TecArt, 2004. 533p.

NAMDARI, H.; BOTTONE, E. J. Microbiology evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric pathogen. **Journal Clinical Microbiology,** Washington, n. 28, p. 837-840, 1990.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology,* v. 30, p. 295-304, 1998.

PALOMBO, E.A. (2009) Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2009, 15p.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3.ed. Maringá: Eduem, 2008. 311p.

PAVITHRA, D.; DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. *Biomedical Materials*, v. 3, p. 1-13, 2008.

PEATMAN, E. et al. Mechanisms of pathogen virulence and host susceptibility in virulent *Aeromonas hydrophila* infections of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Aquaculture*, V. 482, pg 1-8, 2018.

PEIXOTO, R.M. Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos agentes antimicrobianos e extratos de plantas. **Dissertação (mestrado)**, Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina, PE. 129p. 2009.

PENDUKA, D. In-vitro anti-vibrio activities of crude extracts of *Garcinia kola* seeds. 2002. 117f. **Dissertação (Mestrado em Ciência Microbiológica)**. Faculty of Science and Agriculture, University of Fort Hare, Alice, 2011.

PINTO, C.N.; DANTAS, A.P.; MOURA, KCG, EMERY, F.S.; POLEQUEVITCH, P.F., PINTO M.C.; DE CASTRO, S.L.; PINTO, A.V. (2000) Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, 50, p.11-20.

PORE D, MAHATA N, PAL A, CHAKRABARTI MK (2011) Outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella flexneri* 2a, induces protective immune response in a mouse model. **PLoS One** 6: e22663.

POZO, J.L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 82, p. 204-209, 2007.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F.H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.81, p. 261-266, 2003.

RASMUSSEN-IVEY et al. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification, *Frontiers in Microbiology*, V.1, 2016.

RENO, P. Factors involved in the dissemination of disease in fish populations. *Journal of aquatic animal health*, V. 10 pg. 160-171, 1998.

RIBEIRO, R. D. (2010) Hymenaea. In: lista de espécies da flora do brasil. jardim botânico do rio de janeiro. Disponível em <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/fb083198>> Acesso em: 20 dez. 2015

RICO A, PHU TM, SATAPORNVANIT K, MIN J, SHAHABUDDIN AM, HENRIKSSON PJ, MURRAY FJ, LITTLE DC, DALSGAARD A, VAN DEN BRINK PJ. 2013. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412, 231-243.

ROMERO, A. ET AL., The Animal Model Determines the Results of *Aeromonas* Virulence Factors, *Front. Microbiol.* V. 7, 2016.

ROSSI, T. Hymenaea Coubaril Var. Stignocarpa (Jatobá). (2008) Disponível em:<<Http://Www.Ipef.Br/Identificacao/Hymenaea.Courbaril.Asp>> Acesso em: 03 nov 2015.

RUTHERFORD, S.T.; BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, p. 1-26, 2012.

SÁ, M.C.A, PEIXOTO, R.M, KREWER, C.C, ALMEIDA, J.R.G.S, VARGAS, A.C, COSTA, M.M. Antimicrobial activity of Caatinga biome ethenolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciência Vetrinária*, V.18, n. 2-3, p. 62-66, 2011.

SANTOS F.G.B. 2010. Caracterização fenotípica e molecular de bactérias com potencial patogênico em pacamã (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877). Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do Sao Francisco, Petrolina, PE. 67p.

SAPKOTA A, SAPKOTA AR, KUCHARSKI M, BURKE J, MCKENZIE S, WALKER P, LAWRENCE R. 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ Int*, 34(8), 1215-1226.

SCHABER, J.A. et al. Pseudomonas aeruginosa forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infection and Immunity*, v. 75, p. 3715-3721, 2007.

SHARMA, S., SACHDEVA, P., VIRDI, J. S., Emerging water-borne pathogens, *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 61, N. 5–6, pg 424–428, 2003.

SCOPEL, M. et al. Dipeptide cis-cyclo(LeucylTyrosyl) produced by sponge associated Penicillium sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic Staphylococcus epidermidis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, p. 624-626, 2013.

SCORVO FILHO, J.D., FRASCÁ-SCORVO, C.M.D., ALVES, J.M.C. & SOUZA, F.R.A.D. 2010.A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. *Revista Brasileira de Zootecnia*.

SEN, K; RODGERS M. Distribution of six virulence factors in Aeromonas species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p.1077- 1086, 2004.

SILVA, M.I.G. ET AL. Bioactivity and potencial therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-árid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.22, n.1, p. 193-207, 2012.

SILVA, M. S.; LEITE, K. R. B.; SABA, M. D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae-Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, 14, p. 673-679, 2012.

SINHA, S.; SHIMADA, T.; RAMAMURTHY, T.; BATTACARYA, S.K.; YAMASAKY, S.; TAKEDA, Y.; NAIR, G.B. Prevalence, serotype distributin, antibiotic susceptibility and genetic profiles os mesophilic Aeromonas species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.53, p. 527 -534, 2004.

SOUZA, de, A. C. M. **Potencial antifúngico de extratos de *Hymenaea martiana***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, 2008.

STEWART, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 292, p. 107-113, 2002.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Review of Microbiology, v. 56, p. 187-209, 2002.

TALL, A.; HERVIO-HEATH, D.; TEILLON, A.; BOISSET-HELBERT, C.; DELESMONT, R.; BODILIS, J.; TOURON-BODILI, A. Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyrH sequencing. Journal of applied microbiology, v. 114, n. 6, p. 1713-1724, 2013.

TAVECHIO WLG, GUIDELLI G, PORTZ L. 2009. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. B Inst Pesca, 35(2), 335 – 341.[em português]  
U.S. Food and Drug Administration. 2012. Letter to Aquaculture Professionals. Disponível em <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/ProductSafetyInformation/ucm324048.htm>. Acessado em 12 de Janeiro de 2014.

TELLI, G. S., RANZANI-PAIVA, M. J. T., DE CARLA DIAS, D., SUSSEL, F. R., ISHIKAWA, C. M., TACHIBANA, L., 2014. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. Fish & shellfish immunology 39, 305-311.

TIAN, P., et al. Concurrent Detection of Human Norovirus and Bacterial Pathogens in Water Samples from an Agricultural Region in Central California Coast, Frontiers of Microbiology, 2017

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 718p.

TRANG, N. T. D., KONNERUP, D. E BRIX, H. Effects of recirculation rates on water quality and *Oreochromis niloticus* growth in aquaponic systems, Aquacultural Engineering Aquacultural Engineering, V. 78, Parte B, pg. 95-104, 2017

TRENTIN, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. Journal of Ethnopharmacology, v. 137, p. 327-335, 2011a.

\_\_\_\_\_ et al. Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 1329-1333, 2011b.

\_\_\_\_\_ et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PLoS One*, v. 8, p. 1-13, 2013.

VALLADÃO, G., GALLANI, S. & PILARSKI, F. 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*.

WHYTE, S. 1975. Distribution, trophic relationships and breeding habits of the fish populations in a tropical lake basin (Lake Bosumtwi-Ghana). *Journal of Zoology*, 177, 25-56.

WILSON et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity, *Postgraduate Medical Journal*, V.78, N.918, 2002.

YUNES, R. A.; CARNEIRO, E. **Identificação de glicosídeos na *Hymenaea martiana* Hayne. Arzeik.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

ZAGO, A.C. Análise parasitológica e microbiológica de Tilápia do Nilo criadas em tanque-rede no reservatório de Água Vermelha – SP e suas inter-relações com as variáveis limnológicas e fase de criação. Botucatu. **Dissertação (mestrado)**, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência. 60p. 2012.

ZIMMER, K.R. et al. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. *Environmental Microbiology*, v. 15, p. 2008-2018, 2013.

ZHANG, Q., XU, D.-H. & KLESIUS, P.H. 2013. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary parasitology*, 198, 45-53.

HENRIKSSON JT, MCDERMOTT AM, BERGMANSON JP. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:3648–3654.

MARQUART ME. Animal models of bacterial keratitis. **J Biomed Biotechnol.** 2011; 2011:680642.

THOMPSON BC, HALLIDAY GM, DAMIAN DL. Nicotinamide enhances repair of arsenic and ultraviolet radiation- induced DNA damage in HaCaT keratinocytes and ex vivo human skin. *PLoS One.* 2015; 10(2): e0117491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117491> PMID: 25658450; PubMed Central PMCID: PMC4319842.

# CAPITULO 1

Artigo 1

**Atividade antibiofilme do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* sobre *Aeromonas* spp. isoladas de *Oreochromis niloticus***

Submetido à Revista: Semina: Ciências Agrárias

Normas: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/index>

**Atividade antibiofilme do extrato etanólico bruto de *Hymenaea martiana* sobre *Aeromonas* spp. isoladas de Tilápia do Nilo**

**Antibiofilm activity of the crude ethanolic extract of *Hymenaea martiana* on *Aeromonas* spp. isolated from Tilápia do Nilo**

**Resumo** - Biofilmes bacterianos são produzidos por diversos micro-organismos, incluindo as bactérias do gênero *Aeromonas* e representa preocupação para a saúde dos cultivos aquáticos tanto pela sua alta capacidade de aderência, colonização, quanto pela infecção em tecidos e a sua resistência aos tratamentos com antimicrobianos convencionais. Objetivou-se testar o efeito antibiofilme, do extrato etanólico bruto (EEB) da folha da *Hymenaea martiana* sobre *Aeromonas* spp. isoladas de *Oreochromis niloticus* cultivados. Foram obtidos 30 isolados de *Aeromonas* spp., que foram submetidos ao teste de vermelho congo e sensibilidade de microdiluição em caldo empregando o extrato etanólico bruto da folha da *H. martiana*. As amostras foram caracterizadas fenotipicamente para formação de biofilme e, bem como a atividade antibiofilme (em formação e após sua consolidação) do extrato. Realizou-se a análise do potencial genético para a produção do biofilme por meio da amplificação do gene *fla* (flagelo polar), por reação em cadeia da polimerase (PCR). Na motilidade, os isolados positivos para presença do gene *fla*, foram analisados frente à ação do extrato em duas concentrações diferentes e produziram zonas de migração significativas. O resultado mediano obtido da CBM foi 781,3µg/mL e todas as amostras foram formadoras de biofilme, sendo 40,3% de forte a moderada, enquanto que no teste do potencial genético à presença do gene *fla* foi de 20%. Mesmo com a fraca associação genotípica observada, foi confirmada bactérias produtoras de biofilme, no qual o extrato pesquisado agiu tanto durante a formação, quanto após o biofilme consolidado.

**Palavra chave:** Antimicrobianos, biofilme bacteriano, fitoterápico e *Oreochromis niloticus*.

**Abstract:** Bacterial biofilm is produced by several microorganisms, including bacteria of the genus *Aeromonas* which represent a concern for the health of aquatic cultures due to their high adhesion capacity, colonization, as well their infection in tissues and their resistance to conventional antimicrobial treatments. This research aimed to test the antibiofilm effect of the crude ethanolic extract (CEE) of the *Hymenaea martiana* leaf on *Aeromonas* spp. isolated from cultivated *Oreochromis niloticus*. Thirty isolates of *Aeromonas* spp. were obtained, which were submitted to the sensitivity test to the crude ethanolic extract of *H. martiana* leaf through the technique of minimum bactericidal concentration (MBC). The samples were characterized phenotypically for biofilm formation and the action of the extract in the biofilm in formation

and after its consolidation. The genetic potential for biofilm production was analyzed through the amplification of the *fla* (polar flagellum) gene through the polymerase chain reaction (PCR). In motile, the positive isolates for the presence of the *fla* gene were analyzed against the action of the extract in two different concentrations and produced significant migration zones. The median result obtained from MBC was 781.3 µg / mL. In the formation, 100% of the biofilm forming samples were 40.3% strong to moderate, while the genetic potential test for the presence of the *fla* gene was 20%. In the comparative analysis of the phenotypic and molecular results there was a weak association observed p value = 0.0265. During the formation of the biofilm by a microorganism, several factors can influence the process, such as temperature, pH and surface material, besides other specific genes. However, the species *Aeromonas* spp. was confirmed as a biofilm producer and potential infectious agent.

**Key words:** Antimicrobials, bacterial biofilm, herbal and *Oreochromis niloticus*.

## INTRODUÇÃO

A maioria dos micro-organismos vive em comunidades celulares, formando associações em diferentes graus de complexidade, aderindo-se a variadas superfícies, geralmente compondo um biofilme, que pode ser formado por populações da mesma espécie ou por múltiplas espécies (GOWDA et al., 2015). A adesão bacteriana pode ser facilitada por apêndices celulares, tais como pili, flagelos e fimbrias, os quais proporcionam motilidade e melhor contato célula-superfície provocando lesões e morte em peixes (ABREU et al., 2017).

Os biofilmes são estruturas onde os micro-organismos estão fortemente aderidos a uma superfície com envolvimento da adesina, exopolissacarídeos e proteínas na agregação de células (ARCIOLA et al., 2012). Esse tipo de organização é bastante vantajoso a todas as bactérias, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (ABRAHAM, 2011). São variados os fatores relacionados com a produção do biofilme, como as características físico-químicas da superfície aderida, ou também a expressão de fatores de virulência por parte das bactérias (DUNNE, 2002). Segundo Wu et al. (2014), a formação do biofilme também está associada a motilidade mediada pela natação-flagelar, esse processo ocorre por instigar a ligação célula-à-superfície desempenhando papel importante na virulência de organismos patogênicos.

O gênero *Aeromonas* está presente entre as bactérias formadoras de biofilme, são gram-negativas pertencentes à família *Aeromonadaceae* e consideradas patógenos emergentes e oportunistas com uma atenção clínica em torno da aquicultura em virtude da sua presença em ambientes aquáticos (WAHLI et al., 2005). Espécies de *aeromonas* estão envolvidas em diversas infecções e surtos de doenças como a *A. veronii* causadora de hemorragia interna em peixes (JINGIING et al., 2016), *A. hydrophila* responsável pela maior mortalidade de peixes,

principalmente nos cultivos intensivos e semi-intensivos e as infecções causadas por *Aeromonas* spp. que aumentam em situação de estresse ou manejo inadequado, mesmo quando diminui a temperatura da água onde são cultivados os peixes (BELÉM-COSTA et al., 2006).

O controle desses patógenos é normalmente realizado através de antibióticos, apresentando resultados insatisfatórios pela preocupação com a resistência bacteriana e os resíduos deixados pelas drogas nos animais destinados à produção de alimentos (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). Usui et al. (2016) sugeriram que a *Aeromonas* spp. representa um marcador eficaz para a vigilância da resistência a antimicrobianos em ambientes aquáticos, correlacionando a presença destes com as concentrações de tetraciclina no ambiente, com às taxas de resistência ao antibiótico e a prevalência de genes de resistência a antimicrobianos nos isolados. Neste contexto, a indústria da aquicultura tem o interesse de substituir os antimicrobianos convencionais por terapias alternativas, utilizando extratos e óleos essenciais de plantas, já adotados em outras culturas, como prática para minimizar a utilização de produtos químicos e promover a sanidade dos cultivos.

O termo fitoterápico está relacionado com toda espécie vegetal, cultivada ou não, que pode ser utilizada como propósito terapêutico. A busca de informações sobre a possibilidade de utilização das plantas e suas partes, tem desempenhado papel fundamental na descoberta de novos produtos (JACOBSON et al., 2005). Alguns autores vêm demonstrando a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de plantas da flora nordestina, dentre diversas espécies estudadas a *Hymenaea martiana*, conhecida popularmente como jatobá, apresenta uma ampla utilização na medicina popular no tratamento de problemas respiratórios e gastrointestinais, sendo relacionada também a ação anti-séptica, depurativa, antiinflamatória, antioxidante e antibacteriana (LORENZI e MATOS., 2002; PEREIRA et al., 2007). Em peixes, as plantas também têm sido utilizadas como imuno estimulantes. Em teste *in vivo*, robalos asiáticos foram desafiados com *A. hydrophila* e alimentados com dietas contendo concentrações diferentes da farinha da folha de *Citrus depressa* apresentaram melhora na imunidade não específica e na resistência à doenças sem influenciar negativamente no crescimento dos peixes (SHIU et al., 2016).

Apesar da aquicultura movimentar milhões por ano e a Tilápia do Nilo ser o terceiro grupo de peixe mais cultivado mundialmente, colocando o Brasil em 6º no *ranking* (KUBITZA, 2007), o meio ainda subaproveita os fitoterápicos, com poucas pesquisas e utilizações empíricas. Com isso objetivou-se verificar a ação antibiofilme do extrato etanólico bruto da *H. martiana* sobre a produção de biofilme de isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de Tilápias.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Local de execução.** O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus Ciências Agrárias, localizado na Fazenda Experimental da

Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, situada na Rodovia BR 407, km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº “C1”, Petrolina-PE.

**Isolados bacterianas.** Foram utilizados 30 isolados da bacterioteca do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos - UFRPE, identificados como pertencentes ao gênero *Aeromonas* spp. baseando-se nas características bioquímicas (Gram, catalase, TSI, SIM, indol, GOF, Vm\Vp, citrato, glicose e fermentação de açúcares) segundo Silva (1996) e Buller (2004). Estes isolados foram oriundos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), cultivadas em tanques e açudes do Agreste e Sertão de Pernambuco.

**Obtenção do extrato etanólico bruto da folha de *H. martiana* (EEB).** A solução estoque foi obtida a partir de 0,25g do extrato bruto da folha diluído em 10 mL de álcool absoluto.

**Produção de biofilme Quantificação:** os isolados de *Aeromonas* spp. foram repicados para tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) e incubados por 24 h a 28° C. Após esse período 195 µl de caldo TSB estéril foi distribuído em placas de microtitulação de 96 poços, em triplicata, acrescido de 5µl do cultivo em TSB, sendo as microplacas incubadas por 24 h a 28° C. Após a incubação o conteúdo da microplaca foi descartado para em seguida realizar a lavagem e coloração com a técnica de violeta de genciana (MERINO et al., 2009). A leitura foi realizada em leitor de ELISA e a absorbância mensurada em filtro 620 nm. Seguindo a descrição de Christensen et al. (1985), a produção de biofilme foi classificada em quatro categorias, para isso, primeiramente foi definido como (densidade óptica) DO de ponto de corte e DOc a média da DO do controle negativo. Em seguida, os isolados foram classificados nas seguintes categorias: não aderentes (-:  $DO \leq DOc$ ), fraca a moderadamente aderentes (+:  $DOc < DO \leq 2X DOc$ ) e fortemente aderente (+:  $2X DOc < DO$ ). **Identificação do gene fla:** O DNA dos isolados de *Aeromonas* spp. foram termo extraídos de acordo com Silva (2011). No preparo da PCR foram empregados: Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 2,6 mM, KCl 50 mM, 0,4 µM de cada dNTP, 0,8 µM de cada *primer*, 2.5 unidades de Taq DNA Polimerase e 10 µl de DNA genômico em um volume final de 25 µl. A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento, a 58°C por 30 segundos, e extensão a 72° C por 30 segundos. Após os 35 ciclos, o produto amplificado foi submetido à extensão final por 10 minutos, em seguida os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, e visualizados sobre iluminação ultravioleta em transluminador (Transiluminator Loccus Biotecnologia).

**Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).** Os 30 isolados de *Aeromonas* spp. foram preparados em solução salina 0,85% com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, desta suspensão foram inoculados 100 µl em tubos contendo 9,9 ml de caldo Mueller-Hinton (MH). 200 µl do caldo MH foi distribuído em placas de

microtitulação de 96 poços em triplicata, acrescido de 200 µl da solução estoque do EEB ao primeiro poço e após homogeneização, transferido para o segundo e assim sucessivamente, obtendo as concentrações 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,3; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL. Foram isolados ainda na mesma placa para cada amostra o controle do álcool, o controle positivo com o isolado bacteriano mais o caldo MH sem o EEB e o poço apenas com o EEB. As placas de microdiluição foram incubadas por 24 h a 28° C. Com a utilização de um replicador, alíquotas foram retiradas das microplacas após a incubação e semeadas em placas de petri contendo ágar MH, seguindo-se de incubação. Definiu-se a CBM com a menor concentração do extrato etanólico capaz de inibir o crescimento do inóculo (CLSI, 2006).

**Verificação da ação do extrato da *H. martiana*.** Biofilme em formação: Para avaliar a ação do extrato com biofilme em formação foram testadas apenas as amostras que obtiveram resultado forte e moderado para a quantificação do biofilme. Foram adicionada 100 µl do EEB em triplicata, nas placas de microtitulação 96 poços utilizando a concentração equivalente à metade do valor da CBM adquirida, em seguida foi acrescido mais 100 µl da suspensão contendo caldo TSB com inóculos incubados por 24 h a 28° C, as microplacas foram incubadas a 28° C durante 24 h. Transcorrido o tempo de incubação as placas foram submetidas à coloração pela técnica de violeta de genciana e lavagem segundo Nostro et al. (2007). A leitura foi efetuada em leitor de ELISA. Biofilme consolidado: Após a realização da metodologia anterior (formação de biofilme) obtida a partir da incubação de 100 µl do inóculo bacteriano em microplacas por 24 h a 28° C, foi utilizado o mesmo material, e realizado três lavagens com H<sub>2</sub>O destilado e autoclavada para remoção de células não aderidas e em seguida acrescido 200 µl da solução do EEB na concentração de 50% CBM. O DO<sub>0h</sub> foi determinado, em leitor de ELISA, imediatamente após a adição do extrato (0h) e após 24 h o DO<sub>24h</sub>. Segundo Nostro et al. (2007), a interferência do extrato no biofilme consolidado foi definida pela equação  $(DO_{0h} MÉDIA) / (DO_{24h} MÉDIA) \times 100 =$  Ensaio de motilidade em placa: O método usado foi descrita por Kuchma et al. (2015), onde foi utilizado um Agar mais fluido no topo das placas com a composição de 3% de Agar, 1% de tripton, 5% de extrato de levedura em pó, 5% de cloreto de sódio e água destilada. Após o preparo do Agar foi adicionado 0,25 µg/mL do EEB na concentração 390,6 µg/mL, em duplicata. No centro da placa foram inoculados isolados “overnight” de aeromonas, em escala de Mac Farland 0,5, positivos para o gene *fla*. As placas foram incubadas a 28° C com leitura em 24 h, 48 h e 72 h. Para as placas controle, não foi adicionado o extrato.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *Aeromonas* spp. pesquisados (30) produziram biofilme em 24h, considerado por Li et al. (2007) tempo médio capaz da *A. spp.* de formar biofilme dentro do intervalo de 24 horas. Dentre os 30 isolados foi testada a força de aderência do biofilme resultando em cinco (16,6%) como forte, nove (30%) como moderada e dezesseis (53,3%) como

fraca aderência. Freimoser et al. (1999) em estudo com bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas*, observaram que a espécie *A. hydrophila* foi a única que classificada como forte formadora de biofilme apresentou alta capacidade de aderência, sendo além desse, Kirov et al. (2004) identificaram uma grande adesão de *A. hydrophila*, a diferentes tipos de células com a formação de seu biofilme.

Jingiing et al. (2016) estudaram em duas estirpes de *A. veronii*, 16 genes de virulência (ompAI, ompAII, laf A, ato, aer, fla, gcat, acg, eprCAI, ela, hly, ahp, lábio, ast, alt, exu) envolvidos na produção de biofilme, sendo detectada a presença em ambas as estirpes de metade dos genes pesquisados incluindo o gene *fla*. Divergindo deste estudo, em que a análise comparativa dos resultados fenotípicos com os moleculares foi de fraca associação, sendo p valor = 0,0265, constatando a independência da formação do biofilme com a presença do gene *fla*, presente em apenas 20% dos isolados, sugerindo a influência de outros fatores como temperatura, pH e material da superfície, além de outros genes que podem estar relacionados com a aderência e motilidade, como relatado por Abreu et al. (2017) ou ainda o gene *laf* citado por Gavín et al. (2003) ao encontrarem em 70% das aeromonas dos isolados de peixe e demonstraram que a presença do gene *fla* aumentou a capacidade de cepas em se aderir e invadir células formando biofilmes *in vitro*.

Dois tipos de flagelos são responsáveis pela motilidade das integrantes do gênero *Aeromonas*: o polar que permite que o micro-organismo nade em ambientes líquidos e o flagelo lateral, capaz de impulsionar a célula aumentando sua adesão (SHIMADA et al., 1985). Merino et al. (1997) demonstraram, que o flagelo polar de *A. hydrophila* é essencial para a invasão de linhas celulares de peixe. No estudo *in vitro* de Rabaan et al. (2001) foi observado que o flagelo polar da *A. caviae* é necessário para a adesão ao epitélio de células humanas.

A atividade antimicrobiana do extrato *Hymenaea martiana* foi observada sobre todos os isolados de *Aeromonas* spp. A menor concentração do extrato capaz de inibir a bactéria foi de 781,3 µg/mL, apresentando também a habilidade de redução na formação ou consolidação de biofilmes (HUSAIN et al., 2015a).

Durante a formação, observou-se que após a adição da concentração sub-inibitória (50% CBM=390,6 µg/mL) do extrato, 84,6% das amostras apresentaram redução na produção do biofilme, contudo, mesmo com esta redução, os isolados foram classificados como fracos produtores de biofilme (aderência).

Quanto à observação do biofilme após sua consolidação, houve uma diminuição em dez (76,9%) dos isolados frente ao extrato, isto provavelmente ocorreu devido a presença de substância bactericida no composto etanólico, como demonstrado por Linhares e Ximenes (2011), ao avaliarem o extrato de *H. stignocarpa* Mart. Ex. Hayne na redução da virulência de *Staphylococcus aureus*, obtiveram boa redução na formação de biofilme. Santos et al. (2008) também verificaram resultados positivos contra *S. aureus* e citaram subclasses de flavonóides

com atividade bacteriostática no extrato da *H. martiana*. Silva et al. (2012) mostraram que o extrato etanólico da *H. martiana*, continha quantidade substancial de compostos com atividade bacteriostática ativa.

Em estudos associados com alguns outros produtos naturais têm sido demonstrado que extratos de plantas com baixa propriedade antimicrobiana também podem ser eficazes contra biofilmes bacterianos (UPADHYAY, 2014). A habilidade de suprimir a produção de biofilme em patógenos é muito importante, pois pode ser alvo de novas terapias sinérgicas, que visem reduzir o uso de drogas antimicrobianas convencionais e desta forma retardar a seleção de micro-organismos resistentes (USUI et al., 2016).

Ponnusamy et al. (2010) isolaram bactérias patogênicas de Tilápias do Nilo doentes e testaram cinco diluentes com o extrato de *Clitori ternatea* que produziram zonas de inibição em dois isolados, com maiores áreas nas amostras de *A. formicans* e o acetato de etila nas *A. formicans* e *A. hydrophila*.

Em estudo utilizando concentração sub-inibitória Husain et al. (2015a) avaliaram o efeito do óleo essencial de hortelã pimenta sobre fatores de virulência e produção de biofilme de *P. aeruginosa* e *A. hydrophila*, destacando a ação antibiofilme do óleo nas concentrações de 0,37; 0,75; 1,5 e 3% que levou a uma redução na formação da matriz exopolissacarídica de 42,7; 61; 73 e 84% respectivamente. No mesmo estudo, foi observada a redução da formação do biofilme das estirpes bacterianas quando cultivadas na presença do mentol (800 µg/ml) em 69,4%.

O extrato da semente do *Trigonella foenum-graceum* na concentração mais elevada de 800 µg/ml também obteve significativa redução na formação do biofilme de 76,9% em estirpes de *A. hydrophila* e *P. aeruginosa*. A cafeína, principal composto da *T. foenum-graceum*, a 200µg/ml levou a uma redução de 64% na formação do biofilme em estirpes de *P. aeruginosa* (HUSAIN et al., 2015b).

No ensaio de motilidade, 100% dos isolados testados produziram zonas de migração independente da concentração do extrato de *H. martiana*. Nas placas controle foram produzidas maiores halos, com uma média de raio de 11 mm, enquanto que a média da zona de migração das demais placas foi de 9 mm e 7 mm para 195,3 µg/mL e 390,6 µg/mL respectivamente.

Com o uso do extrato houve redução da motilidade da bactéria, o que corrobora com os relatos de Rahman et al. (2015) que, em um estudo para detecção do *quorum sensing* e atividade antibiofilme do extrato de *Amomum tsaoko* sobre agentes patogênicos alimentares, observaram que o extrato reduziu a motilidade e zonas de migração, do *S. aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *P. aeruginosa*. Segundo os autores, isso pode ter ocorrido devido ao efeito fitoquímico do extrato em processo relacionado com flagelos, biossíntese de flagelos, rotação, *rafting* e quimiotaxia entre outros. Rahman et al. (2015) explicaram que a motilidade é uma

característica notável e importante para a formação de biopelículas e que esse processo depende de flagelos para a movimentação da bactéria.

Husain et al. (2015b) observaram a ação da cafeína, presente no extrato *T. foenum-graceum*, que inibiu 70% da motilidade da *P. aeruginosa*. Em ensaio de motilidade Jahid et al. (2015) estudaram a movimentação de culturas jovens e velhas de *A. hydrophila*, expostas a diferentes concentrações de salinidade e ambas as cepas mostraram motilidade a 3,0% de NaCl. Tremblay e Deziel (2008) relataram, em ensaio com *P. aeruginosa*, que a migração é influenciada pela temperatura de incubação, concentração de Agar, pH e tempo de secagem sob o fluxo laminar.

Atividades com extratos de plantas apresentam grande potencial para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para tratamento e controle das infecções ocasionadas por diversos patógenos em organismos aquáticos.

## CONCLUSÃO

O extrato bruto da *Hymenaea martiana* tem capacidade de reduzir a motilidade, a produção de biofilme e o biofilme já consolidado de *Aeromonas* spp.

**Agradecimentos.**- Universidade do Vale do São Francisco; Universidade Federal Rural de Pernambuco.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, T. J. Food safety hazards related to emerging antibiotic resistant bacteria in cultured freshwater fishes of Kolkata, India. **Advance Journal of Food Science and Technology**, Taiwan, v. 3, n. 1: p. 69-72, 2011.
- ABREU, RUAN E. F.; MAGALHÃES, THAÍS C; SOUZA, RENILDE C; OLIVEIRA, SAMIRA TL; IBELLI, ADRIANA MG; DEMARQUI, FÁBIO N; GOUVEIA, JOÃO JS; COSTA, MATEUS M; GOUVEIA, GISELE V. Environmental factors on virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture International JCR**, 2017.
- ARCIOLA, C. R. et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, USA, v. 33, n. 26: p. 5967-5982, 2012.
- 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**. Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 281-284, may/june 2006.
- BULLER, N. B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. Cambridge: CAB-Publishing, 2004. 361 p.
- CAHIL, M. M. (1990) Bacterial flora of fishes: a review. **Microbial Ecology**. Washington, DC, v. 19, p. 21-41.

CLSI. **Methods for delution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standards. USA, 2006. Document CLSI M7 – A7.

CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., YOUNGER, J. J., BADDOUR, L. M., BARRETT, F. F., MELTON, D. M., BEACHEV, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence. **Journal of Infectious Diseases**. Oxford. V. 157 n. 1, p. 71-7. Janeiro, 1988

COSTA M. M. et al. Virulence factors, antimicrobial resistance and plasmid content of clinical and environmental *Escheirichiacoli* swine isolates. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 62, p. 30-36, 2010.

DUNNE JÚNIOR, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 15, p. 155-166, 2002.

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

FRANCO, A. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. **Archive Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, Denmark, v. 50, p. 28, 2008.

FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, United States of America, v. 6, p. 199-210, 2008.

FREIMOSER, F. M. et al. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.65, n. 8, p. 3727-3729, 1999.

FUMAGALI, E. et al. Production of plant secondary metabolites in plant cell and tissue culture: the example of *Tabernaemontana* and *Aspidosperma* genera. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GAVÍN, R. et al. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, Berlim, v. 43, p. 383-397, 2002.

GAVÍN, R. et al. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 224, p. 77-83, 2003.

GOWDA, T. K. et al. Isolation and soroprevalence of *Aeromonas* spp. Among common food animals slaughtered in Nagpur, Central India. **Foodborne Pathogens Disease**, United States, v. 12, n. 7, p. 626-630, 2015.

HARRISON, L. L.; TURNER, R. J.; CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 981-994, jul. 2006.

HUSAIN, F. M., AHMAD, I., KHAN, M. S. AND AL-SHABIB. N. A. (2015a). Sub - MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of gram-negative bacteria. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. **Frontiers in Microbiologys**, Oxoford, v. 6, maio. 2015.

HUSAIN, F. M., AHMAD, I., KHAN, M. S. AND AL-SHABIB. N. A. (2015b). *Trigonella foenum-graceum* (Seed) extract interferes with quorum sensing regulated traits and biofilm formation in the strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. **Hindawi Publishing Corporation**, Arábia Saudita, p. 10, janeiro. 2015.

JACOBSON, T. K. B. et al. Influencia de fatores edáficos na produção de fenóis totais etaninos de duas espécies de barbatimão. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v. 35. n. 3, p. 163-169, 2005.

JAHID, I. K. et al. (2015). Effect of salinity and incubation time of planktonic cells on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila*. **Food Microbiology**, United States, v. 49, p. 142/151, 2015.

JINGJING, S. et al. Characterization of Virulence Properties of *Aeromonas veronii* isolated from diseased Gibel Carp (*Carassius gibelio*). **International Journal of Molecular Sciencers**, Suíça, v. 17, p. 496, 2016.

KIROV, S. M. M.; CASTRISIOS, J. G. S. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesions that contribute to biofilm formation on surfaces. **Infection and Immunity**, United States, v. 72, p.1939-1945, 2004.

KUBITZA, F. Tilápia na bola de cristal. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 99, p. 16-23, jan./fev. 2007.

KUCHMA, N. J. D. et al. Cyclic Di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 requires the motab stator. **Journal Bacteriology**, United States, v. 197, n. 3, p. 420-430, 2015.

LI, J. et al. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 110, n. 3, p. 823-830, 2011.

LINHARES, L. A.; XIMENES, E. C. P. A. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne frente a *Staphylococcus aureus* multirresistente. In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Recife: UFPE, p. 26-32, 2010.

LINHARES, L. A.; XIMENES, E. C. P. A. Efeito da concentração subinibitória do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. EX. Hayne sobre os fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Recife: UFPE, p. 54-65, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum de estudo da flora LTDA, 2002. 512 p.

MILLEZI, F. M. et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**, United States, v. 32, p. 351-359, 2012.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J. A.; FOSTER, T. J.; PENADES, J. R.; LASA, I. The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* sero group O:34 strains. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 151, p. 213- 217, 1997.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J. A.; FOSTER, T. J.; PENADES, J. R.; LASA, I. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Oxford v. 191, n. 3, p. 832–843, 2009

NOSTROA.;ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of medical microbiology**. Barcelona, v. 56, p.519-523, 2007.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Maringá: Eduem, 2008. 311 p.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; CAETANO, L. C. Plantas Medicinais: do popular ao científico. EDUFAL, 1ª ed, p. 90, 2005.

PEREIRA, C. K. B., et al. Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá). In: 30ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., Águas de Lindoia, SP, 2007.

PONNUSAMY, S.; GNANARAY, W. E.; ANTONISAMY, M. J.; SELVAKUMAR, V.; NELSON, J. (2010). The effect of leaves extracts of *Clitoria ternatea*Linn against the fish pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Bangladesh, v. 43 n. 6, p. 412-420, 2010.

RABAAN, A. A., I. GRYLLOS, J. M. TOMÁS, AND J. G. SHAW. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to Hep-2 cells. **Infection and Immunity**. Washington, DC v. 69, p. 4257-4267, 2001.

RAHMAN, M. R. T.; LOU, Z.; YU, F.; WANG, P.; WANG, H. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *Amomum tsaoko* (*Amomum tsaoko* *Crevoitet Lemarie*) on food borne pathogens. **Journal of Biological Sciences**, Árabia saudita, v. 30, n. 30,p. 09 - 034, set. 2015.

SÁ, M. C. A. et al. Antimicrobial activity of Caatinga biome ethenolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, BR v. 18, n. 2/3, p. 62-66, 2011.

SANTOS, J. F. L.; AMOROZO, M. C. M.; MING, L. C. Uso de plantas medicinais na comunidade rural da Vargem Grande, município de Natividade da Serra, SP. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, SP, v. 10, n. 3, p. 67-81, 2008.

SANTOS, F. G. B. **Caracterização fenotípica e molecular de bactérias com potencial patogênico em pacamã (*Lophosilurus alexandri* Steindachner, 1877)**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do Sao Francisco, Petrolina, PE.

SCOARIS, D. O. et al. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking waterAntonie van Leeuwenhoek : International Journal of General and Molecular Microbiology. Cidade do Porto, Portugal, v. 93, p. 111-122, 2008.

SHIMADA, T.; SAKAZAKI, R.; SUZUKI, K. Peritrichous flagella in mesophilic strains of aeromonas. Jpn. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, Washington, DC v.38, p. 141-145, 1985.

SHIU, Y. L. et al. (2016). Effects of hiramí lemon, *Citrus depressa* Hayata, leaf meal in diets on the immune response and disease resistance of juvenile Barramundi, *Lates calcarifer* (bloch), against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. V. 55 p. 332 e 338. Junho 2016.

SILVA, L. J. ***Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São Francisco: fatores de virulência e perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados.** 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE.

SILVA, M. E. G. C.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P. HPCL-DAD Analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Coden (USA), v. 4, n. 2, p. 1166, 2012.

SILVA, N. Novos métodos de análise microbiológica de alimentos. **Coletânea** do Instituto de tecnologia de alimento, Brazilian Journal of Food Technology, São Paulo- BR, v. 25, n. 1, p. 1-13, jan./jun. 1996.

SILVA, V. F. et al. Potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de plantas frente a bacilos gram negativos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas na região de Petrolina-PE. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 883-890, mar./abr. 2014.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, Alemanha, v. 292, p. 107-113, 2002.

TAMMINEN, M. et al. Tetracycline resistance genes persistat aquaculture farm sin the absence of selection pressure. **Environmental Science & Technology**, University of California, Berkeley, v.45, p. 386-391, 2011.

TREMBLAY, J., DEZIEL, E. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. **Journal of Basic Microbiol.** Alemanha, v. 48, p. 509-515, 2008.

UPADHYAY, A. **Investigating the potential of plant-derived antimicrobials and probiotic bacteria for controlling *Listeria monocytogenes*.** 2014. 326 f. Dissertations (Mestrado em Ciencia animal e veterinária) – University of Connecticut Graduate School, USA.

USUI, M. et al. Use of *Aeromonas* spp. as general indicators of antimicrobial susceptibility among bacteria in aquatic environments in Thailand. **Journal Frontiers in microbiology**, Japão, v. 7, n. 710, maio, 2016.

VALENTIM, A. P. T. **Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá).** 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

WAHLI, T. et al. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. J. **Journal of Fish Diseases**, Canadá, v. 28, p. 141-150, 2005.

WANG, G. et al. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonashydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, n. 3, p. 1048-1054, 2003.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, Sichuan University- Japan, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2014.

## CAPITULO 2

Artigo 2

**Ação do extrato etanólico bruto de *Hymenaea martiana* sobre aderência de *Aeromonas* spp. em epitélio de Tilápia do Nilo *ex vivo***

Submetido à Revista: Semina: Ciências Agrárias

**Normas:** <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/index>

**Ação do extrato etanólico bruto de *Hymenaea martiana* sobre aderência de *Aeromonas* spp. em epitélio de Tilápia *ex vivo***

**Action of the crude ethanolic extract of *Hymenaea martiana* on adhesion of *Aeromonas* spp. in ex vivo Tilapia epithelium**

**Resumo:** O interesse pela ação farmacológica de produtos naturais tem crescido e encontrado significativa aceitação popular. Nas culturas de organismos aquáticos, os fitoterápicos são utilizados para diversas finalidades, como estimuladores de apetite e do sistema imunológico e como proposta de cultivos mais saudáveis e orgânicos. Mas, são problemas de surtos de mortalidade causados por *Aeromonas* spp. em cultivos, que levaram a proposições de novas com o extrato etanólico bruto (EEB) de *Hymenaea martiana* (Jatobá) contra fatores de virulência ligados as infecções por esse micro-organismo. O extrato foi testado em modelos *in vitro* e *ex vivo*, utilizado como substrato *ex vivo*, epitélio de Tilápia do Nilo exposto em placas de Petri à inóculos de *Aeromonas* spp. e ao extrato testado. Para a confirmação da presença de cinco genes de virulência importantes na aderência, fixação e invasão principalmente, foram feitos testes moleculares, onde 90% dos isolados apresentaram pelo menos um dos cinco genes analisados, sendo selecionados para o teste *ex vivo* os 14 isolados que apresentaram o maior número de genes pesquisados. O EEB de jatobá apresentou efetividade como antimicrobiano, possuindo como concentração bactericida mínima 781,3µg/ml, onde foi analisado napesquisa a metade desse valor (concentração sub-inibitória). O modelo *ex vivo* foi avaliado em três ensaios laboratoriais (A, B e C), onde no grupo A (com EEB e sem icóculo), foi confirmado por histologia, que o EEB não se mostrou tóxico no epitélio, enquanto no grupo B (com inóculo e sem EEB) a aderência bacteriana foi associada ao grande desgaste do tecido, contrário do observado no Grupo C (com EEB e inóculo) onde a presença do EEB possibilitou a diminuição da aderência bacteriana e assim interferindo na frequência da autólise tecidual. Foi confirmada a eficácia do EEB de jatobá contra fatores relacionados com a aderência e fixação da *A. spp.*, não agredindo o epitélio da tilápia cultivada. O modelo *ex vivo* ainda possibilitou, com o uso de um meio mais complexo do que o caldo Muller Hinton (MH) usado no modelo *in vitro*, de observar reações do extrato, utilizando menos animais em uma proposta mais ética, abordando valores de redução, refinamento e substituição do uso de animais em pesquisas.

**Palavras chave:** modelo *ex vivo*, fitoterápicos, *Oreochromis niloticus* e aderência bacteriana.

**Abstract:** Interest in the pharmacological action of natural products has grown and found significant popular acceptance. In cultures of aquatic organisms, these herbal remedies have found several uses, such as appetite stimulators and the immune system. But they are problems of mortality outbreaks caused by *Aeromonas* spp. in cultures that lead the research to propose

new interventions with the crude ethanolic extract of the leaf of *Hymenaea martiana* against virulence factors linked to the infections by this microorganism. The methodologies tested were *in vitro* and *ex vivo* models, where the latter was used as substrate, Nile Tilapia epithelium, the most cultivated sweet fish in Brazil. To confirm the presence of five important virulence genes in adherence, fixation, invasion among others, molecular tests were performed. All the evaluated isolates had at least three of the five analyzed genes. The *H. martiana* CEE, known as jatobá, showed antimicrobial effectiveness, with a minimum bactericidal concentration of 781.3 µg / ml and half of this value (subinhibitory concentration) was evaluated *ex vivo* in three different laboratory tests, where in group A, after histopathological analysis, confirmed that CEE was not toxic in the epithelium, while in group B, without its presence bacterial adhesion was one of the causes for the great tissue wear, contrary to that observed in Group C, where the presence of CEE allowed the reduction of bacterial adhesion and thus the frequency of tissue autolysis. The *H. martiana* BSE confirmed its efficacy against factors related to the adhesion and fixation of *A. spp.*, Not attacking the cultured tilapia epithelium. The *ex vivo* model also made it possible, through a more complex medium than the Muller Hinton broth used in the *in vitro* model, to observe extract reactions, using fewer animals and thus less suffering in a more ethical proposal, approaching values of reduction, refinement and replacing the use of animals in research.

**Keywords:** *ex vivo* model, phytotherapeutic, *Oreochromis niloticus* and bacterial adherence.

## INTRODUÇÃO

O uso terapêutico de plantas medicinais tem contribuído desde a antiguidade de forma benéfica para a saúde. O Brasil está em primeiro no *ranking* da biodiversidade de plantas com potencial econômico e farmacológica sendo elas uma importante fonte de produtos biologicamente ativos que podem ser utilizados como modelos para a síntese de um grande número de fitoterápicos (DUTRA et al., 2016; OLIVEIRA, 2015).

Segundo Herrero et al. (2013) e Rojas et al. (2006) as plantas medicinais apresentam diferentes compostos bioativos que interfere no desenvolvimento, reprodução e atuação de micro-organismos em geral, sendo promissores no combate as bactérias patogênicas.

A *Hymenaea martiana* é uma árvore brasileira da família das Leguminosae comumente utilizada na medicina tradicional e reconhecida como fonte de compostos fenólicos, destacando os flavonóides, amplamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores da planta (CIPRIANO et al., 2014; FIGUEIREDO, 2014). Segundo Vieira (2016) o extrato etanólico bruto da sua folha apresentou atividade antimicrobiana.

Das culturas aquáticas em destaque no Brasil esta a Tilapicultura, que desde a década de 90 vem se tecnificando e intensificando sua produção. Esse cultivo tem gerado acúmulo de dejetos, aumento de micro-organismos indesejados deixando os animais estressados e mais vulneráveis a possíveis infecções, dentre elas a bacteriana, o que reduz sua produtividade e, em casos extremos, leva a mortalidade de parte dos animais, ou de todo o lote cultivado (HIDALGO e FIGUERAS, 2012).

Das bactérias mais presentes em organismos aquáticos, as espécies do gênero *Aeromonas* são as mais frequentes, podendo infectar diversos tecidos, causando septicemia e hemorragia (BEAZ-HIDALGO et al., 2010). Nas *Aeromonas* a virulência é considerada multifatorial, exemplo do seu mecanismo de aderência em tecidos externo que, quando em grande concentração ou pela presença pré-existente de úlceras e feridas, infectam os tecidos internos, provocando, por conseguinte as infecções musculares e sistêmicas. Essas bactérias produzem vários produtos extracelulares biologicamente ativos, tais como: hemolisinas (aerolisinas), citotoxinas, enterotoxinas, proteases, leucocidinas, fosfolipases, elastases, DNAses, adesinas e, ainda, colinesterases e endotoxinas. A capacidade de produzir diversos fatores de virulência contribui para a patogênese da doença (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

O presente estudo avaliou metade da concentração bactericida mínima (concentração sub-inibitória) do EEB de *H. martiana* sobre os efeitos da *Aeromonas* spp. em um modelo *ex vivo* tendo como substrato tecido epitelial de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

## MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi dividido em três momentos: Identificação, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) de cinco genes de virulência (*aer*-aerolisina, *lip*-lipase, *ahy*-elastase, *fla*- flagelina e *ast*-enterotoxinas) nos isolados de *Aeromonas* spp.; definição da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico bruto da folha da *H. martiana* frente a bactérias *Aeromonas* spp. isolados de tilápia de cultivo e a ação sub-inibitória do EEB frente a essas bactérias, usando como substrato tecido epitelial de Tilápias do Nilo.

Para a caracterização da presença do gene *fla* a reação constou de tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50mM de KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 μM de *primers*, 2.5 U de Taq polimerase e 5 μL de DNA molde não quantificado. Os ciclos de amplificação constaram de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 25 segundos, anelamento por 30 segundos a uma temperatura de 55°C e extensão a 72°C por 60 segundos. Em seguida, houve uma extensão final a uma temperatura de 72°C por 5 minutos.

Para o gene *ast* a reação constou de tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μM de *primers*, 2,5 U de Taq polimerase e 5 μL de DNA molde não quantificado. Os ciclos de amplificação constaram de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 25 segundos, anelamento por 30 segundos a uma temperatura de 55°C e extensão a 72°C por 60 segundos. Em seguida, houve uma extensão final a uma temperatura de 72°C por 5 minutos.

Para o gene *aer* a reação constou de tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50mM de KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTPs, 0,4 μM de *primers*, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 8 μL de DNA molde não quantificado. Os ciclos de amplificação constaram de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos a uma temperatura de 55.5°C e extensão a 72°C por 30 segundos. Em seguida, houve uma extensão final a uma temperatura de 72°C por 5 minutos.

Para o gene *ahy* a reação constou de tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTPs, 0,4 μM de *primers*, 1,5 U de Taq DNA polimerase, e 4,0 μL de DNA molde não quantificado, totalizando um volume total de 25 μL. Os ciclos de amplificação constaram de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos a uma temperatura de 60.6°C e extensão a 72°C por 60 segundos. Em seguida, houve uma extensão final a uma temperatura de 72°C por 10 minutos.

Para o gene *lip* a reação constou de tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μM de *primers*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, e 4,0 μL de DNA molde não quantificado. Totalizando um volume total de 25 μL. Os ciclos de amplificação constaram de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos a uma temperatura de 58.2°C e extensão a 72°C por 30 segundos. Em seguida, houve uma extensão final a uma temperatura de 72°C por 10 minutos.

Concentração bactericida mínima: A CBM foi determinada conforme o método utilizado por Mariz (2018).

Modelo *ex vivo*: Foi utilizada a concentração sub-inibitória do EEB da folha do jatobá (*H. martiana*) como agente inibidor de atuação da atividade bacteriana em tecido epitelial de tilápia (*O. niloticus*) frente à bactéria *A. spp.* isoladas de tilápias cultivadas.

O experimento consistiu na aquisição dos animais recém abatidos (menos de 1 hora após o abate) dos quais foi retirado uma amostra de tecido epitelial de 2 cm<sup>2</sup> de área, do dorso do animal, logo após o término das brânquias. O tecido foi lavado com água destilada estéril e

exposto a luz ultravioleta para esterilização. A esterilização foi testado mergulhando o tecido tratado em placas contendo caldo MH e incubadas por 24 h a 28°C, sendo então o líquido inoculado em placas com ágar MH, incubadas nas mesmas condições, obtendo-se placas limpas, indicando sua inocuidade.

Os tecidos foram testados utilizando-se 3 grupos: Grupo A: tecido e EEB na concentração sub-inibitória; Grupo B: tecido e inóculo bacteriano (*A. spp.* na escala 0,5 na escala Marc Farland); e Grupo C: tecido, inóculo e EEB na concentração sub-inibitória.

No grupo A o tecido tratado foi disposto em placas de Petri e submetido a 0,23 mL do EEB para verificar a ação do extrato no tecido, sendo incubados por 24 h a 28° C.

No grupo B os tecidos tratados foram dispostos em placas de Petri e os 14 inóculos bacterianos selecionados após teste molecular e *in vitro*, foram preparados em caldo Muller Hinton, sendo diluído em tubos de ensaio na concentração referente a 0,5 de turbidez na escala Marc Faland, sendo 25 µl desta diluição aplicado sobre o tecido e misturados em movimentos leves até sua total dissipação pela placa e pelo tecido, e após incubação em estufa por 24 h a 28° C.

No grupo C os tecidos foram colocados nas placas e tanto o inóculo preparado no grupo B quanto o extrato na concentração do grupo A, foram aplicados simultaneamente e as placas incubadas por 24 h a 28° C.

O calculo referente às quantidades estabelecidas levaram em consideração a concentração inicial do extrato (2500), concentração final (390,6µg/mL) e o volume final de 15ml por placa de Petri, tendo sido aplicado o cálculo:  $C_i.V_i = C_f.V_f$ .

Foram realizadas análises visuais e histopatológicas em todas as amostras, para se determinar as condições morfológicas e sua possível relação com os fatores de virulência identificados nos isolados.

Para as análises histopatológicas, as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%. Depois foram desidratadas em séries crescentes de etanol, embebidos em parafina em processador automático (LEICA TP 1020) e seccionados em micrótomo (LEICA RM2245) a uma espessura de cinco micra. As lâminas histológicas foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) para a visualização clássica das estruturas da pele e por meio da técnica do ácido periódico de Schiff (PAS). Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas em bálsamo do Canadá.

## RESULTADOS

Todos os isolados selecionados apresentaram no mínimo três genes pesquisados. O gene *fla* foi o que apareceu menos 35,7% (5), enquanto o *lip* se confirmou em 92,9% (13) das amostras avaliadas. As associações que ocorreram com maior frequência foram com o gene *lip* (*lip* + *aer* = 12; *lip* + *ahy* = 9; *lip* + *ast* = 9).

A metade da CBM do EEB de *H. martiana* encontrado frente a isolados de *A. spp* foi de 390,6µg/ml, esta concentração foi então utilizada para a verificação da sua atuação frente a *A. spp* no tecido epitelial de *O. niloticus*.

Visualmente foram detectadas algumas diferenças entre os grupos testados. O grupo A, o tecido e o meio de cultura utilizado apresentou moderadas modificações, diferente dos Grupos B e C onde se observou “limo” sobre as amostras e o meio turvado. Essas diferenças se confirmaram por meio de análises histopatológicas, onde 100% das amostras do Grupo A permaneceram com estruturas de tecido como os cromatófagos e pequenas áreas autolisadas.

Nos exames histopatológicos, 100% das amostras dos grupos B e C apresentaram avançado processo de autólise, contudo em 64,3% dos tecidos do grupo C, o desgaste tecidual se apresentou menor, diferente do Grupo B, onde não foi possível observar as estruturas do tecido em virtude da evolução da autólise.

Na observação com objetiva de 100, foram verificados campos maiores com presença de colônias bacterianas aderidas nas amostras do Grupo B e em menor frequência no Grupo C. O extrato agiu, em 24 h, diminuindo a aderência das bactérias e com isso amenizando a ação da degradação tecidual.

## DISCUSSÃO

O modelo *ex vivo* utilizado proporcionou a verificação de resultados relevantes, primeiramente trazendo a possibilidade um modelo mais complexo que o teste padrão *in vitro* (que utiliza o caldo MH) recriando substratos e micro ambientes encontrados nos tecidos naturais dos peixes, bem como substituindo em grande parte o modelo *in vivo*, que demandaria um número maior de animais, submetidos ao estresse e sofrimento. Zhu et al. (2017) também ressaltaram a importância desse intervalo entre os modelos, *in vitro* e *in vivo*, já que muitas experiências *in vivo* são limitadas, como o fator quantidade, restrito no caso de voluntários humanos ou da preocupação crescente com o sofrimento a que os animais de laboratório são submetidos (ZHANG et al., 2014).

Contudo Cazarin et al. (2004) e Thompson et al. (2015) citaram também que é importante levar em consideração que os modelos *ex vivo*, apesar de serem sistemas mais

complexos do que os modelos *in vitro*, em sua maioria não reproduzem de maneira fidedigna o comportamento de determinada substância no metabolismo. Um organismo é composto por trilhões de células, de diversos tipos e funções, que se relacionam e interconectam, influenciando umas às outras, e tamanha complexidade não é passível de ser reproduzida em tais modelos. Entretanto, eles são de grande utilidade para atingir objetivos específicos, como para o estudo da ação do medicamento na célula ou a influência da genética no metabolismo de um medicamento (MARQUART, 2011).

Autores com Zhu et al. (2017), Asserin et al. (2015) e Zhang et al. (2014) se empenharam em argumentar o valor ético da pesquisa utilizando modelo *ex vivo*, considerando esse o fator mais importante para o desenvolvimento de mais pesquisas utilizando essa metodologia. Outros autores como Henrikson et al. (2009) e Marquart (2011) explicam que muitas vezes os modelos *in vivo* apresentam limitações, as córnea humana, por exemplo, são aproximadamente oito vezes maiores e mais espessas que as dos ratos, utilizados em pesquisas nessa área, contribuindo para a escolha de uso de modelos *ex vivo* nessas pesquisas.

Tanto nos resultados *in vitro*, quanto *ex vivo*, o EEB conseguiu inibir mecanismos importantes para a patogênese da aeromonas, corroborando com Simões et al. (2008) ao avaliarem a ação do extrato de própolis como anti-séptico bucal através de modelos *in vitro* e *ex vivo*, não constatando diferença nos resultados dos dois modelos. Muller et al. (2013) também observaram eficácia para a avaliação *ex vivo*, mantendo o máximo de padronização com os modelos vivos. Comparando os modelos *in vivo* e *ex vivo*, Zhu et al. (2017) observaram que houve rapidamente redução significativa da carga bacteriana na córnea de coelhos quando exposta a luz azul antibacteriana (aBL) nas duas metodologias.

Os resultados dos testes moleculares realizados indicaram que o gene *lip* esteve presente em 92,9% dos isolados corroborando com Murray et al. (2000) e Garcia-Lopez et al. (2004), que relataram que entre os principais fatores de virulência associados à *Aeromonas* spp. patogênicas para peixes, estão as lípases que causam lise de membranas celulares e eritrócitos, ocasionando grandes danos tissulares, invadindo o hospedeiro e permitindo, desta forma, o aporte de nutrientes necessários ao desenvolvimento do micro-organismo.

Existem evidências de que algumas espécies de *Aeromonas* spp., contaminantes comuns de água, sejam enteropatogênicas, possuindo capacidade de produzir enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas e/ou invadir células epiteliais (KIROV,1993). Ghataka et al. (2006) verificaram que, de 55 isolados de *Aeromonas* sp. avaliados, 92,72% revelaram potencial citotóxico em quatro diferentes linhagens celulares. As enterotoxinas estiveram presentes em 57,1% das amostras estando associado com a lípase em 64,3% das amostras demonstrando a importância das associações de genes como potencializador dos fatores de virulência, confirmado no

trabalho desenvolvido por Jिंगiing et al. (2016). Gavín et al. (2003) detectaram a presença de mais de um gene em suas amostras ( *ast*, *fla*, *aer*, *alt* entre outros) envolvidos com aderência, motilidade e produção de biofilme. Pablos et al. (2009) evidenciaram que isolados de *Aeromonas* que contenham dois ou mais genes de virulência associados, tem o potencial de causar doença. Embora a virulência dessas bactérias esteja associadas a múltiplos fatores, algumas delas sintetizam mais fatores de virulência e com mais frequência de que outras (ABREU et al., 2017; KOZINSKA, 2007).

Contraponto com a resposta genotípica, o gene *fla* importante para mobilidade, aderência e fixação bacteriana ocorreu em menor frequência entre os genes estudados (AGUILERA-ARREOLA et al., 2007). Segundo Khajanchi et al. (2010) o gene *fla* também participa de um dos sistemas de aderência mais conhecidos em bactérias mediado por cápsulas e flagelos. Rabaan et al. (2001) verificaram em um estudo *in vitro*, que o flagelo polar da *A. caviae* é necessário para a adesão ao epitélio de células humanas e Abreu et al. (2017) reafirmaram a importância do gene *fla* na formação do flagelo polar para mobilidade, adesão e formação de biofilme. Os resultados obtidos nessa pesquisa estão de acordo com os obtidos por Jिंगiing et al. (2016) que detectaram a formação de biofilme nos testes independente da presença do gene *fla*, sugerindo a presença de outros genes e fatores que podem estar relacionados com a aderência e motilidade, como o gene *laf* que Gavín et al. (2003) encontrou em 70% dos isolados de peixe, caracterizados como forte aderentes.

A degradação tecidual caracterizada pela autólise ocorreu com maior rapidez em amostras sem o EEB, permitindo assim a ação das bactérias sobre as amostras, corroborando com Ayala et al. (2010) e Ocanõ-Higuera et al. (2009) que citaram que nos peixes o estágio de autólise ocorre com maior ou menor velocidade, dependendo principalmente da contaminação microbiana e temperatura de exposição. Segundo Trezza (2006), a autólise é um processo de desintegração que começa após a morte e em que há participação de bactérias, dependendo apenas da ação de enzimas celulares, confirmado nesta pesquisa, em que o Grupo A (sem inóculo) apresentou autólise, mas em menor abrangência, levando a observação que o EEB não apresentou efeito toxicológico no epitélio (CORRÊA et al., 2003; BARROS e DAVINO, 2003; SPIELMANN, 2002). Tomita et al. (2004) descreve que a autólise observada na histopatologia ocorre em tecido de indivíduos mortos com participação de fatores como a presença de bactérias aderidas, diferente dos tecidos de indivíduos vivos onde se produz necrose, porque o primeiro é difuso e não envolve células inflamatórias.

O resultado dos exames histopatológicos permitem concluir que o EEB de *H. martiana* dificulta a aderência e degradação provocada pela *A. spp.*, confirmando o que Harikrishnan e Balasundaram (2005) verificaram ao utilizarem outras plantas medicinais frente a *A. hydrophyla*

e o que encontraram Dorman e Deans (2000) quando utilizaram óleos voláteis extraídos de vegetais como agentes antimicrobianos.

Contudo recomenda-se mais estudo sobre o efeito do EEB de *H. martiana* aplicado em água de cultivo, para a confirmação da ausência de efeitos negativos nos animais, e nos seus produtos e subprodutos. A metodologia *ex vivo* utilizada foi um passo para completar estudos científicos realizados em um número menor de animais vivos.

## CONCLUSÃO

Foi verificada a alta capacidade do EEB de *H. martiana* em dificultar a aderência, permanência e a ação da *Aeromonas* spp. no tecido epitelial do *O. niloticus*, através do modelo *ex vivo*.

**Agradecimentos:** Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade do vale do São Francisco e a Estação marinha de Aquicultura da FURG.

## REFERÊNCIAS

ABREU, RUAN E. F.; MAGALHÃES, THAÍS C; SOUZA, RENILDE C; OLIVEIRA, SAMIRA TL; IBELLI, ADRIANA MG; DEMARQUI, FÁBIO N; GOUVEIA, JOÃO JS; COSTA, MATEUS M; GOUVEIA, GISELE V. Environmental factors on virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture International** *JCR*, 2017.

AGUILERA-ARREOLA M.G., HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ C., ZÚÑIGA G., FIGUERAS M.J., GARDUÑO R.A. & CASTRO-ESCARPULLI G. 2007. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *A. veronii* and *A. hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: A comparative study. **Can. J. Microbiol.** 53:877-887.

ASSERIN J, LATI. E, SHIOYA T, B, PRAWITT J. The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an *ex vivo* model and randomized, placebo-controlled clinical trials. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 14, 291—301. 2015.

AYALA MD, I ABDEL, M SANTAELLA, C MARTÍNEZ, MJ PERIAGO, F GIL, A BLANCO, O ALBORS. 2010. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. **WT-Food Science and Technology** 43, 465-475.

BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; BUJÁN, N.; ROMALDE, J.L. & FIGUERAS, M.J. (2010). Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Systematic and Applied Microbiology** 33, pp. 149-153.

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

BALLS, M.; VAN ZELLER, A.-M; HALDER, M.,eds. *Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation*. **Amsterdam: Elsevier**, 2000. 1795 p.

BARROS SB & DAVINO SC. Avaliação da toxicidade. In: Oga S, Camargo MMA & Batistuzzo JAO. (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

CAZARIN K. C. C, CORRÊA C. L., ZAMBRONE F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 40, n. 3, jul./set., 2004

CIPRIANO, J.; MARTINS, L.; DEUS, M. S. M.; PERON, A. N. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**. v. 26. n. 2. p. 41-51, 2014.

CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; TREVISAN, R.M.S. Avaliação do risco. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 1.6. p. 69-76.

DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A. W. *Principles and methods of toxicology*. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 18, p. 853-916.

DORMAN, H. J. D. E DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, V. 88, N. 2, pg 308–316, 2000.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 2016. *in press*.

FAO - Food Agriculture Organization of the United Nations. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Disponível em: [www.fao.org/3/a-i3720e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf)

FIGUEIREDO, P. A. **Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e fotoprotetor de extratos de *Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Assis, 2014.

FIGUEIREDO, M.A.P.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies. **Journal of Applied Ichthyology**, p. 1-6, 2014.

GARCIA-LÓPEZ, M. L.; SANTOS, J. A.; OTERO A. M. (2004). *Aeromonas* spp. Food Info Online Features, United King: IFIS Publishin. Disponível (online): <http://WWW.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/13366> (25 de setembro).

GAVÍN. R, MERINO. S, ALTARRIBA. M (2003). Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. **FEMS Microbiol Lett** 224(1):77–83. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00418-X)

GHATAKA, S.; AGARWALB, R. K.; BHILEGAONKARA, K. N. Comparative study of cytotoxicity of *Aeromonas* spp. on four different cell lines Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases. Oxford, n. 29, p. 232–240, 2006.

GRAM, L. E DALGAARD, P.; Fish spoilage bacteria – problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, V. 13, N. 3, pg 262-266, 2002.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBAÑES, E. Compressed fluids for the bioactive compounds. Trends in Analytical Chemistry. v. 43, p. 67-83, 2013.

HARIKRISHNAN, R. E BALASUNDARAM, C. Antimicrobial activity of medicinal herbs in vitro against fish pathogen, *Aeromonas hydrophila*. **Fish Pathology**, V. 40, N. 4, pg 187-189, 2005.

HENRIKSSON JT, MCDERMOTT AM, BERGMANSON JP. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2009; 50:3648–3654.

HIDALGO, R. B. E FIGUERAS, M. J. Molecular detection and characterization of furunculosis and other *aeromonas* fish infections. **Health and Environment in Aquaculture, InTechOpen**, pg. 97-132, 2012.

HUMANE Society of United States (HSUS). Washington: [s.n.], 2003. Disponível em: <<http://www.hsus.org/ace/352>>. Acesso em: 11 jul. 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Produção da pecuária municipal 2013. 41.

JENSEN, F., NIELSEN, M. E NIELSEN, R.. Increased competition for aquaculture from fisheries: Does improved fisheries management limit aquaculture growth? **Fisheries Research**,159, 25-33, 2014.

JINGJING, S. et al. Characterization of Virulence Properties of *Aeromonas veronii* isolated from diseased Gibel Carp (*Carassius gibelio*). **International Journal of Molecular Sciencers**, Suíça, v. 17, p. 496, 2016.

KHAJANCHI, B.K.; FADL, A.A.; BORCHARDT, M.A.; BERG, R.L.; HORNEMAN, A.J.; STEMPER, M.E.; JOSEPH, S.W.; MOYER, N.P.; SHA, J.; CHOPRA, A.K. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of waterto-human transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.7, p.2313-2325, 2010.

KIROV. S. M (1993) The public health significance of *Aeromonas* spp. foods **Int J Food Microbiol** 20(4):179–198. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90164-C](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90164-C)

KIROV S. M, TASSELL B. C, SEMMLER A. B. T, O'DONOVAN L. A, RABAAN A. A, SHAW J. G (2002) Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J Bacteriol* 184(2):547–555. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.547-555.2002>

KIROV, S. M. M.; CASTRISIOS, J. G. S. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesions that contribute to biofilm formation on surfaces. **Infection and Immunity**, United States, v. 72, p.1939-1945, 2004

KOZÍNSKA A. Dominant pathogenic species of mesophilic *Aeromonas* isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *Journal of fish diseases*, V.30,. 293 – 301, 2007.

KOZÍNSKA A, PEKALA A (2012) Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish. **Scientific World**:J 1–J 9

MARQUART M. E. Animal models of bacterial keratitis. **J Biomed Biotechnol**. 2011;2011:680642.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicol. Letters**, v. 140- 141, p. 21-30, 2003.

MURRAY, B. W., SCHINTANI, S., SULTMANN, H., KLEIN, J. Major histocompatibility complex class II a genes in cichlid fishes: Identification, expression, linkage relationships,

and haylotype variation. **Immunogenetica New York: Springer Venlag**, V.51, n.7, p.576 – 586, jun.2000.

NEVES, M. C. A. et al., Analgesic and anti-inflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **Phytotherapy Research**. 1993.

OCAÑO-HIGUERA V, E MARQUEZ-RÍOS, M CANIZALES-DÁVILA, F CASTILLOYÁÑEZ, R PACHECO-AGUILAR, M LUGO-SÁNCHEZ, K GARCÍA-OROZCO, AZ GRACIANO-VERDUGO. 2009. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. **Food Chemistry** 116, 933-938.

OLIVEIRA, A. C. S. de. **Composição química e atividades antioxidante e anti-inflamatória da casca e entrecasca de *Capparis jacobinae* Moric. Ex Eichler**. Sergipe: UFS, 2015. 74p. (Dissertação – Mestrado em Biotecnologia).

OLIVEIRA M., SALES-LUÍS T., SEMEDO-LEMSADDEK T., RIBEIRO T., PEDROSO N.M., TAVARES L. AND VILELA C.L., (2011). Antimicrobial resistance *Aeromonas* isolated from Eurasian otters (*Lutra lutra Linnaeus*, 1758) in Portugal in “Perspectives in Animal Ecology and Reproduction”.

PABLOS, M.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍALÓPEZ, M.L. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. *International Journal of Food Microbiology*, v.135, p.158–164, 2009

PABLOS M., HUYS G., CNOCKAERT M., RODRÍGUEZ-CALLEJA J.M., OTERO A., SANTOS J.A. AND GARCÍA-LÓPEZ M.L., (2011). Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. ***International Journal of Food Microbiology***. 147 (3): 203 - 210.

PEIXOTO, R. M.; Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against *Staphylococcus spp.* isolates from small ruminants with mastitis. **Revista Caatinga**, v.29, n.3, 2016.

RABAAN, A. A., I. GRYLLOS, J. M. TOMÁS, AND J. G. SHAW. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to Hep-2 cells. **Infection and Immunity**. Washington, DC v. 69, p. 4257-4267, 2001.

REGITANO, J. B. E LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, V. 34, N. 3, pg.601-616, 2010.

ROJAS, J. J. et al., Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2006.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The principles of humane experimental technique*. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. Disponível em: <[http:// altweb.jhsph.edu/publications/humane\\_exp/het-toc.htm](http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm)>. Acesso em: 14 maio 2003.

SCHAUDINN C, DITTMANN C, JURISCH J, LAUE M, GUÈNDAY-TUÈRELI N, BLUME-PEYTAVI U (2017) Development, standardization and testing of a bacterial wound infection model based on ex vivo human skin. **PLoS ONE** 12(11): e0186946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186946>

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. **ILAR Journal**, v. 43, supl., p. S85-S94, 2002.

SIMÕES C. C, ARAÚJO D. B, ARAÚJO R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(1): 84-89, Jan./Mar. 2008

SOUZA, A. C. M. et al.; Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*, **Mycoses**, V. 53, N. 6, pg 500–503, 2010.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, v. 43, supl., p. S11- S17, 2002.

STEPHENS, M. L., GOLDBERG, A. M., ROWAN, A. N. The first forty years of the alternatives approach: refining, reducing, and repalcing the use of laboratory animals. In: ROWAN, A. N. *The state of the animals 2001*. Washington: Humane Society Press, 2001. chapter 8. Disponível em: <[http://files.hsus.org/web-files/PDF/ MARK\\_State\\_of\\_Animals\\_Ch\\_08.pdf](http://files.hsus.org/web-files/PDF/ MARK_State_of_Animals_Ch_08.pdf)>. Acesso em: 15 fev. 2017.

STOKES, W. S. Humane endpoint for laboratory animals used in regulatory testing. **ILAR J.**, v. 43, supl., p. S31-S38, 2002.

THREE Rs Declaration of Bologna. In: BALLS, M.; VAN ZELLER, A.-M; HALDER, M., eds. *Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation*. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 15.

THOMPSON BC, HALLIDAY GM, DAMIAN DL. Nicotinamide enhances repair of arsenic and ultraviolet radiation- induced DNA damage in HaCaT keratinocytes and ex vivo human skin. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0117491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117491> PMID: 25658450; PubMed Central PMCID: PMC4319842.

TOMITA Y, M NIHIRA, Y OHNO, S SATO. 1999. Histological study of early postmortem changes in various organs: comparison of the paraffin embedding method and the epoxy resin embedding method. **Jpn J legal Med** 53, 207-217.

TOMITA Y, M NIHIRA, Y OHNO, S SATO. 2004. Ultra structural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. **legal Med** 6, 25-31.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 718p.

TREZZA F. 2006. Data de la muerte: las transformaciones cadavéricas. Dosyuna Ediciones Argentinas, Buenos Aires, Argentina, Pp 256.

VIEIRA, D. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* da folha da *Hymenaea martiana* Hayne como medida preventiva da mastite caprina. **Dissertação**. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-DMFA. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical-PPGCAT, 2016.

WHITE, W. J. The use of laboratory animals in toxicologic research. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 16, p. 773-818.

ZHANG H.B., WANG L.H. & ZHANG L.H. 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 99:4638-4643.

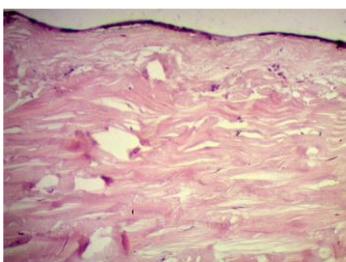
ZHANG. Q, XU. D. H, KLESIUS. P. H. (2013). Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Vet Parasitol** 198(1):45-53.

ZHANG Y, ZHU Y, GUPTA A,. Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a mouse burn model: implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections. **J Infect Dis**. 2014;209:1963–1971.

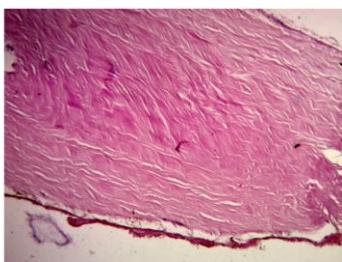
ZHU H, IRENE E. KOCHEVAR B, ZHAO I. J, WANG F, WANG Y, SUN X, HAMBLIN M. R., DAI T. Antimicrobial Blue Light Therapy for Infectious Keratitis: Ex Vivo and In Vivo Studies. **iovs.arvojournals.org**. January 2017 j Vol. 58 j No. 1 j 587.

ZURLO, J.; RUDACILLE, D.; GOLDBERG, A. M. *Animal and alternatives in testing: History, science, and ethics*. Larchmont: The Johns Hopkins University, 2002. Disponível em: <[http://caat.jhsph.edu/pubs/animal\\_alts/animal\\_alts.htm](http://caat.jhsph.edu/pubs/animal_alts/animal_alts.htm)>. Acesso em: 14 jul. 2003.

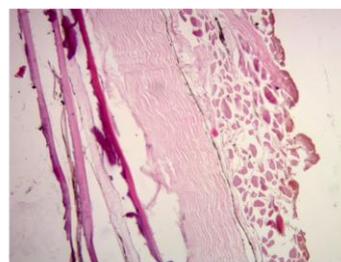
## ANEXO



**Figura 1.** – Tecido epitelial de tilápia do grupo B. Imagem obtida ao microscópio de luz. HE. Objetiva de 40x ( 550x) .



**Figura 2.** - Tecido epitelial de tilápia do grupo C. Imagem obtida ao microscópio de luz. HE. Objetiva de 40x ( 550x).



**Figura 3.** – Tecido epitelial de tilápia do grupo A. Imagem obtida ao microscópio de luz. HE. Objetiva de 40x ( 550x).

**Tabela 2:** *Primers* utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes de virulência nos isolados.

Gene	Primers	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento em pares de bases	Referência
Aerolisina	aer-F aer-R	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG CCAGTTCCAGTCCCACCACT	431	(HOWARD et al., 1987)
Elastase	ahyB-F ahyB-R	ACACGGTCAAGGAGATCAAC CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	540	(SEN, 2005)
Lipase	pla/lip-F pla/lip-R	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	383 – 389	(SEN, 2005)
Enterotoxina (ast)	ast-F ast-R	TCTCCATGCTTCCCTTCCA GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	331	(SEM; RODGERS, 2004)

---

Flagelo polar (fla)	polar fla F fla R	TCCAACCGTYTGACCTC GMYTGGTTGCGRATGGT	608	(SANTOS et al., 2010)
------------------------	-------------------------	--	-----	-----------------------------

---