

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Luana da Costa Pires

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Maclura tinctoria*
(L) D. Don ex Steud CONTRA PATÓGENOS DE PEIXES**

Santa Maria, RS
2018

Luana da Costa Pires

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Maclura tinctoria* (L) D. Don
ex Steud CONTRA PATÓGENOS DE PEIXES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Berta Maria Heinzmann

Santa Maria, RS
2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Pires, Luana da Costa
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE Maclura
tinctoria (L) D. Don ex Steud CONTRA PATÓGENOS DE PEIXES
/ Luana da Costa Pires.- 2018.
74 p.; 30 cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann
Coorientador: Bernardo Baldisserotto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Tajúva 2. Jundiá 3. Resistência bacteriana 4.
Aeromonas I. Heinzmann, Berta Maria II. Baldisserotto,
Bernardo III. Título.

Luana da Costa Pires

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Maclura tinctoria* (L) D. Don
ex Steud CONTRA PATÓGENOS DE PEIXES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 27 de julho de 2018:



Berta Maria Heinzmann, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Juliana Simoni Moraes Tondolo, Dra. (UFSM)



Leticia Trevisan Gressler, Dra. (IFFar-FW)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meus dias em direção aos meus sonhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro via bolsa de estudos.

À minha Orientadora, Prof.^a Dr.^a Berta Maria Heinzmann, pelo apoio, pelas oportunidades proporcionadas e pelo conhecimento compartilhado.

À todos os colegas/amigos do Laboratório de Extrativos Vegetais, pelo conhecimento, paciência e companheirismo.

Ao Laboratório de Fisiologia dos Peixes e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, pelo espaço cedido para a realização dos testes.

Ao Laboratório de Bacteriologia e a Prof.^a Dr.^a Agueda Palmira Castagna de Vargas pelo espaço cedido para a realização dos testes.

Ao Laboratório de Química da Madeira, em especial ao aluno de doutorado Rodrigo Coldebella e a Prof.^{ra}. Dr.^a. Cristiane Pedrazi

À minha família, por acreditar no meu sonho e por estar sempre ao meu lado, sem vocês eu não chegaria até aqui.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Maclura tinctoria* (L) D. Don ex Steud CONTRA PATÓGENOS DE PEIXES

AUTORA: Luana da Costa Pires
ORIENTADORA: Berta Maria Heinzmann

Em aquicultura, frequentemente as condições sanitárias a que os animais são submetidos são inadequadas, sendo considerados fatores estressantes desencadeadores de processos patológicos como as infecções bacterianas. A resistência bacteriana surge nesse contexto através do uso indiscriminado e equivocado de terapias antibióticas, provocando nos últimos anos um aumento no número de casos de resistência a antimicrobianos. Esse crescimento é refletido em criações aquícolas, onde as patologias em peixes não responsivas culminam em prejuízos econômicos e ambientais. O grande aumento de resistência aos antibióticos e os efeitos residuais de seu uso convencional estimula a procura por novos agentes antimicrobianos de baixo impacto ambiental e que possam ser utilizados na prevenção e/ou tratamento de infecções bacterianas em peixes. Buscando essa nova abordagem, a espécie vegetal *Maclura tinctoria* (Moraceae), contém em seus extratos componentes com propriedades antimicrobianas reconhecidas. Este estudo teve por objetivo investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos brutos de folhas, casca, alborno e cerne dessa espécie vegetal frente a bactérias do gênero *Aeromonas* obtidas de jundiás (*Rhamdia quelen*) naturalmente infectados. Adicionalmente investigamos a atividade depressora central dos extratos bem como os efeitos provocados em jundiás quando expostos aos mesmos por longo período, visando avaliar a segurança de uma possível estratégia terapêutica à base destes extratos. Além disso, o extrato que apresentou os resultados mais promissores nos ensaios anteriormente citados teve seu efeito avaliado *in vivo* sobre a sobrevivência de jundiás experimentalmente infectados com *A. hydrophila*. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi avaliada pelo método de Microdiluição em caldo Müller-Hinton cátion ajustado. A atividade depressora central foi avaliada pela determinação dos tempos de indução ao estado sedativo e/ou anestésico e sua posterior recuperação em 30, 100 e 300 mg/L. No teste de longa exposição os peixes foram expostos às concentrações de 30 e 100 mg/L dos extratos por 24 horas. No ensaio antimicrobiano *in vivo*, os jundiás foram expostos a banhos por cinco dias com 30 mg/L do extrato do cerne. A composição química do extrato do cerne foi analisada por CLAE-DAD-MS. O extrato do cerne apresentou promissora atividade antimicrobiana *in vitro*, enquanto que as outras amostras apresentaram fraca atividade. No teste de atividade depressora central o extrato de folhas foi o único a induzir estágio de sedação profunda, os demais extratos induziram o estágio de sedação leve nas três concentrações analisadas. O ensaio de longa exposição demonstrou que os animais submetidos aos extratos da casca, alborno e cerne apresentaram um comportamento que variou de normal à sedação leve, já o extrato de folhas provocou um aprofundamento dos estágios de sedação. O ensaio antimicrobiano *in vivo* revelou uma alta taxa de sobrevivência (85,4%) dos animais expostos ao extrato do cerne em comparação com o controle infectado sem tratamento (6,9%), não diferindo estatisticamente do florfenicol (100%). A composição química revelou a presença de compostos da classe dos polifenóis. O extrato do cerne mostrou ser uma alternativa para o tratamento de infecções bacterianas causadas por *A. hydrophila* em jundiás.

Palavras-chave: Tajúva. Jundiá. Resistência bacteriana. *Aeromonas* sp.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud AGAINST FISH PATHOGENS.

AUTHOR: Luana da Costa Pires
ADVISOR: Berta Maria Heinzmann

The sanitary conditions to which the animals are submitted in aquaculture are often inadequate, being stressing factors triggering pathological processes as bacterial infections. In this context, bacterial resistance arises through the indiscriminate and misuse of antibiotics, leading in recent years to an increase in the number of antimicrobial resistance. This growth is reflected in aquaculture, where non-responsive pathologies in fish culminate in economic and environmental losses. The large increase in antibiotic resistance and the residual effects of conventional antibiotics stimulates the search for new antimicrobial therapies of low environmental impact that can be used in the prevention and / or treatment of bacterial infections in fish. Looking for this new approach, the tree *Maclura tinctoria* (Moraceae), contains in its extracts components with recognized antimicrobial properties. The objective of this study was to investigate the *in vitro* antimicrobial activity of ethanolic extracts of the leaves, bark, sapwood and heartwood of this plant against bacteria of the genus *Aeromonas* obtained from naturally infected silver catfish (*Rhamdia quelen*). In addition, we investigated the central depressant activity of the extracts as well as their effects in silver catfish after long exposition, in order to evaluate the safety of a possible therapeutic strategy based on these extracts. In addition, the extract which presented the most promising results in the above-mentioned assays had its effect evaluated *in vivo* on the survival of silver catfish experimentally infected with *A. hydrophila*. The *in vitro* antimicrobial activity was evaluated by the Microdilution method in cation-adjusted-Müller-Hinton broth. The evaluation of the central depressant activity was performed by determining the induction times to the sedative and / or anesthetic state and its subsequent recovery at 30, 100 and 300 mg/L. In the long exposure test the fish were exposed to the concentrations of 30 and 100 mg/L of the extracts for 24 hours. In the *in vivo* antimicrobial assay, silver catfish were exposed to baths for five days with 30 mg/L of the heartwood extract. The chemical composition of the heartwood extract was analyzed by HPLC-DAD-MS. The heartwood extract showed promising *in vitro* antimicrobial activity, while the other samples presented weak activity. In the central depressant activity test the leaves extract was the only one to induce a stage of deep sedation, the other extracts induced the light sedation stage in the three analyzed concentrations. The long exposure experiment showed a behavior that ranged from normal to light sedation for the animals submitted to extracts of the bark, sapwood and heartwood, and the leaf extract caused a deepening of the sedation stages. The *in vivo* antimicrobial assay revealed a high survival rate (85.4%) of the animals exposed to the heartwood extract compared to the untreated control (6.9%) without statistical difference to florfenicol (100%). The chemical composition revealed the presence of compounds of the polyphenol class. Heartwood extract showed to be an alternative for the treatment of bacterial infections caused by *A. hydrophila* in silver catfish.

Keywords: Tajuva. Silver catfish. Bacterial resistance. *Aeromonas* sp.

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO

Figura 1 - Ensaio experimentais.....	14
Figura 2 - Partes do tronco de <i>M. tinctoria</i>	14

ARTIGO

Figure 1 - <i>M. tinctoria</i> crude extracts induce sedation in silver catfish	45
Figure 2 - Fish 24h-behavior under sedative bath with 30 mg/L or 100 mg/L <i>M. tinctoria</i> extracts.....	46
Figure 3 - Survival of silver catfish infected with <i>Aeromonas hydrophila</i>	47

LISTA DE QUADROS

APRESENTAÇÃO

Quadro 1 - Atividades biológicas descritas para os extratos vegetais da família Moraceae 17

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO

Tabela 1 - Estágios de sedação e anestesia em peixes (GOMES et al., 2011).....	29
Tabela 2 - Pontuações atribuídas aos animais conforme estágio de sedação e/ou anestesia....	31
Tabela 3 - Grupos experimentais do ensaio de sobrevivência.....	32

ARTIGO

Table 1 - <i>In vitro</i> antimicrobial activity of extracts from leaves (LE), bark (BE), sapwood (SE) and heartwood (HE) of <i>Maclura tinctoria</i> . Strains 13, 18, 169/07: clinical isolates of <i>Aeromonas hydrophila</i>	Erro! Indicador não definido.
Table 2 - Major phytochemical compounds identified in the heartwood extract.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
EFO	Extrato etanólico de folhas
ECA	Extrato etanólico da casca
EAL	Extrato etanólico do alburno
ECE	Extrato etanólico do cerne
CSAL / SALC	Controle Salina / Saline Control
CI / IC	Controle Infectado / Infected Control
CFL / FLC	Controle Florfenicol / Florfenicol Control
CECE / HEC	Controle extrato bruto do cerne / Heartwood Control
TFL / IFL	Tratamento Florfenicol / Infected Florfenicol
TECE / IHE	Tratamento extrato do cerne / Infected Heartwood
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
SEMA	Secretaria Estadual de Meio Ambiente
Defap	Departamento de Florestas e Áreas Protegidas
HCl	Ácido clorídrico
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos acoplado ao Espectrômetro de Massas
CMH	Caldo Müller-Hinton
CMHCA	Caldo Müller-Hinton Cátion Ajustado
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
DZP	Diazepam
EUG	Eugenol
SNC	Sistema Nervoso Central
EPM	Erro Padrão da Média
OEs	Óleos Essenciais
FAO	Food and Agriculture Organization

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	12
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1.1 Extratos vegetais em piscicultura.....	15
1.1.2 Família Moraceae, gênero <i>Maclura</i> , espécie <i>Maclura tinctoria</i>	16
1.1.3 <i>Rhamdia quelen</i> e infecção por <i>Aeromonas sp.</i>	19
1.1.4 Atividade antimicrobiana de extrativos vegetais frente a cepas de <i>Aeromonas sp.</i> e o uso de antibióticos sintéticos em piscicultura.....	21
1.1.5 Vantagens de extratos vegetais sobre substâncias sintéticas de ação depressora central	23
1.2 PROPOSIÇÃO	25
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
1.3.1 Material Vegetal	26
1.3.2 Drogas e Solventes	26
1.3.3 Extração do material vegetal bruto	27
1.3.4 Patógenos de peixes	27
1.3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	28
1.3.6 Animais.....	28
1.3.7 Avaliação da atividade depressora do Sistema Nervoso Central (SNC)	29
1.3.8 Longo tempo de exposição	30
1.3.9 Ensaio de sobrevivência	31
1.3.10 Análise cromatográfica	33
1.3.11 Análise estatística.....	33
2 ARTIGO	34
3 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO A - AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES CIENTÍFICAS ENVOLVENDO A ESPÉCIE <i>M. tinctoria</i> PELO SISBIO	71
ANEXO B – PARECER N° 5307210617 DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	72

1 APRESENTAÇÃO

A piscicultura é uma atividade agrícola em constante crescimento mundial (FAO, 2016), com previsão de crescimento superior a 100% (FAO, 2016; TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). A mudança por hábitos alimentares mais saudáveis contribuiu para o crescimento dessa atividade no mundo (VALLADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2016). Nesse contexto, um fator preponderante é o fato da carne de peixe ser considerada altamente nutritiva por ser rica em proteínas, aminoácidos, sais minerais e vitaminas, além de conter baixo teor de gordura (CREPALDI et al., 2006). No Brasil, as condições climáticas e grande disponibilidade de recursos hídricos também contribuem para o crescimento dessa atividade (SCORVO-FILHO, 2004).

Em contrapartida, com a intensificação da produção, a ocorrência de doenças é hoje determinante na qualidade do produto e viabilidade econômica da atividade (FIGUEIREDO; LEAL, 2008). Doenças parasitárias e bacterianas são hoje as principais responsáveis pela alta taxa de mortalidade e perdas econômicas na piscicultura (DIAS; MARTINS, 2017). Normalmente infecções bacterianas progridem a partir da suscetibilidade imunológica dos animais, como consequência de práticas de manejo inadequadas como, alta densidade populacional nos viveiros, grande quantidade de matéria orgânica depositada, baixa qualidade da água e realização de procedimentos veterinários e transporte (SILVA, 2010). Infecções por bactérias do gênero *Aeromonas* estão entre as principais causadoras de doenças na piscicultura destacando-se: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. bestiarum* e *A. veronii* (FIGUEIREDO; LEAL, 2008). A detecção desses agentes patogênicos é reconhecida por sua presença na pele, brânquias, intestino dos peixes e na água (SILVA, 2010). *A. hydrophila* é considerada zoonótica, por isso, também tornam-se importantes a adoção de boas práticas de manipulação e processos de sanitização adequados (SILVA, 2010).

Produtos de origem sintética como florfenicol e oxitetraciclina são antibióticos amplamente utilizados em aquicultura, por apresentarem amplo espectro de ação e serem eficientes no tratamento de infecções bacterianas (GORDON et al., 2006; BOWKER; CARTY; BOWMAN, 2013; KOLODZIEJSKA et al., 2013; CHUAH, 2016). Entretanto, os efeitos ocasionados pelo uso indiscriminado e equivocado desses antibióticos contribuiu nos últimos anos para o aumento da resistência bacteriana, sendo este um problema de saúde global (NADIMPALLI et al., 2017). Além disso, a falta de

uma legislação específica para o uso de antibióticos em piscicultura também tem contribuído para o agravamento desse fenômeno no país.

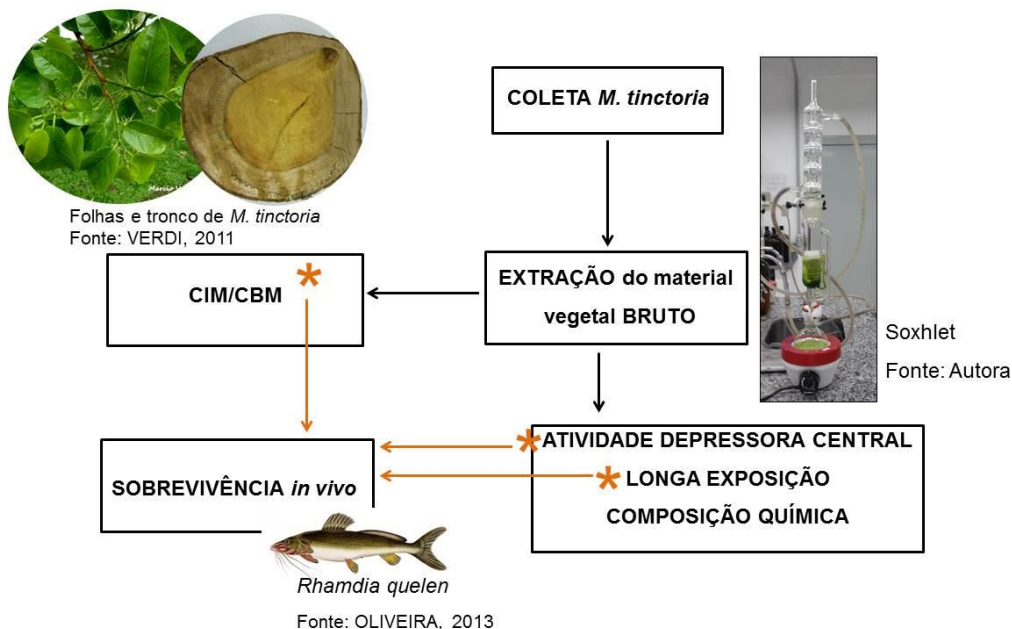
Em produções aquícolas, a utilização de substâncias naturais vem crescendo devido às vantagens fornecidas por esses compostos. Estudos demonstram que metabólitos vegetais secundários, incluindo alcaloides, compostos fenólicos, terpenoides, esteroides, óleos essenciais (OEs) e seus componentes, por vezes aumentam a taxa de crescimento, melhoram o sistema imunológico ou apresentam atividade antimicrobiana, além de promover a redução dos efeitos secundários deletérios ocasionados pelo uso de substâncias sintéticas (CITARASU, 2010). Vaquero et al. (2010) evidenciaram que a atividade antibacteriana de espécies vegetais está altamente relacionada com a concentração de compostos fenólicos presentes na planta.

A pesquisa por novos agentes antimicrobianos é necessária em aquicultura, tendo em vista o crescimento dessa atividade e da resistência bacteriana no país. A espécie *Maclura tinctoria* (L) D. Don ex Steud. (Moraceae) é uma fonte promissora para utilização em piscicultura, devido às atividades biológicas já descritas para a espécie, entre elas a atividade antimicrobiana (LAMOUNIER et al., 2012). Portanto, esta dissertação de mestrado tem por objetivo a avaliação do potencial antimicrobiano de extratos etanólicos obtidos da madeira, cascas e folhas de *M. tinctoria* frente a bactérias do gênero *Aeromonas* patogênicas para peixes. Tais atividades foram avaliadas *in vitro* e *in vivo*, com o intuito de propor uma intervenção farmacológica que possibilite o tratamento de infecções bacterianas em peixes cultivados. Adicionalmente, a atividade depressora central e o efeito dos extratos a longo prazo foram também avaliados.

A dissertação está apresentada na forma de um artigo científico, o qual se encontra inserido no capítulo 2. O manuscrito relata a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *M. tinctoria in vitro*, a determinação da atividade depressora central e a ocorrência de possíveis sinais de toxicidade induzidos pelos extratos. Por fim, a análise de sobrevivência é exposta, visando avaliar o efeito da atividade antimicrobiana *in vivo*, correlacionando os resultados encontrados com a composição química do extrato escolhido para o ensaio de sobrevivência. O manuscrito encontra-se formatado nas normas do periódico ao qual foi submetido: “Microbial Pathogenesis (ISSN: 0882-4010)” A dissertação é finalizada com a conclusão, referências e anexos. A figura 1 representa um esquema da maneira em que os ensaios

experimentais foram realizados e a figura 2 descreve as partes do tronco utilizadas neste trabalho.

Figura 1 - Ensaio experimentais



Fonte: Autora

* Indica que somente o extrato que obteve os melhores resultados nos testes *in vitro* e *in vivo* foi utilizado no teste de sobrevivência *in vivo*; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima.

Figura 2 - Partes do tronco de *M. tinctoria*



Fonte: Autora

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Extratos vegetais em piscicultura

Extratos vegetais são fontes promissoras de estudo para verificação do potencial farmacológico de diversas espécies vegetais. Os extrativos vegetais são compostos de baixo peso molecular, responsáveis por determinadas características da planta como: odor, gosto, cor, resistência ao apodrecimento e propriedades abrasivas. A composição e quantidade desses compostos na planta dependem de fatores como espécie, idade, local de cultivo, entre outros (LAMOUNIER et al., 2012). Citarasu (2010) evidenciou a atividade benéfica de extratos e OEs, na aquicultura devido à eficiência desses produtos na redução de efeitos secundários produzidos por produtos sintéticos ao meio ambiente. Assim, OEs, extratos e seus constituintes isolados apresentam-se como alternativa para a manutenção do bem-estar animal.

A aquicultura é uma atividade profissional que vem crescendo consideravelmente a cada ano. Entretanto, esse aumento de produção está associado a maiores índices de doenças relacionadas à criação do pescado (FAO, 2016). Entre as espécies nativas mais cultivadas no sul do país, podemos citar o jundiá (*Rhamdia quelen*) (BALDISSEROTTO, 2009). A adoção de medidas de profilaxia e tratamento de enfermidades que acometem peixes e outras espécies aquáticas são relevantes, tendo em vista o crescimento da atividade pesqueira no país. Silva (2010) relacionou o crescimento da piscicultura intensiva e semi-intensiva no país com o aumento da ocorrência de contaminações microbiológicas nas produções. A contaminação bacteriana de peixes ou produtos oriundos da pesca é um exemplo de situação que poderia causar um desequilíbrio na saúde e na cadeia produtiva nacional.

Figueiredo e Leal (2008) destacaram que, em vários estados do país, o controle de doenças microbianas tem sido realizado somente através do uso de antibióticos clássicos. Entretanto, essas substâncias produzem um grande impacto no meio ambiente devido aos resíduos químicos que são liberados na água e à indução de resistência bacteriana (CHAKRABORTY; HANCZ, 2011; SHAKYA; LABH, 2014).

Produtos naturais têm se tornado fontes de estudo como potenciais agentes redutores de estresse, através da atividade sedativa e anestésica produzida por compostos presentes em espécies vegetais (FAÇANHA; GOMES, 2005). A atividade sedativa de produtos naturais pode desempenhar um papel fundamental devido a

redução do estresse resultar na prevenção de imunossupressão e, em consequência, em uma menor suscetibilidade à contaminação por patógenos (ROSS; ROSS, 2008). Por outro lado, os compostos ativos presentes nos extrativos vegetais podem aumentar a resposta do sistema imune inato. Por apresentarem efeito antimicrobiano e antioxidante, entre outros, os extrativos vegetais tornam-se interessantes alternativas farmacológicas para a promoção da saúde animal e qualidade do pescado, além de causarem menor impacto ambiental (CHAKRABORTY; HANCZ, 2011).

1.1.2 Família Moraceae, gênero *Maclura*, espécie *Maclura tinctoria*

A espécie *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. sinônimo *Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudich. ex B. D. Jackson (PEDERNEIRAS, 2018) está classificada na família Moraceae, sendo predominantemente tropical (CARVALHO, 2003). A espécie *M. tinctoria* pode ser encontrada nas regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul, sendo que não é considerada endêmica do país (PEDERNEIRAS, 2018). É conhecida popularmente como amoreira, amora-do-mato ou tajúva (CARVALHO, 2003). Lamounier (2010) caracterizou a madeira da espécie como altamente resistente ao ataque de organismos xilófagos e imune a cupins, fato que pode justificar sua utilização na construção civil. Quanto à coloração, o alborno apresenta-se branco-amarelado e o cerne amarelo-dourado, devido à presença de flavonoides. Já as flores e os frutos apresentam coloração amarelo-esverdeada, estes por possuírem um pericarpo carnoso e doce, atraem aves, morcegos e macacos para alimentarem-se deles (BATTILANI; SANTIGO; SOUZA, 2006).

O uso popular da espécie inclui o tratamento de dores na coluna (ALVES et al., 2008), dor de dentes (BUENO et al., 2005), sífilis e reumatismo, tendo sido descritos efeitos cicatrizante e anti-inflamatório (POTT; POTT, 1994), adstringente e analgésico (DUARTE et al., 2012). Na literatura existem outros estudos, relacionados ao uso medicinal da espécie: atividade quimiopreventiva (CALDERON et al., 2000), antioxidante e antimicrobiana (LAMOUNIER et al., 2012). Groweiss e colaboradores (2000) determinaram a atividade anti-HIV do extrato metanólico, obtido da casca de *M. tinctoria*. Neste estudo foram isolados sete compostos fenólicos, que apresentaram atividade antiviral, destacando-se o composto macluraxantona com uma CE_{50} (Concentração Efetiva 50) que variou de 1 a 2,2 $\mu\text{g/mL}$. O quadro 1 descreve as atividades biológicas descritas para espécies vegetais da família Moraceae.

Quadro 1 - Atividades biológicas descritas para os extratos vegetais da família Moraceae

(continua)

Espécie vegetal	Parte Utilizada	Tipo de extrato	Atividade biológica	Referência
<i>Artocarpus communis</i>	Cascas das raízes	Aquoso	Hipoglicemiante	ADEWOLE et al. (2007)
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Folhas, cascas e caule	Hidroalcoólicos	Antimicrobiana, antioxidante	CAVALCANTE et al. (2013)
<i>Artocarpus heterophylluse</i> <i>Artocarpus integer</i>	Raízes	Acetônico	Anti-inflamatória, anticariogênica, antifúngica, antineoplásica, hipoglicemiante	PANTHONG et al. (2013)
<i>Artocarpus nobilis</i>	Folhas	N-butanólico, metanólico, aquoso	Antifúngica	JAYASINGHE et al. (2004)
<i>Brosimum gaudichaudii</i>	Folhas e raízes	Etanólicos, hexânicos	Anti-helmíntica, hepatotóxica, inibição do carcinoma epidermóide	POZETTI et al. (2006)
<i>Brosimum gaudichaudii</i>	Cascas e folhas	Etanólicos	Antimicrobiana	BORGES et al. (2017)
<i>Dorstenia multiformis</i>	Folhas	Etanólico bruto e frações: hexânicas, clorofórmicas e acetato de etila	Analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, citotóxica, anti-hipertensiva	BALESTRIN et al. (2008)
<i>Ficus benghalensis</i>	Folhas	Metanólico, benzênico, acetônico	Larvicida	MGOVINDARAJAN et al. (2011)
<i>Ficus benjamina</i>	Folhas e caule	Acetato de etila	Antibacteriana	RESCHKE et al. (2007)
<i>Ficus carica</i>	Folhas	Acetato de etila	Hipolipidêmicas em ratos diabéticos tipo 2.	IRUDAYARAJ et al. (2017)
<i>Ficus deltoidea</i>	Folhas	Aquoso	Antiinflamatória	ZAKARIA et al. (2011)

Quadro 1 – Atividades biológicas descritas para os extratos vegetais da família Moraceae.

(continuação)

Espécie vegetal	Parte Utilizada	Tipo de extrato	Atividade biológica	Referência
<i>Ficus deltoidea</i>	Folhas	Aquoso	Antidiabética	ADAM et al. (2012)
<i>Ficus exasperata</i>	Folhas	Aquoso	Hipoglicemiante e hipotensiva	ADEWOLE et al. (2011)
<i>Ficus platyphylla</i>	Cascas do caule	Metanólico	Anticonvulsivante	CHINDO et al. (2014)
<i>Ficus polita</i>	Raízes	Metanólico, fração hexânica e acetato de etila:hexânica	Antimicrobiana	KUETE et al. (2011)
<i>Ficus ovata</i>	Cascas do caule	Metanólico bruto, fração hexânica e acetato de etila	Antimicrobiana	KUETE et al. (2009)
<i>Ficus racemosa</i>	Cascas das raízes	Metanólico	Antidiabética	BHASKARA et al. (2002)
<i>Ficus racemosa</i>	Cascas	Aquoso	Antidiurética	RATNASOORIYA et al. (2003)
<i>Ficus religiosa</i>	Frutos e raízes	Etanólico bruto e frações hexânica, acetato de etila e butanólica	Anticonvulsivante	SINGH et al. (2016)
<i>Ficus religiosa</i>	Cascas	Metanólico	Antiviral <i>in vitro</i>	CAGNO et al. (2015)
<i>Morus alba</i>	Folhas, raízes e galhos	Hidroetanólico, frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica	Antimicrobiana, hipoglicemiante, antipirética, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antioxidante	PEREIRA et al. (2013)
<i>Morus alba</i>	Folhas	Metanólico	Aumento da imunidade humoral e celular	BHARANI et al. (2010)
<i>Morus bombycis</i>	Caule	Metanólico	Anti-inflamatória	OH et al. (2015)
<i>Morus celtidifolia</i>	Folhas	Hexânico	Antimicrobiana e citotóxica	VIVEROS et al. (2015)
<i>Morus nigra</i>	Frutos	Dimetilsulfóxido	Antiploriferativa e apoptótica	TURAN et al. (2017)

Quadro 1 – Atividades biológicas descritas para os extratos vegetais da família Moraceae.

(conclusão)

Espécie vegetal	Parte Utilizada	Tipo de extrato	Atividade biológica	Referência
<i>Morus nigra</i>	Folhas	Etanólico	Antibacteriana, antioxidante, citotóxica	SOUZA et al. (2016)
<i>Maclura tinctoria</i>	Madeira e casca	Cicloexânico:etanólico, etanólico, aquoso, metanólico:aquoso, acetônico:aquoso	Antimicrobiana	LAMOUNIER et al. (2012)
<i>Maclura tinctoria</i>	Madeira e casca	cicloexânico:etanólico, etanólico, aquoso, metanólico:aquoso, acetônico:aquoso	Antioxidante	LAMOUNIER et al. (2012)
<i>Maclura tinctoria</i>	Casca	Metanólico	Antiviral	GROWEIS et al. (2000)
<i>Maclura tinctoria</i>	Folhas	Etanólico	Antifúngica	EL SOHLY et al. (2001)

Fonte: Autora

1.1.3 *Rhamdia quelen* e infecção por *Aeromonas* sp.

Entre as espécies aquícolas mais cultivadas no país, podemos citar o jundiá (*Rhamdia quelen*, família Pimelodidae), sendo encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México (MONTANHA et al., 2011). O cultivo do jundiá está em ascensão no sul do Brasil devido ao bom índice de reprodução dessa espécie (GOMES et al., 2000; DIAS et al., 2002). É a espécie nativa de peixe com maior presença no Estado do Rio Grande do Sul (BALDISSEROTTO, 2009). É um peixe onívoro, de hábitos noturnos que tolera bem baixas temperaturas, apresentando crescimento acentuado no verão (MONTANHA et al., 2011, FRACALOSSO et al., 2004). O jundiá apresenta uma boa aceitação no mercado consumidor devido à ausência de espinhos intramusculares, e ao fato de ser de fácil domesticação e adaptação às condições de cultivo (MONTANHA et al., 2011).

Estudos recentes buscam a melhoria do bem-estar animal e o crescimento do cultivo da espécie no país. A pesquisa por novos agentes sedativos e/ou anestésicos tem como objetivo a redução do estresse provocado pela alta densidade populacional, grande quantidade de matéria orgânica e má qualidade da água (FAÇANHA; GOMES, 2005;

SILVA, 2010; SILVA et al., 2015), além do auxílio da atividade biológica propriamente dita em procedimentos veterinários e de transporte (CUNHA, et al., 2010; SILVA et al., 2013; HELDWEIN et al., 2014; BENOVIĆ et al., 2015; PARODI et al., 2016). A busca por novos agentes antimicrobianos surge a partir do crescimento de infecções bacterianas nas criações, tendo como consequência a grande taxa de mortalidade causada por agentes patogênicos e a resistência bacteriana causada pelo uso equivocado e indiscriminado de antibióticos (SILVA et al., 2017; SOUZA C. et al., 2017; SOUZA R. et al., 2017). A suplementação da dieta com adição de compostos bioativos auxilia na promoção do crescimento, ganho de massa corporal, propriedades antioxidantes além de auxiliar o sistema imunológico e reprodutivo (PÊS et al., 2016; BATTISTI et al., 2017; ZEPPENFELD et al., 2017; ZAGO et al., 2018).

Infecções bacterianas causadas pelo gênero *Aeromonas* sp. são as mais prevalentes em piscicultura (FIGUEIREDO E LEAL, 2008). *Aeromonas* sp. são bacilos Gram-negativos pertencentes à família Aeromonadaceae (JANDA; ABBOTT, 2010). O gênero *Aeromonas* é composto por 25 espécies (HIDALDO; FIGUERAS, 2013), que são patógenos oportunistas, anaeróbios facultativos, oxidase e catalase positivos (SILVA, 2010). Em um estudo, realizado por Silva (2010), foram coletadas e analisadas 96 amostras de água e peixes, todas positivas para presença de *Aeromonas* sp. Neste mesmo estudo, das 162 cepas isoladas, 89 foram de água e 73 de peixes, correspondendo a 55% e 45% respectivamente, das amostras contaminadas por *Aeromonas*.

Os fatores de virulência presentes no gênero *Aeromonas* são de diferentes origens (KOZINSKA; PEKALA, 2011) classificados em extracelulares, como as aerolisinas, lipase, hemolisinas, proteases, enterotoxinas, entre outros, bem como estruturas associadas às células, como os flagelos, proteínas de membrana externa, lipopolissacarídeos e cápsulas (SILVA, 2010; HIDALGO; FIGUERAS, 2013; JAHID et al., 2015; ABREU et al., 2017). Outros fatores de virulência envolvem a via de sinalização celular *quorum sensing* e a produção de complexos proteicos que se aderem às células do hospedeiro (KOZINSKA; PEKALA, 2011). A intensidade de aderência das cepas aos tecidos está relacionada aos diferentes graus de danos teciduais (SILVA, 2010; KOZINSKA; PEKALA, 2011). *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. sobria* e *A. bestiarum* são as principais espécies causadoras de doenças em peixes denominada “septicemia hemorrágica” (QUINN et al., 2004; FIGUEIREDO; LEAL, 2008). Os principais órgãos afetados são os rins, baço, pâncreas, fígado, brânquias,

musculatura esquelética e cérebro (FIGUEIREDO; LEAL, 2008), os quais apresentam-se pálidos e flácidos (BOIJINK; BRANDÃO, 2001). As lesões causadas por essas bactérias incluem descamação cutânea, ulcerações pelo corpo e nos barbilhões, iniciando-se no pedúnculo caudal, com exposição da musculatura (BARCELLOS et al., 2008), lesões ao redor do ânus, no poro genital, nas nadadeiras e brânquias (BOIJINK; BRANDÃO, 2001). Jundiás inoculados com *A. hydrophila* apresentaram 100% de mortalidade em 24h após a inoculação (BOIJINK; BRANDÃO, 2001). Silva (2010) descreveu que o grau de infecção depende do estado fisiológico dos peixes e do grau de virulência da cepa (MEYLAN et al., 2018).

1.1.4 Atividade antimicrobiana de extrativos vegetais frente a cepas de *Aeromonas* sp. e o uso de antibióticos sintéticos em piscicultura

Na aquicultura a ocorrência de bacterioses está estritamente relacionada com situações de estresse a que os peixes são submetidos (ALEXANDER; KIRUBAKARAN; MICHAEL, 2010). Entretanto, na grande maioria das vezes as doenças provocadas por esses agentes patogênicos são secundárias, pois estes fazem parte da microbiota da água ou do peixe, manifestando-se quando os animais estão imunologicamente debilitados (ALEXANDER; KIRUBAKARAN; MICHAEL, 2010; SILVA, 2010). Das et al. (2015) realizaram uma pesquisa para avaliar a eficácia do extrato aquoso de *Ocimum sanctum* contra cepas de *A. hydrophila* presentes em alevinos da espécie *Labeo rohita*. O extrato das folhas estimulou a imunidade dos peixes e aumentou a resistência de *L. rohita* frente a *A. hydrophila*.

Com relação à espécie vegetal de interesse desse trabalho, a atividade antimicrobiana de extratos etanol/cicloexano, etanol/água e metanol/água da madeira e das cascas de *M. tinctoria* frente a cepas de microrganismos aeróbios (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*) e anaeróbios (*Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*) foi determinada. Para os microrganismos expostos ao extrato da casca foram obtidas as melhores CIMs (Concentrações Inibitórias Mínimas), de 20 a 400 µg/mL, já para as cepas expostas ao extrato da madeira, as CIMs ficaram entre 200 e 400 µg/mL. A menor CIM (20 µg/mL) foi encontrada frente à bactéria anaeróbica Gram-negativa *Prevotella nigrescens* exposta ao extrato etanol/cicloexano da casca (LAMOUNIER et al., 2012).

O tratamento de infecções bacterianas em piscicultura ainda é na maioria das vezes realizado pelo uso de antibióticos clássicos (FIGUEIREDO E LEAL, 2008). Um estudo proposto por Costa et al. (2008) determinou a atividade antimicrobiana de produtos sintéticos frente a 51 cepas isoladas de jundiá incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os microrganismos utilizados no estudo foram: *Acinetobacter spp.* (8 cepas), *Aeromonas spp.* (15 cepas), *Edwardsiella spp.* (2 cepas), *Enterobacter spp.* (2 cepas), *Klebsiella spp.* (1 cepa), *Plesiomonas spp.* (5 cepas), *Pseudomonas spp.* (1 cepa), *Vibrio spp.* (6 cepas) e *Staphylococcus spp.* (11 cepas). Os resultados demonstraram que 100% dos isolados foram sensíveis à gentamicina, 96,08% apresentaram sensibilidade ao sulfazotrin, 92,16% ao cloranfenicol, 84,31% à tetraciclina, 84,31% ao ácido nalidíxico, 60,78% à nitrofurantoína, 43,14% à eritromicina, 43,14% à ampicilina, 29,41% à espiramicina, 25,50% à colistina, e 3% à penicilina G. Com exceção de um isolado de *Staphylococcus spp.*, as bactérias analisadas no presente estudo foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos testados.

O florfenicol e a oxitetraciclina são os únicos antibióticos aprovados para uso em piscicultura no Brasil, sendo mais utilizados para tratar infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em piscicultura, apresentando amplo espectro de ação (KOLODZIEJSKA, et al., 2013, YANG et al., 2013). Estudos recentes demonstram a suscetibilidade dos microrganismos a esses antibióticos. Machado et al. (2016) determinaram a toxicidade da Terramicina[®], antibiótico à base de oxitetraciclina, em peixes das espécies *Oreochromis niloticus*, crustáceos *Daphnia magna* e à planta aquática *Lemna minor*. A Terramicina[®] foi considerada altamente tóxica para as espécies estudadas, com risco de causar poluição ambiental, resultado semelhante ao encontrado para a alga *Tetraselmis chuii* quando exposta aos antibióticos florfenicol e oxitetraciclina (FERREIRA, et al., 2007). Carraschi et al. (2016) realizaram um estudo para avaliação hematológica e histopatológica em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infectados naturalmente com *Aeromonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina heterodentata* e *Anacanthorus penilabiatus*, tratados por sete dias com os antibióticos enrofloxacin, toltrazuril, florfenil e tiametoxame. Os resultados indicaram leucocitose, aumento do hematócrito, nível de hemoglobina, volume corpuscular médio e diminuição dos glóbulos vermelhos.

A sensibilidade microbiana de 90 cepas de *Aeromonas spp.* isoladas de *Oncorhynchus mykiss* foram avaliadas quando expostas aos antibióticos amoxicilina,

cefalotina, ciprofloxacino, oxitetraciclina, cloranfenicol, florfenicol, estreptomicina, gentamicina, nitofurantoína, sulfametoxazol e trimetoprima. Todas as cepas foram resistentes aos antibióticos amoxicilina e a cefalotina, já a resistência ao florfenicol e ao sulfametoxazol foi menos comum entre as cepas (AKINBOWALE, et al., 2007). Os efeitos crônicos da exposição por 12 semanas à oxitetraciclina e sulfametoxazol em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram avaliados, a exposição prolongada produziu estresse oxidativo, suprimiu a imunidade inata, causou peroxidação lipídica no fígado e intestino e afetou o catabolismo da gordura intestinal (LIMBU, et al., 2018).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, envolvendo o uso de produtos naturais no combate de infecções microbianas em piscicultura, foram realizados por nosso grupo de pesquisas nos últimos anos. Enquanto Parodi et al. (2013) avaliaram o efeito *in vitro* do extrato de *Aloysia triphylla* contra cepas bacterianas isoladas de jundiás, Sutili et al. (2014, 2015a, 2015b) realizaram experimentos com óleos essenciais *in vitro* e *in vivo* utilizando a mesma espécie animal, *Rhamdia quelen*. Um estudo proposto por Silva et al. (2017) determinaram que somente o isômero S-(+)-linalol foi ativo contra *A. hydrophila*. Os resultados apontam que extrativos vegetais e constituintes isolados possuem potencial para serem utilizados em aquicultura como agentes terapêuticos e profiláticos frente a infecções causadas por cepas de *A. hydrophila*. O efeito desses produtos naturais se deve, entre outros, a sua ação como imunoestimulantes, aumentando a resistência do animal a infecções, diminuindo as contaminações provocadas por microrganismos e promovendo um aumento na sobrevivência dos juvenis (PARODI, et al., 2013; SUTILI, et al., 2014, 2015a, 2015b).

1.1.5 Vantagens de extratos vegetais sobre substâncias sintéticas de ação depressora central

O metanossulfato de triclaína (MS-222) é um agente anestésico amplamente utilizado em piscicultura (POPOVIC, et al., 2012) em procedimentos que envolvem operações de rotina, como seleção de peixes, transporte, coleta de sangue e vacinação (POPOVIC et al., 2012). Entretanto, alguns estudos demonstram que o MS-222 pode provocar aumento na pressão parcial de gás carbônico, diminuição do pH, aumento dos níveis de cortisol e lactato, aumento no número de eritrócitos e alteração do equilíbrio osmótico (WAGNER et al., 2014; ZHAO et al., 2014; PHUONG et al., 2017). Esses efeitos promovem diminuição na imunidade dos animais (POPOVIC et al., 2012)

tornando-os suscetíveis a infecções bacterianas. Além de serem eficientes agentes sedativos e anestésicos (CUNHA, 2010; HELDWEIN et al., 2014; BENOVIĆ et al., 2015; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2017), produtos vegetais, por apresentarem propriedades imunoestimulantes, surgem como promissores agentes capazes de reduzir o estresse provocado por procedimentos de rotina nas criações (CITARASU, 2010).

A concentração de 0,5 mL/L do extrato aquoso de *Clibadium surinamense* (cumambí) foi considerada ideal para procedimentos de realização de biometria e breve manejo em tambaquis (*Colossoma macropomum*), pois os animais submetidos a esse extrato recuperaram rapidamente a normalidade natatória e essa concentração foi capaz de promover sedação profunda (SANTOS et al., 2016). Becker et al. (2013) verificaram o perfil de indução sedativa do extrato metanólico de *Condalia buxifolia* (Rhamnaceae) em jundiás, a amostra induziu somente sedação leve nos animais expostos a concentrações entre 0,5 e 120 µL/L. O extrato etanólico das flores de jambu (*Spilanthes acmella*) foi avaliado quanto ao grau de sedação/anestesia capaz de produzir em tambaquis (*Colossoma macropomum*). A concentração de 20 mg/L foi recomendada para uso como anestésico, por promover anestesia em um tempo de indução rápido (<3 min.) e recuperação anestésica em menos de 5 min., sem provocar nos animais sinais de toxicidade (BARBAS, et al., 2016). A atividade sedativa e/ou anestésica exerce importante função no transporte dos animais (ROSS; ROSS, 2008). Salbego et al. (2015) pesquisaram os efeitos do extrato metanólico de *Condalia buxifolia* em *Rhamdia quelen* submetidos a transporte por 6h, os resultados demonstraram que o extrato foi eficaz em reduzir a produção de radicais livres e amônia total, sendo também capaz de promover a diminuição da perda dos íons Na⁺, Cl⁻ e K⁺.

1.2 PROPOSIÇÃO

A presente dissertação tem como objetivo analisar o potencial de *Maclura tinctoria* como alternativa de baixa toxicidade, custo reduzido e baixo impacto ambiental para tratamento de infecções bacterianas causadas pelo gênero *Aeromonas* em peixes.

Neste sentido esta dissertação tem como objetivos específicos:

- I) Obter extratos etanólicos de diferentes partes do tronco (casca, cerne e alburno) e de folhas de *Maclura tinctoria*;
- II) Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos obtidos de diferentes órgãos vegetais de *Maclura tinctoria* frente a cepas bacterianas que infectam jundiás, *Rhamdia quelen*;
- III) Avaliar a atividade sedativa e anestésica com o intuito de verificar possível ação central dos extratos etanólicos e assim determinar a concentração dos extratos a ser utilizada no teste antimicrobiano *in vivo*;
- IV) Avaliar possíveis sinais de toxicidade, doenças ou mortalidade provocados pelos extratos etanólicos em ensaio de longa exposição e assim determinar a concentração dos extratos a ser utilizada no teste antimicrobiano *in vivo*;
- V) Avaliar o efeito da aplicação do extrato de maior atividade *in vitro* e sem sinais aparentes de toxicidade nos testes prévios *in vivo*, em ensaios *in vivo* utilizando jundiás;
- VI) Obter o perfil químico do extrato etanólico utilizado no teste antimicrobiano *in vivo* correlacionando-o com a atividade biológica detectada.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Material Vegetal

O material vegetal (folhas, casca, albúrnio e cerne) foi coletado no município de Porto Mauá, Rio Grande do Sul (27°35'26" S; 54°40'46" O). O licenciamento do material coletado foi tramitado pela Secretaria Estadual de Meio Ambiente (SEMA), Departamento de Florestas e Áreas Protegidas (Defap), Agência Nacional de Santa Rosa/RS, estando registrado sob número 0030671D. Uma exsicata das folhas foi identificada pelo Engenheiro florestal Rodrigo Coldebella e depositada no Herbário do Departamento de Biologia, UFSM, Brasil (SMDB 17.258). Nosso grupo de pesquisa obteve autorização para a realização de atividades científicas envolvendo a espécie vegetal pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO, número 60108-1) (Anexo A). A autorização de acesso ao patrimônio genético foi concedida pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, número #010191/2014-3).

1.3.2 Drogas e Solventes

Para obtenção dos extratos brutos foi utilizado como solvente etanol 95% (Química Moderna[®], Brasil). Nos testes *in vivo* de atividade depressora central e longa exposição foram utilizados como grupos controle o diazepam (DPZ, Germed Pharma[®], Brasil) um agonista do receptor benzodiazepínico GABA_A e o eugenol (S.S. White[®], Brasil), um fenilpropanoide com reconhecida atividade sedativa/anestésica (CUNHA et al., 2010; BENOVIĆ et al., 2015). Para os ensaios antimicrobianos *in vitro* foi utilizado o antibiótico florfenicol (Sigma Aldrich[®]). Os solventes utilizados para a análise cromatográfica foram metanol grau HPLC (Dinâmica[®], Brasil), ácido acético grau HPLC (Sigma Aldrich[®]). Água ultrapura (Milli-Q) utilizada nas análises cromatográficas.

1.3.3 Extração do material vegetal bruto

As folhas (EFO), cascas (ECA), alborno (EAL) e o cerne (ECE) foram pulverizados separadamente em moinho tipo Willye (Modelo TE-680, TECNAL). O material vegetal pulverizado foi submetido à extração a quente com auxílio de aparelho do tipo Soxhlet (ANVISA, 2010), utilizando como solvente etanol 95%, até o esgotamento do material vegetal. A extração do material vegetal pulverizado ocorreu em triplicata. Após, os extratos etanólicos brutos foram submetidos à evaporação em rota-evaporador (BUCHI Rotavapor, Modelo R-144) a 50°C sob pressão reduzida para a eliminação do solvente e mantidos em dessecador até peso constante para o cálculo dos rendimentos (massa/massa %). Os extratos foram liofilizados (Modelo L101 Liotop®) para remoção total de resíduos de solventes.

1.3.4 Patógenos de peixes

Foram utilizadas três cepas de *A. hydrophila* identificadas como 13, 18 (BANDEIRA JÚNIOR et al., 2017) e 169/17 e uma cepa de *A. veronii*, isoladas de peixes (*Rhamdia quelen*) naturalmente infectados obtidos de fazendas de peixes locais. Cepas de referência (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 e *Escherichia coli* ATCC 25922) foram utilizadas como controle de qualidade (CLSI 2014a, VET03/VET04-S2). As cepas bacterianas foram isoladas de lesões de pele e de rins dos animais e plaqueadas em ágar sangue 5% e MacConkey (Kasvi®). Após 48 horas de incubação a 37°C, o crescimento bacteriano foi observado e as colônias foram submetidas a testes bioquímicos e de coloração Gram (QUINN, 1994) para identificação. A identificação molecular foi realizada partindo da extração do DNA de colônias pelo método de ebulição e posterior análise da sequência parcial (~1400 pares de bases) do gene 16S rRNA amplificado com pares universais (FREDRICKS; RELMAN, 1998). Os PCRs foram sequenciados pelo ACTGene Molecular Analysis (Centro de Biotecnologia UFRGS, Brasil) com sequenciador automático ABIPRISM 3100. As sequências consenso foram montadas usando quatro programas do pacote sStaden (STADEN, et al., 2000). A sequência consenso foi comparada com outras sequências disponíveis do sistema de banco de dados do GenBank, utilizando a ferramenta BLASTN. As sequências 16S rRNA relativas mais próximas foram utilizadas para a identificação.

1.3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antibacteriana dos extratos etanólicos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo Müller-Hinton (CMH) (Sigma Aldrich®). A concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) foram determinadas em conformidade com as diretrizes do *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2014b, VET04-A2)*. Os extratos foram diluídos em etanol e incorporados ao caldo Müller-Hinton cátion ajustado (CMHCA, Sigma Aldrich®) para obtenção das concentrações de 6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.125 µg/mL (em triplicata). Os controles utilizados foram: controle positivo, (florfenicol) nas concentrações 0,063 a 130 µg/mL (em triplicata), controle de crescimento (CMHCA, inóculo e etanol 70%) e controle negativo (CMHCA). O inóculo foi preparado em solução salina 0,9% com turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland ($\approx 2 \times 10^8$ UFC/mL), densidade óptica 600 nm (OD600) $0,13 \pm 0,01$. Da solução do inóculo, 1 mL foi diluído em 9 mL de CMHCA ($\approx 1 \times 10^7$ UFC/mL). Dessa suspensão foram inoculados 10 µL em cada poço, contendo um volume total de 100 µL/poço ($\approx 1 \times 10^6$ UFC/mL). A CIM foi definida como a menor concentração da amostra ou do antibiótico capaz de inibir o crescimento visível dos isolados, após a incubação a 28°C por 24 h, em condições de aerobiose, através da adição de 10 µL da solução corante resazurina 0,1% (Sigma Aldrich®). Para a verificação da CBM (Concentração Bactericida Mínima), antes da adição do corante nos poços, foram retirados 10 µL de cada poço, plaqueados em ágar MH cátion ajustado e incubados nas mesmas condições da CIM. A CBM foi definida como a menor concentração capaz de provocar a morte da cepa, não sendo visualizado no ágar o crescimento de colônias.

1.3.6 Animais

Jundiás da espécie *Rhamdia quelen* (14.50 ± 1.3 g e 10.36 ± 0.29 cm) foram transferidos de uma fazenda local para o laboratório onde foram mantidos em tanques de 250L continuamente aerados com parâmetros de água controlados. A temperatura e o nível de oxigênio (19.9 ± 2.6 °C, $8.0 \pm 0,7$ mg/L) foram determinados usando o aparelho YSI oxygen meter (Modelo Y5512, USA). Para controle do pH ($7,7 \pm 0,05$) foi utilizado o aparelho DMPH-2 (Digimed, Brasil). O nível de amônia total ($0,9 \pm 0,3$ mg/L) foi calculado usando o método do salicilato (VERDOUW et al., 1978). Os

animais foram alimentados diariamente com ração comercial (28% de proteína bruta) e mantidos em jejum por 24 horas antes dos experimentos. A água dos tanques foi trocada diariamente logo após a alimentação, para retirada de resíduos. O protocolo foi aprovado pelo Departamento de Ética e Bem-estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria (Processo 5307210617).

1.3.7 Avaliação da atividade depressora do Sistema Nervoso Central (SNC)

Os efeitos sedativos e anestésicos dos extratos etanólicos foram avaliados em juvenis de jundiás ($4,77 \pm 0,26$ g e $7,76 \pm 0,43$ cm) nas concentrações de 30, 100 e 300 mg/L. O diazepam (DZP) e o eugenol, ambos na concentração de 30 mg/L, foram utilizados como controles positivos. Como controle negativo foi usado o etanol, utilizado como veículo para solubilização das amostras. Neste grupo os juvenis foram submetidos a banho em água contendo etanol na maior concentração utilizada para a diluição das amostras. No teste foram utilizados um total de 120 animais ($n = 8$). O protocolo de comportamento para avaliar a indução e recuperação sedativa/anestésica foi seguido conforme Gomes et al. (2011) com modificações. Esse protocolo descreve seis estágios de depressão progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC), entretanto no nosso trabalho foram observados cinco estágios de indução, descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Estágios de sedação e anestesia em peixes (GOMES et al., 2011).

Estágio	Descrição	Resposta Comportamental
S2	Sedação leve	Perda parcial de equilíbrio, sem reação a estímulos externos
S3a	Perda parcial de equilíbrio	Peixes perdem postura natatória (viram de lado) mas mantêm capacidade de natação
S3b	Perda total de Equilíbrio (sedação profunda)	Os animais perdem a capacidade natatória, mas existe resposta à pressão no pedúnculo caudal
S4	Anestesia	Perda da atividade reflexa, sem reação a fortes estímulos de contato
S5	Colapso medular (morte)	Término do movimento respiratório (morte)

Os animais foram mantidos, individualmente, em aquários de 1L até atingirem estágio S4 ou pelo tempo máximo de 30 minutos. Após o tempo de indução, os animais foram transferidos para um aquário livre de drogas para monitorar o tempo de recuperação, que é caracterizada por um comportamento de natação normal e resposta a estímulos externos. Os animais foram observados pelo tempo máximo de 30 minutos de recuperação. Os tempos de indução e de recuperação foram marcados em cronômetro digital (ZSD-808, Hong Kong). Após a recuperação os animais foram agrupados de acordo com o protocolo experimental e colocados em aquários de 40L, para observação de qualquer comportamento anormal, doenças ou mortalidade, por 48 horas. Este protocolo segue os mesmos padrões de observação já descritos em outros trabalhos (SILVA et al., 2013; HELDWEIN et al., 2014; BENOVIĆ et al., 2015; GARLET et al., 2016; SILVA et al., 2017).

1.3.8 Longo tempo de exposição

A avaliação do efeito a longo prazo dos extratos brutos foi realizada visando a observação de possíveis efeitos adversos/tóxicos induzidos pelos extratos vegetais em jundiás ($5,84 \pm 0,60$ g e $7,73 \pm 0,29$ cm), nas concentrações sedativas de 30 mg/L e 100 mg/L, determinadas a partir do ensaio da atividade central dos extratos descrito na seção anterior. Neste ensaio foram utilizados um total de 96 animais ($n = 8$) Água e veículo (etanol 95% na maior concentração utilizada para diluição das amostras) foram os grupos controle, DZP (30 mg/L) e eugenol (30 mg/L) os controles positivos. Os juvenis foram transferidos individualmente para aquários de 1L e expostos à concentração de 30 mg/L ou 100 mg/L de extrato e observados nos tempos de 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 horas. O grau de sedação dos animais foi avaliado seguindo o protocolo adaptado de Gomes et al. (2011) já descrito no teste anterior de depressão do sistema nervoso central. Para cada estágio de sedação ou anestesia foi atribuído uma pontuação ao animal, descritos na tabela 2. Quanto menor a pontuação significa que mais profundo é o estágio de sedação em que o animal se encontra (HELDWEIN et al., 2012). Após 24h, os animais foram reagrupados em aquários livres de drogas para verificação de possíveis sinais de toxicidade e/ou mortalidade.

Tabela 2 - Pontuações atribuídas aos animais conforme estágio de sedação e/ou anestesia

Estágio	Descrição	Pontuação
Comportamento normal	Natação normal, com reação a estímulos	3
S2	Sedação leve	2
S3a	Perda parcial de equilíbrio	1
S3b	Perda total de equilíbrio (Sedação profunda)	0,5
S4	Anestesia	0

1.3.9 Ensaio de sobrevivência

Juvenis de jundiás (N total=72; $23,46 \pm 1,20$ g e $12,86 \pm 0,20$ cm), foram aclimatados por sete dias antes do experimento em tanques continuamente aerados com parâmetros de água controlados. Os animais foram divididos em 18 caixas plásticas, com 20L de água cada. Os testes foram conduzidos seguindo a metodologia de Sutili et al. (2015a), com modificações na técnica. Os animais foram divididos em dois grupos: infectados e não infectados (grupos controle). Os animais infectados receberam uma injeção intramuscular de 60 μ L de inóculo de *Aeromonas hydrophila* (cepa 18), $1,5 \times 10^9$ UFC; 1,2 OD 600 nm, e os animais não tratados receberam uma injeção intramuscular de 60 μ L de solução salina estéril do lado direito latero-dorsal. Os grupos foram (n = 4, em triplicata), descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Grupos experimentais do ensaio de sobrevivência

Grupos	Sigla português/ inglês	Descrição
Controle salina	CSAL / SALC	Juvenis injetados com salina e submetidos a banho somente em água
Controle inóculo	CI / IC	Juvenis injetados com inóculo e submetidos a banho somente em água
Controle florfenicol	CFL / FLC	Juvenis injetados com salina e submetidos a banho em florfenicol 40 mg/L
Controle extrato do cerne	CECE / HEC	Juvenis injetados com salina e submetidos a banho em ECE 30 mg/L
Tratamento florfenicol	TFL / IFL	Juvenis injetados com inóculo e expostos ao tratamento com 40 mg/L de Florfenicol
Tratamento extrato do cerne	TECE / IHE	Juvenis injetados com inóculo e expostos ao tratamento com 30 mg/L de ECE

O tratamento com ECE 30 mg/L foi o escolhido tendo como base os resultados dos testes de atividade antimicrobiana *in vitro*, atividade depressora do SNC e longa exposição. Cinco horas após a inoculação os animais foram expostos a um único banho de com os tratamentos (florfenicol ou extrato do cerne). No dia seguinte à inoculação foram retirados 20% (4L) da água de cada banho e recolocados mais 20% de água em cada caixa, após sua aclimatação em aquários de 250 L. Esse procedimento foi realizado por cinco dias, a fim de mimetizar o que ocorre em fazendas de produtores locais. A mortalidade causada por *A. hydrophila* foi avaliada durante cinco dias. O extrato foi solubilizado em etanol 70% antes da adição aos banhos.

1.3.10 Análise cromatográfica

A amostra ECE foi analisada por HPLC-DAD-MS. O instrumento é formado por um aparelho Shimadzu modelo Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) acoplado sequencialmente a um detector UV-VIS de arranjo de diodos SPD-M20A e a um espectrômetro de massas modelo QTOF Compact (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha) controlado por software OtofControl. Os parâmetros ESI-MS otimizados foram: tensão capilar, 4500V; temperatura do gás de secagem 215°C; fluxo do gás de secagem 10,0 L/min; pressão do gás de nebulização 5,0 bar; colisão RF, 150 Vpp; tempo de transferência 70 Is, armazenamento pré-pulso, 5 Is e energia de colisão m/z 100, 20 eV; m/z 500; 30 eV; m/z 1000; 35 eV utilizando nitrogênio como gás de colisão. O processamento dos dados foi realizado com software de Análise de Dados 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas em coluna C-18 (4,6 mm X 250 mm) com tamanho de partícula de 5 µM de diâmetro e pré-coluna C-18. A fase móvel foi constituída por A: ácido acético a 2% (pH 4,2) e B: metanol: ácido acético: água destilada na proporção de 18:1:1, seguindo o gradiente de eluição: 0 min: 20% de B; 0-25 min: 50% de B; 25 – 30 min: 20% de B, a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção, espectro de massas obtido da biblioteca do aparelho, padrões externos e dados publicados na literatura. A análise foi realizada em triplicata.

1.3.11 Análise estatística

Os dados são reportados como média \pm EPM (Erro Padrão da Média). Os dados dos testes de atividade depressora central e longa exposição foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn. Os dados do ensaio de sobrevivência foram analisados pelo teste de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier com o teste de Log-rank. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism© version 6.01.

2 ARTIGO

***Maclura tinctoria* extracts: *in vitro* antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila* and survival increase in experimentally infected silver catfish (*Rhamdia quelen*).**

Luana da C. Pires ^a, Patrícia Rodrigues ^a, Quelen I. Garlet ^a, Luísa B. Barbosa ^b, Bibiana P. da Silveira ^c, Guerino Bandeira Jr. ^a, Lenise de L. Silva ^a, Amanda L. Gindri ^d, Rodrigo Coldebella ^e, Cristiane Pedrazzi ^e, Agueda P.C. de Vargas ^c, Bernardo Baldisserotto ^a, Berta M. Heinzmann ^{a, b, *}

^a Post-Graduation Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Pharmacy Course, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Post-Graduation Program in Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^d Laboratory of Research and Development, Integrated Regional University of Alto Uruguai e Missões, Santiago, RS, Brazil.

^e Post-Graduation Program in Forest Engineering, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

* Corresponding author

E-mail address: berta.heinzmann@gmail.com (Berta M. Heinzmann)

Postal address: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria
97105-900, Santa Maria – RS, Brazil.

ABSTRACT

The growth of bacterial infections in fish farming arises from the stressful conditions that the animals undergo and the indiscriminate and misuse of antibiotic therapies that in recent years have caused an increase in the number of cases of microbial resistance. In order to develop an effective antimicrobial agent with low environmental impact for use in aquaculture, extracts of four *Maclura tinctoria* organs were obtained: leaves (LE), bark (BE), heartwood (HE), and sapwood (SE). The dried and milled plant material was extracted separately with ethanol. The extracts, after freeze-dried, were tested for their antimicrobial activity by microdilution in Müller-Hinton broth for determination of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) against fish pathogens. In order to verify the safety and to

determine the adequate concentration range for *in vivo* antimicrobial activity assay, central depressant activity and long exposure experiment were also evaluated at concentrations of 30, 100 and 300 mg/L by immersion using juveniles of silver catfish, *Rhamdia quelen*. The evaluation of the central depressant activity was performed by determining induction times to sedation and / or anesthesia and recovery. In the long exposure test, silver catfish juveniles were exposed to concentrations of 30 and 100 mg/L of the extracts for 24 hours. The *in vivo* antimicrobial experiment was performed using silver catfish experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*, to verify their survival when exposed to baths for 5 days with 30 mg/L of HE extract. The chemical composition of HE was analyzed by HPLC-DAD-MS, since HE showed the best antimicrobial activity *in vitro* (MIC 400 and 800 µg/mL). In the central depressant activity test, LE was the only one to induce a stage of deep sedation, the other extracts induced the light stage of sedation at the three concentrations analyzed. In the long exposure experiment the animals submitted to BE, SE, and HE presented a behavior that ranged from normal to light sedation, and the LE caused a deep sedation. The *in vivo* antimicrobial assay revealed a high survival rate (85.4%) of the HE-exposed animals compared to the untreated infected control (6.9%) and did not differ statistically from florfenicol (100%). The chemical composition revealed the presence of polyphenolic compounds. HE has potential to be used in the prevention / control of *A. hydrophila* infections in fish.

Key words: *Aeromonas*, fish, heartwood extractive, anthocyanidins, flavonoids.

1. Introduction

Brazil is the 14th largest producer of aquatic animals, with more than 84% of its production coming from continental aquaculture [1]. Silver catfish, *Rhamdia quelen*, is an endemic species from South America and the main native species raised in southern Brazil [2]. This fish is commonly infected by bacteria of the genus *Aeromonas*, responsible for large economic losses in fish farming [3], and are reported in several parts of the world and considered the prevalent bacterial diseases in freshwater fishes [4]. Virulence factors of the genus *Aeromonas* are multifactorial and involve the ability of microorganisms to adhere to host cells through protein complexes called adhesins [5]. Other factors include extracellular active products such as aerolysin, lipase,

hemolysin and protease, cellular structures such as flagella, which contribute to the formation of biofilm and the cell signaling quorum sensing [6-8].

The conventional treatment for bacterial infections in aquaculture facilities is usually done with antibiotics [9, 10]. However, the increase of antimicrobials misuse, such as their use in sub-therapeutic doses, for inadequate periods, self-medication or for non-therapeutic purposes has led to the development of resistant strains [11]. In addition, recent studies have shown that aquatic animals can serve as reservoirs for multidrug-resistant pathogenic bacterial strains [12].

For this reason, the search for new antimicrobial agents, which are safe to the animals and the environment are so important and different natural products have been increasingly researched over the years, aiming their application in aquaculture practices [13, 14]. In this context, plant extractives appear as promising antimicrobial agents against infections caused by bacteria of the genus *Aeromonas* in fish farming [14-16]. Vaquero et al. [17] have shown that the antibacterial activity of plant species is highly related to the phenolic compounds concentration present in their extracts. *Maclura tinctoria* (L) D. Don ex Steud. (Moraceae) synonym *Chlorophora tinctoria* (L) Gaudich. ex B. D. Jackson [18] is a tree species native from Brazil and rich in phenolic compounds [19-25]. Extracts obtained from this plant species presented wound healing, anti-inflammatory [26], astringent, analgesic [27], chemopreventive [28], antioxidant, and antimicrobial effects [29].

Therefore, the objective of this work was to verify the *in vitro* antimicrobial potential of extracts obtained from leaves (LE), bark (BE), sapwood (SE) and heartwood (HE) of *M. tinctoria*, as well as the evaluation of the *in vivo* effect of the most active *in vitro* extract, using *R. quelen* experimentally infected with *A. hydrophila*. In addition, in order to evaluate the safety of these extracts for the animals, tests were performed to verify possible central depressant activity and long-term effects.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The different plant organs (leaves, bark, sapwood, and heartwood) were collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil at 27°35'26" S and 54°40'46" W. The licensing of the collected material was processed by the Province Department of Environment, Department of Forests and Protected Areas, National Agency of Santa

Rosa / RS, under registry 0030671D. The voucher was identified by the Forest Engineer Rodrigo Coldebella and deposited in the Herbarium of the Department of Biology, UFSM, Brazil (SMDB 17.258). Our research group obtained authorization to perform scientific activities involving the plant species through the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO, number 60108-1).

2.2. Drugs and reagents

To obtain the crude extracts, 95% ethanol was used (Química Moderna, Brazil). In the *in vivo* tests of central depressant activity and long exposure, the benzodiazepine receptor agonist GABA_A Diazepam (DPZ, Germed Pharma[®], Brazil) and Eugenol (SS White[®]) with recognized sedative / anesthetic activity were used as positive controls [30, 31]. For the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial assays the antibiotic florfenicol (Sigma Aldrich[®]) was used. The solvents used for the chromatographic analysis were methanol (Dynamica[®], Brazil), acetic acid (Sigma Aldrich[®]) both HPLC grade, and Ultrapure water (Milli-Q).

2.3. Extraction of plant material

Leaves, bark, sapwood, and heartwood were separately pulverized in Willey mill (Model TE-680, TECNAL) and subjected to hot extraction with Soxhlet [32], using ethanol until exhaustion of the plant material. The extraction occurred in triplicate. Then, the crude ethanolic extracts were concentrated in a rotary evaporator (BUCHI Rotavapor, Model R-144) at 50 ° C and kept in desiccator until constant weight to yields determination (m/m%). The extracts were lyophilized (Model L101 Liotop[®]) for total removal of solvent residues.

2.4. Fish pathogens

Reference strains (*A. hydrophila* ATCC 7966 and *Escherichia coli* ATCC 25922) were used as control [33]. Three strains of *A. hydrophila* identified as 13 (MF372509), 18 (MF372510) [34] and 169/17 (MH397689) and one strain of *Aeromonas veronii* (MH397688), isolated from naturally infected fish (*R. quelen*) obtained from local fish farms were used in the assays. Strains were isolated from skin lesions and kidney of the animals and plated on blood agar 5% and MacConkey (Kasvi[®]). After 48 hours of incubation at 37°C, bacterial growth was observed and the

colonies were submitted to biochemical and Gram staining tests [35] for identification. Molecular identification was performed by extracting DNA from colonies by the boiling method and subsequent partial sequence analysis (~ 1400 base pairs) of the 16S rRNA gene amplified with universal pairs [36]. PCRs were sequenced by ACTGene Molecular Analysis (Biotechnology Center UFRGS, Brazil) with ABIPRISM 3100 automatic sequencer. Consensus sequences were assembled using four programs from the sStaden package [37]. The consensus sequence was compared to GenBank available sequences using the BLASTN tool. The closest relative 16S rRNA sequences were used for identification.

2.5. Animals

For the *in vivo* experiments silver catfish (*R. quelen*) obtained from local fish farms were used. In the survival trials (*in vivo* antimicrobial activity) the animals used had 23.46 ± 1.20 g (12.86 ± 0.20 cm). For the evaluation of sedative and anesthetic effects, as well as for long-term exposure, silver catfish juveniles were used, with the following characteristics: 5.30 ± 0.37 g (7.74 ± 0.01 cm).

The fish were transferred to the laboratory and kept in continuously aerated 250 L tanks with controlled water parameters for acclimation during seven days prior to the experiments. The temperature and dissolved oxygen level (19.9 ± 2.6 ° C, 8.0 ± 0.7 mg/L) were determined using the YSI oxygen meter (Model Y5512, USA). For pH control (7.7 ± 0.05) the DMPH-2 device was used (Digimed, Brazil). Total ammonia levels (0.9 ± 0.3 mg/L) were determined using the salicylate method [38]. The animals were fed daily with commercial feed (28% crude protein) and fasted for 24 hours prior to the experiments. The water was changed daily just after feeding to remove waste. The protocol was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria (Process 5307210617).

2.6. Evaluation of *in vitro* antimicrobial activity

The extracts activities were evaluated by the Müller-Hinton broth (MHB) microdilution method (Sigma Aldrich®). Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal (MBC) were determined according to the guidelines of the Clinical Laboratory Standards Institute [39]. The extracts were diluted in ethanol and incorporated into Müller-Hinton cation adjusted broth (MHCAB, Sigma Aldrich®) to obtain the concentrations of 6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25

and 3.125 µg/mL (in triplicate). The controls used were: positive control (Florfenicol®) at concentrations of 0.063 to 130 µg / mL (in triplicate), growth control (MHCAB, inoculum and ethanol 70%) and negative control (MHCAB). The inoculum was prepared in 0.9% saline solution with turbidity equivalent to the McFarland 0.5 scale ($\approx 2 \times 10^8$ CFU/mL), optical density 600 nm (OD₆₀₀) 0.13 ± 0.01 . From the inoculum solution, 1 mL was diluted in 9 mL of MHCAB ($\approx 1 \times 10^7$ CFU / mL). From this suspension 10 µL were inoculated into each well, for a total volume of 100 µL/well ($\approx 1 \times 10^6$ CFU/mL). MIC was defined as the lowest concentration of the sample capable of inhibiting the visible growth of the isolates after incubation at 28 ° C for 24 h under aerobic conditions by the addition of 10 µL of the 0.1% resazurin dye solution (Sigma Aldrich®). For MBC verification, prior to the addition of the dye in the wells, 10 µL of each well was plated on MH cation agar adjusted and incubated under the same conditions used for MIC determination. MBC was defined as the lowest concentration capable of causing strain death without visible growth of colonies.

2.7. *In vivo* experiments

The sedative and anesthetic effects as well as the effects of long exposure to the extracts were evaluated before the *in vivo* antimicrobial activity experiments, aiming to define the safest extract and also a safe concentration range for the treatment of silver catfish experimentally infected with *A. hydrophila*.

2.7.1. Evaluation of Central Nervous System depressant activity

The sedative and anesthetic effects of the extracts were evaluated at concentrations of 30, 100 and 300 mg/L. Positive controls Diazepam (DZP) and eugenol were tested at 30 mg/L. As negative control, ethanol was used at the highest concentration used for the previous solubilization of the samples, prior to their addition to the water. In this experiment, a total of 144 animals (N = 8 each treatment and concentration) were used. The behavioral protocol to evaluate induction and recovery of sedation / anesthesia was adapted from Gomes et al. [40], through the observation of five stages of induction: S2) light sedation, without reaction to external stimulus, S3a) sedation with partial loss of equilibrium, with swimming capacity, S3b) deep sedation, sedation with total loss of equilibrium, no swimming capacity, S4) anesthesia, S5) spinal cord collapse.

The animals were individually maintained in 1 L aquaria until they reached S4 stage or for a maximum time of 30 minutes. After the induction time, animals were transferred to a treatment-free aquarium to monitor the recovery time, which was considered complete when fish had normal swimming and response to external stimulus. In the recovery, animals were observed for a maximum time of 30 minutes. The induction and recovery time was set in digital timer (ZSD-808, Hong Kong). After recovery, the animals were grouped according to the experimental protocol and placed in 40 L aquaria, to observe any abnormal behavior, diseases or mortality, for 48 hours. This protocol follows the same patterns of observation described in other studies [14, 31, 41-43].

2.7.2. Prolonged exposure experiments

The effect of prolonged exposure of silver catfish juveniles to the extracts was evaluated in order to observe possible adverse / toxic effects induced by the extracts in the fish, at the sedative concentrations of 30 mg/L and 100 mg/L, determined as described in the previous subitem. In this assay a total of 96 animals ($n = 8$) were used. Water and vehicle (95% ethanol at the highest concentration used for sample dilution) were used as negative controls, DZP (30 mg/L) and eugenol (30 mg/L) as positive controls. The juveniles were transferred individually to 1 L aquaria and exposed to 30 mg/L or 100 mg/L of extract and observed at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 hours. The degree of sedation of the animals was evaluated as described in the previous *in vivo* experiment. For each stage of sedation or anesthesia a score was assigned to the animal: normal behavior) 3; stage S2) 2; stage S3a) 1; stage S3b) 0.5; stage S4) 0. Therefore, the lower the score, the deeper the stage of sedation the animal was in. After 24 hours, the animals were reassembled in treatment-free aquaria to verify possible signs of toxicity.

2.7.3. Survival experiment / *In vivo* antibacterial activity

After acclimation, silver catfish ($N = 72$, 4 per group, in triplicate) were divided into 18 plastic boxes, with 20 L of water each. The experiments were conducted following the methodology of Sutuli et al. [16], with modifications. The animals were divided into two groups: infected and non-infected (control groups). Infected animals received an intramuscular injection of 60 μL of inoculum containing *A. hydrophila* (strain 18), 1.5×10^9 CFU; 1.2 OD 600 nm, and untreated animals received an

intramuscular injection of 60 μ L of sterile saline solution on the right latero-dorsal side. The groups were: saline control (SALC: juveniles injected with saline and submitted to bath only in water), inoculum control (IC: juveniles injected with inoculum and submitted to bath only in water), florfenicol control (FLC: juveniles injected with saline and submitted to bath in florfenicol 40 mg/L), HE control (HEC: juveniles injected with saline and submitted to HE 30 mg/L bath), florfenicol treatment (IFL: juveniles injected with inoculum and exposed to 40 mg/L florfenicol), HE treatment (IHE: juveniles injected with inoculum and exposed to 30 mg/L HE). Treatment with HE 30 mg/L was chosen based on the results of *in vitro* antimicrobial activity tests, CNS depressant activity, and prolonged exposure. Five hours after inoculation the animals were exposed to a single bath with the treatments. In this experiment, HE was solubilized in 70% ethanol before addition to the baths. The next day 20% (4 L) of the water in each aquarium was removed and another 20% of water was replaced, after its acclimatization in 250 L aquariums. This procedure was carried out for five days in order to mimic what occurs in local fish farms. Mortality was evaluated for five days.

2.8. Chromatographic analysis

The HE sample was analyzed by HPLC-DAD-MS. The instrument consists of a Shimadzu model Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) sequentially coupled to a SPD-M20A diode-array UV-VIS detector and a QTOF Compact mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) controlled by OtofControl software. The optimized ESI-MS parameters were: capillary tension, 4500 V; drying gas temperature 215°C; drying gas flow 10.0 L/min; fogging gas pressure 5.0 bar; RF collision, 150 Vpp; transfer time, 70 Is, pre-pulse storage, 5 Is and collision energy m/z 100, 20 eV; m/z 500; 30 eV; m/z 1000; 35 eV using nitrogen as collision gas. Data processing was performed with Data Analysis software 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The analyzes were performed on C-18 column (4.6 x 250 mm) with particle size of 5 μ M diameter and pre-column C-18. The mobile phase consisted of A: 2% acetic acid (pH 4.2) and B: methanol: acetic acid: ultrapure water in the ratio of 18: 1: 1, following the gradient elution: 0 min: 20% B; 0-25 min: 50% B; 25-30 min: 20% B, at a flow rate of 0.8 ml/min. Peaks were identified by comparing their retention time and mass spectrum with the apparatus database, external standards and data published in the literature. The analysis was performed in triplicate.

2.9. Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SEM. Data from the central depressant activity and long exposure were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. Survival assay data were analyzed by the Kaplan-Meier survival analysis with the Log-rank test. Statistical analysis were performed using program GraphPad Prism[®] version 6.01.

3. Results

3.1. *In vitro* antimicrobial activity

The HE presented the lowest MIC and MBC against the six strains analyzed, compared to the evaluated extracts obtained from the other plant organs (LE, BE, SE). MIC ranged from 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and MBC ranged from 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 6400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for HE. The strains 13 (*A. hydrophila*) and *A. veronii* were the most susceptible to this extract (MIC of 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBC of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for both), where as strains of *A. hydrophila* ATCC 7966, 18 and 169/07 showed intermediary susceptibility (MIC of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBC of 800 and 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Leaf extract did not present antimicrobial activity at the tested concentrations against the analyzed strains. The samples BE and SE showed weak antimicrobial activity with MICs and MBCs ranging from 6400 to > 6400 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The antibiotic florfenicol presented MICs ranging from 0.253 for *A. veronii* to 0.507 for isolates 13 and 18 of *A. hydrophila*, and ATCC. MIC of the antibiotic against *E. coli* ATCC 25922, quality standard, was 8.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 1).

Table 1

In vitro antimicrobial activity of extracts from leaves (LE), bark (BE), sapwood (SE) and heartwood (HE) of *Maclura tinctoria*. Strains 13, 18, 169/07: clinical isolates of *Aeromonas hydrophila*

SAMPLES	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						MBC ($\mu\text{g/mL}$)					
	ATCC A. <i>hydrophila</i>	ATCC <i>E. coli</i>	13	18	169/07	<i>Aeromonas</i> <i>veronii</i>	ATCC A. <i>hydrophila</i>	ATCC <i>E. coli</i>	13	18	169/07	<i>Aeromonas</i> <i>veronii</i>
Florfenicol [®]	0.507	8.125	0.507	0.507	1.015	0.253	0.507	4.062	0.507	0.507	1.015	0.253
LE	>6400	>6400	>6400	>6400	>6400	>6400	>6400	>6400	>6400	>6400	>6400	>6400
BE	6400	>6400	6400	6400	>6400	6400	>6400	>6400	6400	6400	>6400	>6400
SE	6400	>6400	6400	6400	>6400	6400	6400	>6400	6400	6400	>6400	6400
HE	800	1600	400	800	800	400	800	6400	800	1600	1600	800

3.2. Extractive yield

Among the extracts, the leaves showed the highest extractive yield (18.90 g%), followed by the heartwood (13.44 g%), bark (9.68 g%), and sapwood (2.91 g%), respectively.

3.3. Central Nervous System depressant activity

The objective of this assay was to verify the degree of sedation induced by extracts of *M. tinctoria*, for later *in vivo* antimicrobial experiments. In the sedation stage S2 all samples presented an induction profile similar to the DZP control (induction time 51s), except HE and BE at the concentrations of 30 and 300 mg/L respectively. At the concentration of 30 mg/L the HE presented significantly longer induction time than LE, BE, and SE, but there was no statistical difference between the extracts at the concentration of 100 mg/L. At the concentration of 300 mg/L the induction time of BE was higher than that of SE.

The sedation stage S3a was reached by LE at 30, 100 and 300 mg / L and by SE at the concentration of 300 mg/L. The other samples did not reach stage S3a at the total observation time (30 minutes). The extracts that reached stage S3a presented an induction profile similar to DZP. The SE at the concentration of 300 mg/L presented significantly longer induction time compared eugenol. The S3b stage was reached only by the animals exposed to LE at the concentration of 300 mg/L, with no statistical difference with eugenol.

The recovery time of fish exposed to LE at 300 mg/L did not present statistical difference in comparison to DZP and eugenol controls. The groups exposed to the other samples required less time to recover swimming movements compared to DZP and EUG. Animals exposed to vehicle (ethanol 30 mg/L) did not reach any stage of sedation up to the end of observation time (30 min) (Figure 1).

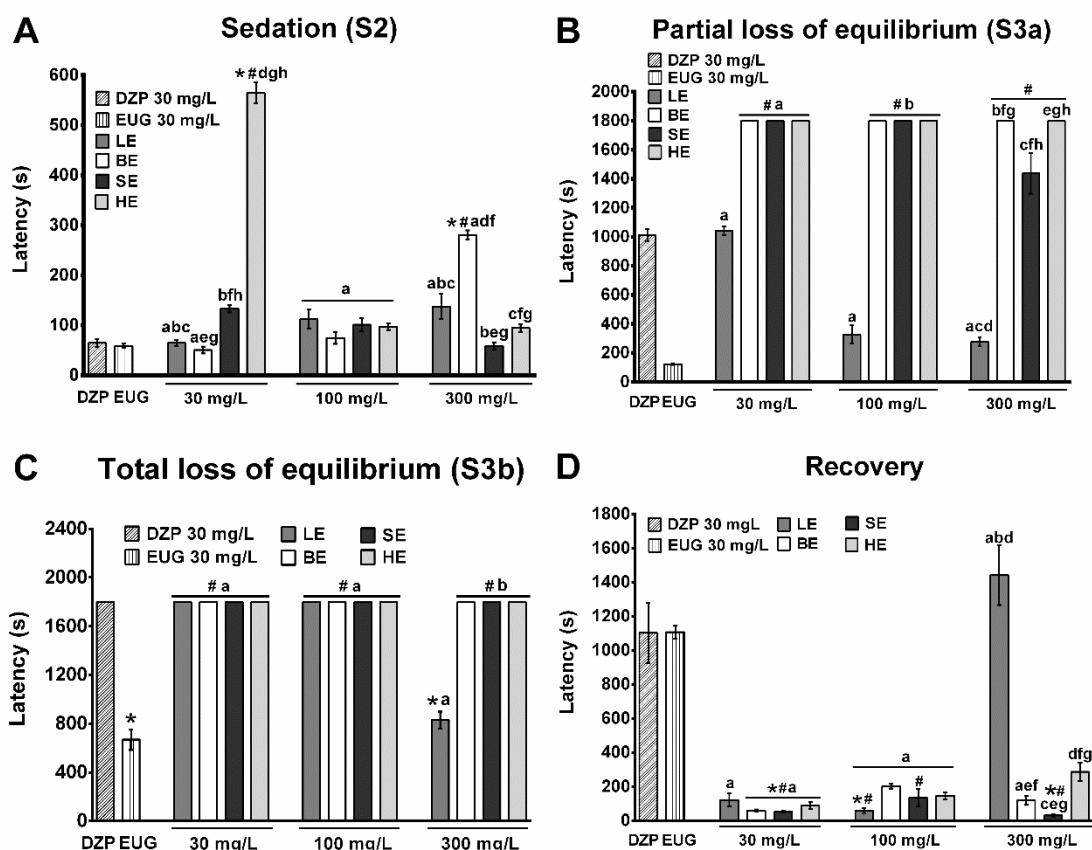


Figure 1 - *M. tinctoria* crude extracts induce sedation in silver catfish. Sedation levels are described as S2: light sedation; S3a: sedation with partial loss of equilibrium; S3b: sedation with total loss of equilibrium; Recovery: time spend for total sedation recovery, where the animal show normal behavior similar to those in water control. Different lowercase letters indicate significant difference between samples: Leaves (LE), bark (BE), sapwood (SE), and heartwood (HE) extracts, at each evaluated concentration ($p < 0.05$). * $p < 0.05$, statistical difference from diazepam (DZP); # $p < 0.05$ statistical difference from eugenol (EUG), Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test.

3.4. Prolonged exposure experiment

The animals submitted to 30 mg/L of BE, SE, and HE showed behavior similar to the vehicle (control) at all times of observation. Fish of these groups presented high scores, which means that through 24 h the animals reached the stage of light sedation or showed normal swimming behavior.

The animals submitted to LE at concentrations of 30 and 100 mg/L presented behavior similar to DZP, that is, fish presented a deepening of the sedation as time went by. Through the 24 hours of observation, animals reached deeper sedation stages (S3a and S3b) compared to the previous test, with a maximum duration of 30 min. Stage S5

(medullary collapse) was observed in some fish. Mortality was: LE_{30mg/L} 33%; LE_{100mg/L} 50%, and HE_{100mg/L} 67% (Figure 2).

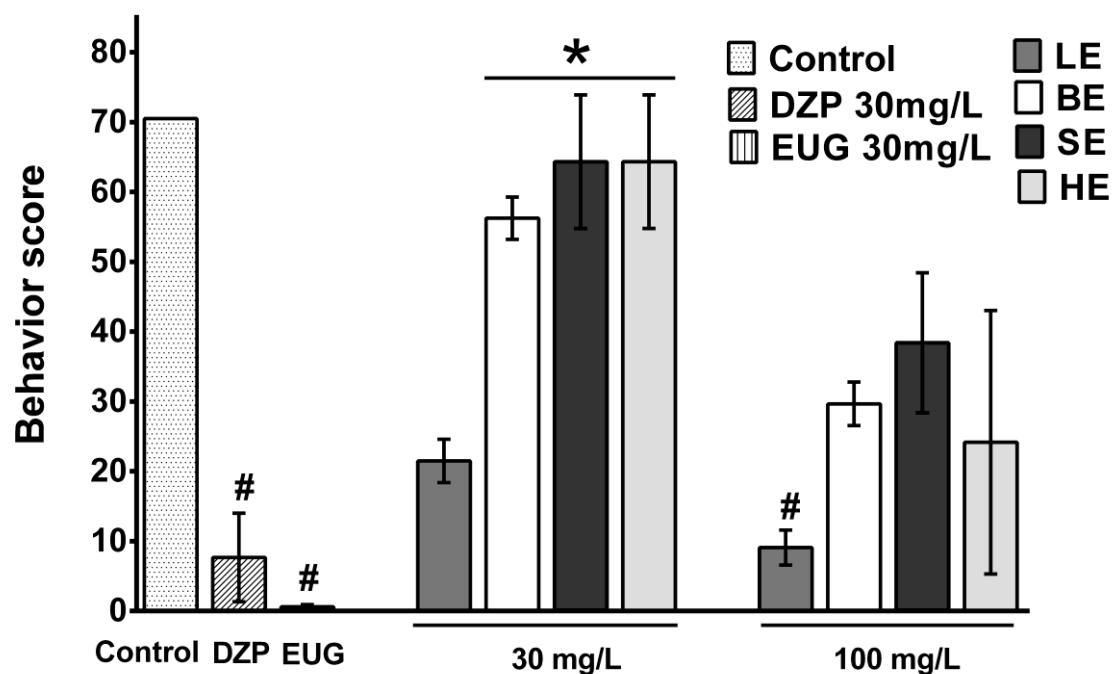


Figure 2 - Fish 24h-behavior under sedative bath with 30 mg/L or 100 mg/L *M. tinctoria* extracts. Behavior score was adapted from Heldwein et al. [42]. No significant difference were detected between extracts: LE (leaves), BE (bark), SE (sap-wood) and HE (heartwood) extracts, at the evaluated concentrations ($p < 0.05$). * $p < 0.05$, statistical difference from diazepam (DZP); # $p < 0.05$ statistical difference from control, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test.

3.5. Survival experiment / *In vivo* antibacterial activity

The non infected group (saline control- SALC) presented 76.4% survival, while the infected group (inoculum control - IC) had 6.9% survival at the end of the 5th day. Infected groups treated with antibiotic and HE presented 100% and 85.4% survival, respectively, with no statistical difference between them. Furthermore, the survival index of the HE-treated group was similar to the SALC group. The groups FLC and HEC presented 100% and 91.6% survival respectively (Figure 3).

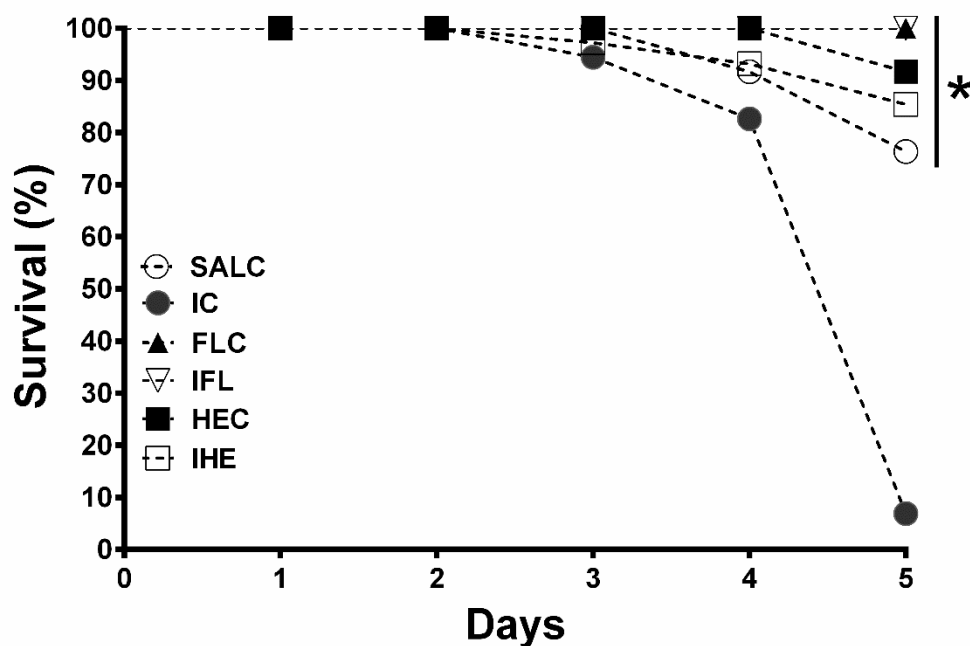


Figure 3 - Survival of silver catfish infected with *Aeromonas hydrophila*. SALC- uninfected untreated animals; IC-infected untreated animals; FLC: uninfected animals treated with florfenicol 40 mg/L; IFL: infected animals treated with florfenicol 40 mg/L; HEC: uninfected animals, treated with 30 mg/L heartwood extract; IHE: infected animals treated with the heartwood extract (30 mg/L). * $p < 0.05$ indicates statistical difference from the infected control, Kaplan-Meier survival analysis with Log-rank's test.

2.6. Chemical composition

The analysis of the chemical composition of *M. tinctoria* HE revealed the presence of compounds belonging to the polyphenols. Of the five identified compounds, five belong to the class of flavonoids, while one of them is a dimer of flavan-3-ol, classified as proanthocyanidin (Table 2).

Table 2

Major phytochemical compounds identified in the heartwood extract.

Peak n°	Rt (min)	Mw	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragment signals	Tentative assignment	Chemical classification	Reference
6	7.1	304	303	125	Taxifolin	Dihydroflavonol	[44]
19	9.5	594	593	303, 593, 285	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	Flavonol	[45]
33	13.9	576	287	125, 177, 211, 247, 287, 303, 417	Procyanidin dimer (type A) (Flavan-3-ol dimer)	Proanthocyanidin	[46]
38	15.0	448	447	447, 327, 285	Luteolin-6- <i>C</i> -glucoside (isoorientin)	Flavone	[45]
64	22.4	270	269	134, 135	Genistein	Isoflavone	Equipment Library

Rt: retention time; Mw: molecular mass; m/z: main mass of spectrum

4. Discussion

The results obtained for *M. tinctoria* ethanolic extracts in the *in vitro* tests evidenced antibacterial activity against important pathogens in fish culture. Previous studies had described the antimicrobial activity of extracts of the same plant species, such as Lamounier et al. [29], which described its *in vitro* activity against pathogens colonizers of the oral microbiota. There are also reports of the antimicrobial activity of extracts obtained from other plants of the family Moraceae [47-50]. Furthermore, the *in vitro* assay showed that HE had the most promising antibacterial activity according to the criteria established by Aligiannis et al. [51].

Studies performed with the isolated compound eugenol and the essential oils (EOs) from leaves of *Hesperozigis ringens* and *Ocimum americanum* against strains of *A. hydrophila* isolated from silver catfish detected equivalent MICs to eugenol and *H. ringens* EO (800 to 3200 µg/mL), and from 200 to 1600 µg/mL for *O. americanum* EO [15, 16]. The MIC obtained for HE (400 µg/mL for strain 13) is within the range described by Sutili et al. [15, 16] for *A. hydrophila* also isolated from *R. quelen*. Although both of these studies evaluated effects against *A. hydrophila*, they used different strains which frequently present distinct susceptibilities [52]. Meylan et al. [53] described that antimicrobial tolerance varies from pathogen to pathogen, and depends on the physiological conditions of each microorganism, that is, the degree of infection is also related to the immunological animal conditions. Another important point to consider is that the EOs from the studies of Sutili et al. [15, 16] and the extracts of the present study were obtained from different plant species. Therefore, to confirm the reproducibility of the assay performed, *E. coli* strain ATCC 25922 was used as the quality standard for the tests, presenting an MIC (8.125 µg/mL), which is within the established reliability standards for the antibiotic florfenicol (MIC between 2 and 16 µg/mL) [33].

The extracts yields found in the present study were considered satisfactory, due to the extractive process and the separation of the distinct plant organs, which causes loss of material. Radojkov et al. [54] obtained a yield of 23.40% for the ethanolic extract of the leaves of *Morus alba*, a species that belongs to the same family of *M. tinctoria*. The lower yield found in the present study may be supported by the processing conditions of the samples and because they are from different plant species [55]. The current study found superior yields than those from Lamounier et al. [29] for the ethanolic extracts of bark (1.49%) and wood (3.9%) of *M. tinctoria*, even with the separation of wood in sapwood and heartwood, a result

that characterizes the efficiency of the extractive process and the strategy chosen in the present study.

The CNS depressant activity assay revealed that BE, SE, and HE showed a sedation induction profile similar to each other, even though they were obtained from different plant organs. Only the LE sample at the concentration of 300 mg/L took the animals to the deep sedation stage (S3b). The fish submitted to the extracts present an light sedation induction profile (stage S2), characterized by the absence of reaction to external stimuli [40]. The methanolic extract of *Condalia buxifolia* (Rhamnaceae) presented an induction profile similar to that found for extracts of *M. tinctoria* [56]. Previous studies have demonstrated the depressant activity of extracts containing flavonoids on the Central Nervous System of different animals [57-59]. Flavone derivatives, such as luteolin-6-C-glucoside, detected in HE, are considered good ligands for the benzodiazepine site of the GABAA receptor [58]. The same authors describe the central depressant activity of a glycoside derived from kaempferol, also present in HE.

Concentrations above 300 mg/L could promote anesthesia in silver catfish submitted to LE. However, in the case of fish undergoing pharmacological treatments involving exposure for a long period, induction of anesthesia is not desired, since it could lead fish to the S5 stage of CNS depression [43]. The concentrations of 30 and 100 mg/L induced light sedation and were therefore chosen for the long exposure experiment. Plant extracts that provide the stage of light sedation are important in fish farming, in view of the need to control animal stress during simple procedures involving capture and handling [60]. Plant extractives capable of reducing the stress caused by routine procedures in breeding prevent the immune system's compromise as a result of this stress [13] and, consequently, decrease the number of bacterial infections and mortality in fish farming. According to Das et al. [61], the aqueous extract of *Ocimum sanctum* leaves stimulated the immunity of the fish and increased the resistance of *Labeo rohita* fingerlings against *A. hydrophila*.

Exposure of silver catfish to 30 mg/L *M. tinctoria* extracts for 24 h mimicked the sedative profile that had been previously detected in the central depression trials. Only the animals exposed to 100 mg/L of LE presented a deepening of the sedation stages, with behavior similar to that observed for DZP. The fish exposed to BE, SE, and HE 30 mg/L presented a behavior similar to the vehicle control after 30 min, while those submitted to BE, SE, and HE 100 mg/L only after 10h of exposure. Therefore, the results of the long exposure test indicated a greater safety of BE, SE, and HE at the concentration of 30 mg/L. Safety in the use of these extracts is indicated by the behavior of the animals through the 24 hours of

observation, which varied between normal and light sedation stages, producing no signs of toxicity or mortality. Silver catfish exposed for 6 h to the methanolic extract of the leaves of *C. buxifolia* at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{L/L}$ developed mild sedation and there was no deepening to the stage of anesthesia through the observation time [56]. This extract was considered safe for use as a sedative by the authors. The same was observed for the isolated compound of *Nectandra grandiflora* leaves EO, (+)-dehydrofuquinone, at the concentrations of 10 and 20 mg/L [43].

The results presented in the *in vitro* antimicrobial activity assay, central depressant activity, and long exposure experiments showed that HE at the concentration of 30 mg/L was the most suitable for the *in vivo* experiments with infected fish. This sample showed an *in vitro* promising antimicrobial activity, did not induce anesthesia, neither any signs of toxicity or mortality in the long exposure test. The strain selected as inoculum was strain 18 (*A. hydrophila*), because it showed moderate *in vitro* antimicrobial susceptibility and, therefore, characterized a greater challenge for the detection of the biological activity of the extract *in vivo*.

Eugenol (5 and 10 mg/L) and the EOs of leaves of *H. ringens* (20 and 40 mg/L) and *O. americanum* (20 mg/L) promoted 37, 66, 70, 66 and 75% survival of *A. hydrophila*-infected *R. quelen*, respectively [15, 16], similar to those obtained for HE of *M. tinctoria*. These three studies reinforce the satisfactory antimicrobial capacity of plant products, resulting in an increased survival rate of infected animals exposed to treatments with natural products.

The identification of the chemical composition of HE revealed the presence of compounds with antimicrobial activity, such as taxifolin [62], kaempferol-3-*O*-rutinoside [63], and isoflavone genistein [64, 65]. Polyphenolic compounds are widely studied because they show promising antimicrobial activity and, among them, flavan-3-ols, flavonols, and proanthocyanidins are the most researched because they present a broad spectrum of action and higher antimicrobial activity when compared with other polyphenols [66]. Flavonols, such as kaempferol-3-*O*-rutinoside and dihydroflavonois, such as taxifolin, exert their antimicrobial action through the inactivation of cell membrane proteins and also by suppression of virulence factors such as inhibition of biofilm formation, reduction of adhesion of host ligands, and neutralization of bacterial toxins [67]. Flavonols are compounds with a hydrophobic characteristic and are therefore capable of overcoming the phospholipid membranes of bacteria exerting their activity within the bacterial cell [68]. Proanthocyanidins in turn promote plasma membrane destabilization, enzyme inhibition, and may also block the substrates necessary for microbial growth [69]. On the other hand, the high survival rate

found in infected fish treated with HE may also be related to the immunostimulatory capacity reported for genistein [70]. One or more of these compounds may be responsible for the activity found for HE, acting synergistically and thereby promoting the survival of silver catfish.

5. Conclusion

The HE presented the most promising results of the extracts of *M. tinctoria* tested in the biological assays of the present study. A promising *in vitro* antibacterial activity, low sedative activity and absence of signs of toxicity in animals after 24 h exposure, characterized this extract in the preliminary tests. When evaluated by immersion at the concentration of 30 mg/L, this extract increased the survival of silver catfish experimentally infected with *A. hydrophila*. Thus, HE can be considered a safe and efficient agent for the treatment of bacterial infections caused by *A. hydrophila* in fish. Additionally, this extract can also be used to reduce animal stress during minor veterinary procedures that do not require anesthesia. However, additional studies are needed to determine its mechanisms of action as well as the concentrations to be used in other fish species.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) scholarships supported this research. Berta M. Heinzmann, Bernardo Baldisserotto and Agueda P.C de Vargas are recipients of CNPq fellowships (grant numbers 454447/2014-0, 301156/2012-3 and 310757/2016-9 respectively). Luana da C. Pires, Patrícia Rodrigues, Quelen I. Garlet, Bibiana P. da Silveira, Guerino Bandeira Jr. and Rodrigo Coldebella receive scholarships from CAPES. Financial support: FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul) PgG 02 / 2017 – 17/2551-0000914-2

REFERENCES

[1] FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of the World Fisheries and Aquaculture. Rome, 2014, p. 223.

- [2] B. Baldisserotto, Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro, *Ciência Rural*, Santa Maria. 39 (2009) 291–299.
- [3] S.R. Shakya, S.N. Labh, Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture, *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 2 (2014) 44-47.
- [4] S. Ghatak, J. Blom, S. Das, R. Sanjukta, K. Puro, M. Mawlong, I. Shakuntala, A. Sem, A. Goesmann, A. Kumar, S.V. Ngachan, Pan-genome analysis of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas caviae* indicates phylogenomic diversity and greater pathogenic potential for *Aeromonas hydrophila*, *Antonie van Leeuwenhoek*. 109 (2016) 945-956.
- [5] A. Kozinska, A. Pekala, Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile *Aeromonads* in fish, *The Cientific World Journal*. 2012 (2011) 1-9.
- [6] R.B. Hidalgo, M.J. Figueras, *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease, *Journal of Fish Diseases*. 36 (2013) 371-388.
- [7] I.K. Jahid, F.R. Mizan, A.J. Ha, S.D. Ha, Effect of salinity and incubation time of planktonic, and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila*, *Food Microbiology*. 49 (2015) 142-151.
- [8] R.E.F Abreu, T.C. Magalhães, R.C. Souza, S.T.L. Oliveira, A.M.G. Ibelli, F.N. Demarqui, J.J.S. Gouveia, M.M. Costa, G.V. Gouveia, Environmental factors on virulence of *Aeromonas hydrophila*, *Aquaculture International*. 26 (2017) 495-507.
- [9] J. Bebak, B. Wagner, B. Burnes, T. Hanson, Farm size, seining practices, and salt use: risk factors for *Aeromonas hydrophila* outbreaks in farm-raised catfish, Alabama, USA, *Preventive Veterinary Medicine*. 118 (2015) 161-168.
- [10] P.H. Serrano, Responsible use of antibiotics in aquaculture, in: *FAO Fisheries technical paper 469* (Rome; United Nations); Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2005, p. 89.
- [11] A.A. Adegoke, A.C. Faleye, G. Singh, T.A. Stenström, Antibiotic resistant superbugs: assessment of the interrelationship of occurrence in clinical settings and environmental niches, *Molecules*. 22 (2016).
- [12] Y. Den, Y. Wu, L. Jiang, A. Tan, R. Zhang, L. Luo, Multi-drug resistance mediated by class 1 integrons in *Aeromonas* isolated from farmed freshwater animals, *Frontiers in Microbiology*. 7 (2016).
- [13] T. Citarasu, Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry, *Aquaculture International*. 18 (2010) 403-414.
- [14] L.L. Silva, L.S. Balconi, L.T. Gressler, Q.I. Garlet, F.J. Sutili, A.P.C. Vargas, B. Baldisserotto, A.F. Morel, B.M. Heinzmann, S-(+)- and R-(-)-linalool: a comparison of the *in*

in vitro anti-*Aeromonas hydrophila* activity and anesthetic properties in fish, Anais da Academia Brasileira de Ciências. 89 (2017) 203-212.

[15] F.J. Sutili, L.C. Kreutz, M. Noro, L.T. Gressler, B.M. Heinzmann, A.C. Vargas, B. Baldisserotto, The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*), Veterinary Immunology and Immunopathology. 157 (2014) 142-148.

[16] F.J. Sutili, L.L. Silva, L.T. Gressler, L.T. Gressler, E.K. Battisti, B.M. Heinzmann, A.P.C. Vargas, B. Baldisserotto, Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish, Journal of Applied Microbiology. 119 (2015) 47-54.

[17] M.J.R. Vaquero, L.R.T. Serravalle, M.C.M. Nabraab, Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions, Food Control. 21 (2010) 779-785.

[18] P.E.R. Carvalho, Espécies Arbóreas Brasileiras, Curitiba, Embrapa Florestas, 2003.

[19] T.W. Wu, L.H. Zeng, J. Wu, K.P. Fung, Morin: a wood pigment that protects three types of human cells in the cardiovascular system against oxyradical damage, Biochemical Pharmacology. 47 (1994) 1099-1103.

[20] A. Groweiss, J.H. Cardellina, M.R. Boyd, HIV-Inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*, Journal of Natural Products. 63 (2000) 1537-1539.

[21] E. Kupeli, I. Orhan, G. Toker, E. Yesilada, Anti-inflammatory and antinoceptive potential of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids, scandenone and auriculasin, Journal of Ethnopharmacology. 107 (2006) 169-174.

[22] R. Ramadass, S. Kombiyil, N.K. Kasinathan, N.D. Sivasithamparam, Attenuation of mitochondrial oxidative stress by morin during chemical carcinogen-mediated mammary carcinogenesis, Biomedicine and Preventive Nutrition. 2 (2012) 9-15.

[23] K. Sinha, P. Sadhukhan, S. Saha, P.B. Pal, P.C. Sil, Morin protects gastric mucosa from nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin induced inflammatory damage and apoptosis by modulating NF- κ β pathway, Biochimica et Biophysica Acta. 1850 (2015) 769-783.

[24] H.N. Elsohly, A.S. Joshi, A.C. Nimrod, L.A. Walker, A.M. Clark, Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*, Planta Médica. 67 (2001) 87-89.

[25] G. Cioffi, E.L. Morales, A. Braca, N. Tommasi, Antioxidant chalcone glycosides and flavanones from *Maclura* (*Chlophora*) *tinctoria*, Journal of Natural Products. 66 (2003) 1061-1064.

[26] A. Pott, V.J. Pott, Plantas do Pantanal, Brasília, Embrapa, 1994.

- [27] M.R. Duarte, J.B. Gomes, R.H. Santos, M. Yano, Leaf microscopic characters of *Maclura tinctoria* (L.) D. DON EX STEUD., Moraceae, Visão Acadêmica, Curitiba. 13 (2012) 4-15.
- [28] A.I. Calderon, C.K. Angerhof, J.M. Pezzuto, N.R. Farnsworth, R. Foster, R. Condit, M.P. Gupta, D.D. Soejarto, Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of a plants in a tropical forest of Panamá, Economic Botany. 54 (2000) 278-294.
- [29] K.C. Lamounier, L.C.S. Cunha, S.A.L. Morais, F.J.T. Aquino, R. Ghang, E.A. Nascimento, M.G.M. Souza, C.H.G. Martins, W.R. Cunha, Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity, and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud, Hindawi Publishing Corporation. 2012 (2012) 1-7.
- [30] M.A. Cunha, F.M.C. Barros, L.O. Garcia, A.P.L. Veeck, B.M. Heinzmann, V.L. Loro, T. Emanuelli, B. Baldisserotto, Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*, Aquaculture. 306 (2010) 403-406.
- [31] S.C. Benovit, L.L. Silva, J. Salbego, V.L. Loro, C.A. Mallmann, B. Baldisserotto, E.M.M. Flores, B.M. Heinzmann, Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*, Anais da Academia Brasileira de Ciências. 87 (2015) 1675-1689.
- [32] ANVISA, Farmacopéia Brasileira, five ed., Brasília: ANVISA, 2010.
- [33] CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Second Informational Supplement. CLSI document VET03/VET04-S2, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
- [34] G. Bandeira Júnior, T.S. Pês, E.M.H. Saccol, F.J. Sutili, W.Rossi Júnior, A.L. Murari, B.M. Heinzmann, M.A. Pavanato, A.C. de Vargas, L.L. Silva, B. Baldisserotto, Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture, Industrial Crops and Products. 97 (2017) 484-491.
- [35] P.J. Quin, 1994. *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Vibrio* species, in: P.J. Quin, M.E. Carter, B.K. Markey, G.R. Carter, (Eds.), Clinical Veterinary Microbiology, Wolfe Publishing, London, UK, pp. 243-253.
- [36] D.N. Fredricks, D.A. Relaman, Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate, Journal of Clinical Microbiology. 36 (1996) 2810-2816.
- [37] R. Staden, K.F. Beal, J.K. Bonfield, The staden package, 1998, Methods in Molecular Biology. 132 (2000) 115-130.
- [38] H. Verdouw, C.J.A. Van Echteld, E.M.J. Dekkers, Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate, Water Research. 12 (1978) 399-402.
- [39] CLSI, Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document VET04-A2, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

- [40] D.P. Gomes, B.W. Chaves, A.G. Becker, B. Baldisserotto, Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*, *Aquaculture Research*. 42 (2011) 878-886.
- [41] L.L. Silva, Q.I. Garlet, S.C. Benovit, G. Dolci, C.A. Mallmann, M.E. Burger, B. Baldisserotto, S.J. Longhi, B.M. Heizmann, Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 46 (2013) 771-779.
- [42] C.G. Heldwein, L.L. Silva, E.Z. Gai, C. Roman, T.V. Parodi, M.E. Burger, B. Baldisserotto, E.M.M. Flores, B.M. Heinzmann, S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 41 (2014) 621-629.
- [43] Q.I. Garlet, L.C. Pires, D.T. Silva, S. Spall, L.T. Gressler, M.E. Burger, B. Baldisserotto, B.M. Heinzmann, Effect of (+) – dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 49 (2016) 1-9.
- [44] B. Yuan, M. Lu, K.M. Eskridg, L.D. Isom, M.A. Hanna, Extraction, identification, and quantification of antioxidant phenolics from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells, *Food Chemistry*. 244 (2018) 7-15.
- [45] F. Sánchez-Rabaneda, O. Jáuregui, I. Casals, C. Andrés-Lacueva, M. Izquierdo-Pulido, R.M. Lamuela-Raventus, Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*), *Journal of Mass Spectrometry*. 38 (2003) 35-42.
- [46] L.M. Bystrom, B.A. Lewis, D.L. Brown, E. Rodriguez, R.L. Obendorf, Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits, *Food Chemistry*. 111 (2008) 1017-1024.
- [47] S. Mawa, K. Husain, I. Jantan, *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, traditional uses and biological activities, Hindawi Publishing Corporation. 2013 (2013) 1-8.
- [48] L. Pethakamsetty, S. Ganapaty, K.M. Bharathi, Phytochemical and antimicrobial examination of the root extracts of *Morus indica*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 21 (2013) 75-80.
- [49] F. Hussain, Z. Rana, H. Shafique, Z. Hussain, Phytopharmacological potential of different species of *Morus alba* and their bioactive phitochemicals: a review, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7 (2017) 950-956.
- [50] J.E.M. Teinkela, X.S. Noundou, S. Fannang, F. Meyer, J.C. Vardamides, E. Mpondo Mpondo, R.W.M. Krause, A.G.B. Azebaze, J.C.A. Nguedia, *In vitro* antimicrobial activity of the methanol extract and compounds from de wood of *Ficus elastica* Roxb. Ex Hornem aerial roots, *South African Journal of Botany*. 111 (2017) 302-306.
- [51] N. Aligiannis, E. Kalpoutzakis, S. Mitaku, I.B. Chinou, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (2001) 4168-4170.

- [52] L. Radlinski, B.P. Conlon, Antibiotic efficacy in the complex infection environment, *Current Opinion in Microbiology*. 42 (2018) 19-24.
- [53] S. Meylan, I.W. Andrews, J.J. Collins, Targeting antibiotic tolerance, pathogen by phathogen, *Cell*. 172 (2018) 1228-1238.
- [54] M.M. Radojkovic, Z.P. Zekovic, S.S. Vidovic, D.D. Kocar, P.Z. Maskovic, Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoids contents of mulberry (*Morus spp. L.*, Moraceae) extracts, *Hemijaska industrija*. 4 (2012) 547-552.
- [55] T. Balwal, S.M. Ezzat, L. Rastrelli, I.D. Bhatt, M. Daglia, A. Baldi, H.P. Devkota, I.E. Orhan, J.K. Patra, G. Das, C. Anandharamakrishnan, L.G. Gomez, S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, A.G. Atanasov, A critical analisys of extraction techniques used for botanicals: trends, priorities, industrial uses and optimization strategies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 100 (2018) 82-102.
- [56] A.G. Becker, M.A. Cunha, L.O. Garcia, C.C. Zeppenfeld, T.V. Parodi, G. maldaner, A.F. Morel, B. Baldisserotto, Efficacy of engenol and methanolic extract of *Condalia buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhandia quelen*, *Neotropical Ichthyology*. 11 (2013) 675-681.
- [57] A.C. Gazola, G.M. Costa, L. Castellanos, F.A. Ramos, F.H. Reginato, T.C.M. Lima, E.P. Schenkel, Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp, *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 25 (2015) 1-6.
- [58] M.L. Loscalzo, C. Wasowski, M. Marder, Neuroactive flavonoid glycosides from *Tilia petiolaris* DC. Extracts, *Phytotherapy Research*. 23 (2009) 1453-1457.
- [59] A.K. Jäger, L. Saaby, Flavonoids and the CNS, *Molecules*. 16 (2011) 1471-1485.
- [60] L.G. Roos, B. Ross, Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, Oxford: Blackwell Science three ed. 2008.
- [61] R. Das, R.P. Raman, H. Saha, R. Sinh, Effect of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) extract on the immunity and survival of *Labeo rohita* (Hamilton) infectes with *Aeromonas hydrophila*, *Aquaculture Research*. 46 (2015) 1111-1121.
- [62] Y.S.F. Fongang, J.J.K. Bankeu, M.S. Ali, A.F. Awantu, A. Zeeshan, C.N. ASSOBA, L. Mehreen, B.N. Lenta, S.A. Ngouela, E. Tsamo, Flavonoids and other bioactive constituents from *Ficus thonningii* Blume (Moraceae), *Phytochemistry Letters*. 831 (2014) 1-7.
- [63] G. Bisignano, R. Sanogo, A. Marino, R. Aquino, V. D'Angelo, M.P. Germano, R. De Pasquale, C. Pizza, Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents, *Letters in Applied Microbiology*. 30 (2000) 105-108.
- [64] T. Wang, Y. Liu, X. Li, Q. Xu, Y. Feng, S. Yang, Isoflavones from green vegetable soya beans and their antimicrobial and antioxidant activities, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98 (2017) 2043-2047.

- [65] H. Choi, J.S. Park, K.M. Kim, M.S. Kim, K.W. Ko, C.G. Hyun, J.W. Ahn, J.H. Seo, S.Y. Kim, Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 63 (2018) 255-261.
- [66] M. Daglia, Polyphenols as antimicrobial agents, *Current opinion by Biotechnology*. 23 (2012) 174-181.
- [67] R. Barbieri, E. Coppo, A. Marchese, M. Daglia, E. Sobarzo-Sánchez, S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, Phytochemicals for human disease: an update on plant-derived compounds antibacterial activity, *Microbiological Research*. 196 (2017) 44-68.
- [68] A.B. Hendrich, Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds, *Acta Pharmacologica Sinica*. 27 (2006) 27-40.
- [69] R.A. Dixon, D.Y. Xie, S.B. Sharma, Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*. 165 (2005) 9-28.
- [70] A. Gaur, A.L. Bathia, Genistein: a multipurpose isoflavone, *International Journal of Green Pharmacy*. 3 (2009) 176-183.

3 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nessa dissertação comprovaram o potencial biológico da espécie *Maclura tinctoria* para a utilização dos extratos em piscicultura. Dentre as principais conclusões destacam-se as mencionadas a seguir:

- I) O extrato das folhas obteve o melhor rendimento extrativo (18,9 g%) seguido do cerne (13,44 g%), casca (9,68 g%) e alburno (2,91 g%);
- II) O extrato bruto do cerne foi a amostra com melhor atividade antimicrobiana *in vitro* (CIMs 400 e 800 µg/mL) frente a cepas de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas veronii* (CIMs 400 µg/mL) apresentando promissora atividade antimicrobiana;
- III) Os jundiás expostos aos extratos de *M. tinctoria* apresentaram um perfil de sedação leve (S2), com exceção do EFO 300 mg/L, que induziu nos animais estágio S3b;
- IV) O ensaio de longa exposição revelou a toxicidade dos extratos das folhas nas concentrações de 30 e 100 mg/L e do cerne em 100 mg/L;
- V) O extrato do cerne 30 mg/L foi o escolhido para o ensaio de sobrevivência demonstrando ser altamente eficiente no combate à mortalidade (85,4% de sobrevivência) ocasionada pela infecção bacteriana por *Aeromonas hydrophila*, não apresentando diferença estatística do florfenicol (100% de sobrevivência);
- VI) A análise da composição química revelou a presença de compostos da classe dos polifenóis, especialmente flavonoides, com reconhecida atividade antimicrobiana.

REFERENCIAS

- ABREU, R. E. F. et al. Environmental factors on virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture International**, v. 26, n. 4, p. 495-507, 2017.
- ADAM, Z.; KHAMIS, S.; ISMAIL A.; HAMID, M. *Ficus deltoidea*: A potential alternative medicine for diabetes mellitus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p.1-12, 2012.
- ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. O. Hyperglycaemic effect of *Artocarpus communis* Forst (Moraceae) root bark aqueous extract in wistar rats. **The Cardiovascular Journal Africa**, v. 18, n. 4, p. 221-7, 2007.
- ADEWOLE, S. O. et al. Hypoglycaemic and hypotensive effects of *Ficus exasperata* Vahl. (Moraceae) leaf aqueous extract in rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 3, p. 275-83. 2011.
- ALEXANDER, C. P.; KIRUBAKARAN, C. J. W.; MICHAEL, R. D. Water soluble fraction of *Tinospora cordifolia* leaves enhanced the non-specific immune mechanisms and disease resistance in *Oreochromis mossambicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 5, p. 765-772, 2010.
- ALVES, E. O. et al. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 651-658, 2008.
- BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- AKINBOWALE, O. L. et al. Antibiotic and heavy metal resistance in motile *Aeromonads* and *Pseudomonads* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 2, p. 177-182, 2007
- BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291 – 299, 2009.
- BANDEIRA JÚNIOR, G., et al. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 484 - 491, 2017.
- BARBAS, L. A. L. et al. Jambu, *Spilanthes acmella* as a novel anaesthetic for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*: Secondary stress responses during recovery. **Aquaculture**, v. 456, p. 70-75, 2016.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 355-363, 2008.
- BATTISTI, E. K. et al. Growth and oxidative parameters of *Rhamdia quelen* fed dietary levels of vitamin A. **Aquaculture**, v. 474, p. 11-17, 2017.

- BALESTRIN, L. et al. Contribution to the phytochemical study of *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) with approach in antioxidant activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 230-235, 2008.
- BECKER, A. G. et al. Efficacy of engenol and methanolic extract of *Condalia buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 675-681, 2013.
- BHARANI, S. E. et al. Immunomodulatory activity of methanolic extract of *Morus alba* Linn. (mulberry) leaves. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 63-8, 2010.
- BHASKARA, R. R. et al. Glucose lowering efficacy of *Ficus racemosa* bark extract in normal and alloxan diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 6, p. 590-2, 2002.
- BATTILANI, J. L.; SANTIAGO, E. F.; SOUZA, A. L. T. Morfologia de frutos, sementes e desenvolvimento de plântulas e plantas jovens de *Maclura tinctoria* (L.) D. Don. Ex Steund. (Moraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 581-589, 2006.
- BENOVIT, S. C. et al. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1675-1689, 2015.
- BYSTROM, L. M., et al. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 1017-1024, 2008.
- BORGES, J. et al. Evaluation of antibacterial activity of the bark and leaf extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trécul against multidrug resistant strains. **Natural Product Research**, v. 31, n. 24, p. 2931-2935, 2017.
- BOIJINK, C. L., BRANDÃO, D. A. Inoculation with *Aeromonas hydrophila* bacteria and the survival of juvenile jundiá, *Rhamdia quelen* (*Teleostei: pimelodida*). **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 503-507, 2001.
- BOWKER, J. D.; CARTY, D.; BOWMAN, M. P. The safety of Aquaflo (50% Florfenicol) administered in feed to fingerling yellow perch. **North American Journal of Aquaculture**, v. 75, p. 517-523, 2013.
- BUENO, N. R. et al. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 39-44, 2005.
- CAGNO V. et al. *Ficus religiosa* L. bark extracts inhibit human rhinovirus and respiratory syncytial virus infection *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 176, p. 252-7. 2015.
- CALDERON, A. I. et al. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a tropical forest of Panamá. **Economic Botany**, v. 54, n. 3, p. 278-294, 2000.

- CARRASCHI, S. P. et al. Efficacy of the florfenicol and of the oxytetracycline in the control in *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 579-583, 2011.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Curitiba, Embrapa Florestas, 2003. 637 p.
- CAVALCANTE, G. M. et al. Atividade antimicrobiana de *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) sobre o desenvolvimento de *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Plena**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2013.
- CHAKRABORTY, S. B.; HANCZ, C. Application of phytochemicals of immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Reviews in Aquacultures**, v. 3, p. 103-119, 2011.
- CHINDO, B. A. et al. Behavioral and anticonvulsant effects of the standardized extract of *Ficus platyphylla* stem bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 351-60, 2014.
- CHUAH, L. O. et al. Antibiotic application and emergence of multiple antibiotic resistance (MAR) in global catfish aquaculture. **Current Environmental Health Reports**, v. 3, n. 2, p. 118-127, 2016.
- CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**, v. 18, p. 403-414, 2010.
- CLSI. 2014a. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Second Informational Supplement. **CLSI document VET03/VET04-S2**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2014b. Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline-Second Edition. **CLSI document VET04-A2**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- COSTA, M. M. et al. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 477 - 480, 2008.
- CREPALDI, D. V. et al. A situação da aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3-4, p. 81-85, 2006.
- CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 403-406, 2010.
- DAS, R. et al. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) extract on the immunity and survival of *Labeo rohita* (Hamilton) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 1111-1121, 2015.
- DIAS, M. T. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 693-698, 2002.

DUARTE, M. R. et al. Caracteres microscópicos de folha de *Maclura tinctoria* (L.) D. ex Steund., Moraceae. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 13, n. 4, p. 4-15, 2012.

ELSOHLY, H. N. et al. Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. **Planta Medica**, v. 67, p. 87-89, 2001.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. L. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Charadidae). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of the World Fisheries and Aquaculture**. Rome. 2016.

FERREIRA, C.S.G. et al. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 452-458, 2007.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 08-14, 2008.

FRACALOSSO, D. M., et al. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum (Animal Sciences)**, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

FREDRICKS, D. N., RELAMAN, D. A. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2810-2816, 1998.

GARLET, Q.I. et al. Effect of (+) – dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2016.

GAZOLA, A. C. et al. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 1-6, 2015.

GOMES, L. C. et al. Biologia do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GOMES, D. P. et al. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 6, p. 878-886, 2011.

GORDON, L. et al. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1167-1176, 2006.

GROWEISS, A.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. HIV-Inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1537-1539, 2000.

- HAKKINEN, S. H. et al. HPLC Method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 543-551, 1998.
- HELDWEIN, C.G. et al. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, n. 6, p. 621–629, 2014.
- HELDWEIN C. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.45, n. 5, p. 436-443, 2012.
- HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1591-1598, 1992.
- HIDALGO, R. B., FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. Whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p. 371-388, 2013.
- HOSSAIN, M. B. et al. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10576-10581, 2010.
- IRUDAYARAJ, S. S. et al. Protective effects of *Ficus carica* leaves on glucose and lipids levels, carbohydrate metabolism enzymes and β -cells in type 2 diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1074–1081, 2017.
- JAHID, I.K. et al. Effect of salinity and incubation time of planktonic, and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila*. **Food Microbiology**, v. 49, p. 142-151, 2015.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.
- JAYASINGHE, L. et al. Geranyl chalcone derivatives with antifungal and radical scavenging properties from the leaves of *Artocarpus nobilis*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 9, p. 1287-90, 2004.
- KOŁODZIEJSKA, M. et al. Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. **Chemosphere**, v. 92, n. 9, p. 1253-1259, 2013.
- KOZINSKA, A., PEKALA, A. Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile *Aeromonads* in fish. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-9, 2011.
- KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 556-561, 2009.
- KUETE, V. et al., Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 6, p. 2-6, 2011.

LAMOUNIER, K. C. **Estudo dos polifenóis, atividade antioxidante e antimicrobiana da madeira e casca de *Maclura tinctoria* (L.) D. Don. Ex Steud.** 2010. 105 p. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, SP, 2010.

LAMOUNIER, K. C. et al. Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity, and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

LIAO, S. G. et al. Rapid screening and identification of caffeic acid and its esters in *Erigeron breviscapus* by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 17, p. 2533-2541, 2010.

LIMBU, S. M. et al. Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk. **Environment International**, v. 115, p. 205-219, 2018.

LIN, L. Z. et al. Comparison of the phenolic component profiles of skullcap (*Scutellaria lateriflora*) and germander (*Teucrium canadense* and *T. chamaedrys*), a potentially hepatotoxic adulterant. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 4, p. 298-306, 2009.

LOSI, G. et al. Apigenin modulates GABAergic and glutamatergic transmission in cultured cortical neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 502, p. 41-46, 2004.

MACHADO, A. A. et al. Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline antibiotic for tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Daphnia magna*, and *Lemna minor*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1244-1250, 2016.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MEYLAN, S., ANDREWS, I. W., COLLINS, J. J. Targeting antibiotic tolerance, phatogen by phathogen. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1228-1238, 2018.

MGOVINDARAJAN, G. et al. Mosquito larvicidal properties of *Ficus benghalensis* L. (Family: Moraceae) against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 7, p. 505-509, 2011.

MILUTINOVIĆ, A. et al. Methanol extracts of 28 *Hieracium* species from the Balkan Peninsula – comparative LC–MS analysis, chemosystematic evaluation of their flavonoid and phenolic acid profiles and antioxidant potentials. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 1, p. 30-47. 2017.

MONTANHA, P. F. Características fisiológicas e reprodutivas do *Rhamdia quelen*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 17, 2011.

NADIMPALLI, M. et al. Combating global antibiotic resistance: emerging one health concerns in lower- and middle-income countries. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 6, p. 963-969, 2018.

NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTE, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 519-525, 2002.

OH, N. et al. Anti-inflammatory properties of *Morus bombycis* Koidzumi via inhibiting IFN- β signaling and NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 424-428, 2015.

OLIVEIRA, A. Peixes de água doce do Brasil - Jundiá (*Rhamdia quelen*). 2013 Disponível em: <https://www.cpt.com.br/artigos/peixes-de-agua-doce-do-brasil-jundia-rhamdia-quelen>. Acesso em 11 de maio de 2018.

OLIVEIRA, A. M. et al. Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L. (Moraceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

OLIVEIRA, A. M. et al. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n. 24, p. 162-168, 2016.

PANTHONG, K. et al. Prenylated flavone from roots of a hybrid between *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus integer* and its biological activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 10, p. 1656-1661, 2013.

PARODI, T. V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L' Hérít) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 283-292, 2013.

PEDERNEIRAS, L. C. *Maclura* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10186>>. Acesso em 24 abril de 2018.

PEREIRA, C. B. et al. Atividade Anti-inflamatória e avaliação da toxicidade do extrato hidroetanólico de *Morus alba* (Moraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 133-137, 2013.

PÊS, T. S. et al. Effect of diets enriched with rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology Biochemistry**, v. 42, p. 321-333, 2016.

PHUONG, L. M. et al. Recovery of blood gases and haematological parameters upon anaesthesia with benzocaine, MS-222 or Aqui-S in the air-breathing catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. **Ichthyological Research**, v. 64, n. 1, p. 84-92, 2016.

- PLAZONIC, A. et al. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpus* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2466-2490, 2009.
- POPOVIC, N. T. et al. Tricaine methane sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, p. 1-12, 2012.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília, Embrapa, 1994. 320 p.
- POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2006.
- QUERALT, A. V. et al. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. **Food Chemistry**, v. 154, n. 1, p. 299-307, 2014.
- QUINN, P. J. et al. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, London, p. 137-143, 1994.
- QUINN P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, London. 330p., 2004.
- RATNASOORIYA, W. D; JAYAKODY, J. R; NADARAJAH, T. Antidiuretic activity of aqueous bark extract of Sri Lankan *Ficus racemosa* in rats. **Acta Biologica Hungarica**, v. 54, n. 3, p. 357-63, 2003.
- RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Oxford, Blackwell Science. 3 Ed. 2008. 240 p.
- SALBEGO, J. et al. Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 437, p. 46-50, 2015.
- SÁNCHEZ, C. J. et al. Comprehensive, untargeted, and qualitative RP-HPLC-ESI-QTOF/MS2 metabolite profiling of green asparagus (*Asparagus officinalis*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 46, p. 78-87, 2016.
- SÁNCHEZ, F. R. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003.
- SANTOS, V.A. et al. Anesthetic induction of the aqueous extract of cunambí, "*Clibadium surinamense*" Linn. to perform biometrics in tambaquis, "*Colossoma macropomum*". **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 2, p. 291-298, 2016.

SCORVO-FILHO, J. D. Agronegócio da aquicultura: perspectivas e tendências. **Textos técnicos do Instituto de Pesca de São Paulo**, 2004.

SHAKYA, S. R., LABH, S. N. Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. **European Journal of Biothechnology and Bioscience**, v. 2, n. 4, p. 44-47, 2014.

SILVA, R. M. L. **Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores da qualidade da água em pisciculturas da região da Baixada Ocidental Maranhense**. 2010. 91 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2010.

SILVA, L. L. et al. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 9, p. 771-779, 2013.

SILVA, L. L. et al. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 215-223, 2015.

SILVA, L.L. et al. S-(+)- and R-(-)-linalool: a comparison of the *in vitro* anti-*Aeromonas hydrophila* activity and anesthetic properties in fish. **Anais da Acadêmia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 203-212, 2017.

SINGH, D.; GOEL, R. K. Anticonvulsant mechanism of saponins fraction from adventitious roots of *Ficus religiosa*: possible modulation of GABAergic, calcium and sodium channel functions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 579-585, 2016.

SOUZA, C. F. et al. Nanotechnology improves the therapeutic efficacy of *Melaleuca alternifolia* essential oil in experimentally infected *Rhamdia quelen* with *Pseudomonas aeruginosa*. **Aquaculture**, v. 473, p. 169-171, 2017.

SOUZA, G. R. et al. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 248-254, 2016.

SOUZA, R. C. et al. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 29-33, 2017.

STADEN, R., BEAL, K. F., BONFIELD, J. K. The staden package, 1998. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 115-130, 2000.

SUTILI, F. J. et al. The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 157, p. 142-148, 2014.

SUTILI, F. J. et al. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 47-54, 2015a.

- SUTILI, F. J. et al. *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 95-100, 2015b.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017.
- TURAN, I. et al. Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 241-248, 2017.
- VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 1-19, 2016.
- VAQUERO, M. J. R. et al. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from Argentinean herbs infusions. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 779–785, 2010.
- VERDI, M. *Maclura tinctoria* (L.) Don ex Steud. 2011. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7882. Acesso em 11 de maio de 2018.
- VERDOUW H., VAN ECHELD, C. J. A., DEKKERS, E. M. J. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, n. 6, p. 399-402, 1978.
- VIOLA, H. et al. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 213-216, 1995.
- VIVEROS, V. E. et al. Biological activities of *Morus celtidifolia* leaf extracts. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 1177-80, 2015.
- YANG, Q. et al. Pharmacokinetics of florfenicol after oral administration in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, p. 586-592, 2013.
- YUAN, B. et al. Extraction, identification, and quantification of antioxidant phenolics from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells. **Food Chemistry**, v. 244, n. 1, p. 7-15, 2018.
- WAGNER, K. A. et al. Physiological stress responses to prolonged exposure to MS-222 and surgical implantation in juvenile Chinook salmon. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 34, p. 863-873, 2014.
- ZAKARIA, Z. A. et al. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Ficus deltoidea*. **Biological Research for Nursing**, v. 14, n. 1, p. 90-7, 2011.
- ZEPPENFELD, C. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* – Stress and antioxidant parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1-6, 2017.
- ZAGO, D.C. et al. *Aloysia triphylla* in the zebrafish food: effects on physiology, behavior, and growth performance. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 465-474, 2018.

ZHAO, J. et al. Effects of temperature reduction and MS-222 on water quality and blood biochemistry in simulated transport experiment of largemouth bronze gudgeon, *Coreius guichenoti*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 5, p. 494-507, 2014.

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES CIENTÍFICAS ENVOLVENDO A ESPÉCIE *M. tinctora* PELO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 60108-1	Data da Emissão: 15/08/2017 14:52
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: LUANA DA COSTA PIRES	CPF: 026.105.320-59
----------------------------	---------------------

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
9	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outra

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPECIE	Maclura tinctoria

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82727615



Página 1/1

ANEXO B – PARECER N° 5307210617 DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade antimicrobiana e antiparasitária de extratos e constituintes isolados de plantas medicinais para aplicação em aquicultura.", protocolada sob o CEUA nº 5307210617, sob a responsabilidade de **Berta Maria Heinzmann** e equipe; *Fabiola Tonelli Ferrari; Luana da Costa Pires; Luísa Barichello Barbosa; Patrícia Rodrigues ; Bernardo Baldisserotto* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 09/08/2017.

We certify that the proposal "Antimicrobial and antiparasitic evaluation activity of extracts and isolated constituents of medicinal plants for application in aquaculture.", utilizing 112 Fishes (males and females), protocol number CEUA 5307210617, under the responsibility of **Berta Maria Heinzmann and team; Fabiola Tonelli Ferrari; Luana da Costa Pires; Luísa Barichello Barbosa; Patricia Rodrigues ; Bernardo Baldisserotto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 08/09/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)