

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

Isadora Aguirre Rosa

**EXTRATOS DE *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling COMO
ANTIBACTERIANOS EM PISCICULTURA**

Santa Maria, RS
2019

Isadora Aguirre Rosa

**EXTRATOS DE *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling COMO ANTIBACTERIANOS
EM PISCICULTURA**

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 título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Berta Maria Heinzmann
Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS
2019

Rosa, Isadora Aguirre
EXTRATOS DE *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling COMO
ANTIBACTERIANOS EM PISCICULTURA / Isadora Aguirre Rosa.-
2019.
60 f.; 30 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2019

1. "Espanta-pulga" 2. Extrato hexânico 3. Lamiaceae 4.
Jundiá 5. *Aeromonas hydrophila* I. Título.

Isadora Aguirre Rosa

**EXTRATOS DE *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling COMO ANTIBACTERIANOS
EM PISCICULTURA**

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 título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 02 de agosto de 2019:

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

Fernando Jonas Sutili, Dr. (CESURG)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM) - Parecer

Santa Maria, RS
2019

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Cleidi e Lison, meus maiores incentivadores.
Amo vocês incondicionalmente!*

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela vida, por estar sempre comigo, ser meu refúgio e fortaleza, orientando meus passos e protegendo o meu caminho.
- Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por serem a minha base e porto seguro, por toda ajuda, amor e dedicação para comigo, pelo exemplo de profissionais e, sobretudo, seres humanos.
- Aos meus familiares, pelo incentivo, confiança e compreensão nesta caminhada.
- À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Berta M. Heinzmann, por ter me aceitado como orientada no mestrado, por toda a orientação, disponibilidade, ajuda e confiança depositadas;
- Ao meu co-orientador, Prof^o. Dr^o. Bernardo Baldisserotto, pelas orientações recebidas e contribuições para o trabalho.
- Às professoras Dr^a. Agueda Palmira Castagna de Vargas e Dr^a. Juliana Felipetto Cargnelutti pela oportunidade de realizar estudos em colaboração com o Laboratório de Bacteriologia (LABAC).
- À equipe do Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEVE) pelo companheirismo e auxílio nas diversas atividades e experimentos conduzidos.
- Às equipes do Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE) e LABAC da UFSM por sempre manter as portas abertas para a realização de pesquisas.
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pelos ensinamentos fornecidos.
- À CAPES pela bolsa de estudos e demais órgãos de fomento que custearam os experimentos desenvolvidos.
- À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por toda a estrutura e oportunidades oferecidas.
- Às minhas amigas e amigos que sempre estiveram comigo nesta caminhada, me apoiando e incentivando em todos os momentos, mesmo que a longas distâncias.
- A todos que, de alguma forma, me apoiaram e/ou contribuíram para a concretização deste trabalho, o meu muito obrigada.

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos.”*
(Augusto Cury)

RESUMO

EXTRATOS DE *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling COMO ANTIBACTERIANOS EM PISCICULTURA

AUTOR: Isadora Aguirre Rosa

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

A aquicultura encontra-se em constante expansão em nosso país e em nível mundial. Concomitante a esse crescimento, aumentou-se a ocorrência de bacterioses relacionadas a situações estressantes às quais os peixes são constantemente submetidos, tais como a alta densidade populacional nos viveiros, má qualidade de água e condições inadequadas de manejo, resultando em altas taxas de mortalidade e prejuízos aos piscicultores. A bactéria *Aeromonas hydrophila* é um dos principais agentes patogênicos na aquicultura, acometendo especialmente o jundiá (*Rhamdia quelen*). Os produtos naturais caracterizam uma fonte alternativa para o tratamento e/ou prevenção de doenças na medicina veterinária, tendo em vista as diversas vantagens que apresentam em comparação aos produtos de origem sintética. A espécie *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Lamiaceae), popularmente conhecida por “espanta-pulga” merece destaque, uma vez que seu óleo essencial é detentor de propriedades aplicáveis em aquicultura, como larvicida, antimicrobiana, antiparasitária e anestésica. Por esta razão, este estudo objetivou avaliar o potencial de extratos de *H. ringens* como antibacterianos em piscicultura. Para isso, as folhas foram coletadas, secas, moídas e extraídas sequencialmente com hexano e, posteriormente, etanol, em aparelho de Soxhlet. Os extratos concentrados foram mantidos em dessecador e liofilizados. A atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. O extrato hexânico de *H. ringens* (EHHR) apresentou o melhor resultado nos ensaios *in vitro* e foi utilizado para o ensaio de sobrevivência *in vivo*, onde juvenis de jundiá experimentalmente infectados por *A. hydrophila* foram expostos a um único banho terapêutico contendo os diferentes tratamentos (EHHR a 15 e 30 mg/L; florfenicol a 4 mg/L). A mortalidade foi avaliada durante 7 dias. Para a identificação dos fitoconstituintes presentes na fração volátil do EHHR utilizou-se cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, já para quantificação dos mesmos, cromatografia gasosa com detector por ionização em chama. O EHHR demonstrou-se eficaz nos ensaios de suscetibilidade *in vitro*, apresentando fraca atividade antibacteriana (concentrações inibitórias mínima, CIMs, e bactericidas mínima, CBMs, entre 1600 e 6400 µg/mL) frente a *A. hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Citrobacter freundii* e *Raoultella ornithinolytica*. Foram identificados seis constituintes fitoquímicos na fração volátil do EHHR, sendo que o monoterpenoide pulegona caracterizou-se como o majoritário. Este extrato permitiu uma taxa de sobrevivência relativa de 93,33% de jundiás infectados experimentalmente por *A. hydrophila* 7 dias após um único banho terapêutico a 30 mg/L, enquanto que o antimicrobiano florfenicol, promoveu uma taxa de 60%. O EHHR constitui uma fonte biodegradável promissora para o controle e tratamento de infecções bacterianas em aquicultura orgânica.

Palavras-chave: “Espanta-pulga”. Extrato hexânico. Lamiaceae. Jundiá. *Aeromonas hydrophila*.

ABSTRACT

EXTRACTS OF *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling AS ANTIBACTERIAL IN FISH FARM

AUTHOR: Isadora Aguirre Rosa
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann

Aquaculture is constantly expanding in our country and worldwide. Concomitant to this growth, the occurrence of bacterioses related to stressful situations to which fish are constantly subjected, such as the high population density in nurseries, poor water quality and inadequate management conditions, has been increased, resulting in high mortality rates and damage to fish farmers. The bacterium *Aeromonas hydrophila* is one of the main pathogens in aquaculture, especially affecting the jundiá (*Rhamdia quelen*). Natural products characterize an alternative source for the treatment and/or prevention of diseases in veterinary medicine, in view of the various advantages they present compared to products of synthetic origin. The species *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Lamiaceae), popularly known as "espanta-pulga", deserves special mention, since its essential oil has properties applicable to aquaculture, such as larvicide, antimicrobial, antiparasitic and anesthetic. For this reason, this study aimed to evaluate the potential of extracts of *H. ringens* as antibacterial in fish farming. For this, the leaves were collected, dried, ground and extracted sequentially with hexane and, later, ethanol, in Soxhlet apparatus. The concentrated extracts were kept in desiccator and lyophilized. The *in vitro* antibacterial activity of the extracts was evaluated by the broth microdilution method. The hexane extract of *H. ringens* (HEHR) showed the best result in the *in vitro* assays and was used for the *in vivo* survival assay, where jundiá juveniles experimentally infected with *A. hydrophila* were exposed to a single therapeutic bath containing the different treatments (HEHR at 15 and 30 mg/L; 4 mg/L florfenicol). Mortality was assessed for 7 days. For the identification of the phytochemicals present in the volatile fraction of the HEHR, gas chromatography coupled to mass spectrometry was used, for quantification of the same, gas chromatography with flame ionization detector. The HEHR was effective in *in vitro* susceptibility assays with weak antibacterial activity (minimal inhibitory concentrations, MICs, and minimal bactericidal, MBCs, between 1600 and 6400 µg/mL) against *A. hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Citrobacter freundii* and *Raoultella ornithinolytica*. Six phytochemical constituents were identified in the volatile fraction of the HEHR, and the monoterpenoid pulegone was characterized as the majority. This extract allowed a relative survival rate of 93.33% of jundiás experimentally infected by *A. hydrophila* 7 days after a single therapeutic bath at 30 mg/L, whereas the antimicrobial florfenicol, promoted a rate of 60%. EHR is a promising biodegradable source for the control and treatment of bacterial infections in organic aquaculture.

Keywords: "Espanta-pulga". Hexane extract. Lamiaceae. Jundiá. *Aeromonas hydrophila*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Ágar Mueller-Hinton
CMHAC	Caldo Mueller-Hinton com ajuste catiônico
CBM	Concentração bactericida mínima
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EHHR	Extrato hexânico de <i>Hesperozygis ringens</i>
EPM	Erro Padrão da Média
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IK	Índices de retenção de Kovats
OD	<i>Optical Density</i>
OE	Óleo essencial
PTFE	Politetrafluoretileno
SISBIO	Sistema de autorização e informações em biodiversidade
TI	Temperatura inicial
UFC	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

APRESENTAÇÃO

- Figura 1** – Sinais clínicos de peixes infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) exoftalmia; (B) áreas hemorrágicas pelo corpo; (C) distensão abdominal; (D) incoordenação de movimentos. Fonte: adaptado de FIGUEIREDO et al. (2008).....17
- Figura 2** – Aspecto macroscópico de lesões em jundiás (*Rhamdia quelen*). (a), (b), (c), (d), (f), (i): lesões ulcerativas; (e): destruição do pedúnculo caudal; (g), (h) e (j): lesões hemorrágicas. Fonte: adaptado de BARCELLOS et al., 2008.....18
- Figura 3** – Exemplar de jundiá, *Rhamdia quelen*. Fonte: <http://www.fishbase.org>.....20
- Figura 4** – *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling – aspecto geral da planta. Fonte: PINHEIRO, C. G. (arquivo pessoal – 2014).....25
- Figura 5** – Inflorescência de corola violácea de *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. Fonte: BORDIGNON, S. A. L. (Flora Digital do RS e de SC – http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=10668).....25
- Figura 6** – Estrutura química do monoterpenoide pulegona (C₁₀H₁₆O). Fonte: <https://www.extrasynthese.com/r-pulegone.html>.....28
- Figura 7** – Estrutura química do monoterpenoide rotundifolona (C₁₀H₁₄O₂). Fonte: adaptado de De Sousa et al. (2007).....30

ARTIGO

- Figure 1** – Survival rate of silver catfish juveniles infected with *Aeromonas hydrophila* (MF 372510) and treated with a single therapeutic bath of *Hesperozygis ringens* hexane extract (HEHR). Different letters indicate a significant difference between the groups. Kaplan–Meier survival analysis with logrank test ($p \leq 0.05$). (■) Uninfected control (fish inoculated with sterile saline), (●) FLOR (fish infected and treated with 4 mg l⁻¹ of florfenicol), (Δ) HEHR 30 (30 mg l⁻¹ of HEHR), (▲) HEHR 15 (15 mg l⁻¹ of HEHR), (□) control infected (fish infected and untreated).....41

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO

Tabela 1 – Teor do monoterprenoide pulegona em óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling.....	27
---	----

ARTIGO

Table 1 – Chemical composition of the hexane extract volatile fraction obtained from <i>Hesperozygis ringens</i> leaves.....	40
---	----

Table 2 – Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of hexane (HEHR) and ethanol (EEHR) extracts of <i>Hesperozygis ringens</i> (6400-3,12 µg/mL) against fish pathogenic bacteria.....	41
--	----

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	12
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.2.1 Desafios em piscicultura	14
1.2.2 <i>Rhamdia quelen</i>	20
1.2.3 Produtos naturais	22
1.2.4 <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling	25
1.3 OBJETIVOS	31
1.3.1 Objetivo geral	31
1.3.2 Objetivos específicos	31
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
1.4.1 Coleta, processamento e extração de <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling	31
1.4.2 Análise da fração volátil do extrato hexânico de <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling por cromatografia gasosa	32
1.4.3 Cepas bacterianas	33
1.4.4 Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	33
1.4.5 Ensaio de sobrevivência <i>in vivo</i>	34
1.4.6 Análise estatística	35
2 ARTIGO	36
3 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1 APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma prática tradicional que data de séculos e refere-se a uma atividade multidisciplinar de cultivo de diversas espécies aquáticas, incluídos neste contexto plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes (OLIVEIRA, 2009). Já a piscicultura refere-se à criação específica de peixes (FRASCÁ-SCORVO e FILHO, 2011). Segundo dados da FAO (*Food and Agriculture Organization*), a pesca e a aquicultura têm demonstrado um crescimento exponencial em nosso país e em nível mundial, uma vez que caracterizam uma importante fonte de alimento, nutrição, renda e subsistência para diversas populações (FAO, 2016). Todavia, disparidades no crescimento verificado entre diferentes países podem estar relacionados ao clima, gestão, mercado, ambiente social e instituições (NADARAJAH e FLAATEN, 2017).

A produção mundial de peixes alcançou 171 milhões de toneladas em 2016, das quais 88% foram direcionadas ao consumo humano (FAO, 2018). Tal fato contribui para o crescimento econômico/financeiro dos países produtores, possibilitando uma fonte de renda e subsistência a cerca de 59,6 milhões de pessoas em todo o mundo (FAO, 2018). Neste contexto, a China destaca-se como o país que mais contribui para a produção de pescados, sendo responsável pela produção de 45% da produção mundial (SEBRAE, 2015). O Brasil encontra-se no ranking de 14º maior produtor, e este cenário está em constante expansão, apesar do consumo *per capita* ser abaixo do recomendado pela FAO (12 kg/hab/ano) (FAO, 2016; PEIXE BR, 2019). A região Sul apresentou um crescimento de 11,3% no setor de piscicultura em 2018, sendo que o jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa que, apesar de pouco cultivada, tem sido o modelo experimental de diversos estudos farmacológicos (SEBRAE, 2015; BIANCHINI et al., 2017; BANDEIRA JUNIOR et al., 2019; PEIXE BR, 2019). O incentivo ao consumo de alimentos mais saudáveis por meio de políticas públicas, o aumento da disponibilidade e a inserção de novos produtos, bem como o aumento da culinária japonesa são alguns fatores que têm favorecido o consumo de pescados em nosso país (SEBRAE, 2015).

Contudo, a crescente demanda por pescados intensificou a piscicultura intensiva, cujos animais são submetidos, muitas vezes, a condições estressantes, como a alta densidade populacional nos viveiros, má qualidade da água e condições inadequadas de transporte e manejo (SILVA, 2010; NADARAJAH e FLAATEN, 2017). Tais condições afetam

diretamente a saúde e o bem-estar dos peixes, favorecendo o surgimento de doenças infecciosas (COSTA, 2011; SEGNER et al., 2012; OLUSOLA, EMIKPE e OLAIFA, 2013).

O aumento da incidência de bacterioses contribui à utilização indiscriminada de antimicrobianos pelos piscicultores, os quais também fazem o uso de substâncias ilegais ou legalizadas para outras espécies animais, agravando o quadro de infecções, uma vez que há uma pressão seletiva entre as bactérias, que permanecem no ambiente aquático, com consequente surgimento de bactérias multirresistentes (BARCELLOS et al., 2008; SAPKOTA et al., 2008). Bactérias do gênero *Aeromonas*, além de serem importantes patógenos em aquicultura, também fazem parte da microbiota intestinal normal de peixes (ROMERO, FEIJOÓ e NAVARRETE, 2012). Por esta razão, a presença destas bactérias não é indicativa de doença, porém o tipo e o grau de estresse exercido sobre os peixes é considerado um fator que contribui para surtos de doenças, assim como a condição fisiológica do hospedeiro, a virulência bacteriana e o grau de resistência genética inerente a populações específicas de peixes (CIPRIANO, BULLOCK e PYLE, 2001; ROMERO, FEIJOÓ e NAVARRETE, 2012).

Os produtos naturais têm sido alvo de busca por substâncias bioativas com propriedades farmacológicas aplicáveis na medicina veterinária, visando tratar e/ou prevenir enfermidades, assim como promover o bem-estar animal (SILVA et al., 2013; SUTILI et al., 2015a; BANDEIRA JUNIOR et al., 2017). A utilização de substâncias oriundas de fontes naturais é caracterizada por apresentar menor potencial nocivo por serem biodegradáveis, de menor impacto ao meio ambiente, menor probabilidade de induzir efeitos adversos e capaz de causar efeitos aditivos, potenciadores e/ou sinérgicos quando em associação (YUNES, PEDROSA e FILHO, 2001). Adicionalmente, compostos naturais são constituídos por uma grande variedade de substâncias com mecanismos de ação distintos, dificultando o surgimento de resistência microbiana (YUNES, PEDROSA e FILHO, 2001). Neste âmbito, o Brasil merece destaque tendo em vista a sua ampla biodiversidade, que corresponde entre 10 a 20% das espécies vegetais estimadas no planeta (ROMÃO et al., 2015).

A espécie *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling, pertencente à família Lamiaceae e comumente conhecida por “espanta-pulga”, é de notória relevância para o uso em piscicultura, tendo em vista as diversas propriedades farmacológicas de seu óleo essencial (OE) comprovadas e aplicáveis neste setor, tais como larvicida (SILVA et al., 2014), anestésica (SILVA et al., 2013), antibacteriana (SUTILI et al., 2015a; BANDEIRA JUNIOR et al., 2017) e antiparasitária (BANDEIRA JUNIOR et al., 2017). Por esta razão, buscou-se avaliar o potencial antibacteriano de extratos obtidos das folhas de *H. ringens* por extração

com solventes frente a bactérias patogênicas aos peixes. Desta forma, pretende-se encontrar alternativas de origem natural eficazes para o controle de bacterioses em piscicultura, estimulando a redução do uso de antimicrobianos sintéticos convencionais. Concomitantemente, a descrição das atividades biológicas dessa espécie vegetal em risco de extinção pode permitir o estímulo ao seu cultivo e propagação, auxiliando na manutenção desta espécie com atividades farmacológicas de importância em piscicultura.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Desafios em piscicultura

O fato de o setor de piscicultura estar em expansão, favorece a piscicultura intensiva, na qual os peixes frequentemente estão alocados em altas densidades de estocagem, com consequente aumento de disputas territoriais, aumento da quantidade de matéria orgânica e amônia e níveis de oxigênio reduzidos na água (SILVA, 2010; NADARAJAH e FLAATEN, 2017). Hormônios imunossupressores, como o cortisol e catecolaminas, são liberados em tais condições (BALDISSEROTTO et al., 2014), o que propicia a instalação de doenças oportunistas, e, conseqüentemente, gerando prejuízos consideráveis ao piscicultor (LEIRA et al., 2017).

Dentre os problemas sanitários que podem ocorrer em pisciculturas intensivas, os mais importantes são descritos na sequência. No entanto, cabe destacar que as perdas na aquicultura não são causadas apenas pela ocorrência de doenças. Como exemplo pode ser citada a predação por lavras de Odonata. Conhecidas como “libélulas”, constituem-se pragas que afetam os peixes nos estágios de larva, pós-larva e alevino, e são responsáveis por promover redução parcial ou total em populações de peixes (ZANIBONI-FILHO, 2000; SILVA et al., 2014).

Doenças ocasionadas por vírus em piscicultura são tão avassaladoras quanto às ocasionadas por bactérias, porém não ocorrem com frequência no Brasil, já as doenças parasitárias costumam ser a causa de cerca de 8% das doenças em peixes (BALDISSEROTTO e NETO, 2004; LEIRA et al., 2017). A ictiofiríase, também conhecida como doença dos pontos brancos ou ictio, é uma parasitose causada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* que ocasiona perdas econômicas em peixes comerciais e ornamentais (GARCIA et al., 2011b). Este protozoário localiza-se por toda a superfície externa do corpo e brânquias de seu hospedeiro, podendo ser visto a olho nu

(BALDISSEROTTO e NETO, 2004). Durante o período de reprodução, único momento em que se pode combater este patógeno, ele se rompe da epiderme e fixa-se a outro substrato, no qual se divide em formas infectantes que irão atacar outros jundiás (BALDISSEROTTO e NETO, 2004). As lesões na pele dos animais oriundas da saída do parasito em reprodução são consideradas uma porta de entrada para infecções secundárias ocasionadas por fungos, vírus e, principalmente, bactérias (MATTHEWS, 2005). Segundo Garcia et al. (2011a), a intensidade da infecção por este patógeno no jundiá (*R. quelen*) varia com o pH da água.

O ectoparasito *Gyrodactylus* sp. ataca várias partes externas do corpo de peixes, podendo acarretar em mortandade dos mesmos (HEGGBERGET e JOHNSEN, 1982). De acordo com Luque (2004), outros parasitas podem acometer os peixes, tais como espécies dos gêneros *Myxobolus*, *Henneguya* e *Kudoa*, que formam cistos, contendo numerosos esporos, nas brânquias, órgãos internos e na musculatura de peixes. Baldisserotto e Neto (2004) relatam que o microcrustáceo *Lernaea* sp. é outro parasito que causa sérios problemas, especialmente em criações de jundiás, uma vez que ocasionam lesões externas que facilitam o aparecimento concomitante de infecções bacterianas.

As doenças de origem bacteriana representam cerca de 80% dos casos de doenças em peixes e são as que acarretam em maior impacto econômico no setor de piscicultura (BALDISSEROTTO e NETO, 2004; LEIRA et al., 2017). Bactérias patogênicas para peixes normalmente estão presentes na água e na microbiota dos animais, porém desencadeiam enfermidades quando o hospedeiro se encontra debilitado, estando sujeito principalmente às infecções causadas por *Aeromonas* spp., *Edwardsella* spp., *Flavobacterium columnare*, *Francisella* spp. e *Streptococcus* spp. (LEIRA et al., 2016).

Segundo Peixoto et al. (2012), o gênero *Aeromonas* spp. é constituído por bactérias oportunistas carreadoras de múltiplos fatores de virulência. Dentre as principais espécies de importância clínica destacam-se: *A. hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii* e *Aeromonas schubertii* (PEIXOTO et al., 2012). Estas bactérias são consideradas invasores secundários, estabelecendo-se ao mesmo tempo em que outras infecções bacterianas, virais, parasitárias ou em virtude de problemas nutricionais ou de estresse (PAVANELLI et al., 2008). Atualmente, estes patógenos são considerados emergentes agentes primários, pois possuem mecanismos altamente específicos para promoção de doenças (LEIRA et al., 2017).

Os jundiás são suscetíveis a diversas doenças, embora algumas ocorram mais frequentemente, como a ictiofiríase, ocasionada pelo protozoário *I. multifiliis* (GARCIA et al., 2011b), e a infecção por *A. hydrophila*, (BARCELLOS et al., 2008). Outras bactérias, como

Citrobacter freundii e *Raoultella ornithinolytica*, já foram relatadas como a causa de morte de jundiás naturalmente infectados e a causa de intoxicação humana por histamina, em virtude do consumo da carne contaminada, respectivamente (KANKI et al., 2002; PÁDUA et al., 2014; BANDEIRA JUNIOR et al., 2017).

1.2.1.1 *Aeromonas hydrophila*

A bactéria *A. hydrophila* apresenta-se na forma de bastonete Gram-negativo anaeróbio facultativo, sendo normalmente móvel com flagelos polares, apesar de algumas cepas serem não-móveis (VISWANATAN et al., 2015). Leira et al. (2016) relatam que se trata de uma bactéria não formadora de esporos, sendo catalase e oxidase positiva. A distribuição destas bactérias é cosmopolita, sendo comumente encontradas no intestino dos peixes, água e sedimentos de lagos ricos em matéria orgânica (BARCELLOS et al., 2008).

O patógeno *A. hydrophila* é um dos principais agentes causadores de doenças em peixes, dentre eles incluem-se a tilápia, pacu, piracanjuba, e, especialmente, o jundiá, sendo a principal infecção bacteriana que acomete esta espécie de peixe (BARCELLOS et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2008). Além disso, também é capaz de acometer répteis, anfíbios e mamíferos, inclusive seres humanos (FIGUEIREDO et al., 2008). Conforme Leira et al. (2017), é uma bactéria adaptada ao crescimento em temperaturas que variam entre 5 e 37°C. Autores como Leira et al. (2016) afirmam que o crescimento máximo é verificado em torno de 28°C.

É importante ressaltar que *A. hydrophila* possui uma virulência de caráter multifatorial, sendo capaz de secretar uma ampla gama de enzimas extracelulares, tais como hemolisinas (α e β) (LEIRA et al., 2016), enterotoxina (LJUNGH, WRETILIND e MÖLLBY, 1981), além de proteases (metalopeptidases e peptidases séricas) (SCHEFFER et al., 1988; LEIRA et al., 2016), amilase, elastase, aerolisina, nuclease, lipase (PEIXOTO et al., 2012) e é capaz de formar biofilme (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018). Tais fatores auxiliam a bactéria em diversas etapas da infecção, como a aderência inicial ao peixe, bem como no escape das defesas do sistema imune do animal e, por isso, exercem um papel vital na ecologia, sobrevivência e patogenicidade desse microrganismo (PEMBERTON, KIDD e SCHMIDT, 1997; FIGUEIREDO et al., 2008; PANDEY, NAIK e DUBEY, 2010).

Os sinais clínicos da doença causada por *A. hydrophila* em peixes (Figura 1) variam de lesões de pele, superficiais ou profundas, a quadros típicos de septicemia (LEIRA et al., 2017). É comum a ocorrência de hemorragia cutânea no corpo e nas nadadeiras, podendo

progredir para ulcerações com perda de epitélio e/ou dano ao tecido muscular (BARCELLOS et al., 2008; LEIRA et al., 2017). Em quadros de infecção sistêmica, a exoftalmia (projeção do globo ocular) é frequente, além de abdômen distendido contendo líquido serosanguinolento e presença de petéquias hemorrágicas nas vísceras (LEIRA et al., 2017).

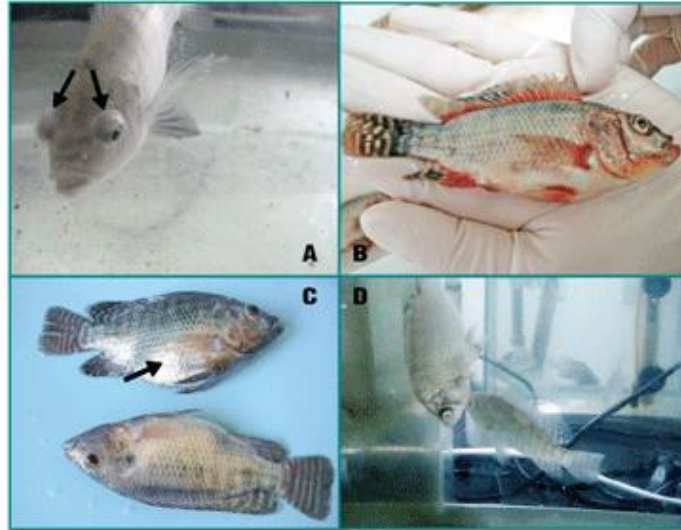


Figura 1 – Sinais clínicos de peixes infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) exoftalmia; (B) áreas hemorrágicas pelo corpo; (C) distensão abdominal; (D) incoordenação de movimentos. Fonte: adaptado de FIGUEIREDO et al. (2008).

Em jundiás, os aspectos clínicos (Figura 2) são semelhantes aos demais peixes infectados por *A. hydrophila*, porém Barcellos et al. (2008) descrevem que inicialmente esta bactéria afeta o pedúnculo caudal, causando ulcerações na pele (Figura 2a), seguida de ulcerações no corpo (Figura 2b), podendo evoluir para perda de pele (Figura 2c) e lesões descamativas erosivas no corpo (Figura 2c e 2d) e barbilhões (Figura 2d), bem como pode ocorrer completa destruição do pedúnculo caudal (Figura 2e) e exposição da musculatura (Figura 2f). Estes autores também relatam a presença de muco nas lesões (Figura 2g e 2h) e lesões hemorrágicas difusas pelo corpo (Figura 2i) e localizadas na base das nadadeiras dorsal e adiposa (Figura 2j).

A transmissão da doença ocorre horizontalmente a partir das excretas dos peixes ou lesões da pele, e o peixe acometido normalmente morre entre 2 e 10 dias do início do aparecimento de sinais clínicos (BARCELLOS et al., 2008). Em casos de septicemia fatal, o animal morre antes mesmo de desenvolver os sintomas da doença (LEIRA et al., 2016).

Autores como Peixoto e colaboradores (2012) relatam que a *A. hydrophila*, juntamente com a *Aeromonas salmonicida*, caracterizam-se por serem agentes patogênicos para peixes e

para a saúde pública, por multiplicar-se e produzir exotoxinas em temperaturas de refrigeração. Nos seres humanos, *A. hydrophila* comumente não é causadora de doenças, exceto em casos específicos de indivíduos imunodeprimidos, podendo causar gastroenterite, diarreia, infecções urinárias, e, em casos mais graves, acarreta a morte (HOCHEDÉZ et al., 2010; VISWANATAN et al., 2015).

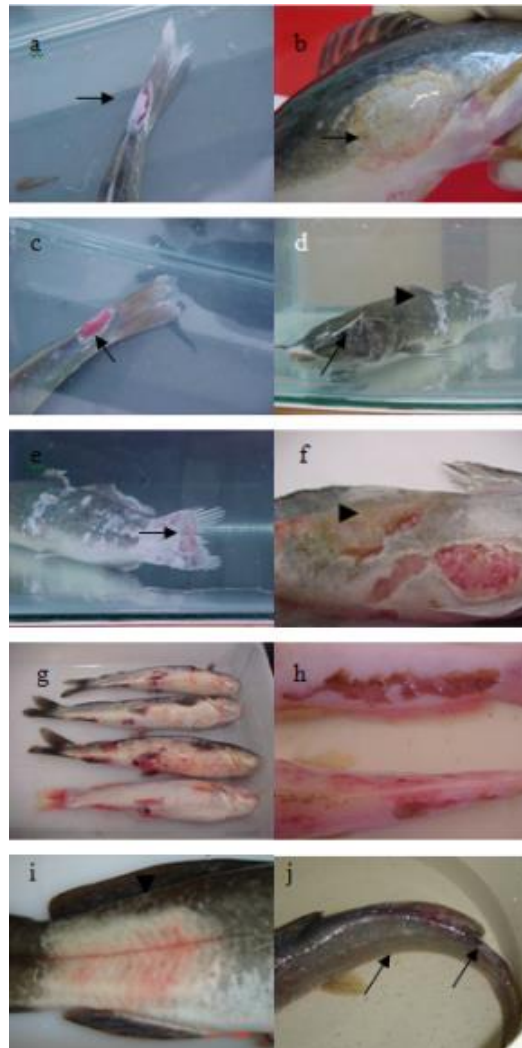


Figura 2 – Aspecto macroscópico de lesões em jundiás (*Rhamdia quelen*). (a), (b), (c), (d), (f), (i): lesões ulcerativas; (e): destruição do pedúnculo caudal; (g), (h) e (j): lesões hemorrágicas. Fonte: adaptado de BARCELLOS et al., 2008.

O tratamento de doenças bacterianas em piscicultura normalmente se dá através da administração de antimicrobianos via incorporação à ração ou via administração direta na água de cultivo (LEIRA et al., 2017). Em relação aos antimicrobianos utilizados, autores como Bandeira Junior et al. (2019) relatam que há uma escassez de tratamentos para infecções bacterianas neste setor, sendo que os únicos antimicrobianos aprovados pelo *Food and Drug*

Administration (FDA) são a oxitetraciclina, florfenicol e sulfadimetoxina/ormetoprima (FDA, 2014). Diante deste fato, ocorre com maior frequência o uso demasiado e irracional de outras substâncias ilegais ou legalizadas para outras espécies animais, induzindo a uma pressão seletiva sobre os microrganismos e favorecendo ao aumento da resistência bacteriana (SAPKOTA et al., 2008; PEIXOTO et al., 2012).

Em relação aos antimicrobianos aprovados para uso em piscicultura, sabe-se que a resistência bacteriana à classe das tetraciclinas (oxitetraciclina) possivelmente esteja associada a uma resistência cromossômica ou mediada por plasmídeos ou transposons, favorecendo a diminuição do acúmulo do fármaco no interior da célula (ANVISA, 2019). Já a resistência aos anfenicóis (florfenicol) pode ser adquirida através de plasmídeos ou alterações da permeabilidade ao fármaco, estando envolvida na produção de enzimas, como a acetiltransferase ou nitrorredutase, que inativam o composto, ou, ainda, através de bombas de efluxo que fazem a extrusão ativa do fármaco para fora do citoplasma (SILVA et al., 2018; ANVISA, 2019). A resistência bacteriana às sulfonamidas (sulfadimetoxina) pode ocorrer por mutação, com conseqüente aumento da produção de ácido *para*-aminobenzóico ou da síntese de di-hidropteróico sintetase, que apresentam pouca afinidade pelo antimicrobiano, ao passo que a resistência à classe das diaminopirimidinas (ormetoprima) normalmente ocorre por perda da capacidade da bactéria de ligação ao fármaco por modificação na enzima di-hidrofalato redutase (BAPTISTA, 2013; ANVISA, 2019).

O aumento da resistência de bactérias do gênero *Aeromonas* spp. está relacionado não somente ao uso indiscriminado de antimicrobianos, mas também à presença de resíduos de metais contaminantes, oriundos de atividades industriais e de mineradoras, que atuam como agente seletivo na proliferação de resistência a antimicrobianos, assim como pela presença de mecanismos de resistência das bactérias, como bombas de efluxo, as quais agem bombeando os fármacos intracelulares para o meio extracelular (PEIXOTO et al., 2012).

Diversos autores têm relatado resistência para espécies de *Aeromonas*. De acordo com Peixoto e colaboradores (2012), a maioria destas apresenta resistência à penicilina, ampicilina e carbenicilina. Outros estudos demonstraram diferentes graus de resistência para *A. hydrophila* frente aos antimicrobianos amoxicilina, ticarcilina, eritromicina, cefoxitina, doxiciclina (SAAVEDRA et al., 2004; BARCELLOS et al., 2008; PEIXOTO et al., 2012).

1.2.2 *Rhamdia quelen*

Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824), popularmente conhecido por jundiá, é um teleósteo de água doce pertencente à família Heptapteridae e à ordem Siluriformes (GOMES et al., 2000; BAUMGARTNER et al., 2012). A distribuição desta espécie é neotropical, compreendendo desde o México até a Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Dentre os outros nomes populares pelos quais esta espécie é conhecida, destacam-se: jundiá-tinga, jandiá, sapipoca, bagre, bagre negro e bagre sulamericano (GOMES et al., 2000; BAUMGARTNER et al., 2012).

Segundo Silfvergrip (1996), a coloração do jundiá pode variar de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia (Figura 3). O crescimento desta espécie é mais pronunciado nos primeiros anos de vida, sendo que até o terceiro ou quarto ano de vida a taxa de crescimento é maior nos machos do que nas fêmeas, e, ao atingir este estágio de vida, a situação se inverte e as fêmeas passam a crescer mais rapidamente (GOMES et al., 2000). Segundo os mesmos autores, o comprimento assintótico das fêmeas é equivalente a 66,5 cm, enquanto que dos machos é de 52,0 cm. Adicionalmente, as fêmeas costumam ter uma maior expectativa de vida, podendo alcançar os 21 anos de idade, ao passo que os machos vivem em torno de 11 anos (WEIN, 1980). A maturidade sexual de ambos os sexos é atingida com um ano de idade e seu período reprodutivo ocorre de agosto a março (GOMES et al., 2000).



Figura 3 – Exemplar de jundiá, *Rhamdia quelen*. Fonte: <http://www.fishbase.org>.

Esta espécie tem sido extensivamente estudada como modelo farmacológico em virtude do seu fácil manejo, resistência ao frio (MEYER, 2003), fácil adaptação a dietas artificiais e à criação intensiva (ZANIBONI FILHO, 2004; FIGUEIREDO et al., 2014), de crescimento rápido (GOMES et al., 2000), bem adaptada a diferentes ambientes e, ainda, de boa aceitação pelo mercado consumidor (MARCHIORO e BALDISSEROTTO, 1999).

Os jundiás costumam viver em lagos e poços fundos de rios, tendo preferência por ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação

(GOMES et al., 2000), além de possuírem acentuada aversão à luz, e, devido a este fato, buscam por locais mais escuros (PIAIA, TOWNSEND e BALDISSEROTTO, 1999). Conforme Piaia, Townsend e Baldisserotto (1999), alevinos expostos à escuridão demonstraram crescimento significativamente maior que nos expostos continuamente à luz ou ao fotoperíodo normal. Segundo os mesmos autores, o melhor desempenho de crescimento no escuro é provavelmente em virtude da diminuição das lutas e pelo fato de os alevinos ingerirem mais alimento no escuro.

Os adultos desta espécie têm hábito alimentar onívoro (BALDISSEROTTO, 2013), demonstrando preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (GOMES et al., 2000). Adicionalmente, é um peixe que, se alimentado uma vez ao dia, tem crescimento semelhante caso fosse alimentado duas a quatro vezes ao dia. Tal fato representa um fator importante dentro do manejo em piscicultura, uma vez que podem ser aliados uma melhor eficiência produtiva, redução do desperdício de alimento, e menores custos de produção (CARNEIRO e MIKOS, 2005).

Segundo Baldisserotto (2013), a capacidade de sobrevivência de jundiás a grandes variações de concentração osmótica no meio ambiente é limitada. Por essa razão, esta espécie é classificada como estenoalina. Em estudo realizado por Marchioro e Baldisserotto (1999), alevinos de jundiá suportam até 9,0 g/L de sal marinho comum (NaCl) por 96 h, o que permite a adição do mesmo na água com a finalidade de reduzir o estresse durante o transporte de um local para outro, além de promover ação curativa contra ictioparasitas, desde que utilizado na quantidade de 1-3‰ (PRIETO, 1991). Estudos conduzidos por Marchioro (1997), evidenciaram que alevinos de jundiá suportam uma variação de pH na faixa de 4,0 a 8,5, enquanto que Zaions e Baldisserotto (2000) demonstraram que o crescimento dos mesmos é melhor na faixa de pH de 5,0 a 9,0. Trata-se de um peixe euritérmico, devido à capacidade de tolerar uma ampla faixa de temperatura (BALDISSEROTTO, 2013). Segundo Gomes e colaboradores (2000), alevinos de jundiá suportam temperaturas entre 15 e 34°C.

Embora *R. quelen* represente uma espécie de relevante produtividade e de boa aceitação no mercado consumidor (MARCHIORO e BALDISSEROTTO, 1999; PEIXE BR, 2019), a sua produção tem sofrido prejuízos econômicos, devido à grande incidência de mortalidade em consequência de doenças infecciosas, por problemas diretamente relacionados ao manejo e cultivo dos peixes (BARCELLOS et al., 2008; ROMERO, FEIJOÓ e NAVARRETE, 2012). A infecção causada pela bactéria Gram-negativa *A. hydrophila* é a principal infecção bacteriana que acomete a espécie *R. quelen*, sendo responsável por altas

taxas de mortalidade com consequentes perdas econômicas no setor de piscicultura (BARCELLOS et al., 2008; SILVA, 2010).

1.2.3 Produtos naturais

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma prática popular advinda de milênios, cujo intuito é trazer benefícios à saúde seja prevenindo ou tratando doenças (ALVIM et al., 2006; OLUSOLA, EMIKPE e OLAIFA, 2013). Os produtos naturais representam uma abundante fonte de novas moléculas (NASIR et al., 2015). Anteriormente, Citarasu e colaboradores (2010) já descreviam um crescimento entre 5 e 15% no mercado mundial de fitoterapia. Embora haja diversos estudos referentes ao uso terapêutico de plantas medicinais, a maioria delas permanece sendo usada com base na cultura popular para promoção e recuperação da saúde das pessoas (ALVIM et al., 2006).

O organismo das plantas é constituído pelos metabolismos primário e secundário, sendo que o primário está relacionado à produção de substâncias essenciais às funções básicas da vida celular, como respiração e biossíntese de aminoácidos (BRAZ-FILHO, 2010). Já o metabolismo secundário não está necessariamente relacionado à manutenção da vida do organismo produtor, mas concede vantagens à sobrevivência e perpetuação da espécie, atuando em processos de polinização, contribuição para a resistência dos organismos contra pragas, patógenos e proteção contra herbívoros (BRAZ-FILHO, 2010).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser classificados em diferentes classes, dentre algumas delas taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas (na forma de glicosídeos ou agliconas livres), compostos fenólicos simples, polissacarídeos, proteoglicanos e terpenoides (OLUSOLA, EMIKPE e OLAIFA, 2013). Estes compostos podem variar quali e quantitativamente de acordo com fatores externos, como temperatura, disponibilidade hídrica, sazonalidade, ritmo circadiano, ataque de patógenos, radiação ultravioleta, entre outros, ou, ainda, fatores intrínsecos à espécie vegetal, como o fator genético (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; PINHEIRO et al., 2016). A presença destas substâncias influi diretamente na atividade biológica da planta e, por este motivo, os produtos naturais, bem como, seus constituintes secundários isolados têm sido abundantemente estudados, especialmente quando a elucidação das propriedades farmacológicas é requerida (SILVA et al., 2013; BIANCHINI et al., 2017; PINHEIRO et al., 2017; OLMEDO, RIBOTTA e GROSSO et al., 2019).

1.2.3.1 Compostos naturais como agentes antimicrobianos em piscicultura

Em produções aquícolas, a utilização de extrativos vegetais, como óleos essenciais (OEs) e extratos, assim como seus constituintes isolados, vem se expandindo, tendo em vista as vantagens fornecidas por estes produtos, que podem estimular o apetite e promover ganho de peso, atuar como imunoestimulantes, redutores de estresse, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antiparasitários, anestésicos e sedativos, caracterizando uma alternativa de baixo impacto ambiental para a manutenção do bem-estar animal (CITARASU, 2010; REVERTER et al., 2014; SILVA et al., 2014; BIANCHINI et al., 2017; BANDEIRA JUNIOR et al., 2018). A prática do uso de compostos de origem vegetal também permite a redução dos efeitos secundários deletérios ocasionados pelo uso de substâncias sintéticas, tais como os efeitos residuais no músculo de peixes e camarões, assim como a presença destas substâncias no ambiente aquático, que favorece à indução de resistência bacteriana (CITARASU, 2010).

No setor de piscicultura, a ocorrência de bacterioses está estritamente relacionada às condições em que os peixes são submetidos, no entanto, na grande maioria das vezes, as doenças provocadas por estes agentes patogênicos são secundárias, manifestando-se em situações em que os animais estão imunologicamente debilitados (SILVA, 2010). De acordo com Citarasu (2010), um imunoestimulante pode ser um fármaco, um estressor ou ação que eleva os mecanismos de defesa ou sistema imune, conduzindo à resistência do animal a doenças. Neste contexto, as plantas medicinais também podem atuar no controle de doenças bacterianas, agindo não apenas por suas propriedades antibacterianas, mas também por sua ação imunoestimulante, estimulando a resistência ao estresse e prevenindo quadros de infecções (OLUSOLA, EMIKPE e OLAIFA, 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo o uso de produtos naturais no controle de infecções microbianas em piscicultura têm sido realizados há vários anos na UFSM. Autores como Parodi et al. (2013) avaliaram o efeito *in vitro* do extrato de *Aloysia triphylla* (“capim-cidró”) contra cepas isoladas de jundiás, já Sutili et al. (2014, 2015a, 2015b) realizaram experimentos com OEs *in vitro* e *in vivo* utilizando a mesma espécie animal, *R. quelen*. Os resultados apontam que tais extrativos vegetais possuem potencial para serem utilizados em aquicultura como agentes terapêuticos e/ou profiláticos, especialmente frente a infecções causadas por *A. hydrophila*. Em *screening* realizado por Bandeira Junior et al. (2019), o OE das espécies vegetais *Aniba parviflora* (“macacaporanga”), *Aniba rosaeodora* (“pau-rosa”), *Conohea scoparioides* (“pataqueira”) e *Lippia origanoides* (“alecrim-d’Angola”) demonstraram ação bactericida frente as bactérias patogênicas de peixes *A. hydrophila*, *C.*

freundii e *R. ornithinolytica*, sendo que o OE de *L. origanoides*, mais eficaz nos ensaios *in vitro*, proporcionou um aumento na longevidade de jundiás experimentalmente infectados por *A. hydrophila*.

Em estudo realizado por Majolo e colaboradores (2017), evidenciaram-se ação bacteriostática e bactericida dos OEs de *Lippia alba* (“erva-cidreira”), *Lippia sidoides* (“alecrim-pimenta”) e *L. origanoides* frente a *A. hydrophila*. Outros estudos também demonstraram atividade antibacteriana para os OEs das espécies *L. alba*, *L. sidoides*, *Ocimum gratissimum* (“alfavaca-cravo”), *Mentha piperita* (“hortelã-pimenta”) e *Zingiber officinale* (“gingibre”), contudo frente a outra bactéria patogênica de peixes, a *Streptococcus agalactiae*, que acomete especialmente a espécie *Oreochromis niloticus* (“tilápia-do-nilo”), desencadeando quadros de meningoencefalite e septicemia (PEREIRA et al., 2010; MAJOLO et al., 2018).

Os monoterpenoides terpinen-4-ol, constituinte majoritário do OE de *Melaleuca alternifolia* (“árvore do chá”), timol e carvacrol, constituintes majoritários do OE de *Origanum vulgare* (“orégano”), quando avaliados isoladamente, demonstraram atividade antibacteriana *in vivo* em jundiás experimentalmente infectados por *A. hydrophila* através da exposição a banhos diários de 30 min por 6 dias (SAGAVE et al., 2015; CUNHA et al., 2019). O estudo evidenciou também que, quando estes compostos estão na forma nanoencapsulada, promovem uma taxa de sobrevivência ainda melhor. Também foi constatado que parâmetros como os níveis de glicose e lactato no fígado e músculo dos jundiás não são indicados como biomarcadores, uma vez que não houve correlação entre a infecção bacteriana e o estado metabólico do peixe (CUNHA et al., 2019).

Os extratos vegetais são comumente empregados para a produção de fitomedicamentos e a atividade farmacológica proporcionada está relacionada ao seu fitocomplexo, cuja ação é resultante da interação complexa entre diferentes constituintes (KLEIN et al., 2009; SIMÕES et al., 2010). No que diz respeito a esta interação, os extratos merecem destaque na busca por novos compostos bioativos com propriedades antimicrobianas, por serem constituídos por uma grande variedade de substâncias capazes de atuar em diferentes alvos moleculares e, portanto, dificultam o desenvolvimento de resistência microbiana (YUNES et al., 2001).

1.2.4 *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling

O gênero *Hesperozygis* Epling, pertencente à família Lamiaceae, abrange seis espécies, das quais cinco se encontram distribuídas nas regiões sul e sudeste do Brasil, enquanto que uma é restrita ao México (FRACARO e ECHEVERRIGARAY, 2006; RIBEIRO et al., 2010). A espécie *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling é uma planta aromática, conhecida popularmente por “espanta-pulga” (FRACARO e ECHEVERRIGARAY, 2006; PINHEIRO, 2014). Segundo Fracaro e Echeverrigaray (2006), esta espécie é descrita como um arbusto lenhoso de 20 a 50 cm de altura, com caule bastante ramificado, cálice de coloração verde recoberto de tricomas curtos e corola de coloração alva a violácea (Figuras 4 e 5).



Figura 4 – *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling – aspecto geral da planta. Fonte: PINHEIRO, C. G. (arquivo pessoal – 2014).



Figura 5 – Inflorescência de corolação violácea de *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. Fonte: BORDIGNON, S. A. L. (Flora Digital do RS e de SC – http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=10668).

1.2.4.1 Distribuição

H. ringens é uma espécie sul americana, considerada endêmica das montanhas das regiões sudeste e sul do Rio Grande do Sul, e comumente encontrada em campos rupestres (FRACARO e ECHEVERRIGARAY, 2006; PINHEIRO, 2014). Segundo Pinheiro (2014), trata-se de uma espécie nativa de ocorrência em campos que integram o bioma Pampa. Fracaro (2006) relata ainda que seu crescimento é favorecido em baixas altitudes, menores de 400 m, em solos arenosos e pedregosos.

Devido à baixa ocorrência, esta espécie foi incluída na listagem oficial de espécies ameaçadas de extinção (Ministério do Meio Ambiente, 2008). Este fato pode ser decorrente de algumas atividades agropastoris para renovação de pastagens do local, como queimadas e limpezas de espécies consideradas invasoras dos campos para criação de gado (PINHEIRO, 2014). Além disso, a baixa eficiência na propagação das suas sementes também pode estar contribuindo para o risco de extinção dessa espécie (FRACARO, 2006; PINHEIRO, 2014).

1.2.4.2 Composição química

Estudos relativos à composição química de *H. ringens* referem-se, em sua maioria, ao seu óleo essencial (OE), cujo rendimento extrativo equivale a aproximadamente 4% (VON POSER et al., 1996; RIBEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2013a; SILVA et al., 2014). Recentemente, Pinheiro e colaboradores (2016) relataram que os maiores rendimentos são obtidos no outono, primavera e verão, cujos valores variam entre 2,32 a 4,38%, ao passo que os menores são detectados no inverno, variando entre 1,15 a 1,91%. Este nível mais baixo de OE pode estar relacionado ao maior número de dias chuvosos no sul do Brasil durante os meses de inverno, uma vez que as estruturas de armazenamento de OE de espécies da família Lamiaceae, como os tricomas glandulares, estão localizadas na superfície, sendo, por isso, removidas com facilidade pela chuva (SILVA et al., 2007; SANDES et al., 2012).

Dentre os diversos compostos identificados relatados na literatura para o OE, podem ser destacados α -pineno, sabineno, β -pineno, limoneno, 1,8-cineol, óxido de *Z*-linalol, óxido de *E*-linalol, linalol, mentona, terpinen-4-ol, α -terpineol, 8-hidróxi-*p*-mentan-3-ona, óxido de *E*-pulegona, 8-hidróxi-*p*-ment-4-en-3-ona, óxido de *Z*-pulegona, óxido de cariofileno, 2,3-epóxi-geranilacetato, canfeno, 1-octen-3-ol, β -mirceno, β -*E*-ocimeno, β -*Z*-ocimeno, eucaliptol, octen-1-ol, acetato de *p*-menta-1,3,8-trieno, 1-acetato de octen-3-ila, *p*-mentona, isopulegol, isomentona, isopulegona, verbenona, *E,E*-2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol,

pulegona, δ -elemeno, eucarvona, acetato de feniletilisobutanoato, β -cariofileno, α -cariofileno, aromadendreno, germacreno D, elixeno, biciclogermacreno, ledol, espatulenol, viridiflorol, epóxido de allo-aromadendreno, β -bisaboleno, 3-careno, β -linalol, neo-isopulegol, tricicleno, mirceno, α -felandreno, γ -terpineno, *iso*-isopulegol, *iso*-mentona, α -humuleno e globulol (VON POSER et al., 1996; RIBEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2013a; SILVA et al., 2014; TONI et al., 2014; TONI et al., 2015; PINHEIRO et al., 2016; BANDEIRA JUNIOR et al., 2017).

Embora o OE de *H. ringens* apresente diferentes constituintes fitoquímicos em sua composição, o monoterpenoide pulegona caracteriza-se como o constituinte majoritário, podendo variar o seu teor entre 54,13 e 96,63%, conforme verificado na Tabela 1. Em estudo de sazonalidade conduzido por Pinheiro e colaboradores (2016), verificou-se que a composição química do óleo de *H. ringens* pode variar quali e quantitativamente conforme a estação do ano. Estes mesmos autores destacam que a pulegona manteve-se como composto majoritário em todas as estações do ano, contudo o seu teor é variável de acordo com a estação, cujos maiores teores ocorrem no outono e verão, ao passo que o menor teor foi observado no inverno.

Tabela 1 – Teor do monoterpenoide pulegona em óleos essenciais obtidos das folhas de *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling.

Teor de pulegona	Referência bibliográfica
79,2%	VON POSER et al., 1996
86%	RIBEIRO et al., 2010
96,63%	SILVA et al., 2013a
95,18%	SILVA et al., 2014
95,18%	TONI et al., 2014
81,37%	TONI et al., 2015
54,13-81,17%	PINHEIRO et al., 2016
96,63%	BANDEIRA JUNIOR et al., 2017

A pulegona ($C_{10}H_{16}O$; peso molecular: 152,2334), também conhecida como *p*-ment-4(8)-en-3-ona, é um composto orgânico líquido praticamente insolúvel em água, mas miscível em etanol, éter dietílico e clorofórmio, classificado como monoterpenoide com função cetônica, e de odor agradável e refrescante de hortelã (Figura 6) (GRUNDSCHOBBER, 1979; BASER, KIRIMER e TÜMEN, 1996; SOULDOUZI et al., 2018; NIST, 2018). Inicialmente,

a pulegona foi isolada do OE de *Mentha pulegium* (“poejo”), do qual seu nome foi derivado (BASER, KIRIMER e TÜMEN, 1996).

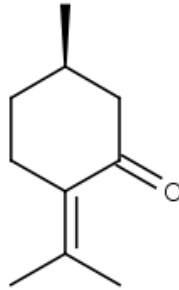


Figura 6 – Estrutura química do monoterprenoide pulegona (C₁₀H₁₆O). Fonte: <https://www.extrasynthese.com/r-pulegone.html>.

Este constituinte químico pode ser encontrado em uma variedade de plantas, sendo que ocorre naturalmente em ambas as formas enantioméricas (+) e (-) (SOUSA et al., 2011), porém nos OEs obtidos da família Lamiaceae a forma R-(+) é a que prevalece (BASER, KIRIMER e TÜMEN, 1996). Dentre estas espécies, a pulegona faz parte da composição química do OE, destacando-se *Nepeta cataria* (GIERCZYNSKI, JAKUBCZAK e JAGIELSKI, 2009), *Agastache formosanum* (SOUSA et al., 2011), *M. pulegium*, *Mentha longifolia* (YAHIA et al., 2019) e *Mentha spicata* (DHIFI et al., 2012), também pertencentes à família Lamiaceae. No gênero *Hesperozygis* Epling, também está presente no OE das espécies *Hesperozygis marifolia* (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2011), *Hesperozygis myrtooides* (MARTINI et al., 2011) e *Hesperozygis rhododon* (VON POSER et al., 1996).

Adicionalmente, não foram encontrados relatos quanto à composição química de extratos pertencentes a esta espécie vegetal.

1.2.4.3 Propriedades biológicas/farmacológicas comprovadas

Em relação às atividades biológicas de *H. ringens*, os diferentes estudos encontrados na literatura referem-se ao OE das folhas. Esta espécie vegetal é utilizada popularmente como inseticida, devido ao seu alto teor de pulegona, cuja propriedade inseticida já foi comprovada cientificamente (BASBAGCI e ERLER, 2013). Contudo, não foram encontrados outros estudos que confirmem tal propriedade para esta espécie vegetal.

Estudos conduzidos por Ribeiro e colaboradores (2010) evidenciaram ação antiparasitária/acaricida frente a fêmeas ingurgitadas e larvas do carrapato *Rhipicephalus*

(*Boophilus micriplus*) para o OE de *H. ringens*, o qual foi capaz de inibir significativamente a postura de ovos e a eclosão destes. Estes resultados confirmam o seu uso popular como agente antiparasitário. Bandeira Junior et al. (2017) também avaliou o potencial deste OE como antiparasitário, no entanto, frente a outro importante patógeno em piscicultura, o parasita monogenético *Gyrodactylus* sp., que apresentou mortalidade significativamente aumentada após 1 h de exposição ao OE.

De acordo com Silva et al. (2014), o OE possui propriedade larvicida, detectada frente a larvas da família Coenagrionidae (Odonata), comumente conhecidas como “libélulas”, constituindo-se pragas capazes de promover redução parcial ou total em populações de peixes. Além de atuar contra estes parasitas, o OE de *H. ringens* também demonstrou ação bacteriostática e bactericida frente a cepas de *A. hydrophila* e *A. veronii* (SUTILI et al., 2015a; BANDEIRA JUNIOR et al., 2017). Sutili e colaboradores (2015a) verificaram, ainda, que o OE permitiu a redução em 71% da hemólise gerada por bactérias β -hemolíticas de *A. hydrophila*, demonstrando a capacidade deste composto em inibir um importante fator de virulência desta bactéria.

Por meio de testes realizados em sementes de *Lactuca sativa* (“alface”), uma espécie bioindicadora utilizada em estudos de atividade alelopática inibitória em sementes dicotiledôneas, verificou-se um efeito antigerminativo tanto para o OE, quanto para o extrato alcóolico de *H. ringens*, também obtido a partir das folhas (VON POSER et al., 1996). Mais recentemente, verificou-se que o óleo de *H. ringens* tem potencial para controle de ervas classificadas como daninhas, como *Bidens pilosa* (“picão-preto”) e *Lolium multiflorum* (“azevém”), ao mesmo tempo em que não afeta a germinação de *L. sativa* e *Glycine max* (PINHEIRO et al., 2017). A diferença na atividade alelopática entre os estudos pode ser justificada pelas diferentes metodologias empregadas, bem como pela diferença entre cultivares da espécie-alvo (PINHEIRO et al., 2017). A toxicidade aguda do OE foi avaliada no zooplâncton de água doce *Daphnia pulex*, que determinou que a concentração letal (CL₅₀ – 24 h) foi de 61,5 mg/L, representando um baixo grau de toxicidade (BANDEIRA JUNIOR et al., 2017).

A atividade anestésica em jundiás para o OE de *H. ringens* foi comprovada através de testes conduzidos por Silva e colaboradores (2013), que destacam o potencial deste óleo, uma vez que o mesmo não foi capaz de induzir a efeitos adversos detectáveis, sendo que o óleo pode ser usado como anestésico para esta espécie de peixe em faixas de concentração de 111 a 554 μ L/L. Estes mesmos autores verificaram, através da avaliação dos níveis de glicose no sangue, que o OE não se caracteriza um agente estressor por si só.

Posteriormente, Toni et al. (2014) demonstraram que o OE de *H. ringens*, após indução de anestesia em jundiás, afeta o metabolismo energético dos mesmos, porém tais parâmetros são reestabelecidos em um período de recuperação de até 240 min (4 h). Estes autores destacam, ainda, que o OE não prejudica a ionorregulação dos peixes.

Com relação ao constituinte majoritário isolado do OE, a pulegona é utilizada como agente aromatizante em alimentos e bebidas, assim como é componente de fragrâncias e repelentes de pulgas (HALL e OSER, 1965; TYLER, 1993 apud OKUT et al., 2017). A respeito das atividades farmacológicas da pulegona, de Sousa et al. (2007), através do teste de contorção induzida por ácido acético em camundongos, verificaram um efeito antinociceptivo diretamente relacionado à estrutura química/grupo farmacofórico deste composto, cujo grupo cetona contribui tanto quanto ao grupo epóxido da rotundifolona (Figura 7), um monoterpenoide isolado do OE de *Mentha x vilosa* com atividade antinociceptiva comprovada. De Sousa et al. (2011) reforçam que a pulegona possui o perfil de um fármaco analgésico, confirmado através de modelos químicos e térmicos de nocicepção, além de ser um composto psicoativo com efeito depressor central, devido à diminuição na deambulação, aumento no tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos, e, ainda, aumento da latência de convulsões através do método de pentilenotetrazol.

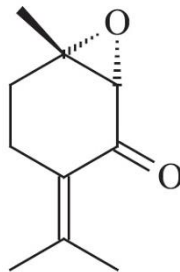


Figura 7 – Estrutura química do monoterpenoide rotundifolona (C₁₀H₁₄O₂). Fonte: adaptado de De Sousa et al. (2007).

Com base em dados da literatura, verificaram-se outras atividades biológicas para a pulegona, tais como antipirética (URBINA et al., 1989) e anti-histamínica (URBINA et al., 1990). Basbagci e Erler (2013) descrevem que a pulegona possui potencial para uso como fumigante para o controle de moscas do colmo de cogumelos. Entretanto, outros autores relatam atividade antimicrobiana para este monoterpenoide, a qual foi detectada por González-Chávez et al. (2011) frente ao fungo filamentoso *Aspergillus flavus* Link, e por Oumzil et al. (2002) frente a 12 diferentes cepas bacterianas, dentre algumas delas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. freundii* e *Proteus mirabilis*, além de atividade antifúngica frente *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

Adicionalmente, também foram descritas para a pulegona atividades hipercolesterolêmica (IMAZUMI et al., 1985), hepatotóxica e, ainda, foi verificada toxicidade em pulmão de camundongos (GORDON et al., 1982; THORUP et al., 1983), limitando o seu uso. Segundo Dhifi et al. (2012), a concentração segura para uso humano foi limitada a < 1% em função da toxicidade deste composto. Pavlidou e colaboradores (2004) inferem que a forte toxicidade deste monoterprenoide pode ser suprimida na presença de mentona, o que permite inferir que fenômenos sinérgicos, aditivos, potenciadores e/ou antagonísticos possam estar envolvidos na alteração da toxicidade da pulegona.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antibacteriano de diferentes extratos de *Hesperozygis ringens* no cultivo de peixes.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obter extratos hexânico e etanólico das folhas de *H. ringens*;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de *H. ringens* frente a cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Raoultella ornithinolytica* e *Citrobacter freundii*;
- Avaliar o efeito da aplicação do extrato mais eficiente como antibacteriano *in vitro* em ensaio de sobrevivência *in vivo* em juvenis de jundiás (*R. quelen*) infectados experimentalmente com *A. hydrophila*;
- Obter o perfil químico do extrato mais eficiente como antibacteriano.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Coleta, processamento e extração de *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling

Folhas de *Hesperozygis ringens* foram coletadas no distrito de Santo Antônio, Santa Maria, RS, e identificadas pelo Engenheiro Florestal Carlos Garrido Pinheiro. Uma exsicata

foi depositada no Herbário do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Por tratar-se de uma espécie ameaçada de extinção, solicitou-se uma autorização prévia para a coleta do material vegetal pelo Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade (SISBIO, número 44197-2).

Subsequentemente à coleta, as folhas foram secas à temperatura ambiente, pulverizadas em moinho de facas e submetidas à extração em aparelho de Soxhlet, utilizando hexano e, consecutivamente, após secagem completa do cartucho contendo o material vegetal, etanol a 96%, ambas extrações até a exaustão do pó das folhas. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e concentrados sob pressão reduzida, mantidos em dessecador até peso constante e, posteriormente, liofilizados para assegurar que as amostras estivessem completamente livres de solventes. O rendimento extrativo foi expresso em porcentagem, considerando o peso do material vegetal extraído (massa do extrato seco / massa do material vegetal seco %).

1.4.2 Análise da fração volátil do extrato hexânico de *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling por cromatografia gasosa

A análise da composição química foi realizada utilizando apenas o extrato hexânico, pois o mesmo apresentou a melhor atividade nos ensaios antibacterianos *in vitro* e, por isso, também foi escolhido para os experimentos *in vivo*. A identificação dos componentes químicos da fração volátil do extrato hexânico de *H. ringens* (EHHR) (análise qualitativa) foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em sistema hifenado AGILENT 7890A, equipado com um detector seletivo de massas série 5975C. Por meio desta técnica, é possível analisar e identificar compostos voláteis, como os terpenoides, que compõem os OEs e as frações voláteis dos extratos obtidos com solventes orgânicos apolares, entre eles o hexano (FRONZA et al., 2011; BANDEIRA JUNIOR et al., 2017). O extrato (10 mg) foi diluído em hexano (1,5 mL) (grau HPLC) e sonicado (Unique 1450A) durante 10 min. Subsequentemente, o extrato foi filtrado em membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) hidrofóbica, com poros de 0,45 µm e uma alíquota de 1 mL foi retirada para análise. A determinação quantitativa da fração volátil foi realizada por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC). Este procedimento foi realizado em triplicata.

A análise foi realizada em uma coluna capilar DB5-MS (5% fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm). Os parâmetros de análise utilizados foram: modo de

injeção Split inlet 1:50; programação do forno: 40°C de temperatura inicial (TI) por 4 min, 40-320°C a 4°C/min; gás carreador: He (1 mL/min); temperatura do injetor, detector e interface: 250°C. Os componentes foram identificados por comparação de seus índices de retenção de Kovats (IK), determinados por uma curva de calibração de n-alcenos, injetados sob as mesmas condições cromatográficas que as amostras, e padrões de fragmentação de massas descritos na literatura e na espectroteca do equipamento (ADAMS, 2009; NIST, 2009).

Para quantificação dos fitoconstituintes por CG-DIC, utilizou-se um cromatógrafo AGILENT 7890A. Os parâmetros de análise foram os mesmos que os mencionados anteriormente para CG-EM, com exceção dos seguintes: injeção pelo modo splitless; temperatura do injetor e detector: 300°C. A porcentagem dos componentes químicos foi baseada na normalização da área do pico.

1.4.3 Cepas bacterianas

Os isolados clínicos utilizados neste estudo foram obtidos de peixes naturalmente infectados (*R. quelea*) identificados fenotipicamente e genotipados por Bandeira Junior et al. (2018). As sequências foram depositadas no banco de dados do GenBank sob números: *A. hydrophila* cepa 13 (MF 372509), *A. hydrophila* cepa 18 (MF 372510), *A. hydrophila* cepa 169/07 (MH 397689), *A. veronii* cepa 58/17 (MH 397688), *C. freundii* (MF 565839) e *R. ornithinolytica* (MF 372511). *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 também foi incluído nos ensaios.

1.4.4 Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

A atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos foi avaliada utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento VET04-A2 (CLSI, 2014). Para estes ensaios, foram utilizados 64 mg de cada extrato. Os extratos hexânico e etanólico foram diluídos em etanol a 96 e 70%, respectivamente, e incorporados ao caldo Mueller-Hinton com ajuste catiônico (CMHAC) (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO) nas concentrações de 6.400; 3.200; 1.600; 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. O antimicrobiano florfenicol (Sigma Aldrich®) foi utilizado como controle positivo, pois é um dos antimicrobianos aprovados pelo FDA para uso em aquicultura (FDA, 2014), diluído em etanol a 96% e incorporado no CMHAC nas

concentrações de 130; 65; 32,5; 16,25; 8,12; 4,06; 2,03; 1,02; 0,51; 0,25 e 0,12 µg/mL. Etanol 96 e 70% foram testados como controles veiculares. Todas as amostras foram testadas em triplicata. O inóculo bacteriano foi preparado com colônias crescidas em ágar Mueller-Hinton (AMH) (Sigma Aldrich®) (28°C/48 h em condições aeróbicas) em solução salina a 0,9% com densidade óptica ajustada para 0,15 (600 nm), equivalendo a $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Posteriormente, foi realizada uma diluição de 1:10 em CMHAC, resultando em um inóculo de concentração 1×10^7 UFC/mL. Desta suspensão, 10 µL (1×10^5 UFC/mL) foram inoculados em todos os poços, exceto nos referentes ao controle negativo. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por 24 h em condições de aerobiose.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos após a incubação. A adição de 10 µL de solução de corante resazurina a 0,1 % (Sigma Aldrich®) foi utilizada para indicar a viabilidade microbiana, evidenciada pela coloração rosa nos poços, ou indicar a ausência de crescimento microbiano, evidenciada pela coloração azul. Os valores da concentração bactericida mínima (CBM) foram determinados por re-inoculação (28°C/24 h sob condições aeróbicas) de alíquotas de 10 µL dos poços onde não houve crescimento detectável na superfície de placas contendo AMH. A menor concentração da amostra que não mostrou crescimento de colônia foi definida como o CBM.

1.4.5 Ensaio de sobrevivência *in vivo*

Juvenis de jundiá (*R. quelen*) da mesma desova foram transferidos de uma piscicultura local para o Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE), onde foram mantidos e aclimatados durante 3 dias em tanques continuamente aerados. Os animais (N = 120; $7,68 \pm 0,14$ g e $11 \pm 0,12$ cm) foram distribuídos em 24 caixas plásticas (15 L). Os juvenis foram inoculados via intramuscular no lado direito latero-dorsal com 15 µL de solução salina (60 animais) ou 15 µL da *A. hydrophila* cepa 18 (MF 372510) ($1,95 \times 10^8$ UFC/mL; *optical density* (OD) = 0,3; 600 nm) (60 animais). Os peixes não infectados e infectados foram submetidos a quatro tratamentos: controle, EHHR 15 mg/L, EHHR 30 mg/L e FLOR 4 mg/L (tratado com florfenicol 40%, solução injetável, Maxflor®; Virbac, São Paulo, Brasil), totalizando oito grupos (em triplicata, n = 5). O EHHR foi escolhido devido ao seu melhor efeito *in vitro*. Segundo estudo anterior (Rodrigues, P., dados não publicados), as concentrações de EHHR testadas são as mais altas que não possuem efeito anestésico no

jundiá, e foram escolhidas para evitar efeitos colaterais comportamentais durante o longo tempo de exposição nos protocolos de banho. Após a inoculação da suspensão bacteriana ou solução salina, os animais foram transferidos para caixas plásticas e, após 5 h, os tratamentos foram adicionados à água. O EHHR foi previamente diluído em etanol a 96% (1:10) antes de ser adicionado ao banho de água. A partir do segundo dia, 20% da água das caixas foi renovada, sem substituir o extrato/antimicrobiano. A mortalidade foi observada por 7 dias e, posteriormente, os animais remanescentes foram eutanasiados por secção medular.

Durante os experimentos, a temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidos com um medidor de oxigênio YSI (Modelo Y5512). O pH foi verificado com um medidor de pH DMPH-2 (Digimed, São Paulo, Brasil). Os níveis totais de amônia foram determinados usando um kit comercial (Labcon Test). A média dos parâmetros de qualidade da água foram os seguintes: temperatura $20,3 \pm 0,12$, nível de oxigênio dissolvido $8,18 \pm 0,18$ mg/L, pH $7,64 \pm 0,04$ e amônia total $0,025 \pm 0,01$ mg/L. Os animais eram alimentados uma vez ao dia até a saciedade com ração comercial. O alimento não consumido, outros resíduos e fezes eram removidos 30 minutos após a alimentação. Os peixes mortos também eram removidos todos os dias.

A metodologia utilizada neste experimento foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM sob o protocolo número 5307210617.

1.4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A sobrevivência dos peixes foi comparada usando a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier com o teste logrank (SIGMA PLOT 11.0; Systat Software, Erkrath, Alemanha). O nível mínimo de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

2 ARTIGO

O artigo intitulado “Extracts of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity against fish pathogenic bacteria” foi publicado no periódico **Journal of Applied Microbiology**.

ORIGINAL ARTICLE

Extracts of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity against fish pathogenic bacteria

I.A. Rosa¹ , P. Rodrigues¹, A.E. Bianchini¹, B.P. Silveira², F.T. Ferrari³, G. Bandeira Junior¹ , A.P.C. Vargas², B. Baldisserotto¹  and B.M. Heinzmann^{1,3} 

1 Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

2 Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

3 Department of Industrial Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

Keywords

antibiotics, aquaculture, diseases, fish (live), infection.

Correspondence

Berta Maria Heinzmann, Department of Industrial Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, n° 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail: berta.heinzmann@gmail.com

2018/1887: received 2 October 2018, revised 10 January 2019 and accepted 29 January 2019

doi:10.1111/jam.14219

Abstract

Aims: This study investigated the *in vitro* antibacterial activity of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling leaf extracts against fish pathogenic bacteria, as well as the *in vivo* activity of the most active extract in silver catfish (*Rhamdia quelen*) experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Moreover, the chemical composition of the extract used in the survival assay was evaluated.

Methods and Results: Only hexane extract (HEHR) showed *in vitro* antibacterial activity (MIC and MBC ranging from 1600 to 3200 µg ml⁻¹) against clinical isolates of *A. hydrophila*, *Raoultella ornithinolytica* and *Citrobacter freundii*, obtained from naturally infected silver catfish, and *A. hydrophila* ATCC 7966. The major compound of the volatile fraction of HEHR was determined as pulegone. HEHR promoted a 93.33% relative survival rate of silver catfish experimentally infected with *A. hydrophila* 7 days after a single therapeutic bath at 30 mg l⁻¹, while florfenicol at 4 mg l⁻¹, which promoted a 60% relative survival rate.

Conclusions: The antibacterial activity of *H. ringens* (Benth.) Epling leaf extracts seems to be related to phytochemicals of apolar character, since HEHR promoted better survival rate of infected animals than florfenicol.

Significance and Impact of the Study: The HEHR has potential to be used in the control and treatment of bacterial infections in organic aquaculture.

Introduction

Aquaculture has shown exponential growth worldwide and Brazil stands out, mainly due to continental aquaculture (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations 2016). Silver catfish (*Rhamdia quelen*) is the most cultivated native species in Rio Grande do Sul, southern Brazil (Baldisserotto 2009). The species shows easy handling (Fracalossi *et al.* 2002), fast growth (Gomes *et al.* 2000), and easy adaptation to different environments (Marchioro and Baldisserotto 1999). In addition, it is quite tolerant to cold (Fracalossi *et al.* 2002; Baldisserotto 2009) and well accepted by the consumer market (Marchioro and Baldisserotto 1999).

Fish are constantly subjected to stressors such as overcrowding, sudden temperature changes, handling, low-dissolved oxygen concentration, poor nutritional status and adverse health conditions. These stressors contribute to physiological changes and increased susceptibility to infections (Segner *et al.* 2012; Olusola *et al.* 2013). Environmental changes and stress are directly related to bacterial outbreaks caused mainly by *Aeromonas hydrophila* (Barcellos *et al.* 2008). In fish culture, this is particularly important because of economic losses from high mortality rates, due to infectious diseases (Barcellos *et al.* 2008; Romero *et al.* 2012).

Aeromonas hydrophila is a facultative anaerobic Gram-negative rod (Pemberton *et al.* 1997). The virulence of

this bacterium is multifactorial and is related to the presence of pili, the ability to secrete a wide range of enzymes, such as aerolysins, haemolysins, enterotoxins, phospholipases and proteolytic enzymes, and form biofilm, which contributes to the resistance to antibiotics (Pemberton *et al.* 1997; Barcellos *et al.* 2008; Pandey *et al.* 2010; Bandeira Junior *et al.* 2018). In fish, *A. hydrophila* causes ulcerative lesions, exophthalmia, fins erosion and rotting, haemorrhagic septicaemia, and may lead to death (Cipriano *et al.* 2001; Barcellos *et al.* 2008). This bacterium is associated with opportunistic infections, which can also affect humans causing diarrhoea, urinary infections and, in more serious cases, death (Hochedez *et al.* 2010; Viswanatan *et al.* 2015).

Other bacteria that can cause diseases in fish are *Citrobacter freundii* and *Raoultella ornithinolytica*. *Citrobacter freundii* is a Gram-negative Enterobacteriaceae, characterized by being an opportunistic pathogen and some strains have multidrug resistance (Pádua *et al.* 2014). In fish, it is associated with gastroenteritis, severe enteritis, haemorrhages and haemorrhagic septicaemia (Svetlana *et al.* 2003; Pádua *et al.* 2014). On the other hand, the Gram-negative *R. ornithinolytica* is a histamine-producing bacterium able to grow slowly at 4°C. Due to this fact, it may cause histamine poisoning in humans by ingestion of contaminated fish (Kanki *et al.* 2002). In addition, this bacterium may cause urinary tract infection, enteric fever, renal cysts and sepsis (Nakasone *et al.* 2015).

The therapeutic arsenal for the treatment of infections in fish is small, with only oxytetracycline, florfenicol and sulphadimethoxine/ormetoprim approved by the Food and Drug Administration (FDA) for use in aquaculture (FDA 2014). However, such antibiotics may induce adverse effects such as immunodepression and nephrotoxicity, related to its excessive use (Romero *et al.* 2012). In addition, according to FAO guidelines, the use of synthetic antibiotics is not allowed in organic aquaculture and in this case, only the use of plant extracts is authorized (Prein *et al.* 2012).

Recent studies have targeted natural products, since they often contain active substances with pharmacological properties able to treat and/or prevent diseases and thus promote animal welfare (Silva *et al.* 2013b; Sutili *et al.* 2015b; Bandeira Junior *et al.* 2017). The use of substances from natural sources has several advantages over synthetic compounds since they are less likely to induce adverse effects and are able to cause synergistic effects when combined (Yunes *et al.* 2001). In addition, they are a source of biodegradable active molecules, rendering them an ecologically correct option with a relevant therapeutic potential (Yunes *et al.* 2001; Olusola *et al.* 2013).

The mechanisms of bacterial resistance to antibiotics are related either to intrinsic or acquired resistance

(Romero *et al.* 2012). The first relates to the natural ability of resistance to a particular or class of antibiotic (Romero *et al.* 2012; Codjoe and Donkor 2018). However, in the second and most troubling, bacteria acquire resistance by transferring antibiotic resistant genes from one cell to another (Romero *et al.* 2012). Plant extracts consist of a great variety of substances with distinct mechanisms of action, since each substance can act on a different molecular target, which hinders the development of microbial resistance (Yunes *et al.* 2001). For this reason, products of natural origin are a promising source of new antimicrobial compounds.

Hesperozygis ringens (Benth.) Epling (Lamiaceae) is known by the vernacular name of 'espanta-pulga' (Von Poser *et al.* 1996). It is a shrub 20–50 cm high, native to rocky fields of the Pampa biome with a very branched stem (Fracaro and Echeverrigaray 2006). Its essential oil (EO) has pharmacological properties such as larvicide (Ribeiro *et al.* 2010; Silva *et al.* 2014), anaesthetic (Silva *et al.* 2013a), antimicrobial (Sutili *et al.* 2015b; Bandeira Junior *et al.* 2017) and antiparasitic (Bandeira Junior *et al.* 2017). However, to the best of our knowledge, the extracts obtained from this species through solvent extraction have not yet had their biological activities evaluated.

Thus, there is an increasing demand for new antibacterial compounds with low-residual effects for the fish farming sector because the consumption of meat containing high-residual levels of antibiotic characterizes a risk to public health (Romero *et al.* 2012). In addition, due to the need to combat bacterial infections by *C. freundii* and *R. ornithinolytica*, as well as the increase in the incidence of infections caused by *A. hydrophila*, we investigated the antibacterial potential of *H. ringens* extracts in aquaculture. Therefore, the *in vitro* activity of *H. ringens* extracts against fish pathogenic bacteria was assayed. The *in vivo* activity of the most active *in vitro* extract was then assayed using juvenile silver catfish (*R. quelen*) experimentally infected by *A. hydrophila*. In addition, aiming to explain the observed *in vivo* effect, the chemical composition of the extract volatile fraction is described.

Materials and methods

Collection, plant processing and extraction of *H. ringens* (Benth.) Epling

Leaves of *H. ringens* were collected in the district of Santo Antônio, Santa Maria, RS, Brazil and identified by forest engineer Carlos Garrido Pinheiro. Voucher specimen (HDCF 6720) was deposited in the Herbarium of the Department of Forestry Sciences at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Because the plant is an endangered species, authorization for the collection of

plant material was granted by the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO, number 44197-2).

Once collected, the leaves were dried at room temperature, pulverized in a knife mill and then subjected to Soxhlet extraction, using hexane and consecutively, after complete drying of the cartridge containing the plant material, 96% ethanol, both extractions up to the exhaustion of leaf powder (De Castro and Priego-Capote 2010). The extracts were filtered on a filter paper and concentrated under reduced pressure, kept in a desiccator until constant weight and then lyophilized to ensure that the samples were completely free of solvents. The extractive yield is expressed in percentage, considering the weight of the extracted plant material (mass of dry extract/mass of dry plant material %).

Gas chromatography analysis of the volatile fraction of *H. ringens* hexane extract

The analysis of the chemical composition was carried out using only the hexane extract, since this presented the best activity in the antibacterial *in vitro* trials (see Results) and was chosen for the *in vivo* experiments. The identification of the chemical components of the volatile fraction of the hexane extract (HEHR) (qualitative analysis) was carried out by GC-MS in hyphenated system Agilent 7890A, equipped with a mass selective detector series 5975C. By means of this technique, it is possible to analyse and identify volatile compounds, such as terpenoids, which compose both EOs and volatile fractions of extracts obtained with apolar organic solvents, among them hexane (Fronza *et al.* 2011; Bandeira Junior *et al.* 2017). The extract (10 mg) was diluted in hexane (1.5 ml) (grade HPLC) and submitted to ultrasound (Unique 1450A) for 10 min. Subsequently, the extract was filtered in hydrophobic 0.45 μm PTFE (polytetrafluoroethylene) membrane, and an aliquot of 1.0 ml was taken for analysis. The quantitative determination of the volatile fraction was performed by GC with flame ionization detector (GC-FID). This procedure was performed in triplicate.

The analysis was carried out on a DB5-MS capillary column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m \times 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm). The following conditions were used: split inlet 1 : 50; temperature program: 40°C for 4 min; 40–320°C at 4°C min^{-1} ; He as a gas carrier; flow rate 1 ml min^{-1} ; injector, detector and interface temperatures: 250°C. The components were identified by comparison of their retention indices, determined by a calibration curve of n-alkanes injected under the same chromatographic conditions as the samples and mass fragmentation patterns described in the literature (Adams 2009; NIST 2010).

For quantification by GC-FID, an Agilent 7890A was used. The parameters of the analysis were the same as those previously mentioned for GC-MS, with exception of the following: splitless mode injection; temperature of injector and detector: 300°C. The percentage of the chemical components was based on peak area normalization.

Bacterial strains

Clinical isolates used in this study were obtained from naturally infected fish (*R. quelen*) identified phenotypically and genotyped by Bandeira Junior *et al.* (2018). The sequences were deposited in the GenBank database under numbers: *A. hydrophila* strain 13 (MF 372509), *A. hydrophila* strain 18 (MF 372510), *A. hydrophila* strain 169/07 (MH 397689), *A. veronii* strain 58/17 (MH 397688), *C. freundii* (MF 565839) and *R. ornithinolytica* (MF 372511). *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 was also included in the assays.

Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration assays

In vitro antibacterial activity of the extracts was evaluated using the broth microdilution method in accordance with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), document VET04-A2 (CLSI 2014). For these assays, 64 mg of each extract was used. Hexane and ethanol extracts were diluted in 96 and 70% ethanol, respectively, and incorporated in CAMHB (Cation-adjusted Mueller-Hinton broth; Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO) at the concentrations of 6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.12 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The antibiotic florfenicol (Sigma Aldrich[®]) was used as positive control, because it is one of the antimicrobials approved by the FDA for the use in aquaculture (FDA 2014), diluted in 96% ethanol and incorporated in CAMHB at the concentrations of 130, 65, 32.5, 16.25, 8.12, 4.06, 2.03, 1.02, 0.51, 0.25 and 0.12 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Ethanol 96 and 70% were tested as vehicle controls. All samples were tested in triplicate. The bacterial inoculum was prepared with colonies grown in MHA (Mueller-Hinton agar; Sigma Aldrich[®]) (28°C/48 h under aerobic conditions) in 0.9% saline solution at the concentration of $1\text{--}2 \times 10^8$ CFU per ml, the optical density of 600 nm was adjusted to 0.15 using a spectrophotometer. Thereafter, a 1 : 10 dilution in CAMHB was performed, resulting in a concentration inoculum of 1×10^7 CFU per ml. From this suspension, 10 μl (1×10^5 CFU per ml) was inoculated into all wells, except for the negative control. The microplates were incubated in a bacteriological oven at 28°C for 24 h under aerobic conditions.

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of each sample capable

of inhibiting the visible growth of the micro-organisms after incubation. The addition of 10 μl of 0.1% resazurin dye solution (Sigma Aldrich®) was used to indicate microbial viability, evidenced by the pink colour in the wells or the blue coloration indicating nonmicrobial growth. Minimum bactericidal concentration (MBC) values were determined by re-inoculation of 10 μl aliquots from the wells where no growth on the MHA surface was detectable after incubation at 28°C/24 h under aerobic conditions. The lowest concentration of the sample showing no colony growth was defined as the MBC.

Survival experiments

Silver catfish juveniles from the same spawning were transferred from a local fish farm to the laboratory, where they were kept and acclimated for 3 days in continuously aerated tanks. The animals ($N = 120$; 7.68 ± 0.14 g and 11 ± 0.12 cm) were distributed into 24 plastic boxes (15 l). The juveniles were inoculated intramuscularly in the latero-dorsal right side with either 15 μl of saline solution (60 animals) or 15 μl of *A. hydrophila* strain 18 (MF 372510) (1.95×10^8 CFU per ml; 0.3 OD 600 nm) solution (60 animals). Uninfected (U) and infected (I) fish were submitted to four treatments: control, HEHR 15 mg l⁻¹, HEHR 30 mg l⁻¹ and FLOR 4 mg l⁻¹ (treated with florfenicol 40%, injectable solution, Maxflor®, Virbac, São Paulo, Brazil), yielding eight groups (in triplicate, $n = 5$). The HEHR was chosen due to its better *in vitro* effect (see Results). According to a previous study (Rodrigues, P., unpublished data), the tested HEHR concentrations are the highest that have no anaesthetic effect in silver catfish, and were chosen to avoid behavioural side effects during the long exposure time of the bath protocols. After inoculation of the bacterial suspension or saline, the animals were transferred to plastic boxes and after 5 h the treatments were added to the water. The HEHR were previously diluted in 96% ethanol (1 : 10) before being added to the water bath. From the second day, 20% of the water from the treatment boxes was renewed, without replacing the extract/antibiotic. Mortality was observed for 7 days and afterwards, the remaining animals were euthanized by spinal cord sectioning.

During the experiments, dissolved oxygen and temperature were measured with an YSI oxygen meter (Model Y5512). The pH was verified with a DMPH-2 pH meter (Digimed, São Paulo, Brazil). Total ammonia levels were determined using a commercial kit (Labcon Test). The mean water quality parameters were as follows: temperature 20.3 ± 0.12 °C, dissolved oxygen level 8.18 ± 0.18 mg l⁻¹, pH 7.64 ± 0.04 , and total ammonia 0.025 ± 0.01 mg l⁻¹. The animals were fed once a day to satiation with commercial feed. Any uneaten food, other residues

and faeces were removed 30 min after feeding. Dead fish were also removed everyday.

The methodology used in this experiment was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria under protocol number 5307210617.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SE. Fish survival was compared using Kaplan–Meier survival analysis with the logrank test (SIGMA PLOT 11.0; Systat Software, Erkrath, Germany). The minimum significance level was set at $P \leq 0.05$.

Results

Extractive yield and chemical composition of volatile fraction of HEHR

The yield of HEHR was $5.80 \pm 0.36\%$, while the EEHR furnished a yield of $13.98 \pm 0.12\%$. GC-MS and GC-FID analysis of HEHR volatile fraction allowed the identification of six compounds (Table 1). Ten other constituents were detected, but could not be identified, indicating that they are unpublished substances. The major component was identified as the monoterpenoid pulegone (C₁₀H₁₆O), with a content of 47%.

Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration

The most favourable *in vitro* antibacterial activity results were detected for the hexane extract, for which MICs and MBCs found were between 1600 and 6400 $\mu\text{g ml}^{-1}$. However, the hexane extract showed no bactericidal action on the strains *R. ornithinolytica* and *C. freundii*. The ethanol extract of *H. ringens* showed no antibacterial effect up to 6400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Table 2).

Table 1 Chemical composition of the hexane extract volatile fraction obtained from *Hesperozygis ringens* leaves

	RT	CKI	LKI*	Compound	%
1	19.95	1154	1154	Menthone	5.82
2	20.49	1168	1169	Menthol	3.86
3	20.69	1173	1175	Isopulegone	1.84
4	22.98	1236	1237	Pulegone	47.00
5	33.93	1574	1573	Spathulenol	4.35
6	34.09	1579	1576	Caryophyllene	2.19
Total identified =					65.06

RT, retention time; CKI, calculated Kovats index; LKI, literature Kovats index.

*Adams (2009); NIST (2010).

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of hexane (HEHR) and ethanol (EEHR) extracts of *Hesperozygis ringens* (6400–3.12 $\mu\text{g ml}^{-1}$) against fish pathogenic bacteria

Strain	HEHR		EEHR		Florfenicol	
	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 13 (MF372509)	3200	3200	>6400	>6400	0.51	0.51
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 18 (MF372510)	3200	3200	>6400	>6400	0.51	0.51
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain 169/09 (MH 397689)	3200	3200	>6400	>6400	1.02	1.02
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	1600	1600	>6400	>6400	0.51	0.51
<i>Aeromonas veronii</i> strain 58/17 (MH 397688)	1600	1600	>6400	>6400	0.25	0.25
<i>Raotella ornithinolytica</i> strain 35 (MF372509)	6400	>6400	>6400	>6400	2.03	32.5
<i>Citrobacter freundii</i> strain 23 (MF372511)	6400	>6400	>6400	>6400	8.12	130

Survival experiments

In this study, there was a 100% survival rate of animals from uninfected control group. The other uninfected groups, HEHR 15, HEHR 30 and FLOR 4, presented relative survival rates of 100, 93.33 and 93.33% respectively. Therefore, the uninfected groups did not differ statistically between themselves. The infected and untreated control group had a relative survival rate of 46.66%. In the infected group treated with the antibiotic florfenicol (4 mg l^{-1}), the relative survival rate was 60%. However, the infected fish exposed to 15 and 30 mg l^{-1} of HEHR presented relative survival rates of 66.66 and 93.33% respectively (Figure 1).

These results showed a concentration-dependent effect of HEHR on fish survival. No significant differences were

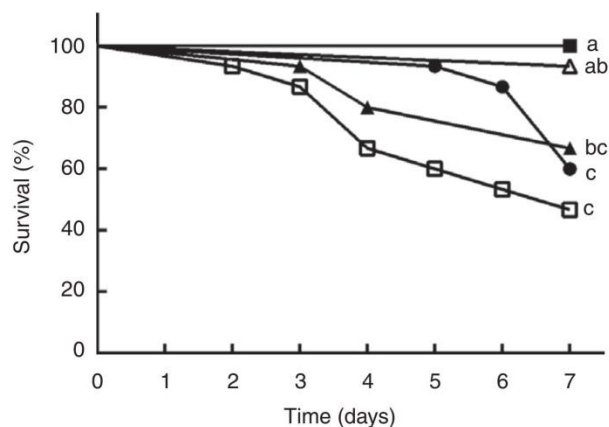


Figure 1 Survival rate of silver catfish juveniles infected with *Aeromonas hydrophila* (MF 372510) and treated with a single therapeutic bath of *Hesperozygis ringens* hexane extract (HEHR). Different letters indicate a significant difference between the groups. Kaplan–Meier survival analysis with logrank test ($p \leq 0.05$). (■) Uninfected control (fish inoculated with sterile saline), (●) FLOR (fish infected and treated with 4 mg l^{-1} of florfenicol), (△) HEHR 30 (30 mg l^{-1} of HEHR), (▲) HEHR 15 (15 mg l^{-1} of HEHR), (□) control infected (fish infected and untreated)

detected between the infected and treated groups with HEHR 15 and FLOR 4. However, both HEHR 15 and FLOR 4 differed from uninfected control, whereas HEHR 30 did not. The HEHR 30 treatment differed statistically from the antibiotic and it was the only infected group to present significant difference when compared to the infected control. Additionally, the extracts and florfenicol alone did not induce apparent toxicity.

Discussion

Extract yield of a plant species may vary according to the solvent used, the time and temperature of extraction, the particle size of the plant material to be extracted, and especially, the chemical nature of the sample (Cunha et al. 2004; Nasir et al. 2015). Thus, the choice of solvents to be used in the extraction process depends on the chemical properties of the required components (Wang et al. 2013). This could justify the difference in the extractive yield between hexane and ethanol extracts of *H. ringens* leaves. A number of studies regarding the EO from *H. ringens* fresh leaves reported yields of approximately 4.0% (Von Poser et al. 1996; Ribeiro et al. 2010). This is similar to the result obtained in this study for HEHR, which is composed of volatile and nonvolatile constituents.

No reports were found on the phytoconstituents of *H. ringens* leaf extracts. For this reason, a sequential extraction was carried out with solvents of increasing polarity. Hexane was firstly used, and then ethanol in order to ensure that the compounds with different polarities could be extracted successfully (Nasir et al. 2015). According to the literature, monoterpenoids, sesquiterpenoids, diterpenoids, triterpenoids and carotenoids can be found in hexane extracts (Kunle et al. 2003; Fronza et al. 2011; Nicolaus et al. 2017). On the other hand, polar solvents such as ethanol have the ability to extract compounds of similar polarity, such as flavonoids (Sharma and Janmeda 2017). As such, this class of polyphenolic constituents is not

usually found in hexane extracts. Monoterpenoids and sesquiterpenoids were identified in the chemical composition of the volatile fraction of HEHR, which makes this result analogous to the ones found in the literature for the EO of *H. ringens* (Von Poser *et al.* 1996; Silva *et al.* 2013a; Pinheiro *et al.* 2016). However, only 65.06% of the hexane soluble fraction could be identified by gas chromatography. Consequently, about a third of the hexane extract components remains unknown; therefore, other methods must be used to identify them. However, first these compounds need to be isolated, so that structural elucidation by spectroscopic methods is possible.

A study on the seasonality of the EO of this species identified an average 93.22% of the volatile substances and 72.76% of monoterpenoid pulegone, ranging from 54.13 to 81.17%, depending on the season (Pinheiro *et al.* 2016). This result differs from this study, in which only 47% of pulegone was detected, from a total of 65.06% of volatile substances identified in HEHR. Other studies reported pulegone as the major component of leaves EO of this species and its percentage may range from 79.2 to 96.63% (Von Poser *et al.* 1996; Ribeiro *et al.* 2010; Silva *et al.* 2013a). For the oxygenated-monoterpenoid pulegone, some biological properties are described in the literature, such as acaricide, allelopathic and insecticide (Mucciarelli *et al.* 2001; Ribeiro *et al.* 2010; Basbagci and Erler 2013).

The variation in the chemical composition of the EO and HEHR may be related to the fact that the conditions of obtaining the extract and the EO were completely different. The EO extraction process requires a shorter extraction time, approximately 3 h. In the method used, only volatile substances are carried by water vapour. However, for the preparation of the extracts using the Soxhlet apparatus, a boiling time of up to 4 h is recommended (European Pharmacopoeia 2007) and all soluble substances in the elected solvent are extracted. Since in this study we used the Soxhlet apparatus until the plant material had completely depleted, the extraction process was performed for 10 h, with a greater exposure to heating and light. Volatile constituents are often photosensitive and tend to be more unstable in the presence of heat, moisture and light, loss may have occurred during preparation of the extract under study (Turek and Stintzing 2013).

In addition, different cultivation sites and factors such as seasonality, pluviometric index, ultraviolet radiation, temperature, atmospheric composition and plant age can interfere with the chemical composition and consequently, in the pharmacological activity of *H. ringens* (Gobbo-Neto and Lopes 2007). Figueiredo *et al.* (2008) reported that the production of secondary plant metabolites can also be influenced by environmental conditions such as pollution, diseases and pests.

Other substances such as menthone, menthol, isopulegone, spathulenol and caryophyllene were identified in the volatile fraction of HEHR and are part of the constituents frequently found in the EO of this species, except menthol (Pinheiro *et al.* 2016). Among the unidentified constituents, there may be compounds unreported in the literature and therefore require isolation for subsequent structural elucidation.

It is noteworthy that no reports have been found on the antimicrobial activity of the HEHR. According to Sutili *et al.* (2015b), the EO of *H. ringens* leaves showed antibacterial activity against fifteen strains of *A. hydrophila* through broth microdilution method. The values of MIC and MBC obtained in this study ranged from 800 to 3200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and were similar to those observed in the present study (MIC and MBC 1600–3200 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Bandeira Junior *et al.* (2017) also verified bactericidal effect of the EO of this species against *Aeromonas* species (MIC and MBC 400–1600 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Moreover, these authors detected antibacterial activity against *R. ornithinolytica* and *C. freundii* (MIC and MBC 1600–3200 $\mu\text{g ml}^{-1}$), while in this study only bacteriostatic action was detected (MIC = 6400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for both the strains. The fact that results for HEHR are in agreement with previous EO studies is not surprising, since they are apolar samples derived from the same organ of a single plant species. Thus, EO and HEHR partially share chemical composition (menthone, pulegone, isopulegone, spathulenol and caryophyllene) which may be directly related to the antibacterial action against fish pathogenic bacteria (Pinheiro *et al.* 2016; Bandeira Junior *et al.* 2017). Nonetheless, the *in vitro* antibacterial activity observed in this study is generally considered weak (Cos *et al.* 2006).

According to Barcellos *et al.* (2008), *A. hydrophila* causes the main infection that affects *R. quelen*. For this reason, the HEHR potential in the treatment of silver catfish juveniles experimentally challenged with *A. hydrophila* was evaluated. In a study conducted by Sutili *et al.* (2015b), exposure to 20 and 40 mg l^{-1} EO of *H. ringens* showed relative survival rates of 70 and 66% through therapeutic baths of 1 h during 5 days. The result obtained for HEHR indicates a better relative survival rate (93.33%). Furthermore, in our study, fish were exposed to a single therapeutic bath. Hence, the best results obtained for the extract in the *in vivo* experiments when compared to the EO suggest that the components not yet identified may be playing a significant role in the *in vivo* observed effect. These constituents may be acting synergistically in favour of pathogen elimination and/or favouring the immune system of silver catfish.

Other species of Lamiaceae family also positively impacted the survival of silver catfish infected with *A. hydrophila*. The EO of the species *Ocimum americanum*

(20 mg l⁻¹) promoted 75% relative survival rate (Sutuli et al. 2015b). On the other hand, the EO of *Lippia alba* (Verbenaceae) promoted a relative survival rate greater than 80% at 16 mg l⁻¹ and greater than 90% at 40 mg l⁻¹ (Sutuli et al. 2015a).

Considering our results, the *in vitro* antibacterial activity of *H. ringens* seems to be related to phytochemicals of apolar character, since only the hexane extract was effective. Moreover, despite HEHR having demonstrated a weak *in vitro* antibacterial activity against fish pathogenic bacteria, this extract promoted a greater survival rate of silver catfish juveniles challenged with *A. hydrophila*, which was better than the treatment with florfenicol. These results support the use of HEHR as a potent antibacterial agent against *A. hydrophila*. Further studies are needed in order to obtain the active substances, evaluate their mechanisms of action and establish their effective concentrations for the treatment of bacterial infections in aquaculture. In addition, other pharmacological properties of this extract should be evaluated, such as the immunomodulatory effect, aiming its application in aquaculture facilities.

Acknowledgements

This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) of Brazil. We are grateful to Dr. Carlos G. Pinheiro for collecting, identifying, drying and grinding plant material and also for requesting authorization for research with this plant species in SISBIO. We thank MSc Quelen I. Garlet for the aid in the execution of the chromatographic analysis.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Adams, R. P. (2009) *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Baldisserotto, B. (2009) Freshwater fish culture in Rio Grande do Sul State: actual situation, problems and future perspectives. *Cienc Rural* **39**, 291–299.
- Bandeira Junior, G., Pês, T.S., Saccol, E.M.H., Sutuli, F.J., Rossi, W., Murari, A.L., Heinzmann, B.M., Pavanato, M.A. et al. (2017) Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Ind Crops Prod* **97**, 484–491.
- Bandeira Junior, G., Sutuli, F.J., Gressler, L.T., Ely, V.L., Silveira, B.P., Tasca, C., Reghelin, M., Matter, L.B. et al. (2018) Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* **125**, 655–665.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Santos, L.R., Motta, A.C., Ritter, F., Bedin, A.C. and Silva, L.B. (2008) *Aeromonas hydrophila* in *Rhamdia quelen*: macroscopic and microscopic aspect of the lesions and antibiotic resistance profiles. *Bol Inst Pesca* **34**, 355–363.
- Basbagci, G. and Erler, F. (2013) Evaluation of some essential oils and their major components against mushroom scatopsid flies as fumigants. *Fresen Environ Bull* **22**, 3170–3178.
- Cipriano, R.C., Bullock, G.L. and Pyle, S.W. (2001) *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *US Fish and Wildlife Service* **134**, 1–25.
- CLSI (2014) *Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals: approved guideline*, 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Codjoe, F.S. and Donkor, E.S. (2018) Carbapenem resistance: a review. *Med Sci* **6**, 1–28.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V. and Maes, L. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* **106**, 290–302.
- Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Drezza, F.T., Povia, G.S. and Carvalho, P.O. (2004) Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc* **15**, 964–970.
- De Castro, M.D.L. and Priego-Capote, F. (2010) Soxhlet extraction: past and present panacea. *J Chromatogr A* **1217**, 2383–2389.
- European Pharmacopoeia. (2007). *European Directorate for the Quality of Medicines*, 7th ed. Strasbourg, France: Council of Europe.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016) *The state of world fisheries and aquaculture 2016*, Rome.
- FDA (2014) *Approved drugs*. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/animalveterinary/developmentapprovalprocess/aquaculture/ucm132954.htm> [accessed on 14 June 2018]
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Scheffer, J.J.C. (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Frag J* **23**, 213–226.
- Fracalossi, D.M., Zaniboni Filho, E. and Meurer, S. (2002) No rastro das espécies nativas. *Panorama da Aqüicultura* **12**, 43–49.
- Fracaro, F. and Echeverrigaray, S. (2006) Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), and endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. *Biochem Genet* **44**, 479–490.

- Fronza, M., Murillo, R., Slusarczyk, S., Adams, M., Hamburger, M., Heinzmann, B., Laufer, S. and Merfort, I. (2011) In vitro cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. *Bioorg Med Chem* **19**, 4876–4881.
- Gobbo-Neto, L. and Lopes, N.P. (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* **30**, 374–381.
- Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C. and Baldisserotto, B. (2000) Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Cienc Rural* **30**, 179–185.
- Hochedez, P., Hope-Rapp, E., Olive, C., Nicolas, M., Beaucaire, G. and Cabié, A. (2010) Bacteremia caused by *Aeromonas hydrophila* complex in the Caribbean Islands of Martinique and Guadeloupe. *Am J Trop Med Hyg* **83**, 1123–1127.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T. and Shibata, T. (2002) *Klebsiella pneumonia* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3462–3466.
- Kunle, O., Okogun, J., Egamana, E., Emojevwe, E. and Shok, M. (2003) Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine* **10**, 59–61.
- Marchioro, M.I. and Baldisserotto, B. (1999) Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. *Cienc. Rural* **29**, 315–318.
- Mucciarelli, M., Camusso, W., Berteza, C.M., Bossi, S. and Maffei, M. (2001) Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha x piperita* on cucumber respiration. *Phytochemistry* **57**, 91–98.
- Nakasone, E.S., Kaneshiro, R., Min, K. and Tokeshi, J. (2015) Emergence of *Raoultella ornithinolytica* on O'ahu: a case of community-acquired *R. ornithinolytica* urinary tract infection. *Hawaii J Med Public Health* **74**, 174–175.
- Nasir, B., Fatima, H., Ahmad, M. and Haq, I.U. (2015) Recent trends and methods in antimicrobial drug discovery from plant sources. *Austin J Microbiol* **1**, 1–12.
- Nicolaus, C., Junghanns, S., Hartmann, A., Murillo, R., Ganzera, M. and Merfort, I. (2017) In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *J Ethnopharmacol* **196**, 94–103.
- NIST (2010) *NIST/EPA/NIH mass spectral library and search/analysis programs*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2010.
- Olusola, S.E., Emikpe, B.O. and Olaifa, F.E. (2013) The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. *Int J Med Aromatic Plants* **3**, 404–412.
- Pádua, S.B., Marques, D.P., Sebastião, F.A., Pilarski, F., Martins, M.L. and Ishikawa, M.M. (2014) Isolation, characterization and pathology of *Citrobacter freundii* infection in native Brazilian catfish *Pseudoplatystoma*. *Braz J Vet Pathol* **7**, 151–157.
- Pandey, A., Naik, M. and Dubey, S.K. (2010) Hemolysin, protease, and EPS producing pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain An4 shows antibacterial activity against marine bacterial fish pathogens. *J Mar Biol* **2010**, 1–9.
- Pemberton, J.M., Kidd, S.P. and Schmidt, R. (1997) Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 1–10.
- Pinheiro, C.G., Machado, C.M., Amaral, L.P., Silva, D.T., Almeida, C.A.A., Longhi, S.J., Mallmann, C.A. and Heinzmann, B.M. (2016) Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. *Braz J Biol* **76**, 176–184.
- Prein, M., Bergleiter, S., Ballauf, M., Brister, D., Halwart, M., Hongrat, K., Kahle, J., Lasner, T. et al. (2012) *Organic aquaculture: the future of expanding niche markets*. Bangkok, Thailand: FAO, Rome and NACA.
- Ribeiro, V.L.S., Santos, J.C., Bordignon, S.A.L., Apel, M.A., Henriques, A.T. and Von Poser, G.L. (2010) Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bioresour Technol* **101**, 2506–2509.
- Romero, J., Feijóo, C. G. and Navarrete, P. (2012) Antibiotics in aquaculture – use, abuse and alternatives. In *Health and Environment in Aquaculture* ed. Carvalho, E. pp. 159–198. Rijeka, Croatia: InTech.
- Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K.S., Mathieu, C., Ruane, N., Jutfelt, F. et al. (2012) Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiol Biochem* **38**, 85–105.
- Sharma, V. and Janmeda, P. (2017) Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves. *Arabian J Chem* **10**, 509–514.
- Silva, L.L., Silva, D.T., Garlet, Q.I., Cunha, M.A., Mallmann, C.A., Baldisserotto, B., Longhi, S.J., Pereira, A.M.S. et al. (2013a) Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotrop Ichthyol* **11**, 443–451.
- Silva, L.L., Garlet, Q.I., Benovit, S.C., Dolci, G., Mallmann, C.A., Bürger, M.E., Baldisserotto, B., Longhi, S.J. et al. (2013b) Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz J Med Biol Res* **46**, 771–779.
- Silva, D.T., Silva, L.L., Amaral, L.P., Pinheiro, C.G., Pires, M.M., Schindler, B., Garlet, Q.I., Benovit, S.C. et al. (2014) Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against *Coenagrionidae* larvae. *J Econ Entomol* **107**, 1713–1720.
- Suttili, F.J., Cunha, M.A., Ziech, R.E., Krewer, C.C., Zeppenfeld, C.C., Heldwein, C.G., Gressler, L.T., Heinzmann, B.M. et al. (2015a) *Lippia alba* essential oil promoted survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. *An Acad Bras Ciênc* **87**, 95–100.
- Suttili, F.J., Silva, L.L., Gressler, L.T., Gressler, L.T., Battisti, E.K., Heinzmann, B.M., Vargas, A.P.C. and Baldisserotto,

- B. (2015b) Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish. *J Appl Microbiol* **119**, 47–54.
- Svetlana, J., Dobrila, J. and Veljovic, L.J. (2003) *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. *Acta Vet* **53**, 399–410.
- Turek, C. and Stintzing, F.C. (2013) Stability of essential oils: a review. *Comp Rev Food Sci Food Saf* **12**, 40–53.
- Viswanatan, S., Manikandan, S., Haniffa, A. and Chairman, K. (2015) Evaluation of resistance against antibiotics, antiseptics and disinfectants in *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fishes. *Pharm Biol Eval* **2**, 40–46.
- Von Poser, G.L., Menut, C., Toffoli, M.E., Vérin, P., Sobral, M., Bessi re, J.M., Lamaty, G. and Henriques, A. (1996) Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian lamiaceae *Hesperozygis ringens* (BENTH.) Eplig and *Hesperozygis rhododon* Eplig. *J Agric Food Chem* **44**, 1829–1832.
- Wang, J., Zhao, Y., Tian, Y., Yan, C. and Guo, C. (2013) Ultrasound-assisted extraction of total phenolic compounds from *Inula helenium*. *Sci World J* **2013**, 1–5.
- Yunes, R.A., Pedrosa, R.C. and Filho, V.C. (2001) Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim Nova* **24**, 147–152.

3 CONCLUSÕES

- A atividade antibacteriana de *H. ringens* está relacionada aos seus fitoconstituintes de caráter apolar, uma vez que apenas o extrato hexânico desta espécie vegetal apresentou ação bacteriostática e bactericida, verificada através de ensaios de suscetibilidade *in vitro*, frente às bactérias patogênicas de peixes *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Citrobacter freundii* e *Raoultella ornithinolytica*;
- Apesar de apresentar fraca atividade antibacteriana *in vitro*, o EHHR proporcionou um aumento na taxa de sobrevivência relativa de juvenis de jundiá (*R. quelen*) experimentalmente infectados por *A. hydrophila* a uma taxa maior que o antimicrobiano de uso convencional, florfenicol (controle positivo);
- A análise por cromatografia gasosa da composição química da fração volátil do EHHR permitiu a identificação de seis constituintes fitoquímicos, sendo que o monoterpenoide pulegona foi identificado como o composto majoritário;
- O EHHR possui potencial para ser usado no controle e tratamento de infecções bacterianas de importância em piscicultura, especialmente durante o cultivo de jundiás infectados por *A. hydrophila*, favorecendo a produção aquícola bem como a aquicultura orgânica;
- Mais estudos são necessários a fim de avaliar outras propriedades farmacológicas do EHHR que possam explicar o efeito observado, além de ensaios de toxicidade deste extrato quando utilizado como antibacteriano em piscicultura. Adicionalmente, também devem ser realizados estudos relativos à identificação dos demais constituintes fitoquímicos ativos de EHHR, seus mecanismos de ação e propriedades farmacológicas aplicáveis no setor piscicultura.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009.
- ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; FILHO, A. J. A. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 1-9, 2006. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/html/2814/281421862003/>>. Acesso em: 30 out. 2015. DOI: 10.1590/S0104-11692006000300003.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos – bases teóricas e uso clínico**. 2019. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/sulfonamidas3.htm>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2013.
- BALDISSEROTTO, B.; MARTOS-SITCHA, J. A.; MENEZES, C. C.; TONI, C.; PRATI, R. L.; GARCIA, L. O.; SALBEGO, J.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. The effects of ammonia and water hardness on the hormonal, osmoregulatory and metabolic responses of the freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 341-352, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24813267>>. Acesso em: 20 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.04.023.
- BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. **Criação de jundiá**. 1. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2004.
- BANDEIRA JUNIOR, G.; SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; DESCOVI, S. N.; SILVEIRA, B. P.; TASCA, C.; MOURÃO, R. H. V.; VARGAS, A. P. C.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils against bacteria isolated from fish: an *in vitro* screening and *in vivo* efficacy of *Lippia origanoides*. **Ciência Rural**, v. 49, n. 6, p. 1-8, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782019000600451>. Acesso em: 18 jun. 2019. DOI: 10.1590/0103-8478cr20190064.
- BANDEIRA JUNIOR, G.; SUTILI, F. J.; GRESSLER, L. T.; ELY, V. L.; SILVEIRA, B. P.; TASCA, C.; REGHELIN, M.; MATTER, L. B.; VARGAS, A. P. C.; BALDISSEROTTO, B. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 655-665, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29741243>>. Acesso em: 24 jun. 2018. DOI: 10.1111/jam.13906.
- BANDEIRA JUNIOR, G., PÊS, T. S.; SACCOL, E. M. H.; SUTILI, F. J.; ROSSI, W.; MURARI, A. L.; HEINZMANN, B. M.; PAVANATO, M. A.; VARGAS, A. C.; SILVA, L. L.; BALDISSEROTTO, B. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p.484-491, 2017.

Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016308706>>. Acesso em: 13 jan. 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.12.040.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; MOTTA, A. C.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; SILVA, L. B. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 355-363, 2008. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/34_3_355-363.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2018.

BASER, K. H. C.; KIRIMER, N.; TÜMEN, G. Pulegone-rich essential oils of Turkey. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 1-8, 1998. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10412905.1998.9700830?needAccess=true>>. Acesso em: 20 mai. 2019. DOI: 10.1080/10412905.1998.9700830.

BASBAGCI, G.; ERLER, F. Evaluation of some essential oils and their major components against mushroom scatopsid flies as fumigants. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 22, n. 11, p. 355-363, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/287851818_Evaluation_of_some_essential_oils_and_their_major_components_against_mushroom_scatopsid_flies_as_fumigants>. Acesso em: 10 jul. 2018.

BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C. S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, A. G.; DEBONA, T.; FRANA, V. A. Siluriformes. In: **Peixes do baixo rio Iguaçu**. Maringá: Eduem, 2012. 203 p. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/sn23w/pdf/baumgartner-9788576285861.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

BIANCHINI, A. E.; GARLET, Q. I.; CUNHA, J. A.; BANDEIRA JUNIOR, G.; BRUSQUE, I. C. M.; SALBEGO, J.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, p. 1-8, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29069225>>. Acesso em: 18 mar. 2019. DOI:10.1590/1414-431X20176346.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100040>. Acesso em: 17 jun. 2019. DOI: 10.1590/S0100-40422010000100040.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 187-191, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000100030&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 27 mai. 2018. DOI: 10.1590/S0103-84782005000100030.

CIPRIANO, R. C.; BULLOCK, G. L.; PYLE, S. W. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **US Fish and Wildlife Service**, Paper 134, 2001. Disponível em: <https://articles.extension.org/sites/default/files/w/1/1e/Aeromonas_hydrophila.pdf>. Acesso em: set. 2016.

CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**, v. 18, p. 403-414, 2010. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-009-9253-7>>. Acesso em: 18 jun. 2019. DOI: 10.1007/s10499-009-9253-7.

CLSI. **Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals: approved guideline**, 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

COSTA, L. S. **Avaliação de óleo de cravo e benzocaína como anestésico para juvenis de tilápia nilótica**. Dissertação. (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2011.

CUNHA, J. A.; BANDEIRA JUNIOR, G.; SILVA, E. G.; SCHEEREN, C. A.; FAUSTO, V. P.; SALBEGO, J.; VAUCHER, R. A.; VARGAS, A. C.; BALDISSEROTTO, B. The survival and hepatic and muscle glucose and lactate levels of *Rhamdia quelen* inoculated with *Aeromonas hydrophila* and treated with terpinen-4-ol, carvacrol and thymol. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 220-224, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018318308>>. Acesso em: 19 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.12.005.

DE SOUSA, D. P.; JÚNIOR, E. V. M.; OLIVEIRA, F. S.; DE ALMEIDA, R. N.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-activity relationship. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 1-2, p. 39-42, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425103>>. Acesso em: 19 mai. 2019. DOI: 10.1515/znc-2007-1-207.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; LIMA, M. R. V.; ALMEIDA, R. N. Pharmacological activity of (*R*)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 66, n. 7-8, p. 353-359, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21950159>>. Acesso em: 19 mai. 2019. DOI: 10.1515/znc-2011-7-806.

DHIFI, W.; JELALI, N.; MNIF, W.; LITAIEM, M.; HAMDI, N. Chemical composition of the essential oil of *Mentha spicata* L. from Tunisia and its biological activities. **Journal of Food Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 362-368, 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4514.2012.00656.x>>. Acesso em: 18 mai. 2019. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2012.00656.x.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. 2016, Rome. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. 2018, Rome. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

FDA. Food and Drug Administration. **Approved drugs**. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 2014 Disponível em: <<https://www.fda.gov/animalveterinary/developmentapprovalprocess/aquaculture/ucm132954.htm>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

FIGUEREDO, A. B.; TANCREDO, K. R.; HASHIMOTO, G. S. O.; ROUMBEDAKIS, K.; MARCHIORI, N. C.; MARTINS, M. L. Haematological and parasitological assessment of silver catfish *Rhamdia quelen* farmed in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 157-163, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054493>>. Acesso em: 19 mar. 2019. DOI: 10.1590/S1984-29612014028.

FIGUEIREDO, H. C. P.; CASTRO, G. A. C.; LEAL, C. A. G.; LOPES, C. O. Quem tem medo de *Aeromonas*? **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, RJ., p. 26-31, 2008. Disponível em: <<http://panoramadaaquicultura.com/paginas/revistas/108/Sanidade108.asp>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

FRACARO, F. **Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo *in vitro* de *Hesperozygis ringens* Benth.** Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), and endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 44, n. 11/12, p. 479-490, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109219>>. Acesso em: 06 jun. 2018. DOI: 10.1007/s10528-006-9044-z.

FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; FILHO, J. D. S. A piscicultura. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 1-4, 2011. Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2011/2011-julho-dezembro/1287-a-piscicultura/file.html?force_download=1>. Acesso em: 12 jun. 2019.

GARCIA, L. O.; BECKER, A. G.; CUNHA, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Effects of water pH and hardness on infection of silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings by *Ichthyophthirius multifiliis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 3, p. 399-405, 2011a. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-7345.2011.00479.x>>. Acesso em: 23 jun. 2019. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2011.00479.x.

GARCIA, L. O.; BECKER, A. G.; BERTUZZI, T.; CUNHA, M. A.; KOCHHANN, D.; FINAMOR, I. A.; RIFFEL, A. P. K.; LLESUY, S.; PAVANATO, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles infected with *Ichthyophthirius multifiliis* and maintained at different levels of water pH. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 1-21, 2011b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255934>>. Acesso em: 27 dez. 2018. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.12.039.

GIERCZYNSKI, R.; JAKUBCZAK, A.; JAGIELSKI, M. Extended multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Bacillus anthracis* strains isolated in Poland. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 3-7, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Richard_Thiery/publication/26240792_Molecular_Epidemiology_of_Q_Fever_in_Poland/links/0fcfd50c9d12b392bd000000.pdf#page=69>. Acesso em: 18 mai. 2019.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1911>. Acesso em: 26 out. 2015. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200026.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782000000100029>. Acesso em: 11 mar. 2018. DOI: 10.1590/S0103-84782000000100029.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. M.; CÁRDENAS-ORTEGA, N. C.; MÉNDEZ-RAMOS, C. A.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, S. Fungicidal properties of the essential oil of *Hesperozygis marifolia* on *Aspergillus flavus* Link. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2501-2506, 2011. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/16/3/2501/htm>>. Acesso em: 18 mai. 2019. DOI: 10.3390/molecules16032501.

GORDON, W. P.; FORTE, A. J.; MCMURTRY, R. J.; GAL, J.; NELSON, S. D. Hepatotoxicity and pulmonar toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 413-424, 1982. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041008X82903878>>. Acesso em: 27 mai. 2019. DOI: 10.1016/0041-008X(82)90387-8.

GRUNDSCHÖBER, F. Literature review of pulegone. **Perfumer Flavorist**, v. 4, p. 15-17, 1979. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/285090454_Literature_review_of_pulegone>. Acesso em: 20 mai. 2019.

HEGGBERGET, T. G.; JOHNSEN, B. O. Infestations by *Gyrodactylus* sp. of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norwegian rivers. **Journal of Fish Biology**, v. 21, n. 1, p. 15-26, 1982. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8649.1982.tb02819.x>>. Acesso em: 23 jun. 2019. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1982.tb02819.x.

HOCHEDÉZ, P.; HOPE-RAPP, E.; OLIVE, C.; NICOLAS, M.; BEAUCAIRE, G.; CABIÉ, A. Bacteremia caused by *Aeromonas hydrophila* complex in the Caribbean Islands of Martinique and Guadeloupe. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1123-1127, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2963982/>>. Acesso em: jun. 2018. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10-0063.

IMAIZUMI, K.; HANADA, K.; MAWATARI, K.; SUGANO, M. Effect of essential oils on the concentration of serum lipids and apolipoproteins in rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 2795-2796, 1985. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00021369.1985.10867166>>. Acesso em: 27 mai. 2019. DOI: 10.1080/00021369.1985.10867166

KANKI, M.; YODA, T.; TSUKAMOTO, T.; SHIBATA, T. *Klebsiella pneumonia* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3462-3466, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126807/>>. Acesso em: 11 jul. 2018. DOI: 10.1128/AEM.68.7.3462-3466.2002.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/49599559_Fitoterapicos_um_mercado_promissor>. Acesso em: 10 nov. 2015.

LEIRA, M. H.; LAGO, A. A.; BOTELHO, H. A.; MELO, C. C. V.; MENDONÇA, F. G.; NASCIMENTO, A. F.; FREITAS, R. T. F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil – uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 44-59, 2016. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevCiVet/article/view/32436>>. Acesso em: 21 jun. 2016. DOI: 10.4025/revcivet.v3i1.32436.

LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; CIACCI, L. S.; CUNHA, L. T.; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; DIAS, N. P.; MELO, C. C. V. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **PUBVET (Londrina)**, v. 11, n. 6, p. 538-544, 2017. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/uploads/17eaa5bbedce847805df581cb4a475be.pdf>>. Acesso em: 21 de jun. 2019. DOI: 10.22256/PUBVET.V11N6.538 - 544.

LJUNGH, A.; WRETLIND, B.; MÖLLBY, R. Separation and characterization of enterotoxin and hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 89B, n. 6, p. 387-397, 1981. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7336925>>. Acesso em: 21 jun. 2019. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1981.tb00205_89B.x.

MAJOLO, C.; PILARSKI, F.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; CHAGAS, E. C. Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 5, p. 388-397, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2018.1487343>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.1080/10412905.2018.1487343.

MAJOLO, C.; ROCHA, S. I. B.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 2380-2387, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/are.13073>>. Acesso em: 18 jun. 2019. DOI: 10.1111/are.13073.

MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 315-318, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103->

84781999000200021&script=sci_abstract&tlng=es>. Acesso em: 13 mai. 2018. DOI: 10.1590/S0103-84781999000200021.

MARCHIORO, M. I. **Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Pimelodidae) à variação de pH e salinidade da água de cultivo.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

MARTINI, M. G.; BIZZO, H. R.; MOREIRA, D. L.; NEUFELD, P. M.; MIRANDA, S. N.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Ocimum selloi* and *Hesperozygis myrtooides*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 1027-1030, 2011. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X1100600726>>. Acesso em: 18 mai. 2019. DOI: 10.1177/1934578X1100600726.

MATTHEWS, R. A. *Ichthyophthirius multifiliis* fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. **Advanced of Parasitology**, v. 59, p. 159-240, 2005. Disponível em: <>. Acesso em: 22 mai. 2019. DOI: 10.1016/S0065-308X(05)59003-1.

MEYER, G. **Exigência protéica em duas concentrações energéticas da dieta e estimativa da exigência em aminoácidos essenciais para alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*.** 2003. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista oficial das espécies ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul.** Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2008, 55 p.

NADARAJAH, S.; FLAATEN, O. Global aquaculture growth and institutional quality. **Marine Policy**, v. 84, p. 142-151, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308597X17302142>>. Acesso em: 08 abr. 2019. DOI: 10.1016/j.marpol.2017.07.018.

NASIR, B.; FATIMA, H.; AHMAD, M.; HAQ, I. U. Recent trends and methods in antimicrobial drug discovery from plant sources. **Austin Journal of Microbiology**, v. 1, p. 1-12, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015306063>>. Acesso em: 09 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.016.

NIST. **NIST/EPA/NIH Mass spectral library and search/analysis programs.** Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2009.

NIST. National Institute of Standards and Technology – U. S. Department of Commerce. **NIST livro de Química na Web, SRD 69,** 2018. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C89827&Mask=200>>. Acesso em: 16 mai. 2018.

OKUT, N.; YAGMUR, M.; SELCUK, N.; YILDIRIM, B. Chemical composition of essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Longifolia* growing wild. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 2, p. 525-529, 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Buenyamin_Yildirim3/publication/316253437_Chemic>

al_composition_of_essential_oil_of_Mentha_longifolia_L_subsp_longifolia_growing_wild/li
nks/59d389704585150177f9603e/Chemical-composition-of-essential-oil-of-Mentha-
longifolia-L-subsp-longifolia-growing-wild.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2019. DOI:

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, n. 1, p. 71-89, 2009. Disponível em: <<http://www.intertox.com.br/phocadownload/Revinter/v2n1/rev-v02-n01-05.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

OLMEDO, R.; RIBOTTA, P.; GROSSO, N. R. Decrease of chemical and volatile oxidation indicators using oregano essential oil combined with BHT in sunflower oil under accelerated storage conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 2522-2535, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-019-03731-8>>. Acesso em: 18 jun. 2019. DOI: 10.1007/s13197-019-03731-8.

OLUSOLA, S. E.; EMIKPE, B. O.; OLAIFA, F. E. The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 404-412, 2013. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/2a30/bc8a7230c9a748ee9fffae3b3f3cd916e932.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

OUMZIL, H.; GHOULAMI, S.; RHAJAOU, M.; ILIDRISSI, A.; FKIH-TETOUANI, S.; FAID, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveoens*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 8, p. 727-731, 2002. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458474>>. Acesso em: 04 jun. 2018. DOI: 10.1002/ptr.1045.

PÁDUA, S. B.; MARQUES, D. P.; SEBASTIÃO, F. A.; PILARSKI, F.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA, M. M. Isolation, characterization and pathology of *Citrobacter freundii* infection in native Brazilian catfish *Pseudoplatystoma*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, p. 151-157, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1004965/isolation-characterization-and-pathology-of-citrobacter-freundii-infection-in-native-brazilian-catfish-pseudoplatystoma>>. Acesso em: 11 jul. 2018.

PANDEY, A.; NAIK, M.; DUBEY, S. K. Hemolysin, protease, and EPS producing pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain An4 shows antibacterial activity against marine bacterial fish pathogens. **Journal of Marine Biology**, v. 2010, p. 1-9, 2010. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jmb/2010/563205/>>. Acesso em: 10 set. 2016. DOI: 10.1155/2010/563205.

PARODI, T. V.; VARGAS, A. P. C.; KREWER, C.; FLORES, E. M. M.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; OLIVEIRA, J. V.; POPIOLSKI, A. C.; MINOZZO, M. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 283-292, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132013000200014>. Acesso em: 10 set. 2016. DOI: 10.1590/S1516-89132013000200014.

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

PAVLIDOU, V.; KARPOUHTSIS, I.; FRANZIOS, G.; ZAMBETAKI, A.; SCOURAS, Z.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic effects of essential oils of greek sage, *Salvia fruticosa*, and mint, *Mentha pulegium*, on *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 21, n. 1, p. 39-49, 2004. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300968089>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

PEIXE BR. **Anuário PeixeBR da Piscicultura 2019**. Brasil: Associação Brasileira da Piscicultura, 2019. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf?>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

PEIXOTO, L. J. S.; SÁ, M. C. A.; GORDIANO, L. A.; COSTA, M. M. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 3, p. 453-461, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n3/a20v79n3.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2019. DOI: 10.1590/S1808-16572012000300020.

PEREIRA, U. P.; MIAN, G. F.; OLIVEIRA, I. C. M.; BENCHETRIT, L. C.; COSTA, G. M.; FIGUEIREDO, H. C. P. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 186-192, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19726142>>. Acesso em: 18 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.07.025.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of silver catfish exposed to different photoperiods. **Aquaculture International**, v. 7, p. 201-205, 1999. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1009299830102.pdf>>. Acesso em: 14 mai. 2018. DOI: 10.1023/A:1009299830102.

PINHEIRO, C. G. **Óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: variabilidade do rendimento, composição química e atividades biológicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

PINHEIRO, C. G.; MACHADO, C. M.; AMARAL, L. P.; SILVA, D. T.; ALMEIDA, C. A. A.; LONGHI, S. J.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 176-184, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842016000100176>. Acesso em: 13 jun. 2018. DOI: 10.1590/1519-6984.16314.

PINHEIRO, C. G.; AMARAL, L. P.; ROLIM, J. M.; LONGHI, S. J.; MACHADO, S. L. O.; HEINZMANN, B. M. Essential oil of the Brazilian native species *Hesperozygis ringens*: a potential alternative to control weeds. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 3, p. 701-711, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2017.1319297>>. Acesso em: 10 jun. 2019. DOI: 10.1080/0972060X.2017.1319297.

PRIETO, A. **Manual para la prevención y del tratamiento de enfermedades en peces de cultivo en agua dulce**. Santiago: ONU/FAO, 1991, 65 p.

RIBEIRO, V. L. S.; SANTOS, J. C.; BORDIGNON, S. A. L.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER, G. L. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2506-2509, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19954969>>. Acesso em: 06 jun. 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.016.

ROMÃO, R.; MARTINELLI, G.; CREPALDI, I.; MARTINEZ-LABORDE, J. B. Brazilian biodiversity for ornamental use and conservation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, p. 100-105, 2015. Disponível em: <<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84927137894&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=biodiversidade+brasileira&st2=&sid=a2d86b81ed6b43b675a38301ec436a57&ot=b&sdt=b&sl=40&s=TITLE-ABS-KEY%28biodiversidade+brasileira%29&relpos=7&citeCnt=3&searchTerm=>>>. Acesso em: 13 jun. 2019. DOI: 10.1590/1984-70332015v15n2n18.

ROMERO, J.; FEIJOÓ, C. G.; NAVARRETE, P. Antibiotics in aquaculture – use, abuse and alternatives. In: **Health and Environment in Aquaculture**. ed. Carvalho, E. 2012. p. 159-198. Rijeka, Croatia: InTech.

SAAVEDRA, M. J.; GUEDES-NOVAIS, S.; ALVES, A.; REMA, P.; TACÃO, M.; CORREIA, A.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Microbiology**, v. 7, p. 207-2011, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492935>>. Acesso em: 14 out. 2016.

SAGAVE, L.; GRESSLER, L. T.; FLORES, F. C.; SILVA, C. B.; VARGAS, A. P. C.; LOVATO, M.; SANGIONI, L. A.; PÖTTER, L.; BOTTON, S. A. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v67n1/0102-0935-abmvz-67-01-00221.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2019. DOI: 10.1590/1678-7454.

SANDES, S. S.; BLANK, A. F.; -BLANK, M. F. A.; VASCONCELOS, J. N. C.; MENDONÇA, S. A. D. Estruturas secretoras foliares em patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, p. 1-6, 2012. Disponível em: <<https://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/448>>. Acesso em: 08 mai. 2019.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, p. 1215-1226, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18565584>>. Acesso em: 12 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.envint.2008.04.009.

SCHEFFER, J.; KÖNIG, W.; BRAUN, V.; GOEBEL, W. Comparison of four hemolysin producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 544-551, 1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2451679>>. Acesso em: set. 2016.

SEBRAE. **Aquicultura no Brasil**. Brasília: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2015. 76p. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)>. Acesso em: 12 jun. 2019.

SEGNER, H.; SUNDH, H.; BUCHMANN, K.; DOUXFILS, J.; SUNDELL, K. S.; MATHIEU, C.; RUANE, N.; JUTFELT, F.; TOFTEN, H.; VAUGHAN, L. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 85-105, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21681416>>. Acesso em: 29 mai. 2018. DOI: 10.1007/s10695-011-9517-9.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. 156 f. Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History. Stockholm, 1996.

SILVA, D. T.; SILVA, L. L.; AMARAL, L. P.; PINHEIRO, C. G.; PIRES, M. M.; SCHINDLER, B.; GARLET, Q. I.; BENOVI, S. C.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; KOTZIAN, C. B.; HEINZMANN, B. M. Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 4, p. 1713-1720, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25195467>>. Acesso em: 06 jun. 2018. DOI: 10.1603/EC13361.

SILVA, J. C. S.; HELDWEIN, A. B.; MARTINS, F. B.; TRENTIN, G.; GRIMM, E. L. Análise de distribuição de chuva para Santa Maria, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 67-72, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662007000100009>. Acesso em: 07 mai. 2019. DOI: 10.1590/S1415-43662007000100009.

SILVA, L. L.; SILVA, D. T.; GARLET, Q. I.; CUNHA, M. A.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252013000200443>. Acesso em: 06 jun. 2018. DOI: 10.1590/S1679-62252013000200014.

SILVA, N. C. S. L.; NOGUEIRA, J. F.; GOUVEIA, J. J. S.; COSTA, M. M.; GOUVEIA, G. V. Gene *floR* e a resistência ao florfenicol em isolados de *Aeromonas* spp. autóctones de organismos aquáticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 357-366, 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v38n3/1678-5150-pvb-38-03-357.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2019. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-4842.

SILVA, R. M. L. **Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da região da baixada ocidental maranhense**. Tese (Doutorado em Medicina

Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SOULDOUZI, R.; RAZI, M.; JALALI, A. S.; JALILZADEH-AMIN, G.; AMANI, S. Effect of (R)-(+)-Pulegone on ovarian tissue; correlation with expression of aromatase cyp19 and ovarian selected genes in mice. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 20, n. 2, p. 231, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5893295/>>. Acesso em: 16 mai. 2019. DOI: 10.22074/cellj.2018.4798.

SUTILI, F. J.; SILVA, L. L.; GRESSLER, L. T.; GRESSLER, L. T.; BATTISTI, E. K.; HEINZMANN, B. M.; VARGAS, A. P. C.; BALDISSEROTTO, B. 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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810355>>. Acesso em: 03 jan. 2018. DOI: 10.1111/jam.12812.

SUTILI, F. J.; CUNHA, M. A.; ZIECH, R. E.; KREWER, C. C.; ZEPPENFELD, C. C.; HELDWEIN, C. G.; GRESSLER, L. T.; HEINZMANN, B. M.; VARGAS, A. C.; BALDISSEROTTO, B. *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. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652015000100095>. Acesso em: 03 jan. 2018. DOI: 10.1590/0001-376520152013044.

SUTILI, F. J.; KREUTZ, L. C.; NORO, M.; GRESSLER, L. T.; HEINZMANN, B. M.; VARGAS, A. C.; BALDISSEROTTO, B. 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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24368084>>. Acesso em: 03 jan. 2018. DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.11.009.

TONI, C.; BECKER, A. G.; SIMÕES, L. N.; PINHEIRO, C. G.; SILVA, L. L.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B. O.; BALDISSEROTTO, B.; Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 701-714, 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-013-9877-4>>. Acesso em: 09 abr. 2019. DOI: 10.1007/s10695-013-9877-4.

TONI, C.; MARTOS-SITCHA, J. A.; RUIZ-JARABO, I.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; PINHEIRO, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Stress response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to the essential oil of *Hesperozygis ringens*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 129-138, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403153>>. Acesso em: 09 abr. 2019. DOI: 10.1007/s10695-014-0011-z.

URBINA, A. V. O.; MARTÍN, M. L.; MONTERO, M. J.; MORÁN, A.; SAN ROMÁN, L. Sedating and antipyretic activity of the essential oil of *Calamintha sylvatica* subsp. *ascendens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 165-171, 1989. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874189900184>>. Acesso em: 25 mai. 2019. DOI: 10.1016/0378-8741(89)90018-4.

URBINA, A. V. O.; MARTÍN, M. L.; MONTERO, M. J.; CARRÓN, R.; SEVILLA, M. A.; SAN ROMÁN, L. Antihistaminic activity of pulegone on the guinea-pig ileum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 295-296, 1990. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/21182311_Antihistaminic_activity_of_pulegone_on_the_guinea-pig_ileum>. Acesso em: 25 mai. 2019. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1990.tb05414.x.

VISWANATAN, S.; MANIKANDAN, S.; HANIFFA, A.; CHAIRMAN, K. Evaluation of resistance against antibiotics, antiseptics and disinfectants in *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fishes. **Pharmaceutical and Biological Evaluations**, v. 2, n. 2, p. 40-46, 2015. Disponível em: <<http://www.onlinepbe.com/index.php/PBE/article/view/17>>. Acesso em: out. 2016.

VON POSER, G. L.; MENUT, C.; TOFFOLI, M. E.; VÉRIN, P.; SOBRAL, M.; BESSIERE, J. M.; LAMATY, G.; HENRIQUES, A. T. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1829-1832, 1996. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf950653c>>. Acesso em: 05 jul. 2018. DOI: 10.1021/jf950653c.

WEIN, M. L. C. **Interpretação da idade e cálculo da curva de crescimento do jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) do banhado de Santa Catarina, RS.** 1980. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1980.

YAHIA, I. B. H.; BOUSLIMI, W.; MESSAOUD, C.; JAOUADI, R.; BOUSSAID, M.; ZAOUALI, Y. Comparative evaluation of Tunisian *Mentha* L. species essential oils: selection of potential antioxidant and antimicrobial agents. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 3, p. 184-195, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2018.1550021?casa_token=uOuHEjDcPSAAAAA:_pPRsxim7TK5RcIeIQkmB6mHK2dPF6242P0oITWxCf7d_u7vJInZkiaof_FCWMEmiCMRG-29N-yDAaYk>. Acesso em: 18 mai. 2019. DOI: 10.1080/10412905.2018.1550021.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422001000100025&script=sci_abstract&tlng=es>. Acesso em: jun. 2016. DOI: 10.1590/S0100-40422001000100025.

ZAIONS, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Na⁺ and K⁺ body levels and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1041-1045, 2000. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782000000600020>.
Acesso em: 25 mai. 2018. DOI: 10.1590/S0103-84782000000600020.

ZANIBONI-FILHO, E. Larvicultura de peixes de água doce. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 203, p. 69-77, 2000.

ZANIBONI FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: Poli, C. R.; Poli, A. T. B.; Andreatta, E. R; Beltrame E.; eds. **Aquicultura: Experiências brasileiras**. Florianópolis: EdUFSC; 2004. p. 337-369.