



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Luiz Gonzaga Alves dos Santos Filho

**Produtos naturais com potencial uso na carcinicultura e seus
efeitos na imunoestimulação de *Litopenaeus vannamei*
(BOONE, 1931)**

Teresina – PI
2019

Luiz Gonzaga Alves dos Santos Filho

Produtos naturais com potencial uso na carcinicultura e seus efeitos na imunoestimulação de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia - RENORBIO (ponto focal: Universidade Federal do Piauí), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área concentração: Biotecnologia em Agropecuária
Orientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz
Coorientadora: Dra. Alitiene Moura Lemos Pereira

Teresina – PI
2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

S237p Santos Filho, Luiz Gonzaga Alves dos.
Produtos naturais com potencial uso na carcinicultura e seus efeitos na imunoestimulação de *Litopenaeus vannamei* e seus efeitos na imunoestimulação de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) / Luiz Gonzaga Alves dos Santos Filho. – 2019.
237 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia – RENORBIO, Teresina, 2019.

“Orientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz”.

“Coorientadora: Dr^a. Alitene Moura Lemos Pereira”.

1. Cacinicultura. 2. Camarão. 3. Produtos Naturais. 4. Imunoestimulante. I. Título.

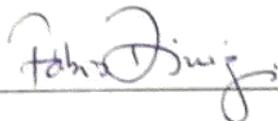
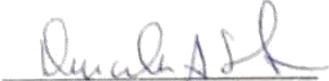
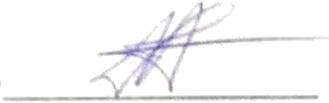
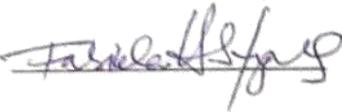
CDD 639.68

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Luiz Gonzaga Alves dos Santos Filho

TÍTULO DO PROJETO: “Produtos naturais com potencial uso na carcinicultura e seus efeitos na imunestimulação de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931).”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz.

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz– EMBRAPA (Presidente)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Profª. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profª. Dra. Ivanilza Moreira de Andrade - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus - IESVAP (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Profª. Dra. Fabíola Helena dos Santos Fogaça – EMBRAPA (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 05 de dezembro de 2019.

HORÁRIO: 09:00h

LOCAL: UFPI/ Campus de Parnaíba

*Aos meus pais Luiz Gonzaga Alves dos
Santos e*

Maria Valdenora de Sousa Santos.

*À minha esposa Sidely Gil Alves
Vieira dos Santos.*

*Em especial à minha filha, Maria Luiza
Alves*

*Vieira dos Santos, fruto do amor mais
forte e
verdadeiro, que multiplicou
infinidamente nossa
felicidade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela abençoada família que me cerca. Aos meus pais, Maria Valdenora de Sousa Santos e Luiz Gonzaga Alves dos Santos por absolutamente tudo, pois minha vida é uma benção por tê-los comigo. À minha esposa, Sidely Gil Alves Vieira dos Santos, pelo amor, carinho, dedicação, motivação, companheirismo e, sobretudo, por me fazer feliz. À minha filha, Maria Luiza Alves Vieira dos Santos, por tornar minha vida cada dia mais feliz e me inspirar a ser uma pessoa melhor. À minha segunda mãe, Maria do Socorro Alves Vieira, pelo amor, carinho e cuidado maternal.

Ao meu orientador Dr. Fábio Mendonça Diniz, por todo auxílio, incentivo e ensinamentos. À minha coorientadora Dra. Alitiane Moura Lemos Pereira, pela confiança, incentivo, ensinamentos e amizade. A todos os meus professores, pela formação desde a alfabetização até a graduação. Em especial ao professor Hamilton Gondim de Alencar Araripe pelos ensinamentos, dedicação e amizade. Aos professores e compadres, André Prata Santiago e Janaina de Araújo Sousa Santiago, por serem exemplos de profissionais, pelo incentivo e amizade. Aos professores e amigos João Marcos de Góes e Lissandra Corrêa Fernandes Góes, pelo incentivo e amizade. Aos trabalhadores da Universidade Federal do Piauí que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho, em especial Francivalda da Conceição Sousa Felícia Maia, por toda ajuda.

Ao amigo Francisco dos Santos Carvalho por toda orientação, ajuda e companheirismo. Ao colega João Batista Alves de Souza pela ajuda e momentos de descontração. Ao Dr. Edy Sousa de Brito, Dr. Kirley Marques Canuto, Dra. Karina Neob de Carvalho Castro e Msc. Ana Sheila de Queiroz Souza por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho. A todos os servidores da Embrapa Meio-Norte de Parnaíba que colaboraram direta ou indiretamente, tornando viável a realização desta pesquisa. À Renata Brito dos Reis, por toda ajuda no desenvolvimento da pesquisa e pela amizade. À Dra. Alyne Rodrigues de Araujo pelas orientações na microbiologia.

Ao prof. Dr. Rafael Diego da Rosa da UFSC e toda competente equipe do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura pela ajuda (alunos Natanael Dantas Farias, Gabriel Machado Matos e Nicolas Argenta da Conceição). À Dra. Oscarina Viana de Sousa do Labomar/UFC por todo apoio.

Aos profissionais Arizonaldo Barbosa de Carvalho e Daniel Clayton Pinheiro Lustosa pela grande colaboração na realização deste trabalho.

Às Pesquisadoras Dra. Durcilene Alves da Silva e Dra. Ivanilza Moreira de Andrade, por toda colaboração nesta Tese. Ao pesquisador Dr. Joilson Ramos de Jesus pelas importantes colaborações. À Dra. Fabiola Helena dos Santos Fogaça pelo incentivo, ajuda e valiosa amizade.

Ao BNDES (Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social), Fea (Fundação Elizeu Alves), Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), SAP (Secretaria de Aquicultura e Pesca), MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) pelo financiamento desta pesquisa.

RESUMO

Diante do atual quadro sanitário vivenciado na cadeia produtiva do camarão *Litopenaeus vannamei* a estimulação da imunidade e melhoria da resistência a doenças tornou-se primordial para o crescimento sustentável da indústria carcinícola. Portanto, objetivou-se com o presente estudo indicar um imunostimulante natural derivado de plantas com capacidade de melhorar a resistência de *L. vannamei* contra infecção do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Foram realizados estudos de caracterização química, atividade antibacteriana, atividade antioxidante, e toxicidade aguda em náuplios de *Artemia salina*, com os óleos essenciais (OEs) de *Achyrocline satureioides*, *Alpinia zerumbet*, *Cymbopogon citratus*, *C. winterianus*, *Lippia alba*, *L. organoides*, *Mesosphaerum suaveolens*, *Ocimum gratissimum*, *O. basilicum*, *Pilocarpus microphyllus*, *Psidium guajava*, *Varronia curassavica*, *Allium sativum*, *Citrus limon*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*. Também foram utilizados os extratos etanólicos (EEs) das plantas *Spondias mombin*, *Myracrodruon urundeuva* e *Punica granatum*. Com base nos resultados preliminares, avaliou-se o efeito da suplementação dietética dos extratos etanólicos de *Myracrodruon urundeuva* e *Punica granatum* (EEMP) na modulação de genes imunorelacionados e na sobrevivência de *L. vannamei* contra infecção causada por WSSV. Todos os OEs e EEs apresentaram importante atividade antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus*. Na mistura dos EEs de *Punica granatum* e *Myracrodruon urundeuva* (1:3) foi observado o melhor resultado de concentração bactericida mínima ($0,078 \text{ mg.mL}^{-1}$). Os EEs apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante, destacando-se a aroeira ($\text{IC}_{50} = 18,22 \pm 0,39 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os EEs não apresentaram atividade tóxica ($\text{CL}_{50} > 1000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) em náuplios de *A. salina*, enquanto os OEs foram considerados tóxicos. A suplementação dietética de EEMP na dose de 1g.kg^{-1} promoveu aumento da atividade antibacteriana da hemolinfa dos camarões e da contagem total de hemócitos, além de modular importantes genes relacionados ao sistema imune de *L. vannamei* (*Litvan ALF-A*, *Litvan ALF-C*, *LvIMD*, *LvDcr1*, *LvAgo1*, *LvproPO2*, *LvPPAE2*, *Lva2M-2* e *LvCAT*). O aumento da concentração de EEMP não ocasionou efeito dose-resposta. A sobrevivência dos animais alimentados com EEMP 1g.kg^{-1} foi significativamente maior que a dos animais do grupo controle após cinco dias de infecção. Em conclusão, sugere-se que o EEMP promove estimulação da imunidade inata e melhoria da resistência contra infecção causada por WSSV em *L. vannamei*. Apesar dos melhores resultados serem verificados com EE, os OEs também possuem potencial de utilização na carcinicultura, tendo em vista as atividades biológicas verificadas.

Palavras-chave: antimicrobiano; antioxidante; imunostimulante; patógeno

ABSTRACT

In view of the current health situation in the shrimp *Litopenaeus vannamei* production chain, increased immunity and disease resistance has become paramount for the sustainable growth of the carcass industry. Therefore, the aim of this study is to indicate a plant-derived natural immunostimulator capable of improving the resistance of *L. vannamei* against infection with white spot syndrome virus (WSSV). Studies were performed of chemical characterization, antibacterial activity, antioxidant activity, and acute toxicity in *Artemia salina* nauplii with essential oils (OEs) of the species *Achyrocline satureioides*, *Alpinia zerumbet*, *Cymbopogon citratus*, *C. winterianus*, *Lippia alba*, *L. organoides*, *Mesosphaerum suaveolens*, *Ocimum gratissimum*, *O. basilicum*, *Pilocarpus microphyllus*, *Psidium guajava*, *Varronia curassavica*, *Allium sativum*, *Citrus limon*, *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris*. Also the ethanolic extracts (EEs) of the plants *Spondias mombin*, *Myracrodruon urundeuva* and *Punica granatum* were used. Based on the preliminary results, the effect of dietary supplementation of the ethanolic extracts of *Myracrodruon urundeuva* and *Punica granatum* (EEMP) on the modulation of immunorelated genes and survival of *L. vannamei* against WSSV infection was evaluated. All OEs and EEs showed important antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus*. In the mixture of *Punica granatum* and *Myracrodruon urundeuva* (1: 3), the best result of minimum bactericidal concentration (0.078 mg.mL^{-1}) was observed. The EEs presented the highest values of antioxidant activity, especially aroeira ($\text{IC}_{50} = 18.22 \pm 0.39 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$). The EEs showed no toxic activity ($\text{LC}_{50} > 1000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) in *A. salina* nauplii, while the EOs were considered toxic. Dietary supplementation of EEMP at a dose of 1g.kg^{-1} promoted increased antibacterial activity of shrimp hemolymph and total hemocyte count, and modulated important genes related to the *L. vannamei* immune system (*Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-C, *LvIMD*, *LvDcr1*, *LvAgo1*, *LvproPO2*, *LvPPAE2*, *Lv α 2M-2* and *LvCAT*). Increasing concentration of EEMP caused no dose response effect. The survival of animals fed with 1g.kg^{-1} EEMP was significantly higher than that of control animals after five days of infection. In conclusion, it is suggested that EEMP promotes innate immunity stimulation and improved resistance against WSSV infection in *L. vannamei*. Although the best results are verified with EE, SOs also have potential for use in shrimp farming, considering as verified biological activities.

Keywords: antimicrobial; antioxidant; immunostimulant; pathogen;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 INTRODUÇÃO.....	19
Figura 1 - Exemplares de <i>Litopenaeus vannamei</i> de uma fazenda de criação do norte do Piauí.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
Figura 2 - Ilustração do complexo sistema de defesa inato dos camarões sendo ativado pela desgranulação dos hemócitos devido ao reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogênicos.....	27
CAPÍTULO I.....	67
Figura 1 - Esquema de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger.....	73
CAPÍTULO II.....	106
Figura 1 - Fluxograma da obtenção dos extratos etanólicos.....	112
Figura 2 - Rendimento do processo de obtenção dos extratos etanólicos.	116
CAPÍTULO III.....	135
Figura 1 - Microplaca de 96 poços com soluções de DPPH em diferentes concentrações para avaliação da estabilidade e construção de reta de calibração.....	142
Figura 2 - Índices de Atividade Antioxidante (IAA) dos óleos essenciais (OEs), extratos etanólicos (EEs) e Trolox.....	145
CAPÍTULO IV.....	158
Figura 1 - CL ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) em náuplios de <i>Artemia salina</i> testando-se diferentes óleos essenciais (OE) e extratos etanólicos (EE) de plantas coletadas no Nordeste do Brasil e suplementos alimentares comerciais para camarões marinhos (SACM).....	167
Figura 2 - Curva dose-resposta da mortalidade de náuplios de <i>Artemia salina</i> x concentração de óleo essencial, extrato etanólicos ou suplemento alimentar comercial para camarões marinhos.....	168
CAPÍTULO V.....	178
Figura 1 - Laboratório de cultivo experimental de camarões marinhos da Embrapa Meio-Norte.....	185
Figura 2 - Retirada da hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> por meio de punção no seio ventral.....	188
Figura 3 - Atividade antibacteriana, contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (IOC 18950), da hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentado com diferentes dietas experimentais a base de extratos etanólicos de <i>Punica granatum</i> L. e <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão.....	194
Figura 4 - Atividade antibacteriana da hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentado com diferentes dietas experimentais a base de extratos etanólicos de <i>Punica granatum</i> L. e <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolado da hemolinfa de camarões de cativeiro.....	194

Figura 5 – Expressão relativa de genes (mRNA) imunorelacionados em intestino médio de *Litopenaeus vannamei*..... 198

Figura 6 - Efeito da administração de extratos etanólicos de *Punica granatum* L. e *Myracrodruon urundeuva* Allemão (EEMP) e suplemento alimentar comercial (SAC) na sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* experimentalmente infectado com vírus da síndrome da mancha branca. . 200

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.....	67
Tabela 1 - Identificação e número de registro do herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDFPar) das espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo.....	72
Tabela 2 – Concentração de compostos majoritários (%) identificados na análise de composição química do óleo essencial de <i>Achyrocline satureioides</i> (A), <i>Allium sativum</i> (B), <i>Alpinia zerumbet</i> (C), <i>Citrus limon</i> (D), <i>Cymbopogon citratus</i> (E), <i>C. winterianus</i> (F), <i>Lippia alba</i> (G), <i>L. origanoides</i> (H), <i>Mesosphaerum suaveolens</i> (I), <i>Ocimum basilicum</i> (J), <i>O. gratissimum</i> (K), <i>Pilocarpus microphyllus</i> (L), <i>Psidium guajava</i> (M), <i>Salvia officinalis</i> (N), <i>Thymus vulgaris</i> (O), <i>Varronia curassavica</i> (P).....	78
Tabela 3 - Componentes majoritários, concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (IOC 18950), <i>V. parahaemolyticus</i> isolado da hemolinfa de camarão de fazenda de criação.....	81
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais combinados em pares contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (IOC 18950), <i>V. parahaemolyticus</i> isolado da hemolinfa de camarão de fazenda de criação. Cada combinação é identificada por uma letra e número.	83
CAPÍTULO II.....	106
Tabela 1 - Identificação e número de registro do herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDFPar) das espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo.....	111
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de extratos etanólicos contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (IOC 18950), <i>V. parahaemolyticus</i> isolado da hemolinfa de camarão de fazenda de criação.	120
Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de extratos etanólicos combinados em pares contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (IOC 18950), <i>V. parahaemolyticus</i> isolado da hemolinfa de camarão de fazenda de criação. Cada combinação é identificada por uma letra maiúscula.	121
CAPÍTULO III.....	135
Tabela 1 - Identificação e número de registro do herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDFPar) das espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo. EE = extrato etanólico; OE = óleo essencial.....	140
CAPÍTULO IV.....	158
Tabela 1 - Identificação e número de registro do herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDFPar) das espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo. EE = extrato etanólico; OE = óleo essencial.....	163

CAPÍTULO V	178
Tabela 1 - Identificação e número de registro do herbário da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr) das espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo.....	183
Tabela 2 – Informações nutricionais da ração comercial API Camarão Antiestresse Total Brasil.....	185
Tabela 3 - Dados da análise da atividade antibacteriana da hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> contra duas estirpes de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . ..	193
Tabela 4 - Contagem total de hemócitos (CTH) da hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados com diferentes doses de suplemento dietético a base de extratos etanólicos de <i>Punica granatum</i> L. e <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão durante 15 dias.....	195
Tabela 5 - Efeito da administração de extratos etanólicos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão e <i>Punica granatum</i> L. e (EEMP) e suplemento alimentar comercial (SAC) na sobrevivência de <i>Litopenaeus vannamei</i> experimentalmente infectado com vírus da mancha branca.....	201

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAH	Atividade antibacteriana da hemolinfa
Abs	Absorvância
AHPND	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease
LitvanALF A	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Anti-lipopolissacarídeo factor isoform A
LitvanALF C	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Anti-lipopolysaccharide factor isoform C
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BUG	Biolog universal growth ágar
Cat	Catalase
CBM	Concentração bactericida mínima
cDNA	DNA complementar
CG-EM	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CL₅₀	Concentração letal média
CLUE/EM	Cromatógrafo líquido de ultraeficiência acoplado a espectrômetro de massas
COHC	Células ovarianas de hamster chinês
Cru	Crustin
CTH	Contagem total de hemócitos
cytMnSOD	Cytosolic manganese superoxide dismutase
DL₅₀	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
dsDNA	Double stranded DNA
EAQ	Extrato aquoso
EE	Extrato etanólicos
EEMP	Extrato etanólico de <i>Myracrodruon urundeuva</i> e <i>Punica granatum</i>
Ef1α	Elongation factor 1 alfa
EFS	Extração em Fase Sólida
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GC	Células granulares
GPx	Glutationa peroxidase
HCs	Células hialinas
HDELTA	Herbário Delta do Parnaíba
HHAP	Hemocyte homeostasis-associated protein
HSP70	Heat shock protein 70kDa
IAA	Índice de atividade antioxidante
IC₅₀	Concentração inibitória de 50% da absorvância
IF-B	Inoculating fluid B
iiPCR	Reação em Cadeia da Polimerase isotérmica isolada
IKK	Quinase I κ B
IMD	Protein immune deficiency

IOC	Instituto Oswaldo Cruz
JAK	Janus kinase
LGBP	Lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein
LITAF	Lipopolysaccharide-induced TNF- α factor
LPS	Lipopolissacarídeos
LvAgo1	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Argonaute 1
LvAMP13.4	<i>Litopenaeus vannamei</i> cuticle protein AMP13.4 mRNA, complete cds
LvCactus	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Cactus
LvCAT	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Catalase
LvDcr1	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Dicer-1
LvPPAE2	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Prophenoloxidase-activating enzyme 2
LvPRDX	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Peroxiredoxin
LvproPO2	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Prophenoloxidase 2
LvRelish	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Relish - Rel/NF- κ B transcription factor
Lva2M-2	<i>Litopenaeus vannamei</i> gene Alpha2-macroglobulin
Lys	Lysozyme
MDA	Malondialdeído
mtMnSOD	Mitochondrial manganese superoxide dismutase
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OE	Óleo essencial
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pen 3a	Penaeidin 3 ^a
Pen 4	(Penaeidin 4
PG	Peptidoglicano
PL₁₄	Pós larvas de 14 dias
PMAP	Padrões moleculares associados a agentes patogênicos
PO	Fenoloxidase
ppA	Prophenoloxidase-activating enzyme
proPO	Profenoloxidase
proPO I	Profenoloxidase I
proPO II	Profenoloxidase II
PRP	Proteínas de reconhecimento de padrões
Prx	Peroxiredoxin
PX	Peroxinectin
RB	<i>Burst</i> respiratório
Rho	Ras-like protein
RNA^m cit-SOD	Cytosolic superoxide dismutase
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa
SAC	Suplemento alimentar comercial
SACM	Suplementos alimentares comerciais para camarões marinhos
SGC	Células semi-granulares
SIC-EDTA	Solução isotônica de ácido etilenodiamino tetra-acético
SNHPA	Síndrome da necrose hepatopancreática aguda
SOD	Superoxide dismutase
TCBS	Ágar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose

TGS I	Transglutaminase I
TGS II	Transglutaminase II
TRL 1	Toll-like receptor 1
TRL 2	Toll-like receptor 2
TRL 3	Toll-like receptor 3
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
TSA	Ágar tríptico de soja
TTC	Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultravioleta
WSSV	White spot syndrome vírus
WSV	White spot vírus
$\alpha 2-m$	$\alpha 2$ -macroglobulin
βG	β -1,3-glicana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 PRINCIPAIS PATÓGENOS NA CARCINICULTURA	22
2.1.1 <i>Vírus da síndrome da mancha branca</i>	22
2.1.2 <i>Vibriose</i>	23
2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAMARÕES	25
2.3 ANTIBIÓTICOS NA AQUICULTURA	28
2.4 PRODUTOS NATURAIS NA AQUICULTURA	30
2.5 PLANTAS COM POTENCIAL FITOTERÁPICO	32
2.5.1 <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	32
2.5.2 <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm.	33
2.5.3 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	33
2.5.4 <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt & Bor.	34
2.5.5 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson	34
2.5.6 <i>Lippia origanoides</i> Kunth	35
2.5.7 <i>Mesosphaerum suaveolens</i> (L.) Kuntze	36
2.5.8 <i>Ocimum gratissimum</i> L.	36
2.5.9 <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardlew.	37
2.5.10 <i>Psidium guajava</i> L.	37
2.5.11 <i>Varronia curassavica</i> Jacq.	38
2.5.12 <i>Allium sativum</i> L.	39
2.5.13 <i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck	39
2.5.14 <i>Ocimum basilicum</i> L.	40
2.5.15 <i>Salvia officinalis</i> L.	40
2.5.16 <i>Thymus vulgaris</i> L.	40
2.5.17 <i>Spondias mombin</i> Jacq.	41
2.5.18 <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	41
2.5.19 <i>Punica granatum</i> L.	42
REFERÊNCIAS	43
3 OBJETIVOS	66
3.1 Objetivo geral	66
3.2 Objetivos específicos	66
CAPÍTULO I	67

Óleos essenciais com potencial de aplicação na carcinicultura: composição química e atividade antibacteriana contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> *	67
RESUMO	68
ABSTRACT	69
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 Material vegetal	72
2.2 Obtenção do óleo essencial	73
2.3 Caracterização química dos óleos essenciais	74
2.4 Atividade antibacteriana	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1 Caracterização dos óleos essenciais	76
3.2 Atividade antibacteriana	80
4 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91
CAPÍTULO II	106
Composição química e atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de <i>Spondias mombin</i> L., <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão e <i>Punica granatum</i> L. contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	106
RESUMO	107
ABSTRACT	108
1 INTRODUÇÃO	109
2 MATERIAL E MÉTODOS	110
2.1 Material vegetal	110
2.2 Obtenção do extrato etanólico (EE)	111
2.3 Caracterização química dos extratos etanólicos	112
2.4 Atividade antibacteriana	114
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
3.1 Caracterização dos extratos etanólicos	116
3.2 Atividade antibacteriana	118
4 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS	125
CAPÍTULO III	135
Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de óleos essenciais e extratos etanólicos de espécies vegetais	135
RESUMO	136

ABSTRACT	137
1 INTRODUÇÃO	138
2 MATERIAL E MÉTODOS	139
2.1 Material vegetal.....	139
2.2 Obtenção do óleo essencial.....	140
2.3 Obtenção do extrato etanólico (EE).....	141
2.4 Atividade antioxidante.....	141
2.5 Análise estatística.....	144
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	144
4 CONCLUSÕES	150
REFERÊNCIAS	151
CAPÍTULO IV	158
Toxicidade aguda de óleos essenciais e extratos etanólicos de plantas náuplios de <i>Artemia salina</i>	Erro! Indicador não definido.
RESUMO	159
ABSTRACT	160
1 INTRODUÇÃO	161
2 MATERIAL E MÉTODOS	162
2.1 Material vegetal.....	162
2.2 Obtenção do óleo essencial.....	163
2.3 Obtenção do extrato etanólico (EE).....	164
2.4 Toxicidade aguda - Concentração Letal (CL ₅₀).....	164
2.5 Análise estatística.....	165
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	166
4 CONCLUSÕES	172
REFERÊNCIAS	173
CAPÍTULO V	178
Efeito da suplementação dietética de extratos etanólicos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão e <i>Punica granatum</i> L. na imunomodulação e resistência de <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931) contra o vírus da mancha branca	178
RESUMO	179
ABSTRACT	180
1 INTRODUÇÃO	181
2 MATERIAL E MÉTODOS	183
2.1 Material vegetal.....	183

2.2 Obtenção do extrato etanólico (EE).....	184
2.3 Design experimental.....	184
2.4 Cultura de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	187
2.5 Determinação da atividade antibacteriana da hemolinfa (AAH).....	188
2.6 Contagem total de hemócitos (CTH).....	189
2.7 Expressão de genes imunorelacionados.....	190
2.8 Diagnóstico de WSSV.....	191
2.9 Infecção por WSSV.....	192
2.10 Análise estatística.....	192
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	193
4 CONCLUSÕES.....	202
REFERÊNCIAS.....	202
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	210
APÊNDICES.....	212
ANEXOS.....	235

1 INTRODUÇÃO

O camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Figura 1) encontra-se naturalmente distribuído ao longo da costa do Pacífico na América Central e do Sul, e tornou-se a espécie de cultivo mais importante em todo o mundo devido ao desenvolvimento bem sucedido de técnicas de manejo em cativeiro (TAYAG et al., 2010; CHEN et al., 2012). Em 2016 a produção mundial desse crustáceo foi 12,46% maior que no ano de 2014, totalizando 4,1 bilhões de toneladas (FAO, 2018).

Figura 1 - Exemplos de *Litopenaeus vannamei* de uma fazenda de criação do norte do Piauí.



Fonte: próprio autor.

A produção comercial dessa espécie de camarão tem sido dificultada por infecções endêmicas e epidêmicas como vibrioses, doenças virais e fúngicas, as quais provocam elevadas taxas de mortalidade (TASSANAKAJON et al., 2018), e têm gerado significativo impacto sobre a rentabilidade da indústria (POURMOZAFFAR; HAJIMORADLOO; MIANDARE, 2017).

A deterioração do ambiente aquícola, pelo emprego de altas densidades de estocagem e uso indiscriminado de antibióticos, tem colaborado significativamente para o aumento da susceptibilidade de ocorrências de surtos

de doenças, devido ao estresse provocado nos animais somado ao aumento da resistência bacteriana a antibióticos (YEH et al., 2009a; CHEN et al., 2016a).

As estratégias tradicionais de controle de doenças na carcinicultura empregam antibióticos e desinfetantes químicos (MONTERO-ROCHA et al., 2006; POURMOZAFFAR; HAJIMORADLOO; MIANDARE, 2017). Contudo, essas práticas já não são recomendadas devido ao surgimento de resistência bacteriana, à preocupações sobre o impacto ambiental e a proteção da vida selvagem (HSIEH et al., 2013).

Diante do atual quadro sanitário da cadeia produtiva do camarão branco do Pacífico, a melhoria da imunidade e da resistência a doenças tornou-se imprescindível para o crescimento continuado e sustentável da indústria carcinícola (TASSANAKAJON et al., 2018). Desse modo, a busca por métodos alternativos para melhorar a imunidade de *L. vannamei* se faz necessária, a fim de diminuir a incidência de surtos de doenças (RUNGRASSAMEE et al., 2014). Surge, portanto, a possibilidade de uso de produtos naturais como forma mais ecológica para o controle das doenças da carcinicultura (ISHWARYA et al., 2018).

Na literatura científica são apresentados resultados relevantes abordando a utilização de produtos naturais derivados de plantas na aquicultura, seja como antimicrobiano ou como promotoras da melhoria do sistema imunológico de peixes e camarões (WU et al., 2015; TREJO-FLORES et al., 2016; PRABU et al., 2018). Dentre as espécies brasileiras com potencial aplicação como antimicrobianos, como a *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (JORAY; PALACIOS; CARPINELLA, 2013), *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm. (KERDUDO et al., 2016), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (PARTOVI et al., 2019), *C. winterianus* Jowitt & Bor. (SILVEIRA et al., 2012), *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson (NUNES et al., 2018), *L. origanoides* Kunth (LOBO et al., 2014), *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (MALAR et al., 2012), *Ocimum gratissimum* L. (CHIMNOI et al., 2018), *O. basilicum* L. (BALDIM et al., 2018), *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew. (ROCHA et al., 2017), *Psidium guajava* L. (SOLIMAN et al., 2016), *Varronia curassavica* Jacq (MATIAS et al., 2016), *Allium sativum* L. (LAWAL et al., 2016), *Citrus limon* (L.) Osbeck (CHUNG; CHO; RHEE, 2018), *Salvia officinalis* L.

(WIJESUNDARA; RUPASINGHE, 2018), *Thymus vulgaris* L. (REYES-JURADO et al., 2019), *Spondias mombin* L. (AROMOLARAN; BADEJO, 2014), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (PIRES et al., 2018) e *Punica granatum* L. (YOUSSEF; EL-MAHMOUDY, 2019), as quais, em sua maioria, ainda não foram investigadas quanto a sua ação antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus*, um patógeno causador de significativas perdas na carcinicultura.

Ante o exposto, o presente trabalho objetivou investigar a composição química e o efeito antibacteriano de produtos naturais a base de plantas encontradas no Brasil contra estirpes de *V. parahaemolyticus*, a atividade antioxidante e a toxicidade aguda em náuplios de *Artemia salina*. Os resultados dos estudos citados anteriormente embasaram a escolha de um produto natural para investigação de seus efeitos na melhoria do sistema imunológico de camarões *Litopenaeus vannamei*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRINCIPAIS PATÓGENOS NA CARCINICULTURA

2.1.1 Vírus da síndrome da mancha branca

Dentre as doenças virais que afetam o desenvolvimento da carcinicultura, a virose da mancha branca tornou-se atualmente a maior ameaça global (LI; WENG; HE, 2019). O agente causador da mancha branca é o vírus da síndrome da mancha branca (sigla em inglês - WSSV) ou o vírus da mancha branca (WSV). O WSSV é um vírus de DNA de cadeia dupla (dsDNA) de envelope grande pertencente ao gênero *Whispovirus* e à família *Nimaviridae* (LIGHTNER, 2011). Por se tratar de um vírus envelopado, o WSSV utiliza suas proteínas do envelope para se conectar ao hospedeiro antes da infecção (YANG et al., 2018). O WSSV é considerado um dos vírus mais onipresentes e letais para camarões cultivados (WANG et al., 1999; YANG et al., 2018). As variações genéticas desse patógeno resultam em cepas com diferentes virulências (SUN et al., 2016).

O vírus da mancha branca possui uma vasta lista de hospedeiros, dentre eles: todos os camarões peneídeos, *Exopalaemon orientalis*, *Macrobrachium rosenbergii* e *Procambarus clarkii* (WANG et al., 1999). Esse vírus também já foi detectado em caranguejos e lagostas selvagens, copépodos e *Artemia* (CHANG; CHEN; WANG, 1998; WANG et al., 1998). Em temperaturas acima de 32°C, o WSSV não se desenvolve em *L. vannamei*, porém quando abaixo de 25°C a doença se desenvolve rapidamente com até 100% de mortalidade (LIGHTNER, 2011).

Em *Litopenaeus vannamei* afetados pelo WSSV ocorre rápida redução no consumo de alimentos, letargia e cutícula com alguns pontos brancos, que representam depósitos anormais de sais de cálcio pelo epitélio cuticular infectado (LIGHTNER, 2011). Um gene da proteína cuticular de *L. vannamei* chamado LvAMP13.4, pode ser significativamente regulado durante uma infecção aguda causada por WSSV (YANG et al., 2018). Também, em muitos

casos, camarões moribundos podem apresentar uma coloração variando do rosa ao castanho avermelhado, devido à expansão dos cromatóforos, com poucas ou nenhuma mancha branca (MEDINA-FÉLIX et al., 2014).

Uma infecção primária causada por WSSV pode enfraquecer os camarões, aumentando sua suscetibilidade a infecções bacterianas (infecções secundárias), sendo normalmente as bactérias do gênero *Vibrio* agentes oportunistas em infecções secundárias (SELVIN; LIPTON, 2003).

2.1.2 Vibriose

Vibriose é o nome geral para um grupo de condições clínicas de gravidade variável, tipicamente associadas ao gênero *Vibrio*, cujos membros são bacilos gram-negativos, positivos para citocromo oxidase, anaeróbios facultativos, muitos dos quais requerem NaCl para o crescimento (JANDA; NEWTON; BOPP, 2015).

Os membros do gênero *Vibrio*, que totalizam mais de 100 espécies, estão predominantemente associados a uma variedade de habitats aquáticos, sobretudo marinhos, sendo exceção limitada a essa regra as espécies *V. cholerae* e *V. mimicus* não-halofílicas, que podem ser encontradas em ambientes de água doce (CHAKRABORTY; NAIR; SHINODA, 1997; KIM et al., 2019).

Em humanos as vibrioses podem variar de casos leves de gastroenterite a situações de risco de vida, como septicemia e infecções invasivas da pele e dos tecidos moles (JANDA; NEWTON; BOPP, 2015). Na indústria carcinícola, as doenças infecciosas causadas pelas espécies de *Vibrio* representam grandes desafios enfrentados em todo o mundo, causando perdas econômicas consideráveis de até U\$ 3 bilhões por ano (FÉLIX et al., 2017; SRINIVASAN; RAMASAMY, 2017). Os principais patógenos oportunistas do camarão branco do Pacífico são *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*, conhecidos por causar sérios surtos (SAULNIER et al., 2000; WEN et al., 2014; TEPAAMORNDECH et al., 2019).

Vibrio harveyi é uma bactéria marinha bioluminescente em forma de bastonete, que pode causar vibriose tanto em vertebrados marinhos quanto em

invertebrados, levando a perdas significativas nos sistemas de aquicultura (THIRUGNANASAMBANDAM et al., 2019). A infecção por *V. harveyi* causa a vibriose luminosa, doença da cauda branca ou síndrome vermelho-brilhante, levando à mortalidade maciça em incubadoras de camarão (TEPAAMORNDECH et al., 2019; CHUMPOL et al., 2019). Produtos extracelulares incluindo proteases, fosfolipases, sideróforos e hemolisinas ou exotoxinas podem ser considerados os causadores da sua patogenicidade (STALIN; SRINIVASAN, 2017; THIRUGNANASAMBANDAM et al., 2019).

O *V. alginolyticus* é um importante patógeno em ambientes costeiros e estuarinos (ZHU; SUN; WANG, 2019). Essa bactéria normalmente causa infecção quando a imunidade do hospedeiro é comprometida, sendo, desta forma, considerado um patógeno secundário e oportunista que causa alta mortalidade de camarões em ambientes estressantes (ZHU; WANG; SUN, 2016). Tanto moluscos como crustáceos podem ser afetados por esse patógeno, especialmente camarões, os quais podem sofrer danos na carapaça (úlceras cutâneas) e hepatopâncreas (BUNPA; SERMWITTAYAWONG; VUDDHAKUL, 2016; KONG et al., 2018).

O *V. parahaemolyticus* é o patógeno causador da síndrome da necrose hepatopancreática aguda (sigla em inglês AHPND), responsável por prejudicar gravemente a produção de camarões e conseqüentemente a renda econômica (THITAMADEE et al., 2016; WANGMAN et al., 2018). Esse patógeno atua principalmente em ambientes costeiros e estuarinos (SHI et al., 2019).

A distribuição de *V. parahaemolyticus* nos ambientes marinhos relaciona-se com a temperatura da água, sendo raramente encontrado em locais com temperatura menor que 15°C (SU; LIU, 2007). A infecção causada por essa bactéria em camarões pode provocar inatividade dos animais, crescimento lento, estômago e intestino médio vazios, e atrofiamento associado à palidez do hepatopâncreas (LEE et al., 2015; ELSHOPAKEY et al., 2018).

Nos primeiros 20 a 30 dias após o povoamento com pós-larvas, a AHPND pode causar até 100% de mortalidade (RAJA et al., 2017; ELSHOPAKEY et al., 2018). Essa doença foi primeiramente relatada na China em 2009 e subsequentemente no Vietnã (2010), Malásia (2011), Tailândia

(2012), México (2013) e Filipinas (2014) (LEE et al., 2015; WANGMAN et al., 2018).

2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAMARÕES

Os camarões dependem de uma resposta imune inata para se defender contra patógenos (ISHWARYA et al., 2018). A vacinação como estimulação imunológica é amplamente usada para prevenir doenças em mamíferos e outros vertebrados, mas não é adequada para invertebrados como camarões, uma vez que esses animais possuem apenas imunidade inata e não têm capacidade de produzir anticorpos (MOTAMEDI-SEDEH et al., 2017).

A presença de partículas estranhas na hemocele dos camarões provoca uma resposta imunológica iniciada através do reconhecimento das moléculas estranhas como lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicano (PG) derivados de paredes celulares de bactérias, e β -1,3-glicana (β G) derivada de fungos e micélios de levedura, as quais são identificadas como padrões moleculares associados a patógenos (PMAP) por moléculas de reconhecimento do hospedeiro (proteínas de reconhecimento de padrões – PRP) (LEE; SÖDERHÄLL, 2002; YUDIATI et al., 2016).

No sistema imunológico inespecífico dos crustáceos os hemócitos são as principais células envolvidas na resposta imunitária, incluindo a atividade fagocítica e a ativação do sistema profenoloxidase (proPO) (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; WU et al., 2017). Os hemócitos podem ser classificados em 3 tipos, com base na presença de grânulos citoplasmáticos: células hialinas (HCs), células semi-granulares (SGC), e células granulares (GC) (TAYAG et al., 2010).

Nos crustáceos Decapoda as células semi-granulares e granulares são induzidas à desgranulação por moléculas microbianas ou estranhas como LPS, β G, e PG na presença de proteínas de reconhecimento de padrões específicos (PPR), como por exemplo, as proteínas de ligação de β G (YEH et al., 2010a; YUDIATI et al., 2016).

As PRP desencadeiam o sistema proPO na presença de polissacarídeos microbianos, libertando proPO e outras proteínas. A conversão de proPO

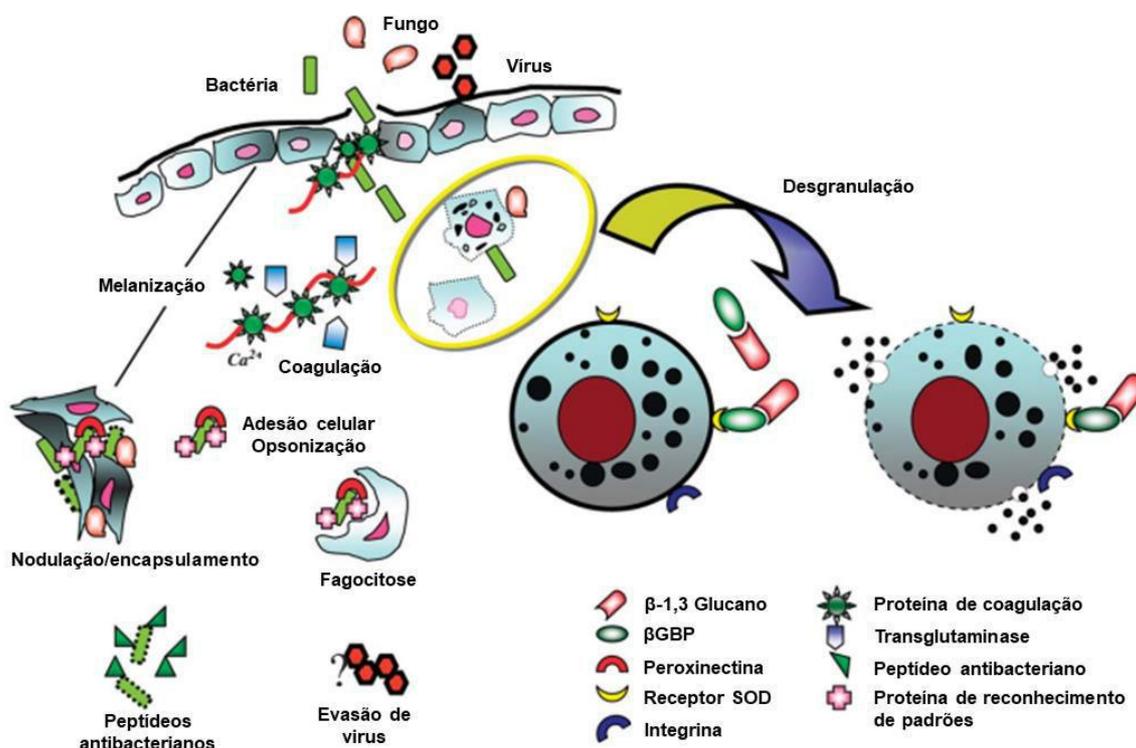
inativo ocorre através de proteólise de uma serino-protease do tipo tripsina para fenoloxidase ativa (PO). A forma PO é uma oxidoreductase que catalisa duas reações sucessivas: a primeira, de hidroxilação de um monofenol a o-difenol (atividade monofenoloxidásica) e, a segunda, de oxidação do o-difenol a o-quinona (atividade difenoloxidásica). A produção de o-quinonas resulta na síntese de melanina através de uma cascata de reações químicas intermediárias, sendo a maioria espontânea, não mediada por enzimas (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004; CHEN et al., 2012).

Desta forma o sistema proPO é ativado através da conversão proteolítica de proPO à fenoloxidase (PO) por PPR ativas na presença de PMAP que subsequentemente resultam na ativação de processos de imunidade inata, tais como melanização, liberação de compostos citotóxicos e encapsulação de agentes patogênicos (CERENIUS; LEE; SÖDERHÄLL, 2008).

A melanização é uma resposta imune de animais invertebrados, especialmente artrópodes, à parasitas, que ocorre devido a atividade de uma oxidoreductase, a fenoloxidase. Esta enzima faz parte de um sistema complexo de proteinases, proteínas de reconhecimento de padrões e inibidores, chamado de sistema de ativação da profenoloxidase (proPO) (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998). Nesse processo a conversão de profenoloxidase à enzima ativa pode ser trazida por quantidades minúsculas de moléculas como lipopolissacarídeos, peptidoglicano e β -1-3-glicana a partir de microorganismos (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Quando uma partícula estranha entra na hemolinfa, os hemócitos reconhecem o intruso como uma molécula não própria do organismo e transformam-se em células adesivas, aderindo-se fortemente ao agente invasor, ligando-se e espalhando-se pela superfície do intruso de modo a formar uma bainha de células de várias camadas durante o encapsulamento (figura 2) (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; YUDIATI et al., 2016).

Figura 2 - Ilustração do complexo sistema de defesa inato dos camarões sendo ativado pela desgranulação dos hemócitos devido ao reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogênicos.



FONTE: adaptado de Jiravanichpaisal; Lee; Söderhäll (2006).

Como resultado da ativação do sistema proPO o parasita é enegrecido na hemolinfa hospedeira pela deposição de melanina devido à ação da fenoloxidase. Esta reação é chamada de melanização, e é facilmente observada em torno de parasitas na hemolinfa ou no exoesqueleto (cutícula) (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). Após a ativação do sistema, as proteínas associadas ganham atividade biológica e participam das reações de defesa celular do animal hospedeiro, através da produção local de quinonas ou semiquinonas citotóxicas através da cascata de ativação proPO, radicais livres e peptídeos antibacterianos (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2008).

Outro fenômeno diretamente relacionado à resposta imunitária de crustáceos diz respeito ao *burst* respiratório (RB), o qual pode ser induzido, mediante estimulação adequada, por componentes solúveis tais como lectinas, LPS ou por estímulos fagocíticos particulados. A estimulação conduz ao

aumento abrupto do consumo de oxigênio, catalisado por uma enzima ligada à membrana celular, NADPH-oxidase, que dá origem ao superóxido (O_2^-). Iniciadas a partir do superóxido, uma série de reações levam à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros compostos reativos, os quais são utilizados no combate aos agentes invasores (MUÑOZ et al., 2000; ESQUER-MIRANDA et al., 2016).

O estresse oxidativo é uma condição fisiológica que resulta de um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a concentração de antioxidantes, que pode resultar em danos ao DNA, proteínas e lipídios (HE et al., 2017). A eliminação eficaz e rápida das EROs é essencial para o bom funcionamento e sobrevivência do organismo (HSIEH et al., 2013; WU et al., 2015).

Após o estresse oxidativo natural, há a elevação da concentração da enzima superóxido dismutase, que é responsável pela eliminação de ânion superóxido, para que não haja prejuízos ao hospedeiro (danos celulares ou até mesmo ao DNA) devido à elevada concentração de compostos reativos de oxigênio (CHENG et al., 2005; ESQUER-MIRANDA et al., 2016). Portanto, capacidade antioxidante do organismo diante do estresse oxidativo causado pela resposta inflamatória à infecções é de suma importância para a manutenção da saúde.

2.3 ANTIBIÓTICOS NA AQUICULTURA

A aquicultura enfrenta problemas crescentes com doenças bacterianas, cujo tratamento requer o uso intensivo de antimicrobianos, os quais são comumente usados durante todo ciclo de produção, tanto na fase larval quanto na de crescimento (SAXENA et al., 2018). Não há antibióticos projetados especificamente para a aquicultura, portanto, são utilizados produtos autorizados desenvolvidos para outras áreas da medicina veterinária (SANTOS; RAMOS, 2016). Na China, alguns antibióticos projetados apenas para seres humanos, por exemplo, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina e furazolidona, tem seu uso frequentemente relatado na aquicultura (LIU; STEELE; MENG, 2017).

Na aquicultura, os antimicrobianos geralmente são administrados a populações inteiras contendo indivíduos doentes e saudáveis, por um processo conhecido como metafilaxia (SANTOS; RAMOS, 2018). Os antibióticos são normalmente adicionados à água principalmente por meio de alimentos enriquecidos com medicamentos, porém, os antibióticos não consumidos e excretados podem permanecer na coluna de água ou atingir o sedimento subjacente, aumentando continuamente sua concentração no ambiente (MARTINS et al., 2019). Estima-se que um mínimo de 75% dos antibióticos usados nos sistemas de aquicultura são exportados para o ambiente ao redor acumulando-se nos sedimentos (LALUMERA et al., 2004)

Os níveis atuais de uso de antimicrobianos na aquicultura em todo o mundo não são fáceis de determinar, porque diferentes países têm diferentes sistemas de distribuição e registro (SAXENA et al., 2018). Por exemplo, na China, o maior produtor aquícola do mundo, 13 antibióticos foram autorizados para uso na aquicultura (doxiciclina, enrofloxacina, florfenicol, flumequina, neomicina, norfloxacina, ácido oxolínico, sulfadiazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, trimetofenicol e trimetofenicol), enquanto apenas cinco (amoxicilina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, sarafloxacina e trimetoprim-sulfadiazina) foram autorizadas para uso no Reino Unido (SANTOS; RAMOS, 2016; LIU; STEELE; MENG, 2017).

No Brasil, o órgão que regula o uso de medicamentos na aquicultura, assim como nos demais setores de produção animal, é a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), que compõe o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (CUNHA, 2017). Na aquicultura brasileira, os dois antibióticos com registro para uso são o florfenicol e a oxitetraciclina, ambos com amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (PILARSKI; GARCIA; SUTILI, 2017).

Muitas bactérias resistentes a antibióticos têm sido encontradas no ambiente, representando um risco a saúde pública. O uso intensivo de antibióticos é uma das principais causas para a introdução de resistência bacteriana (HSIEH et al., 2013; ZHAI et al., 2019). O maior risco potencial à saúde pública associado ao uso de antimicrobianos na aquicultura é o desenvolvimento de um reservatório de genes de resistência transferíveis em bactérias no ambiente aquático, uma vez que esses genes podem ser

disseminados por transferência horizontal para outras bactérias e, finalmente, atingir patógenos humanos (SANTOS; RAMOS, 2016).

Na criação de camarões uma grande quantidade de substâncias antimicrobianas é administrada de forma imprudente, e por isso, muitas estirpes de *Vibrio* têm sido relatadas como resistentes a antibióticos, mesmo utilizando-se concentrações acima da concentração inibitória mínima indicada (REBOUÇAS et al., 2011; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016).

Em vários países, os perfis de resistência a antibióticos mais frequentemente observados em *Vibrio* envolvem ampicilina, penicilina e tetraciclina (ELMAHDI; DA SILVA; PARVEEN, 2016). O uso de antibióticos será, provavelmente, mantido nos cultivos de camarão por um longo tempo, devido à facilidade de acesso aos produtos (ZHANG; LI; SUN, 2011). Portanto, o monitoramento do uso de drogas antimicrobianas na aquicultura deve ser incentivado, a fim de melhorar sua gestão para o benefício da saúde pública e segurança alimentar (REBOUÇAS et al., 2011).

Considerando o dano potencial dos tratamentos com medicamentos veterinários sobre o meio ambiente e a saúde humana e, em alguns casos, sua eficácia limitada, o manejo das doenças deve se concentrar em métodos inofensivos, preventivos e duradouros (REVERTER et al., 2014; ZHAI et al., 2019).

Haja vista que o uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento de bacterioses pode levar a promoção de efeitos secundários indesejáveis, surge a necessidade de utilização de compostos que não tragam riscos a saúde coletiva e ao ambiente, o que pode ser alcançado pelo emprego de produtos naturais (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003; HAI, 2015).

2.4 PRODUTOS NATURAIS NA AQUICULTURA

Na aquicultura uso de óleos essenciais e extratos alcoólicos têm mostrado resultados relevantes em testes de atividade antimicrobiana *in vitro* (PILARSKI; GARCIA; SUTILI, 2017), porém testes *in vivo* são mais escassos. Na carcinicultura, testes com produtos derivados de plantas têm aumentado, com objetivo de investigar compostos com atividade antimicrobiana e que

melhorem a resistência de camarões às infecções causadas por bactérias e vírus (WU et al., 2017; ZHAI et al., 2019).

O uso de produtos naturais na aquicultura pode reduzir os custos de tratamentos, além de ser uma prática ambientalmente amigável devido sua maior biodegradabilidade e por serem menos propensos a produzir resistência aos microrganismos devido à alta diversidade de moléculas (REVERTER et al., 2014).

Os produtos naturais utilizados na aquicultura incluem ervas, especiarias, compostos extraídos de plantas e produtos comerciais derivados de vegetais. Tais produtos podem ser administrados como um todo (planta inteira), partes (folha, caule, raiz ou semente) ou compostos extraídos através do uso da água ou outros solventes, quer isoladamente ou como uma combinação de compostos (HAI, 2015). A seleção de compostos naturais adequados com potenciais propriedades benéficas aos camarões mostra-se como uma tarefa um tanto difícil, sendo, portanto, perfeitamente razoável que indícios possam ser obtidos a partir de informações disponíveis sobre bioprodutos com conhecida ação em vertebrados superiores (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Nos últimos anos, a eficácia de produtos naturais de diferentes origens tem sido extensivamente estudada na criação de camarões no que diz respeito a performances zootécnicas e de saúde (PILOTTO et al., 2019). Pesquisas também se concentram nos efeitos sinérgicos dos antibióticos e medicamentos naturais, uma vez que as combinações de medicamentos também podem reduzir substancialmente a probabilidade de desenvolvimento de resistência a medicamentos e melhorar a eficácia do tratamento (ZHAI et al., 2019).

Muitas plantas têm sido relatadas como promotoras de ação anti-estresse, de aumento do crescimento, estimulação do apetite, aumento da tonicidade, imunoestimulação e propriedades anti-patogênicas em peixes e camarões devido a grupos de compostos como alcalóides, terpenóides, taninos, saponinas, glicosídeos, flavonóides, fenólicos ou esteróides (REVERTER et al., 2014; PALANIKUMAR et al., 2018; WU et al., 2019).

Pesquisas têm relatado a melhoria de parâmetros zootécnicos (ganho de peso, sobrevivência a infecções experimentais), parâmetros hematológicos (catalase, superóxido desmutase, atividade da

profenoxidase, glutathione peroxidase, contagem total de hemócitos e atividade antibacteriana da hemolinfa) e parâmetros genéticos (modulação de genes imunorelacionados) de *L. vannamei* pela administração de produtos naturais derivados de plantas, como: suplementos alimentares a base de *Panax ginseng* (LIU et al., 2011), de mananoligossacarídeos da farinha de copra (RUNGRASSAMEE et al., 2014; LI et al., 2018), de polissacarídeos de *Angelica sinensis* (PAN; JIANG; WU, 2018) e *Astragalus membranaceus* (ZHAI et al., 2019), *Gynura bicolor* (WU et al., 2015), *Yucca schidigera* (YANG et al., 2015), *Aloe vera* (TREJO-FLORES et al., 2016), *Syzygium cumini* (PRABU et al., 2018) e *Rubus coreanus* (SUBRAMANIAN et al., 2013); injeção no seio ventral com solução contendo derivados de *Gynura bicolor* (HSIEH et al., 2013), *Cinnamomum kanehirae* (YEH et al., 2009b) e *Toona sinensis* (HSIEH et al., 2008) e imersão dos camarões em água do mar com produtos extraídos de *Camellia sinensis* (KONGCHUM et al., 2016).

Países com rica biodiversidade de flora, como o Brasil, têm uma ampla variedade de espécies de plantas, o que implica em uma grande diversidade de biomoléculas com propriedades farmacológicas (GOMIDE et al., 2016), as quais possuem potencial promissor para uso na aquicultura (BOIJINK et al., 2016). Nas últimas décadas, óleos essenciais e diversos extratos vegetais têm sido foco de grande interesse dos pesquisadores por representarem potenciais recursos naturais com diversas aplicações (MICHIELIN et al., 2009).

2.5 PLANTAS COM POTENCIAL FITOTERÁPICO

2.5.1 *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

A macela, *Achyrocline satureioides* (Asteraceae), é uma planta herbácea, nativa da América tropical, rica em flavonóides e terpenos, com amplo uso na medicina tradicional (SABINI et al., 2016). Seu potencial biológico somado à baixa genotoxicidade (SABINI et al., 2013; SALGUEIRO et al., 2016) se reflete no fato das 175 moléculas aprovadas para tratamento de câncer

entre 1940 e 2014, 49% são produtos naturais ou derivados dessa planta (SOUZA et al., 2018).

Os compostos presentes nessa planta possuem potencial para o tratamento de tumores gliais (SOUZA et al., 2018), ação antioxidante (GOLTZ et al., 2018), atividade antiviral (SABINI et al., 2016), atividade antibacteriana (JORAY; PALACIOS; CARPINELLA, 2013), cicatrizante (PEREIRA et al., 2017), anti-inflamatório (RIBEIRO et al., 2018), propriedades vasorelaxantes (HNATYSZYN et al., 2004), antiespasmódica (SIMÕES et al., 1988) e atividade colerética (KADARIAN et al., 2002).

2.5.2 *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm.

A colônia, *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae), é uma planta que cresce amplamente nas regiões subtropicais e tropicais (CAVALCANTI et al., 2012), e é abundante no nordeste brasileiro (PINTO et al., 2009). As espécies do gênero *Alpinia* geralmente possuem grandes rizomas que são usados como alimento, temperos ou produtos medicinais (RAO et al., 2014).

Estudos mostram que os compostos bioativos dessa espécie possuem potencial para prevenção e controle de doenças neurodegenerativas (RAO et al., 2014), ação como agente hipotensor (CUNHA et al., 2013; TAO; HU; SHEN, 2013) e potencial antioxidante (CAVALCANTI et al., 2012). Essa planta também pode ser utilizada como antidepressivo (MELO et al., 2015), antiespasmódico no músculo intestinal e vascular (PINHO et al., 2005), antihelmíntico (UPADHYAY et al., 2013) e antibacteriano (KURADE et al., 2010; CASTRO et al., 2016).

2.5.3 *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Cymbopogon citratus, também conhecida como capim-limão, é uma erva perene nativa da Índia e amplamente cultivada em outras regiões tropicais e subtropicais (SAGRADAS et al., 2015) muito utilizada na medicina popular em todo o mundo (COSTA et al., 2011).

Essa planta possui potencial antimalárico (CHUKWUOCHA; FERNÁNDEZ-RIVERA; LEGORRETA-HERRERA, 2016), antioxidante (JAMUNA et al., 2017), anti-inflamatório (FRANCISCO et al., 2013; COSTA et al., 2016), antibacteriano (NAIK et al., 2010; BASSOLÉ et al., 2011), gastroprotetor (SAGRADAS et al., 2015), antinociceptivo (VIANA et al., 2000) e atividade redutora do colesterol (COSTA et al., 2011).

2.5.4 *Cymbopogon winterianus* Jowitt & Bor.

A citronela, *Cymbopogon winterianus* (Cardiopteridaceae), é uma planta aromática que produz um óleo essencial rico em biocompostos, sendo os mais expressivos o citronelal, geraniol e limonemo (KAKARAPARTHI et al., 2014; CRUZ et al., 2015).

Na literatura há relatos sobre importantes propriedades dos compostos dessa planta, como atividade antibacteriana (SILVEIRA et al., 2012), antifúngica (CRUZ et al., 2015), depressora do Sistema Nervoso Central (MELO et al., 2010), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008), inseticida (SILVA et al., 2016), repelente (CHELLAPPANDIAN et al., 2018), anti-inflamatório (MELO et al., 2010), antioxidante (LEITE et al., 2010) e moluscicida contra o transmissor da esquistossomose (RODRIGUES et al., 2013).

2.5.5 *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson

A erva cidreira, *Lippia alba* (Verbenaceae), é uma planta medicinal amplamente utilizada em diferentes regiões da América Central e do Sul como tranquilizante e para desordens digestivas, respiratórias e cardiovasculares (GOMES et al., 2018). Os metabólitos secundários descritos para esta espécie incluem flavonóides, taninos, saponinas triterpênicas iridóides e resinas (AZAMBUJA et al., 2011). Seus compostos fenólicos possuem significativa atividade antioxidante (NUNES et al., 2018).

O óleo essencial dessa planta tem efeito ansiolítico nos peixes *Rhamdia quelen* e *Danio rerio* (JUNIOR et al., 2018). Tem ação no tratamento

antiparasitário das brânquias de tambaqui (SOARES et al., 2016), anestésico para bagre prata *Rhamdia quelen* (BÜRGER et al., 2014), para o tambacu (SENA et al., 2016) e pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* (PARODI et al., 2012), e como antioxidante para os breves períodos de hipóxia ou hiperóxia que ocorrem durante o transporte de peixes (AZAMBUJA et al., 2011).

Pesquisas têm demonstrado que o OE apresenta atividade larvicida contra o carrapato *Rhipicephalus microplus* (PEIXOTO et al., 2015), atividade inseticida contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* (PEIXOTO et al., 2015), antiulcerogênico (PASCUAL et al., 2001), além de possuir atividade antimicrobiana contra várias bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Shigella*, *Mycobacterium*, e fungos do gênero *Candida* (HENNEBELLE et al., 2008).

2.5.6 *Lippia origanoides* Kunth

O alecrim pimenta, *Lippia origanoides* (Verbenaceae), é um arbusto com folhas odoríferas, tipicamente encontrado na Caatinga do nordeste do Brasil (VERAS et al., 2017). Estudos anteriores demonstraram que seu óleo essencial ou extrato etanólico é um potencial inseticida contra cupim *Cryptotermes brevis* (SANTOS et al., 2017), gorgulho-de-milho *Sitophilus zeamais* (OLIVEIRA et al., 2017), ácaro *Tetranychus urticae* (CAVALCANTI et al., 2010) e carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* (GOMES et al., 2014) e antifúngico contra *Candida albicans* (FUNARI et al., 2012; FARIAS et al., 2012).

Os derivados dessa planta também possuem ação antiparasitária contra Monogenoidea de *Oreochromis niloticus* (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013), anti-leishmania *in vitro* (MEDEIROS et al., 2011), antihelmítico (CAMURÇAVASCONCELOS et al., 2008), com efeitos positivos contra a resposta de irritação dérmica e cicatrização de feridas (OLIVEIRA et al., 2014), anti-inflamatório (MONTEIRO et al., 2007) e antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* (VERAS et al., 2012) e *Streptococcus mutans* (LOBO et al., 2014).

2.5.7 *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze

O bamburral, *Mesosphaerum suaveolens*, é uma planta comumente conhecida no Brasil, pertencente à família Lamiaceae, com comprovada ação inibidora enzimática (enzimas CYP1A2, CYP2D6 e CYP3A4) (THOMFORD et al., 2018), ação citotóxica contra células cancerígenas (ARAI et al., 2015), atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, (ELUMALAI et al., 2017).

Essa espécie de planta também possui propriedades antinociceptivas (SANTOS et al., 2007; BEGUM; SAMA; DODLE, 2016), gastro-protetora em diferentes modelos de úlcera gástrica aguda (JESUS et al., 2013), anti-hiperglicêmica (MISHRA et al. 2011), antioxidante (GHAFFARI et al., 2012), anti-inflamatória (JESUS et al., 2009), com atividade inibitória *in vitro* contra *Aeromonas formicans*, *A. hydrophilia*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa* isolados de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (MALAR et al., 2012), e inibidora de vários outros microrganismos, incluindo bactérias e fungos (MONDAL et al., 2007).

2.5.8 *Ocimum gratissimum* L.

A alfavaca-cravo, *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae), é uma erva aromática amplamente distribuída em regiões tropicais, como a América do Sul, a África e o sul e o sudeste da Ásia (CHIMNOI et al., 2018). Nesta planta são encontrados vários compostos bioativos, como polifenóis, flavonóides e ácidos graxos (VENUPRASAD et al., 2014).

Nesta planta já foi verificada ação hipoglicemiante (OKON; UMOREN, 2017), potencial fonte de antioxidantes naturais (HZOUNDA et al., 2016), atividade anti-inflamatória (AJAYI et al., 2017), potencial atividade hipotensora (SHAW; WU; WANG, 2017) e ação antifúngica (DAMBOLENA et al., 2010).

Também já foi estudado seu potencial antileishmanial (UEDA-NAKAMURA et al, 2006), antidiarreico (OFFIAH; CHIKWENDU, 1999), anti-inflamatório no tratamento da asma alérgica ocasionada pelo ácaro *Blomia tropicalis* (COSTA et al, 2012), contra distúrbios digestivos (MADEIRA et al.,

2002), inibidora da eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus* (PESSOA et al., 2002) e antibacteriano (CHIMNOI et al., 2018).

O óleo essencial dessa espécie pode ser utilizado na aquicultura como anestésico e anti-helmíntico em tambaquis (*Colossoma macropomum*) (BOIJINK et al., 2016), antiparasitário de peixes *Gyrodactylus* sp., além de melhorar a resposta antioxidante do bagre prata (BANDEIRA JR et al., 2017) e melhorar a sobrevivência do bagre africano à infecção causada por *Listeria monocytogenes* (ABDEL-TAWWAB et al., 2018). Também pode ser utilizada como anestésico em silver catfish *Rhamdia quelen* (SILVA et al., 2012) e na melhoria da resistência da tilápia *Oreochromis niloticus* à infecção causada por *Streptococcus agalactiae* (BRUM et al., 2017).

2.5.9 *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew.

O *Pilocarpus microphyllus*, de nome comum Jaborandi, é uma planta historicamente usada para fins medicinais (CALDEIRA et al., 2017). As espécies do gênero *Pilocarpus* apresentam uma ampla distribuição na América Latina, ocorrendo do sul da América Central (México) ao sul da América do Sul (CALDEIRA et al., 2017). Essa planta era tradicionalmente utilizada para tratar úlceras na boca, resfriados e gripes, e mais recentemente, descobriu-se que o jaborandi induz tanto a transpiração quanto a salivação (SKIRYCZ et al., 2016).

A pilocarpina é um alcalóide obtido das folhas das plantas desse gênero, com importantes aplicações farmacêuticas no tratamento do glaucoma (ANDREAZZA et al., 2015). Seus alcalóides podem ser utilizados como estratégia terapêutica para danos gastrointestinais induzidos por naproxeno (NICOLAU et al., 2017) e também demonstram potencial antidiabético (FERRERES et al., 2015).

2.5.10 *Psidium guajava* L.

A goiabeira, *Psidium guajava*, é uma planta encontrada em regiões tropicais e subtropicais, incluindo a América Latina, Europa, Ásia e África,

sendo tradicionalmente utilizado na medicina popular em todo o mundo no tratamento de inúmeras doenças (KIM et al., 2016), principalmente como antidiarreico (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008). Os produtos naturais da goiabeira apresentaram flavonóides e fenóis solúveis em sua composição (SOBRAL-SOUZA et al., 2019). As folhas dessa planta são tradicionalmente utilizadas no tratamento dos distúrbios relacionados com o fígado, sistema digestivo, coração, rim e intestino (BHAGAVATHY; MAHENDIRAN; KANCHANA, 2019).

O óleo essencial dessa espécie possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (SOLIMAN et al., 2016, WELI et al., 2018) e seu extrato já foi descrito com relevante atividade antioxidante (MILANI et al., 2018), antifúngica (FERNANDES et al., 2014), antiviral (MORAIS-BRAGA et al., 2016) e antiinflamatória (MCCOOK-RUSSELL et al., 2012).

Os flavonóides isolados de folhas de goiabeira são capazes de inibir o crescimento de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de peixes (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2007). Seu extrato também foi descrito com capacidade de ativar mecanismos imunitários não específicos e melhorar a resistência de *Oreochromis mossambicus* à infecção causada por *Aeromonas hydrophila* (GOBI et al., 2016).

2.5.11 *Varronia curassavica* Jacq.

A *Varronia curassavica* (*Cordia verbenacea*) (Boraginaceae) é uma planta medicinal, nativa do Brasil, distribuída ao longo da costa leste da Amazônia até o sul do estado do Rio Grande do Sul, comumente conhecida como erva-baleeira, pimenteira ou erva-preta (SCIARRONE et al., 2017). As partes aéreas dessa planta possuem um aroma muito forte e persistente, e têm sido usadas na medicina popular na forma de extratos alcoólicos, decocções e infusões por seus produtos anti-ulcerais, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antirreumáticos e analgésicos (PASSOS et al., 2007).

Essa planta possui atividade antitumoral (PARISOTTO et al. 2012), potencial terapêutico em doenças alérgicas envolvendo histamina (OLIVEIRA et al., 2011), atividade antiulcerogênica (ROLDÃO et al., 2008), efeitos

analgésicos e anti-inflamatórios (SERTIÉ et al., 2005), atividade antibacteriana forte contra cepas gram-positivas (MATIAS et al., 2016), além de ser uma importante fonte de antioxidantes (MICHIELIN et al., 2011).

2.5.12 *Allium sativum* L.

O *Allium sativum*, comumente conhecido como alho, é uma planta de floração perene que cresce até 30-60 cm de altura e é usado em todo o mundo em diferentes doenças (MOHAMMADI; HEIDARPOUR; BORJI, 2018).

Pesquisas comprovaram que essa planta possui atividade inseticida (SHAMSI et al., 2018), esquistossomicida (ALY et al., 2017), anti-helmíntica (MOHAMMADI; HEIDARPOUR; BORJI, 2018), antibacteriana (LAWAL et al., 2016), antifúngica (MENDOZA-JUACHE et al., 2017), imunoestimulante (CHANDRASHEKARA; VENKATESH, 2016), atividade antioxidante (CHENG; HUANG, 2018) e pode ser utilizada como agente preventivo contra infecção monogênica na aquicultura (MILITZ et al., 2013).

2.5.13 *Citrus limon* (L.) Osbeck

O *Citrus limon*, pertencente à família Rutaceae, é uma fonte potencial de vitamina C, e o óleo essencial é usado em várias preparações para tratamento da pele (OTANG; AFOLAYAN, 2016). Os efeitos antibacterianos, antioxidantes e anticancerígenos encontrados nas plantas cítricas são devidos ao seu alto conteúdo de compostos fenólicos, particularmente o limoneno, um dos principais compostos de seu óleo essencial (BABA et al., 2016).

As folhas desta planta possuem atividade antifúngica (AMMAD et al., 2018), imunoestimulante em tilápia (*Oreochromis mossambicus*) (BABA et al., 2016), propriedades antidiarreicas (ADENIYI et al., 2017), antibacteriana (OTANG; AFOLAYAN, 2016) e antioxidante (FANCELLO et al., 2016; SMERIGLIO et al., 2019).

2.5.14 *Ocimum basilicum* L.

O *Ocimum basilicum*, conhecido popularmente como manjeriço ou manjeriço doce, originalmente encontrado na Ásia tropical e subtropical (BALDIM et al, 2018). Esta é uma planta medicinal tradicionalmente importante que pertence à família Lamiaceae cultivada em todo o mundo em várias regiões (SUNDARARAJAN et al., 2018).

Pesquisas demonstraram que o manjeriço possui atividade antifúngica, fitotóxica, hemaglutinante (AHMAD et al., 2016), antibacteriana (BALDIM et al, 2018), antioxidante e larvívica (DRIS et al., 2017), antidiabética (MALAPERMAL et al., 2017), anti-inflamatória (RODRIGUES et al., 2016; 2017), antileishmanial (KHAN et al., 2015), vasorelaxante (AMRANI et al., 2009) e pode promover o crescimento e melhorias nas variáveis hematológicas de *Oreochromis niloticus* (SOUZA et al., 2019).

2.5.15 *Salvia officinalis* L.

Salvia officinalis, também conhecida como salvia, é uma planta aromática da família Lamiaceae nativa do Oriente Médio e Mediterrâneo e suas partes aéreas têm uma longa história de uso na culinária e medicina tradicional (GHORBANI; ESMAEILIZADEH, 2017).

Esta planta possui relevante atividade antioxidante (EL EUCH et al., 2019), anti-inflamatórias (LI et al., 2019), antinociceptivas (GHORBANI; ESMAEILIZADEH, 2017), atividade gastroprotetora (MAYER et al., 2009), atividade antileishmanial (NIKMEHR et al., 2014), antifúngica (SOOKTO et al., 2013), anticâncer (RUSSO et al., 2013) e antibacteriana (ADRAR; OUKIL; BEDJOU, 2016).

2.5.16 *Thymus vulgaris* L.

O tomilho, *Thymus vulgaris*, é uma erva nativa do mediterrâneo que possui significativa importância culinária e medicinal, devido a características

como atividade antifúngica (KOHYAMA et al., 2015), potencial antioxidante (BANERJEE et al., 2019), ação antibacteriana (EGUCHI et al., 2016; REYES-JURADO et al., 2019), atividade anti-inflamatória (HABASHY et al., 2018), calmante (KOMAKI et al., 2016), anti-helmíntica (FERREIRA et al., 2016) e anti-tumoral (NIKOLIĆ et al., 2014).

2.5.17 *Spondias mombin* Jacq.

Spondias mombin L. é uma planta pertencente à família Anacardiaceae e nativa do Brasil, conhecida popularmente como cajá (CABRAL et al., 2016). Todas as partes da árvore são medicinalmente importantes, utilizadas como diurético, febrífugo, antidiarreico, no tratamento de hemorróidas e usado para gonorréia e leucorréia (AYOKA et al., 2006).

Estudos tem demonstrado forte ação antibacteriana contra bactérias gram-negativas como *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi* e *Enterobacter aerogens*; e bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (AROMOLARAN; BADEJO, 2014). As folhas e casca dessa planta também possuem potencial benefício terapêutico na hepatotoxicidade induzida por xenobióticos (NWIDU et al., 2018), além de produzir efeitos ansiolíticos e antidepressivos (SAMPAIO et al., 2018).

2.5.18 *Myracrodruon urundeuva* Allemão

A espécie *Myracrodruon urundeuva* Allemão, também conhecida como aroeira-do-sertão, pertencente à família Anacardiaceae, é uma árvore nativa que ocorre naturalmente no bioma Caatinga do semi-árido do nordeste brasileiro (MATOS et al., 2019). É amplamente utilizada na medicina popular (MONTEIRO et al., 2006), e possui comprovada ação antibacteriana (PIRES et al., 2018), antifúngica (SÁ et al., 2009a), antiviral (CECÍLIO et al., 2016), anti-leishmania (CARVALHO et al., 2017) gastroprotetora e anti-inflamatória (GALVÃO et al., 2018).

A casca desta árvore é usada para o tratamento de dores e infecções no sistema genito-urinário, pele, tecidos subcutâneos e sistema digestivo (SÁ et al., 2009b). Essa planta também possui grande importância econômica devido à utilização de sua madeira para construções, mas está em risco de extinção (SÁ et al., 2009c).

2.5.19 *Punica granatum* L.

A romã, *Punica granatum* L. (Lythraceae), é uma planta utilizada no tratamento de várias doenças, como agente antiparasitário, no tratamento de aftas, diarreia e úlceras (PAGLIARULO et al., 2016). As diferentes partes dessa planta são conhecidas como reservatórios naturais de compostos bioativos (BEKIR et al., 2013).

Propriedades antibacterianas já foram verificadas nos frutos, suco, folhas, casca e raiz (GULUBE; PATEL, 2016; ELBATANONY et al, 2019) e propriedades antivirais nas folhas (ANGAMUTHU et al., 2019).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, M. et al. Growth, physiological, antioxidants, and immune response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), to dietary clove basil, *Ocimum gratissimum*, leaf extract and its susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 78, p. 346-354, 2018.
- ADENIYI, O. S. et al. Antidiarrheal activity of hexane extract of *Citrus limon* peel in an experimental animal model. **Journal of integrative medicine**, v. 15, n. 2, p. 158-164, 2017.
- ADRAR, N.; OUKIL, N.; BEDJOU, F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 112-119, 2016.
- AHMAD, K. et al. Antifungal, phytotoxic and hemagglutination activity of methanolic extracts of *Ocimum basilicum*. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 36, n. 6, p. 794-798, 2016.
- AJAYI, A. M. et al. *Ocimum gratissimum* L. leaf flavonoid-rich fraction suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages and peritonitis in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 204, p. 169-178, 2017.
- ALY, I. et al. Efficacy of soluble glycoprotein fraction from *Allium sativum* purified by size exclusion chromatography on murine *Schistosomiasis mansoni*. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 243-248, 2017.
- AMMAD, F. et al. The potency of lemon (*Citrus limon* L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood. **Comptes rendus biologiques**, v. 341, n. 2, p. 97-101, 2018.
- AMRANI, S. et al. Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 157-162, 2009.
- ANDREAZZA, N. L. et al. Characterisation of the membrane transport of pilocarpine in cell suspension cultures of *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of plant physiology**, v. 175, p. 37-47, 2015.
- ANGAMUTHU, Divyadarshini et al. Antiviral study on *Punica granatum* L., *Momordica charantia* L., *Andrographis paniculata* Nees, and *Melia azedarach* L., to Human Herpes Virus-3. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 28, p. 98-108, 2019.
- ARAI, M. A. et al. Hedgehog inhibitors from *Artocarpus communis* and *Hyptis suaveolens*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 15, p. 4150-4154, 2015.

- AROMOLARAN, O.; BADEJO, O. K. Efficacy of fresh leaf extracts of *Spondias mombin* against some clinical bacterial isolates from typhoid patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 6, p. 442-446, 2014.
- AYOKA, A. O. et al. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L.(Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 166-175, 2006.
- AZAMBUJA, C. R. et al. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, n. 1-2, p. 156-161, 2011.
- BABA, E. et al. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture**, v. 465, p. 13-18, 2016.
- BALDIM, J. L. et al. The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. **Industrial crops and products**, v. 112, p. 821-829, 2018.
- BANDEIRA JR, G. et al. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial crops and products**, v. 97, p. 484-491, 2017.
- BANERJEE, P. et al. Polysaccharides from *Thymus vulgaris* leaf: Structural features, antioxidant activity and interaction with bovine serum albumin. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 580-587, 2019.
- BASSOLÉ, I. H. N. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1070-1074, 2011.
- BEGUM, A.; SAMA, V.; DODLE, J. P.. Study of antinociceptive effects on acute pain treated by bioactive fractions of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 5, p. 397-401, 2016.
- BEKIR, J. et al. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and chemical toxicology**, v. 55, p. 470-475, 2013.
- BHAGAVATHY, S.; MAHENDIRAN, C.; KANCHANA, R. Identification of glucosyl transferase inhibitors from *Psidium guajava* against *Streptococcus mutans* in dental caries. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 9, n. 2, p. 124-137, 2019.
- BOIJINK, L. C. et al. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 457, p. 24-28, 2016.

BRUM, A. et al. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 468, p. 235-243, 2017.

BUNPA, S.; SERMWITTAYAWONG, N.; VUDDHAKUL, V. Extracellular enzymes produced by *Vibrio alginolyticus* isolated from environments and diseased aquatic animals. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 12-17, 2016.

CABRAL, B. et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 304-311, 2016.

CALDEIRA, C. F. et al. Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. **Perspectives in ecology and conservation**, v. 15, n. 3, p. 161-171, 2017.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary parasitology**, v. 154, n. 1-2, p. 167-170, 2008.

CARVALHO, C. E. S. et al. Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental parasitology**, v. 175, p. 59-67, 2017.

CASTRO, K. N. de C. et al. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. **Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.

CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010.

CAVALCANTI, B. C. et al. Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 11, p. 4051-4061, 2012.

CECÍLIO, A. B. et al. Antiviral activity of *Myracrodruon urundeuva* against rotavirus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 197-202, 2016.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 116-126, 2004.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.

CHAKRABORTY, S.; NAIR, G. B.; SHINODA, Sumio. Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. **Reviews on environmental health**, v. 12, n. 2, p. 63-80, 1997.

CHANDRASHEKARA, P. M.; VENKATESH, Y. P. Immunostimulatory properties of fructans derived from raw garlic (*Allium sativum* L.). **Bioactive carbohydrates and dietary fibre**, v. 8, n. 2, p. 65-70, 2016.

CHANG, P. S.; CHEN, H. C.; WANG, Y. C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 233-242, 1998.

CHELLAPPANDIAN, M. et al. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. **Environment international**, v. 113, p. 214-230, 2018.

CHEN, Y. Y. et al. Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract produces protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to ammonia stress. **Aquaculture**, v. 370, p. 26-31, 2012.

CHEN, Y. Y. et al. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received fucoidan exhibit a defense against *Vibrio alginolyticus* and WSSV despite their recovery of immune parameters to background levels. **Fish & shellfish immunology**, v. 59, p. 414-426, 2016a.

CHENG, W. et al. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2005.

CHENG, H.; HUANG, G. Extraction, characterisation and antioxidant activity of *Allium sativum* polysaccharide. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 415-419, 2018.

CHIMNOI, N. et al. Characterization of essential oil from *Ocimum gratissimum* leaves: Antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 290-300, 2018.

CHUKWUOCHA, U. M.; FERNÁNDEZ-RIVERA, O.; LEGORRETA-HERRERA, M. Exploring the antimalarial potential of whole *Cymbopogon citratus* plant therapy. **Journal of ethnopharmacology**, v. 193, p. 517-523, 2016.

CHUMPOL, S. et al. Optimization of culture conditions for production of antivibrio compounds from probiotic purple nonsulfur bacteria against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* spp. **Aquaculture**, v. 505, p. 72-83, 2019.

CHUNG, D.; CHO, T. J.; RHEE, M. S. Citrus fruit extracts with carvacrol and thymol eliminated 7-log acid-adapted *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* typhimurium, and *Listeria monocytogenes*: A potential of effective natural antibacterial agents. **Food research international**, v. 107, p. 578-588, 2018.

COSTA, C. A. R. A. et al. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2268-2272, 2011.

COSTA, R. S. et al. *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **International immunopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 126-134, 2012.

COSTA, G. et al. Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 738-745, 2016.

CRUZ, T. P. et al. Atividade fungicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* jowit (Citronela) contra *Fusarium solani*. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, 2015.

CUNHA, M. A. **Legislação de fármacos utilizados na aquicultura**. In: BALDISSEROTO, B. Farmacologia aplicada à aquicultura, UFSM, Santa Maria (2017), pp. 19-40.

CUNHA, G. H. et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vascular pharmacology**, v. 58, n. 5-6, p. 337-345, 2013.

DAMBOLENA, J. S. et al. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 410-414, 2010.

DRIS, D. et al. Chemical composition and activity of an *Ocimum basilicum* essential oil on *Culex pipiens* larvae: Toxicological, biometrical and biochemical aspects. **South African journal of botany**, v. 113, p. 362-369, 2017.

EGUCHI, Y. et al. Identification of terpenoids volatilized from *Thymus vulgaris* L. by heat treatment and their *in vitro* antimicrobial activity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 94, p. 83-89, 2016.

EL EUCH, S. K. et al. *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 253-260, 2019.

ELBATANONY, M. M. et al. Assessment of the antimicrobial activity of the lipoidal and pigment extracts of *Punica granatum* L. leaves. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 1, p. 89-94, 2019.

ELMAHDI, S.; DA SILVA, L. V.; PARVEEN, S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. **Food microbiology**, v. 57, p. 128-134, 2016.

ELSHOPAKEY, G. E. et al. Efficacy of dietary fermented vegetable product on immune response, up-regulation of immune-related genes and protection of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) against *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 497, p. 431-439, 2018.

ELUMALAI, D. et al. Evaluation of phytosynthesised silver nanoparticles from leaf extracts of *Leucas aspera* and *Hyptis suaveolens* and their larvicidal activity against malaria, dengue and filariasis vectors. **Parasite epidemiology and control**, v. 2, n. 4, p. 15-26, 2017.

ESQUER-MIRANDA, E. et al. Effects of methanolic macroalgae extracts from *Caulerpa sertularioides* and *Ulva lactuca* on *Litopenaeus vannamei* survival in the presence of *Vibrio* bacteria. **Fish & shellfish immunology**, v. 51, p. 346-350, 2016.

FANCELLO, F. et al. Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of *Citrus limon* var. pompia leaf essential oil. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 579-585, 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization. **The State of World Fisheries Fisheries and Aquaculture - 2018**, Meeting the Sustainable Development Goals. Rome, 2018.

FARIAS, E. M. F. G. et al. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 3, p. 63-67, 2012.

FÉLIX, D. M. et al. Survival of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed on diets supplemented with *Dunaliella* sp. is improved after challenges by *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 148, p. 118-123, 2017.

FERNANDES, M. R. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39-44, 2014.

FERREIRA, L. E. et al. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary parasitology**, v. 228, p. 70-76, 2016.

FERRERES, F. et al. Comparing the phenolic profile of *Pilocarpus pennatifolius* Lem. by HPLC–DAD–ESI/MSn with respect to authentication and enzyme inhibition potential. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 391-401, 2015.

FRANCISCO, V. et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 126-134, 2013.

FUNARI, C. S. et al. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia species* (Verbenaceae) from Brazil. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2086-2094, 2012.

GALVÃO, W. R. A. et al. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão-A conservationist proposal for the species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189, 2018.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B. J.; PRAKASH, H. S. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl₄ and H₂O₂. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 5, n. 11, p. 868-874, 2012.

GHORBANI, A.; ESMAEILIZADEH, M.. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 7, n. 4, p. 433-440, 2017.

GOBI, N. et al. *Oreochromis mossambicus* diet supplementation with *Psidium guajava* leaf extracts enhance growth, immune, antioxidant response and resistance to *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 58, p. 572-583, 2016.

GOLTZ, C. et al. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) extracts. **Industrial crops and products**, v. 115, p. 227-234, 2018.

GOMES, G. A. et al. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 137, p. 41-45, 2014.

GOMES, A. F. et al. Simultaneous determination of iridoids, phenylpropanoids and flavonoids in *Lippia alba* extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Microchemical Journal**, v. 138, p. 494-500, 2018.

GOMIDE, M. et al. Identification of dysregulated microRNA expression and their potential role in the antiproliferative effect of the essential oils from four different *Lippia* species against the CT26. WT colon tumor cell line. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 627-633, 2016.

GULUBE, Z.; PATEL, M. Effect of *Punica granatum* on the virulence factors of cariogenic bacteria *Streptococcus mutans*. **Microbial pathogenesis**, v. 98, p. 45-49, 2016.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.

HABASHY, N. H. et al. Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek *Thymus vulgaris* extracts and their possible synergism with Egyptian *Chlorella vulgaris*. **Journal of functional foods**, v. 40, p. 317-328, 2018.

HAI, H. N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 446, p. 88-96, 2015.

HE, W. et al. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 70, p. 164-173, 2017.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

HNATYSZYN, O. et al. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. **Phytomedicine**, v. 11, n. 4, p. 366-369, 2004.

HSIEH, T. J. et al. Effects of rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 5, p. 581-588, 2008.

HSIEH, S. L. et al. Effects of the water extract of *Gynura bicolor* (Roxb. & Willd.) DC on physiological and immune responses to *Vibrio alginolyticus* infection in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 1, p. 18-25, 2013.

HZOUNDA, J. B. F. et al. Spectral and chemometric analyses reveal antioxidant properties of essential oils from four Cameroonian *Ocimum*. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 101-108, 2016.

ISHWARYA, R. et al. Sargassum wightii-synthesized ZnO nanoparticles—from antibacterial and insecticidal activity to immunostimulatory effects on the green tiger shrimp *Penaeus semisulcatus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 318-330, 2018.

JAMUNA, S. et al. Potential antioxidant and cytoprotective effects of essential oil extracted from *Cymbopogon citratus* on OxLDL and H₂O₂ LDL induced Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 2, p. 60-69, 2017.

JANDA, J. M.; NEWTON, A. E.; BOPP, C. A. Vibriosis. **Clinics in laboratory medicine**, v. 35, n. 2, p. 273-288, 2015.

JESUS, N. Z. T. de et al. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlceras e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 130-139, 2009.

JESUS, N. Z. T. et al. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 982-988, 2013.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 213-236, 2006.

JORAY, M. B.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3-4, p. 258-261, 2013.

JUNIOR, G. B. et al. *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* essential oils are anxiolytic without inducing aversiveness in fish. **Aquaculture**, v. 482, p. 49-56, 2018.

KADARIAN, C. et al. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. **Pharmacological Research**, v. 45, n. 1, p. 57-61, 2002.

KAKARAPARTHI, P. S. et al. Variation in the essential oil content and composition of Citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) in relation to time of harvest and weather conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 240-248, 2014.

KERDUDO, A. et al. Chemical Composition, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Flowers Essential Oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm. from Martinique Island. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, n. 4, p. e1600344, 2016.

KHAN, I. et al. Evaluation of antileishmanial, antibacterial and brine shrimp cytotoxic potential of crude methanolic extract of Herb *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 35, n. 3, p. 316-322, 2015.

KIM, S.-Y. et al. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* leaves against oxidative stresses. **International journal of biological macromolecules**, v. 91, p. 804-811, 2016.

KIM, K. I. I. et al. Detection of *Vibrio* and ten *Vibrio* species in cage-cultured fish by multiplex polymerase chain reaction using house-keeping genes. **Aquaculture**, v. 506, p. 417-423, 2019.

- KOHIYAMA, C. Y. et al. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1006-1010, 2015.
- KOMAKI, A. et al. Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 6, n. 3, p. 257-261, 2016.
- KONG, J. R. et al. LvCdc42 is a potential negative regulator of Lvp53 in *Litopenaeus vannamei* exposed to *Vibrio alginolyticus* stress. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 82, p. 113-117, 2018.
- KONGCHUM, P. et al. Effect of Green Tea Extract on *Vibrio Parahaemolyticus* Inhibition in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Postlarvae. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 11, p. 117-124, 2016.
- KURADE, N. P. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Lantana camara*, *Ageratum houstonianum* and *Eupatorium adenophorum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 5, p. 539-544, 2010.
- LALUMERA, G. M. et al. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. **Chemosphere**, v. 54, n. 5, p. 661-668, 2004.
- LAWAL, B. et al. Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 4, p. 296-301, 2016.
- LEE, S. Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & shellfish immunology**, v. 12, n. 5, p. 421-437, 2002.
- LEE, C. T. et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 34, p. 10798-10803, 2015.
- LEITE, B. L. S. et al. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 10, p. 1164-1169, 2010.
- LI, L. et al. Anti-inflammatory norabietane diterpenoids from the leaves of *Salvia officinalis* L. **Journal of functional foods**, v. 54, p. 154-163, 2019.
- LI, C.; WENG, S.; HE, J. WSSV–host interaction: Host response and immune evasion. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 558-571, 2019.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. **Journal of invertebrate pathology**, v. 106, n. 1, p. 110-130, 2011.

- LIU, X. L. et al. The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 2, p. 495-500, 2011.
- LIU, X.; STEELE, J. C.; MENG, X.-Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: a review. **Environmental Pollution**, v. 223, p. 161-169, 2017.
- LOBO, P. L. D. et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8-9, p. 1043-1047, 2014.
- MADEIRA, S. V. F. et al. Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 1-4, 2002.
- MALAPERMAL, V. et al. Enhancing antidiabetic and antimicrobial performance of *Ocimum basilicum*, and *Ocimum sanctum* (L.) using silver nanoparticles. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 6, p. 1294-1305, 2017.
- MALAR, T. R. J. J. et al. Bio-efficacy of the leaves extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit against the fish pathogens. **International Journal of Life science & Pharma Research**, v. 2, n. 1, 2012.
- MARTINS, A. F. M. et al. *Plesiomonas shigelloides*: A notable carrier of acquired antimicrobial resistance in small aquaculture farms. **Aquaculture**, v. 500, p. 514-520, 2019.
- MATIAS, E. F. F. et al. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 45-53, 2016.
- MATOS, A. A. et al. An extract from *Myracrodruon urundeuva* inhibits matrix mineralization in human osteoblasts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 237, p. 192-201, 2019.
- MAYER, B. et al. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. **Fitoterapia**, v. 80, n. 7, p. 421-426, 2009.
- MCCOOK-RUSSELL, K. P. et al. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1069-1073, 2012.
- MEDEIROS, M. das G. F. et al. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology international**, v. 60, n. 3, p. 237-241, 2011.

MEDINA-FÉLIX, D. et al. Evaluation of the productive and physiological responses of *Litopenaeus vannamei* infected with WSSV and fed diets enriched with *Dunaliella* sp. **Journal of invertebrate pathology**, v. 117, p. 9-12, 2014.

MELO, M. S. et al. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 4, p. 411-416, 2010.

MELO, L. A. et al. Effects of the use of *Alpinia's zerumbet* essential oil in patients with fibromyalgia. **The Journal of Pain**, v. 16, n. 4, p. S111, 2015.

MENDOZA-JUACHE, A. et al. The essential oil of *Allium sativum* as an alternative agent against *Candida* isolated from dental prostheses. **Journal of Infection and Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, n. 3, p. 158-164, 2017.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6615-6623, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 1, p. 89-96, 2011.

MILANI, L. P. G. et al. Extract from byproduct *Psidium guajava* standardized in ellagic acid: additivation of the in vitro photoprotective efficacy of a cosmetic formulation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 6, p. 692-696, 2018.

MILITZ, T. A. et al. Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in aquaculture. **Aquaculture**, v. 408, p. 95-99, 2013.

MISHRA, S. B. et al. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 9, p. 689-693, 2011.

MOHAMMADI, K. H. H.; HEIDARPOUR, M.; BORJI, H. In vivo therapeutic efficacy of the *Allium sativum* ME in experimentally *Echinococcus granulosus* infected mice. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 60, p. 23-27, 2018.

MONDAL, K. C. et al. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) poit. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 4, p. 568, 2007.

MONTEIRO, J. M. et al. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 338-344, 2006.

- MONTEIRO, M. V. B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.
- MONTERO-ROCHA, A. et al. Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 91, n. 3, p. 188-194, 2006.
- MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 1140-1152, 2016.
- MOTAMEDI-SEDEH, F. et al. Protection of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus by electron-irradiated inactivated vaccine and prebiotic immunogen. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 130, p. 421-425, 2017.
- MUÑOZ, M. et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 89-107, 2000.
- NAIK, M. I. et al. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 7, p. 535-538, 2010.
- NICOLAU, L. A. D. et al. Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 188-195, 2017.
- NIKMEHR, B. et al. In vitro anti-leishmanial activity of methanolic extracts of *Calendula officinalis* flowers, *Datura stramonium* seeds, and *Salvia officinalis* leaves. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 6, p. 423-427, 2014.
- NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, 2014.
- NUNES, M. R. et al. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 192, p. 37-43, 2018.
- NWIDU, L. et al. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Spondias mombin* leaf and stem extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 262-271, 2018.
- OFFIAH, V. N.; CHIKWENDU, U. A. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 327-330, 1999.

OKON, U. A.; UMOREN, I. U. Comparison of antioxidant activity of insulin, *Ocimum gratissimum* L., and *Vernonia amygdalina* L. in type 1 diabetic rat model. **Journal of integrative medicine**, v. 15, n. 4, p. 302-309, 2017.

OLIVEIRA, D. M. C. et al. *Cordia verbenacea* and secretion of mast cells in different animal species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 463-468, 2011.

OLIVEIRA, M. L. M. et al. Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham. essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process. **Journal of ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 283-289, 2014.

OLIVEIRA, A. P. et al. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Industrial crops and products**, v. 107, p. 198-205, 2017.

OTANG, W. M.; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial and antioxidant efficacy of *Citrus limon* L. peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District, Eastern Cape, South Africa. **South African journal of botany**, v. 102, p. 46-49, 2016.

PAGLIARULO, C. et al. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food chemistry**, v. 190, p. 824-831, 2016.

PALANIKUMAR, P. et al. Effect of *Argemone mexicana* active principles on inhibiting viral multiplication and stimulating immune system in Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. **Fish & shellfish immunology**, v. 75, p. 243-252, 2018.

PAN, S.; JIANG, L.; WU, S. Stimulating effects of polysaccharide from *Angelica sinensis* on the nonspecific immunity of white shrimps (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & shellfish immunology**, v. 74, p. 170-174, 2018.

PARISOTTO, E. B. et al. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 101-107, 2012.

PARODI, T. V. et al. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 462-468, 2012.

PARTOVI, R. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Cymbopogon citratus* Essential Oil Alone and in Combination with *Origanum majorana* and

Caryophyllus aromaticus Essential Oils against Some Foodborne Bacteria. **Int J Enteric Pathog**, v. 7, n. 2, p. 60-67, 2019.

PASCUAL, M. E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Il Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 501-504, 2001.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323-333, 2007.

PEIXOTO, M. G. et al. Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 31-36, 2015.

PEREIRA, L. X. et al. *Achyrocline alata* potentiates repair of skin full thickness excision in mice. **Journal of tissue viability**, v. 26, n. 4, p. 289-299, 2017.

PESSOA, L. M. et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 59-63, 2002.

PILOTTO, M. R. et al. Potential immunomodulatory and protective effects of the *Arthrospira*-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish & shellfish immunology**, 2019.

PILARSKI, F.; GARCIA, F.; SUTILI, F. **Antibacterianos utilizados na aquicultura**. In: BALDISSEROTO, B. Farmacologia aplicada à aquicultura, UFSM, Santa Maria (2017), pp. 41-83.

PINHO, F. V. S. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6-7, p. 482-486, 2005.

PINTO, N. V. et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1, 8-cineole in rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1151-1155, 2009.

PIRES, J. G. et al. Hydroalcoholic extracts of *Myracrodruon urundeuva* All. and *Qualea grandiflora* Mart. leaves on *Streptococcus mutans* biofilm and tooth demineralization. **Archives of oral biology**, v. 91, p. 17-22, 2018.

POURMOZAFFAR, S.; HAJIMORADLOO, A.; MIANDARE, H. K. Dietary effect of apple cider vinegar and propionic acid on immune related transcriptional responses and growth performance in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 60, p. 65-71, 2017.

PRABU, D. L. et al. Effect of dietary *Syzygium cumini* leaf powder on growth and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) and defense against virulent strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 489, p. 9-20, 2018.

- QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 619-624, 2008.
- RAJA, R. A. et al. Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 67, p. 368-381, 2017.
- RAO, Y. K. et al. Purification of kavalactones from *Alpinia zerumbet* and their protective actions against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 118, n. 6, p. 679-688, 2014.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P.. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. **Fitoterapia**, v. 78, n. 6, p. 434-436, 2007.
- REBOUÇAS, R. H. et al. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environmental research**, v. 111, n. 1, p. 21-24, 2011.
- REVERTER, M. et al. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50-61, 2014.
- REYES-JURADO, F. et al. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 90-95, 2019.
- RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.
- ROCHA, R. S.; DE SOUSA, O. V.; VIEIRA, F. R. H. S. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 105, n. 1, p. 337-340, 2016.
- ROCHA, J. A. et al. Anthelmintic, antibacterial and cytotoxicity activity of imidazole alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* leaves. **Phytotherapy research**, v. 31, n. 4, p. 624-630, 2017.
- RODRIGUES, K.A. da F. et al. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 10, p. 1293-1297, 2013.
- RODRIGUES, L. B. et al. Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the *Ocimum basilicum* essential oil and its main compound estragole: *In vivo* mouse models. **Chemico-biological interactions**, v. 257, p. 14-25, 2016.

- RODRIGUES, L. B. et al. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 836-846, 2017.
- ROLDÃO, E. F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC.(Boraginaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 94-98, 2008.
- RUBIO-CASTRO, A. et al. Survival and immune-related gene expression in *Litopenaeus vannamei* co-infected with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 464, p. 692-698, 2016.
- RUNGRASSAMEE, W. et al. Mannooligosaccharides from copra meal improves survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after exposure to *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 434, p. 403-410, 2014.
- RUSSO, A. et al. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 42-47, 2013.
- SÁ, R. A. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, 2009a.
- SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009b.
- SÁ, R. A. et al. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 470-477, 2009c.
- SABINI, M. C. et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 463-470, 2013.
- SABINI, M. C. et al. Potent inhibition of Western Equine Encephalitis virus by a fraction rich in flavonoids and phenolic acids obtained from *Achyrocline satureioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 571-578, 2016.
- SAGRADAS, J. et al. Gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* infusion on acute ethanol-induced gastric lesions in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 134-138, 2015.
- SALGUEIRO, A. C. F. et al. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 6-14, 2016.

- SAMPAIO, S. T. I. et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of ethnopharmacology**, v. 224, p. 563-578, 2018.
- SANTOS, T. C. et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 333-336, 2007.
- SANTOS, A. A. et al. Sub-lethal effects of essential oil of *Lippia sidoides* on drywood termite *Cryptotermes brevis* (Blattodea: Termitoidea). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 145, p. 436-441, 2017.
- SANTOS, L.; RAMOS, F. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 16-30, 2016.
- SANTOS, L.; RAMOS, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International journal of antimicrobial agents**, v. 52, n. 2, p. 135-143, 2018.
- SAULNIER, D. et al. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 133-144, 2000.
- SAXENA, S. K. et al. Simultaneous determination of multi-residue and multi-class antibiotics in aquaculture shrimps by UPLC-MS/MS. **Food chemistry**, v. 260, p. 336-343, 2018.
- SCIARRONE, D. et al. Quali-quantitative characterization of the volatile constituents in *Cordia verbenacea* DC essential oil exploiting advanced chromatographic approaches and nuclear magnetic resonance analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1524, p. 246-253, 2017.
- SELVIN, J.; LIPTON, A. P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 57, n. 1-2, p. 147-150, 2003.
- SENA, A. C. et al. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374-379, 2016.
- SERTIÉ, J. A. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 338-344, 2005.
- SHAMSI, T. N. et al. Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor. **Acta Ecologica Sinica**, v. 38, n. 5, p. 325-328, 2018.

SHAW, H.-M.; WU, J.-L.; WANG, M.-S.. Antihypertensive effects of *Ocimum gratissimum* extract: Angiotensin-converting enzyme inhibitor in vitro and in vivo investigation. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 68-73, 2017.

SHI, C. et al. *Vibrio alginolyticus* infection induces coupled changes of bacterial community and metabolic phenotype in the gut of swimming crab. **Aquaculture**, v. 499, p. 251-259, 2019.

SILVA, C. T. S. et al. Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. **Acta histochemica**, v. 118, n. 4, p. 347-352, 2016.

SILVA, L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350, p. 91-97, 2012.

SILVEIRA, S. M. da et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 3, p. 462-470, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., Compositae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281-293, 1988.

SKIRYCZ, A. et al. Medicinal bioprospecting of the Amazon rainforest: a modern Eldorado?. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 781-790, 2016.

SMERIGLIO, A. et al. Antioxidant and cytoprotective activities of an ancient Mediterranean citrus (*Citrus lumia* Risso) albedo extract: Microscopic observations and polyphenol characterization. **Food chemistry**, v. 279, p. 347-355, 2019.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, n. 1, p. 71-90, 2003.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, v. 452, p. 107-114, 2016.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M.. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Embrapa Amapá-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.

SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. *Psidium guajava* bioactive product chemical analysis and heavy metal toxicity reduction. **Chemosphere**, v. 216, p. 785-793, 2019.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current opinion in immunology**, v. 10, n. 1, p. 23-28, 1998.

SOLIMAN, F. M. et al. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 54, n. 2, p. 219-225, 2016.

SOOKTO, T. et al. *In vitro* effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 5, p. 376-380, 2013.

SOUZA, P. O. et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, p. 23-33, 2018.

SOUZA, E. M. et al. Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. **Aquaculture**, v. 504, p. 7-12, 2019.

SRINIVASAN, P.; RAMASAMY, P. Morphological characterization and biocontrol effects of *Vibrio vulnificus* phages against Vibriosis in the shrimp aquaculture environment. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 472-480, 2017.

STALIN, N.; SRINIVASAN, P. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. **Veterinary microbiology**, v. 207, p. 83-96, 2017.

SU, Y. C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food microbiology**, v. 24, n. 6, p. 549-558, 2007.

SUBRAMANIAN, D. et al. Dietary effect of *Rubus coreanus* ethanolic extract on immune gene expression in white leg shrimp, *Penaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 3, p. 808-814, 2013.

SUN, X. et al. Differential expression of microRNAs of *Litopenaeus vannamei* in response to different virulence WSSV infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 58, p. 18-23, 2016.

SUNDARARAJAN, B. et al. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). **Microbial pathogenesis**, v. 125, p. 475-485, 2018.

TAO, L; HU, H. S.; SHEN, X. C. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from Fructus *Alpinia zerumbet* (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings in vitro. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 387-393, 2013.

TASSANAKAJON, A. et al. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 80, p. 81-93, 2018.

TAYAG, C. M. et al. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 28, n. 5-6, p. 764-773, 2010.

TEPAAMORNDECH, S. et al. Effects of *Bacillus aryabhattai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 4-13, 2019.

THIRUGNANASAMBANDAM, R. et al. Genomic insights of *Vibrio harveyi* RT-6 strain, from infected —Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using Illumina platform. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 130, p. 35-44, 2019.

THOMFORD, N. E. et al. Bush mint (*Hyptis suaveolens*) and spreading hogweed (*Boerhavia diffusa*) medicinal plant extracts differentially affect activities of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 enzymes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 211, p. 58-69, 2018.

TREJO-FLORES, J. V. et al. Protective effect of *Aloe vera* in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 465, p. 60-64, 2016.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology international**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.

UPADHYAY, A. et al. Significant longevity-extending effects of *Alpinia zerumbet* leaf extract on the life span of *Caenorhabditis elegans*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 2, p. 217-223, 2013.

VENUPRASAD, M. P. et al. Phytochemical analysis of *Ocimum gratissimum* by LC-ESI-MS/MS and its antioxidant and anxiolytic effects. **South African journal of botany**, v. 92, p. 151-158, 2014.

VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 508-512, 2012.

VERAS, H. N. H. et al. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790-S2795, 2017.

VIANA, G. S. B. et al. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 3, p. 323-327, 2000.

WANG, Y. C. et al. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 221-231, 1998.

WANG, Q. et al. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 170, n. 3-4, p. 179-194, 1999.

WANGMAN, P. et al. PirA & B toxins discovered in archived shrimp pathogenic *Vibrio campbellii* isolated long before EMS/AHPND outbreaks. **Aquaculture**, v. 497, p. 494-502, 2018.

WELI, A. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf. **Journal of King Saud University-Science**, 2018.

WEN, C. et al. Evaluating the potential of marine *Bacteriovorax* sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae. **Veterinary microbiology**, v. 173, n. 1-2, p. 84-91, 2014.

WIJESUNDARA, N. M.; RUPASINGHE, H.P. V. Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 118-127, 2018.

WU, C. C. et al. Dietary administration of *Gynura bicolor* (Roxb. Willd.) DC water extract enhances immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 1, p. 25-33, 2015.

WU, Y. S. et al. Effects of traditional medical herbs —minor bupleurum decoction on the non-specific immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & shellfish immunology**, v. 64, p. 218-225, 2017.

WU, C. C. et al. α -Phellandrene enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & shellfish immunology**, v. 84, p. 1108-1114, 2019.

YANG, Q. et al. Effects of different levels of *Yucca schidigera* extract on the growth and nonspecific immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and on culture water quality. **Aquaculture**, v. 439, p. 39-44, 2015.

YANG, F. et al. A cuticle protein from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* involved in WSSV infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 81, p. 303-311, 2018.

YEH, M. S. et al. A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. **Fish & shellfish immunology**, v. 26, n. 1, p. 49-55, 2009a.

- YEH, R. Y. et al. Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 27, n. 1, p. 26-32, 2009b.
- YEH, S. T. et al. The protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* that had been immersed in the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* and subjected to combined stresses of *Vibrio alginolyticus* injection and temperature change. **Fish & shellfish immunology**, v. 29, n. 2, p. 271-278, 2010a.
- YOUSSEF, H.; EL-MAHMOUDY, A. M. Evaluation of the Antimicrobial Potential of *Punica granatum* Leaves Hydro-methanolic Extract against Selected Pathogens. **American Journal of Current Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 23-33, 2019.
- YUDIATI, E. et al. Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 54, p. 46-53, 2016.
- ZHAI, Q.; LI, J. Effectiveness of traditional Chinese herbal medicine, San-Huang-San, in combination with enrofloxacin to treat AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 87, p. 360-370, 2019.
- ZHAI, Q. et al. Evaluation of combination effects of Astragalus polysaccharides and florfenicol against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 374-383, 2019.
- ZHANG, Y. B.; LI, Y.; SUN, X. L. Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China. **Marine pollution bulletin**, v. 62, n. 11, p. 2299-2307, 2011.
- ZHU, F.; WANG, Z.; SUN, B. Z. Differential expression of microRNAs in shrimp *Marsupenaeus japonicus* in response to *Vibrio alginolyticus* infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p. 76-79, 2016.
- ZHU, F.; SUN, B.; WANG, Z. The crab Relish plays an important role in white spot syndrome virus and *Vibrio alginolyticus* infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 87, p. 297-306, 2019.

Produtos naturais com potencial uso na carcinicultura e seus efeitos na imunoestimulação de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a prospecção de um imunoestimulante natural derivado de plantas visando melhorar a resistência de *L. vannamei* contra infecção do vírus da síndrome da mancha branca

3.2 Objetivos específicos

- Investigar óleos essenciais com potencial de aplicação na carcinicultura, com base na avaliação da composição química e atividade antibacteriana contra *V. parahaemolyticus*.
- Pesquisar o potencial de aplicação na carcinicultura de extratos etanólicos de plantas, com base na avaliação da composição química e atividade antibacteriana contra *V. parahaemolyticus*.
- Avaliar a atividade antioxidante de óleos essenciais e extratos etanólicos de espécies vegetais.
- Determinar a toxicidade aguda de óleos essenciais e extratos etanólicos em náuplios de *Artemia salina*.
- Pesquisar sobre o efeito da suplementação dietética de extrato etanólico de *M. urundeuva* e *P. granatum* na imunomodulação e resistência de *L. vannamei* contra infecção causada pelo vírus da mancha branca.

CAPÍTULO I

**Óleos essenciais com potencial de aplicação na carcinicultura:
composição química e atividade antibacteriana contra *Vibrio
parahaemolyticus***

RESUMO

Agentes patogênicos se tornaram grandes obstáculos à produção e comercialização do camarão *Litopenaeus vannamei*. Devido aos problemas da resistência microbiana aos antibióticos, buscaram-se novas alternativas utilizando-se compostos naturais. Portanto, este estudo objetivou avaliar a composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial (OE) das espécies: *Achyrocline satureioides*, *Alpinia zerumbet*, *Cymbopogon citratus*, *C. winterianus*, *Lippia alba*, *L. organoides*, *Mesosphaerum suaveolens*, *Ocimum gratissimum*, *O. basilicum*, *Pilocarpus microphyllus*, *Psidium guajava*, *Varronia curassavica*, *Allium sativum*, *Citrus limon*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*. Os OEs dos espécimes coletados foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e a caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa com espectrometria de massas. A atividade antimicrobiana dos OEs foi avaliada contra as cepas *V. parahaemolyticus* (IOC 18950) e *V. parahaemolyticus* isolada a partir da hemolinfa de camarões *L. vannamei* de uma fazenda de criação do Nordeste do Brasil. Após identificação das bactérias no sistema OMNILOG GEN III, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), e nas amostras com atividade antibacteriana positiva foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM). Os antibióticos oxitetraciclina, enrofloxacino e ampicilina foram utilizados como controle positivo no ensaio. Foram identificados os seguintes compostos majoritários: 1,8-cineol, 2-tridecanona, acetato de trans-pinocarveila, cânfora, citronelal, citronelol, E-cariofileno, eugenol, geranial, germacreno D, geraniol, limoneno, linalol, mirceno, neral, p-cimeno, sabineno, sulfeto de dialila, dissulfeto de dialila, trissulfeto de dialila, terpinen-4-ol, timol, α -pineno, β -pineno e γ -terpineno. Os valores de CIM e CBM variaram de 0,156 a 10 mg.mL⁻¹ para as estirpes bacterianas utilizadas. O OE de *C. citratus* mostrou a atividade antibacteriana mais forte contra a cepa de *V. parahaemolyticus* (IOC 18950) (CIM e CBM = 0,156 mg.mL⁻¹). Contra a cepa de *V. parahaemolyticus* isolado da hemolinfa de camarão os OE de *C. citratus*, *C. winterianus* e *L. alba* tiveram o menor valor de CBM (0,313 mg.mL⁻¹). Os OE de *L. alba*, *C. winterianus*, *L. organoides*, *S. officinalis*, *A. zerumbet*, *O. basilicum* e *V. curassavica* tiveram atividade bactericida superior à ampicilina contra as duas cepas de *V. parahaemolyticus*. Sugerem-se os compostos majoritários como potenciais agentes microbicidas contra *V. parahaemolyticus*. Desta forma, os óleos essenciais estudados têm potenciais aplicações no controle da bactéria *V. parahaemolyticus*.

Palavras-chave: antibiótico; antimicrobiano natural; gastroenterite; patologia; resistência bacteriana

ABSTRACT

Pathogens have become major obstacles to the production and trade of shrimp *Litopenaeus vannamei*. Due to the problems of microbial resistance to antibiotics, new alternatives are sought using natural compounds. The objective of this study was to evaluate the chemical composition and antibacterial activity of the essential oil (EO) of the species: *Achyrocline satureioides*, *Alpinia zerumbet*, *Cymbopogon citratus*, *C. winterianus*, *Lippia alba*, *L. organoides*, *Mesosphaerum suaveolens*, *Ocimum gratissimum*, *O. basilicum*, *Pilocarpus microphyllus*, *Psidium guajava*, *Varronia curassavica*, *Allium sativum*, *Citrus limon*, *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris*. The EO of the specimens collected was obtained by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus and the chemical characterization of the EOs was performed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer. The antimicrobial activity of EOs was evaluated against the *V. parahaemolyticus* (IOC 18950) and *V. parahaemolyticus* isolated from the *L. vannamei* shrimp hemolymph from a shrimp farm in the northeast of Brazil. After identification of the bacteria in the OMNILOG GEN III system, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined, and in the samples with positive antibacterial activity the minimum bactericidal concentration (MBC) was determined. The oxytetracycline, enrofloxacin and ampicillin antibiotics were used as a positive control in the assay. The following major compounds have been identified: 1,8-cineole, 2-tridecanone, trans-pinocaroneyl acetate, camphor, citronellal, citronellol, E-caryophyllene, eugenol, geranial, germacrene D, geraniol, limonene, linalool, myrene, p-cymene, sabinene, diallel sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, terpinen-4-ol, thymol, α -pinene, β -pinene and γ -terpinene. MIC and MBC ranged from 0.156 to 10 mg.mL⁻¹ for the bacterial strains used. The EO of *C. citratus* showed the strongest antibacterial activity against the *V. parahaemolyticus* strain (IOC 18950) (MIC and MBC = 0.156 mg.mL⁻¹). The EO of *C. citratus*, *C. winterianus* and *L. alba* had the lowest MBC value (0.313 mg.mL⁻¹) against *V. parahaemolyticus* strain isolated from shrimp hemolymph. The EO of *L. alba*, *C. winterianus*, *L. organoides*, *S. officinalis*, *A. zerumbet*, *O. basilicum* and *V. curassavica* had bactericidal activity superior to ampicillin against the 2 strains of *V. parahaemolyticus*. Major compounds are suggested as potential microbicidal agents against the bacterial strains tested. In this way, the essential oils studied may have potential applications in the control of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: natural antimicrobial; biosecurity; gastroenteritis; pathology; bacterial resistance

1 INTRODUÇÃO

O camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) é uma das espécies marinhas comerciais mais importantes do mundo, e durante as últimas duas décadas múltiplos agentes patogênicos se tornaram grandes obstáculos à sua produção e comercialização (RAJA et al., 2017). As bactérias do gênero *Vibrio* são frequentemente mencionadas nesse contexto, devido ao seu grande impacto na produtividade da carcinicultura (WANGMAN et al., 2018).

O *Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria gram-negativa halofílica, mesófila, em forma de bastonete e autóctone do ambiente aquático marinho (KUMAR et al., 2014). Essa bactéria é responsável por causar a síndrome da mortalidade precoce, também conhecida como síndrome da necrose hepatopancreática aguda em camarões (SNHPA) (KHIMMAKTHONG; SUKKARUN, 2017).

Os camarões afetados pela SNHPA podem apresentar severa atrofia do hepatopâncreas e descamação maciça de células epiteliais, o que provoca necrose, anorexia, crescimento lento e mortalidade em grande escala nas unidades de produção, e conseqüentemente grandes perdas econômicas (RAJA et al., 2017; QIN et al., 2018). Além disso, também há grande preocupação com a saúde humana, uma vez que *V. parahaemolyticus* é um dos principais causadores de gastroenterite bacteriana transmitida por frutos do mar em todo o mundo (ORTIZ-JIMÉNEZ, 2018; SILVA et al., 2018).

Uma vez que muitos patógenos impactam negativamente o crescimento da produção aquícola, novas práticas de manejo, visando a biossegurança, devem ser adotadas (LI et al., 2015; RAJA et al., 2017). Devido aos problemas da resistência microbiana, são buscadas alternativas aos antibióticos, principalmente compostos naturais, ervas e fitoquímicos, os quais atualmente têm gerado grande demanda de pesquisas (BEGUM; SAMA; DODLE, 2016; PRABU et al., 2018).

Na aquicultura, o uso de produtos naturais vem ganhando destaque, por serem fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitos e microrganismos, além de não serem prejudiciais ao meio ambiente (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013). Como por exemplo, o óleo essencial (OE) de *L.*

origanoides possui forte atividade antimicrobiana, pode agir como modificador de antibióticos (VERAS et al., 2017). E o OE de *Ocimum gratissimum* já foi descrito com atividade anestésica e anti-helmíntica em tambaquis (*Colossoma macropomum*) (BOIJINK et al., 2016).

Os OEs são geralmente considerados como aditivos seguros (GRAS - *Generally Recognized as Safe*) (FDA, 2018). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil considera que os produtos aromatizantes e as substâncias que se utilizem delas em sua elaboração devem responder, pelo menos, aos requisitos de identidade e pureza e às demais especificações reconhecendo-se como fonte bibliográfica base documentos como EFSA (European Food Safety Authority), FAO/WHO (Expert Committee on Food Additives) e USA Code of Federal Regulation (CFR/ Food and Drug Administration – FDA) (ANVISA, 2007).

Relatos anteriores têm mostrado importante atividade antibacteriana de compostos naturais extraídos de plantas encontradas no Brasil, como: *Achyrocline satureioides* (JORAY; PALACIOS; CARPINELLA, 2013), *Alpinia zerumbet* (KERDUDO et al., 2016), *Cymbopogon citratus* (PARTOVI et al., 2019), *C. winterianus* (SILVEIRA et al., 2012), *Lippia alba* (NUNES et al., 2018), *L. origanoides* (LOBO et al., 2014), *Mesosphaerum suaveolens* (MALAR et al., 2012), *Ocimum gratissimum* (CHIMNOI et al., 2018), *O. basilicum* (BALDIM et al., 2018), *Pilocarpus microphyllus* (ROCHA et al., 2017), *Psidium guajava* (SOLIMAN et al., 2016), *Varronia curassavica* (MATIAS et al., 2016), *Allium sativum* (LAWAL et al., 2016), *Citrus limon* (CHUNG; CHO; RHEE, 2018), *Salvia officinalis* (WIJESUNDARA; RUPASINGHE, 2018) e *Thymus vulgaris* (REYES-JURADO et al., 2019). Porém, não há muitos registros quanto à ação antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus*, um patógeno responsável por provocar grandes perdas na carcinicultura.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química e atividade antibacteriana contra *V. parahaemolyticus* dos óleos essenciais das espécies vegetais supracitadas, encontradas no Brasil, com perspectivas de aplicação na carcinicultura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo estão descritas na Tabela 1. A coleta das partes aéreas das plantas foi realizada no mês de março de 2018, no período da manhã, em Parnaíba, Piauí, Brasil (03° 05' 12,51S 041° 47' 01,21W). O material botânico coletado foi herborizado de acordo com os procedimentos descritos por Fidalgo e Bononi (1984).

A identificação do material se deu por meio de bibliografias especializadas e uso de chaves específicas (GOMES; NEGRELLE, 2003; LOEUILLE et al., 2013; SALIMENA; MÚLGURA, 2015), bem como, através de comparações com materiais já identificados e depositados no Herbário HDelta. O sistema adotado para classificação dos taxa foi o Angiosperm Phylogeny Group (APG IV, 2016). A grafia correta dos nomes científicos foi realizada por meio do banco de dados Missouri Botanical Garden (GARDEN, 2016). O material botânico encontra-se depositado no acervo da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr.

Tabela 1 - Identificação e número de registro do herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr) das espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo.

Nome comum	Nome científico	Registro HDelta
Macela	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	5464
Colônia	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm.	5475
Citronela	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	5472
Capim limão	<i>C. winterianus</i> Jowitt & Bor.	5471
Erva cidreira	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson	5466
Alecrim pimenta	<i>L. organoides</i> Kunth	5469
Bamburral	<i>Mesosphaerum suaveolens</i> (L.) Kuntze	5463
Alfavaca cravo	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	5467
Jaborandi	<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardlew.	0258
Goiabeira	<i>Psidium guajava</i> L.	5473
Erva baleeira	<i>Varronia curassavica</i> Jacq.	5468

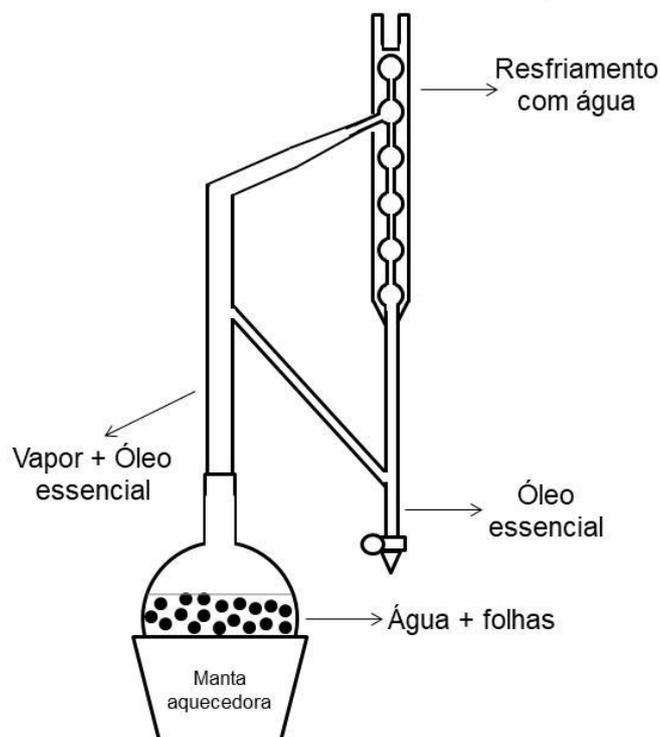
Também foram utilizados óleos essenciais adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich) das seguintes espécies: *Allium sativum* L., *Citrus limon* (L.)

Osbeck, *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L. e *Thymus vulgaris* L. Este estudo foi aprovado pelo Conselho Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) (acesso nº A00721D).

2.2 Obtenção do óleo essencial

O procedimento de obtenção dos óleos essenciais foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Animal (LACA) da Embrapa Meio-Norte, Parnaíba, Piauí, Brasil. O material botânico (folhas) coletado foi seco à sombra em temperatura ambiente. Posteriormente 600 g da amostra desidratada foram imersas em água destilada (3500 ml), e o óleo essencial (OE) obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo de 5000 mL (Figura 1). O tempo de extração foi estabelecido em 240 minutos, a partir do ponto de ebulição da água. Após a extração o OE foi armazenado em frasco âmbar a 4°C (adaptado de YEN e LIN, 2017).

Figura 1 - Esquema de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger.



Fonte: próprio autor.

2.3 Caracterização química dos óleos essenciais

A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da EMBRAPA Agroindústria Tropical em Fortaleza, Ceará Brasil. A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em um instrumento Agilent modelo GC-7890B/MSD-5977A (quadropolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , Agilent), gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹ (8,8 psi) e velocidade linear constante de 36,8 cm.s⁻¹, temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector 150°C, temperatura da linha de transferência 280°C. A programação do forno cromatográfico teve temperatura inicial de 70°C, com rampa de aquecimento de 4°C.min⁻¹ até 180°C e acréscimo de 10°C.min⁻¹ até 250°C ao término da corrida (34,5 min).

Os índices de retenção dos componentes voláteis foram calculados por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C7-C30 em uma coluna HP-5MS (SEIFI et al., 2014; HU et al., 2019). Os analitos foram identificados com base na comparação com os dados obtidos a partir de espectrometria de massa disponível no Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, 2012), e de dados da literatura (ADAMS, 2017). A concentração relativa de cada composto no óleo foi quantificada com base na área do pico, que foi integrada no programa de análise.

2.4 Atividade antibacteriana

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Animal (LACA) da Embrapa Meio-Norte, Parnaíba, Piauí, Brasil. A atividade antimicrobiana do OE de cada espécie vegetal foi avaliada contra uma cepa padrão de *Vibrio parahaemolyticus* do Instituto Oswaldo Cruz (IOC 18950) e um cepa de *V. parahaemolyticus* isolada a partir da hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* de uma fazenda de criação do Nordeste do Brasil. Para o isolamento da cepa proveniente da hemolinfa dos camarões, amostras foram

retiradas por meio de punção no seio ventral com uma seringa de 1 mL carregada com solução anticoagulante fria (2-8°C): Solução Isotônica para Camarões (SIC-EDTA) (VARGAS-ALBORES; GUZMÁN; OCHOA, 1993). Em seguida, a hemolinfa foi inoculada em placas com ágar de tiosulfato-citrato-bílis-sacarose (TCBS) a 37°C durante 24h. As colônias verdes ou azul-esverdeadas foram presuntivamente selecionadas como colônias de *V. parahaemolyticus* e transferidas para placas de ágar tríptico de soja (TSA) contendo 2% de NaCl (ALIPOUR; ISSAZADEH; SOLEIMANI, 2014).

As bactérias tiveram sua identificação confirmada utilizando-se o sistema OMNILOG GEN III de acordo com as instruções do fabricante. As colônias de *V. parahaemolyticus* utilizadas foram inoculadas em BUG™ Agar (Biolog) com 2% de NaCl e incubadas a 34°C por 24 h. Após a incubação, uma única colônia foi coletada e inoculada em 10 ml de fluido de inoculação (IF-B) (Biolog Inc., EUA). O IF-B inoculado foi dispensado em uma microplaca de 96 poços (GEN BI MicroPlate) usando um pipetador de repetição multicanal. A microplaca foi incubada a 33°C por 24 horas. A leitura foi realizada automaticamente pelo sistema computadorizado MicroStation™ (Biolog Inc., EUA) do software (OmniLog® Data Collection).

A atividade antibacteriana do OE foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo nutritivo, adaptado de CLSI (2012). As cepas bacterianas foram mantidas em ágar Mueller Hinton (Merck) e incubadas a 34±2°C. Uma solução estoque de OE de cada espécie foi preparada com 50% de etanol P.A. e 1% Tween 80 (U.S.P.) em água destilada. O caldo Mueller Hinton suplementado com 2% de NaCl foi previamente inoculado com uma suspensão bacteriana padrão ajustada para 0.5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Em seguida, 180 µL do caldo nutriente com bactérias foram pipetados em todos os poços da primeira linha da microplaca de 96 poços, e nos demais poços 100 µL. Posteriormente, foram transferidas alíquotas de 20 µL da solução estoque (100 mg.mL⁻¹) de OE nos poços da primeira linha da placa de microtitulação (totalizando 200 µL). A partir do poço —All até o poço —GII, de cada coluna da microplaca, as soluções foram diluídas em série (diluições por 2) com caldo nutriente, pipetando-se 100 µL de um poço para outro. Ao final foi descartado 100 µL de solução de cada poço da última linha da placa de microtitulação.

Os antibióticos oxitetraciclina, enrofloxacino e ampicilina foram utilizados como controle positivo no ensaio. Em cada microplaca foram mantidos controles de esterilidade (caldo nutritivo sem adição de inóculo bacteriano) e controles de crescimento (caldo nutritivo com inóculo bacteriano com e sem Tween 1%). Todas as placas de microdiluição foram incubadas a $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas em condições de aerobiose. Todos os testes de avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados em triplicata.

O crescimento microbiano foi detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 μL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 3% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do óleo essencial que inibiu totalmente o crescimento microbiano.

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) amostras de 10 μL foram obtidas dos poços nos quais se verificou inibição do crescimento bacteriano e subcultivadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (2% NaCl) e incubadas a $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24h. A CBM foi definida como a menor concentração de cada óleo essencial que inviabilizou totalmente o crescimento bacteriano sobre o ágar sem a presença do agente antimicrobiano.

Com base no desempenho individual da atividade antibacteriana dos OEs, foi realizado um novo ensaio para verificar o possível sinergismo da atividade antibacteriana (CIM e CBM) dos quatro melhores óleos (*A. zerumbet*, *C. citratus*, *C. winterianus* e *L. alba*). Esses OEs foram testados aos pares em misturas com diferentes proporções (25%-75%, 50%-50% e 75%-25%).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos óleos essenciais

Os monoterpenos hidrocarbonetos representaram o principal grupo de compostos das amostras de OEs em *A. zerumbet* (65,76%), *C. limon* (98,67%), *M. suaveolens* (77,42%), *P. guajava* (44,24%), *S. officinalis* (56,39%) e *V. curassavica* (48,47%). Os monoterpenos oxigenados foram mais

representativos em *A. satureioides* (67,98%), *C. citratus* (84,41%), *C. winterianus* (87,27%), *L. alba* (56,65%), *L. organoides* (52,95%), *O. basilicum* (84,5%) e *T. vulgaris* (59%). Em *P. microphyllus* a maioria dos compostos foram sesquiterpenos hidrocarbonetos (58,38%). Os fenilpropanoides foram predominantes em *O. gratissimum* (47,49%), e compostos sulfonados em *A. sativum* (92,47%) (Tabela 2, Apêndice A).

O perfil químico do OE de *A. satureioides* revelou 20 compostos, sendo o acetato de trans-pinocarveila (56,25%) e β -pineno (25,51%) os principais. Em *A. sativum* foram descritos 8 compostos, com maior representatividade de sulfeto, dissulfeto e trissulfeto de dialila (32,17%, 25,43% e 15,79%, respectivamente). Dentre os 27 compostos identificados em *A. zerumbet*, terpinen-4-ol (27,73%), 1,8-cineol (19,24%) e γ -terpineno (14,94%) estavam em maior quantidade. No OE de *C. limon* o limoneno (74,18%) e β -pineno (12,22%) foram predominantes dentre os 12 compostos identificados. No OE de *C. citratus* foram encontrados 13 compostos, sendo o geranial (42,81%), neral (33,37%) e mirceno (13,31%) os mais abundantes. Em *C. winterianus* os compostos citronelal (38,86%), geraniol (33,11%) e citronelol (12%) foram os mais representativos dentre os 20 compostos identificados.

O óleo de *L. alba* apresentou geranial (23,01%), limoneno (17,01%) e neral (15,46%) como compostos majoritários, dentre os 23 compostos identificados. Do total de 23 compostos presentes no OE de *L. organoides*, timol (47,19%), p-cimeno (16,04%) e E-cariofileno (11,26%) predominaram. A análise química do óleo de *M. suaveolens* evidenciou 28 compostos, sendo o principal constituinte o 1,8-cineole (44,54%) seguido de sabineno (13,45%). O perfil químico do óleo de *O. basilicum* revelou 14 compostos, sendo o linalol (74,17%) o principal, enquanto o óleo de *O. gratissimum* continha 12 compostos, com o maior conteúdo de eugenol (47,49%) e 1,8-cineole (36,79%).

Tabela 2 – Concentração de compostos majoritários (%) identificados na análise de composição química do óleo essencial de *Achyrocline satureioides* (A), *Allium sativum* (B), *Alpinia zerumbet* (C), *Citrus limon* (D), *Cymbopogon citratus* (E), *C. winterianus* (F), *Lippia alba* (G), *L. origanoides* (H), *Mesosphaerum suaveolens* (I), *Ocimum basilicum* (J), *O. gratissimum* (K), *Pilocarpus microphyllus* (L), *Psidium guajava* (M), *Salvia officinalis* (N), *Thymus vulgaris* (O), *Varronia curassavica* (P).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Sulfeto de dialila		32,2														
α-Pineno																44,83
Sabineno									13,45							
β-Pineno	25,51		12,2													
Mirceno					13,31											
p-Cimeno								16,04							26,41	
Limoneno			74,2				17,0						27,0			
1,8-Cineol			19,24						44,54		36,79		14,8	28,5		
γ-Terpineno			14,94													
Dissulfeto de dialila		25,4														
Linalool										74,17						
Cânfora														31,2		
Citronelal						38,86										
Terpinen-4-ol			27,73													
Citronnelal						12,0										
Timol																
Neral					33,37		15,5									
Geraniol						33,11										
Geranial					42,81		23,0									
Timol								47,19								51,5
Trans-pinocarveíla	56,25															
Trissulfeto de dialila		15,8														
Eugenol											47,49					
E-Cariofileno								11,26				17,62	16,8			12,27
Germacreno D												18,21				
2-Tridecanona												27,29				

Em *P. microphyllus* foi descrito um perfil químico com 23 componentes, dentre os quais predominaram 2-tridecanona (27,29%), germacreno D (18,21%) e E-cariofileno (17,62%). Na descrição do perfil químico de *P. guajava* observou-se em maior quantidade limoneno (27,03%), E-cariofileno (16,78%) e 1,8-cineole (14,76%) em um total de 34 compostos. No óleo de *S. officinalis* 19 compostos foram constatados, e o principal constituinte foi cânfora (31,23%) seguido por 1,8-cineole (28,53%). No óleo de *T. vulgaris*, entre 17 constituintes identificados, o timol foi o mais abundante (51,5%), seguido por p-cimeno (26,41%). Os compostos α -pineno (44,83%) e E-cariofileno (12,27%) foram os majoritários em relação ao total de 41 encontrados em *V. curassavica*.

Com relação ao perfil químico dos OEs das plantas utilizadas nesta pesquisa, estudos anteriores relatam os mesmos compostos majoritários identificados em *A. saturoioides* (VIEIRA et al., 2006), *A. zerumbet* (LAHLOU et al., 2003), *C. limon* (DĂNILĂ et al., 2018), *C. citratus* (BAYALA et al., 2018), *C. winterianus* (KAKARAPARTHI et al., 2014), *L. alba* (BATISTA et al., 2018), *L. origanoides* (DAMASCENO et al., 2018), *M. suaveolens* (sinônimo de *Hyptis suaveolens*) (OLIVEIRA et al., 2005), *O. basilicum* (PIRAS et al., 2018), *O. gratissimum* (CHIMNOI et al., 2018), *P. microphyllus* (TAVEIRA et al., 2003), *P. guajava* (WELI et al., 2018), *S. officinalis* (EL EUCH et al., 2019), *T. vulgaris* (MOHAMMADI et al., 2019), e *V. curassavica* (sinônimo de *Cordia verbenacea*) (SCIARRONE et al., 2017).

Outras pesquisas também descrevem diferentes compostos majoritários na constituição dos OEs utilizados neste estudo: em *A. zerumbet* (LEAL-CARDOSO et al., 2004), *C. limon* (GUO et al., 2018), *L. alba* (TELES et al., 2012), *L. origanoides* (MENEZES et al., 2018), *M. suaveolens* (SHARMA et al., 2019), *O. basilicum* (PADALIA et al., 2017), *O. gratissimum* (BENELLI et al., 2019), *P. guajava* (KHADHRI et al., 2014), *S. officinalis* (VOSOUGHI et al., 2018) e *A. saturoioides* (LABUCKAS et al., 1999).

Pesquisas anteriores têm demonstrado que as variações na composição química do OE das plantas são comuns, e podem ser amplamente influenciadas por vários fatores, como o habitat (FARHAT; SOTOMAYOR; JORDÁN, 2019), temperatura do dia (KAKARAPARTHI et al., 2014), estágio de crescimento e estação do ano (SCHÖTT et al., 2017), o horário da coleta do material botânico (De VASCONCELOS SILVA et al., 1999), variações

climáticas, altitude, solo e variedades genéticas (SCIARRONE et al., 2017; VAIČIULYTĖ et al., 2017).

3.2 Atividade antibacteriana

Todos os OEs exibiram atividade antibacteriana contra as duas cepas de *V. parahaemolyticus*. Os valores de CIM e CBM variaram de 0,156 a 10 mg.mL⁻¹ para as estirpes bacterianas utilizadas (Tabela 3). O OE de *C. citratus* mostrou a atividade antibacteriana mais forte contra a cepa de *V. parahaemolyticus* (IOC 18950) (MIC e CBM = 0,156 mg.mL⁻¹). Frente à cepa de *V. parahaemolyticus* isolado da hemolinfa de camarão os OE de *C. citratus*, *C. winterianus* e *L. alba* tiveram o melhor valor de CBM (0,313 mg.mL⁻¹).

O OE de *L. alba*, *C. winterianus*, *L. origanoides*, *S. officinalis*, *A. zerumbet*, *O. basilicum* e *V. curassavica* tiveram atividade bactericida superior (CBM < 0,625 mg.mL⁻¹) à ampicilina contra *V. parahaemolyticus* (IOC 18950), porém não foram melhores que os resultados obtidos com enrofloxacino e oxitetraciclina. Contra *V. parahaemolyticus* isolado de hemolinfa de camarão a ampicilina não apresentou atividade bactericida na concentração máxima testada (10 mg.mL⁻¹), e portanto, todos os OE testados apresentaram resultados melhores que a ampicilina, mas não superaram a atividade antibacteriana de enrofloxacino e oxitetraciclina.

Ressalta-se que a cepa isolada a partir da hemolinfa de camarões de fazenda de criação apresentou maior resistência contra os antibióticos ampicilina e oxitetraciclina quando comparada a cepa *V. parahaemolyticus* (IOC 18950). Uma vez que a cepa isolada da hemolinfa de camarões estava em contato direto com o meio ambiente, pressupõe-se que o seu contato com resíduos de antibióticos, bem como com outras bactérias, elevem as chances do aumento da resistência a antibióticos.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais contra *Vibrio parahaemolyticus* (IOC 18950), *V. parahaemolyticus* isolado da hemolinfa de camarão de fazenda de criação.

Espécies	<i>V. parahaemolyticus</i> (IOC 18950)		<i>V. parahaemolyticus</i> isolado de camarão	
	CIM	CBM	CIM	CBM
	Óleo essencial (mg.mL ⁻¹)			
<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	0,625	0,625	1,25	1,25
<i>Allium sativum</i> L.	1,25	1,25	2,5	5,0
<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm.	0,156	0,313	1,25	1,25
<i>Citrus limon</i> (L.)	1,25	2,5	5,0	5,0
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	0,156	0,156	0,313	0,313
<i>C. winterianus</i> Jowitt & Bor.	0,156	0,313	0,313	0,313
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson	0,156	0,313	0,313	0,313
<i>L. organoides</i> Kunth	0,313	0,313	0,313	0,625
<i>Mesosphaerum suaveolens</i> (L.) Kuntze	0,625	0,625	5,0	5,0
<i>Ocimum basilicum</i> L.	0,313	0,313	1,25	1,25
<i>O. gratissimum</i> L.	1,25	1,25	0,625	0,625
<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardlew	10	10	5,0	5,0
<i>Psidium guajava</i> L.	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Salvia officinalis</i> L.	0,313	0,313	0,625	0,625
<i>Thymus vulgaris</i> L.	1,25	1,25	0,313	0,625
<i>Varronia curassavica</i> Jacq	0,156	0,313	10	10
	Antibiótico (µg.mL ⁻¹)			
Antibióticos				
Ampicilina	625	625	10000	-
Enrofloxacino	0,15	0,3	0,15	0,31
Oxitetraciclina	0,00060	0,0012	1,22	2,44

A administração de produtos antibióticos de forma imprudente na produção de camarões é considerada determinante no surgimento de estirpes de *Vibrio* resistentes a antibióticos (REBOUÇAS et al., 2011; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016).

Todas as combinações de OEs exibiram atividade bactericida contra as duas cepas de *V. parahaemolyticus*. Os valores de CIM e CBM variaram de 0,313 a 5 mg.mL⁻¹ para as estirpes bacterianas testadas (Tabela 4). As combinações de OEs A1, A2, A3, B1, B2, C1, C2, C3, D3, E3, F2 e F3 tiveram a melhor atividade bactericida contra a cepa de *V. parahaemolyticus* (IOC 18950) (CBM = 0,313 mg.mL⁻¹). As combinações de OEs B1, D1, D2, F2 e F3 mostraram melhor resultado (CBM = 0,313 mg.mL⁻¹) frente à cepa de *V. parahaemolyticus* isolada de camarão. Nenhuma combinação de OEs superou o resultado obtido contra *V. parahaemolyticus* por *C. citratus*. Desta forma, não se observou sinergismo nas combinações testadas.

Alguns OE utilizados neste estudo já foram descritos anteriormente com atividade antibacteriana contra *V. parahaemolyticus*, como o OE de *Allium sativum* (ROSS et al., 2001), *Ocimum basilicum* (HOSSAIN et al., 2010; SNOUSSI et al., 2016), *Salvia officinalis* (KOGA; HIROTA; TAKUMI, 1999), *Thymus vulgaris* (YANO; SATOMI; OIKAWA, 2006), *O. gratissimum* e *Psidium guajava* (NASCIMENTO et al., 2007).

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais combinados em pares contra *Vibrio parahaemolyticus* (IOC 18950), *V. parahaemolyticus* isolado da hemolinfa de camarão de fazenda de criação. Cada combinação é identificada por uma letra e número.

Espécies	Identificação	Proporção da mistura	<i>V. parahaemolyticus</i> (IOC 18950)		<i>V. parahaemolyticus</i> isolado de camarão		
			CIM	CBM	CIM	CBM	
Mix de óleos essenciais (mg.mL ⁻¹)							
<i>Alpinia zerumbet</i> + <i>Cymbopogon</i> <i>winterianus</i>	A1	25%-75%	0,313	0,313	0,313	0,625	
	A2	50%-50%	0,313	0,313	0,313	0,625	
	A3	75%-25%	0,313	0,313	0,313	0,625	
<i>A. zerumbet</i> + <i>Cymbopogon</i> <i>citratius</i>	B1	25%-75%	0,313	0,313	0,313	0,313	
	B2	50%-50%	0,313	0,313	0,313	0,625	
	B3	75%-25%	0,625	1,25	0,625	0,625	
<i>A. zerumbet</i> + <i>Lippia alba</i>	C1	25%-75%	0,313	0,313	0,625	0,625	
	C2	50%-50%	0,313	0,313	0,625	0,625	
	C3	75%-25%	0,313	0,313	0,625	0,625	
<i>C. winterianus</i> + <i>C. citratius</i>	D1	25%-75%	0,625	0,625	0,313	0,313	
	D2	50%-50%	0,313	0,625	0,313	0,313	
	D3	75%-25%	0,313	0,313	0,313	0,625	
<i>C. winterianus</i> + <i>L. alba</i>	E1	25%-75%	0,313	0,625	0,625	0,625	
	E2	50%-50%	0,625	0,625	0,625	2,5	
	E3	75%-25%	0,313	0,313	1,25	5	
<i>C. citratius</i> + <i>L. alba</i>	F1	25%-75%	0,625	0,625	0,313	0,625	
	F2	50%-50%	0,313	0,313	0,313	0,313	
	F3	75%-25%	0,313	0,313	0,313	0,313	

Os componentes majoritários dos OEs utilizados nesta pesquisa são descritos na literatura científica como potenciais substâncias antibacterianas, como o 1,8-cineol (presente em *A. zerumbet*, *M. suaveolens*, *O. gratissimum*, *P. guajava* e *S. officinalis*) que possui efeito antibacteriano contra cepas de *S. aureus* resistentes à metilicina (MERGHNI et al., 2018), *E. coli*, *P. aeruginosa* (MOGHIMI; ALIAHMADI; RAFATI, 2017), dentre outros (MULYANINGSIH et al., 2010; SOUSA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Esse composto também possui atividade antifúngica contra *Aspergillus carbonarius* (DAMMAK et al., 2019), *A. flavus* (SHUKLA et al., 2012) e *A. parasiticus* (VILELA et al., 2009). Estudos sobre a permeabilidade e fluidez da membrana celular bacteriana revelaram a liberação de constituintes celulares para o meio externo e, portanto, a morte de células bacterianas pela ação de 1,8-cineol (OLIVEIRA et al., 2015; MOGHIMI; ALIAHMADI; RAFATI, 2017).

A 2-tridecanona (presente em *P. microphyllus*) já foi relatada como agente fugistático contra *Lasiodiplodia theobromae* (MOTA et al., 2002) e potencial repelente do inseto *Tuta absoluta* (GILARDÓN et al., 2001). O OE de *Aloysia gratissima*, com alto teor de trans-pinocarveíla (presente em *A. saturoioides*), foi relatado com atividade antibacteriana contra *S. aureus* (FRANCO et al., 2007).

O composto γ -terpineno (presente em *A. zerumbet*) é um hidrocarboneto isomérico classificado como monoterpênico, com relatos de atividade antibacteriana (YOSHITOMI et al., 2016; MILADI et al., 2017) e antifúngica (ESPINOSA-GARCÍA; LANGENHEIM, 1991). Assim como outros terpenos sua ação antimicrobiana está associada a sua capacidade de causar danos nas membranas celulares bacterianas (YOSHITOMI et al., 2016).

OEs ricos em cânfora são relatados como agentes antimicrobianos eficazes contra as bactérias *M. smegmatis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. mutans*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *K. oxytoca*, *A. baumannii* e os fungos *Candida albicans*, *C. kefyr*, *A. niger* e *A. flavus* (BERTELLA et al., 2018; CHATURVEDI et al., 2018). A cânfora (com 95% de pureza) apresenta atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* (BADAWY et al., 2019).

O OE de *C. winterianus*, rico em citronelal, apresenta atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. vulgaris* e *Y. enterocolitica* (SILVEIRA et al., 2012). O

citronelol como composto majoritário do OE de *Pelargonium graveolens* apresenta forte atividade antibacteriana contra *E. coli* (LIN; LEE; CHANG, 2016). Os derivados de citronelal e citronelol, como o α -fenilselena citronelal e α -fenilselena citronelol (VICTORIA et al., 2012), e 3-(p-clorofenil) tio-citronelal (GOLDBECK et al., 2014), assim como o composto puro (SANTOS et al., 2018) apresentam promissora atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. O OE de *C. winterianus* com citronelal e citronelol como principais constituintes apresenta atividade bactericida contra *S. aureus*, *E. coli* (isolada de suínos), *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *C. perfringens* (SCHERER et al., 2009).

O E-cariofileno (presente em *L. origanoides*, *P. microphyllus* e *P. guajava*) possui efeito inibitório sobre o biofilme de *S. mutans*, reduzindo sua virulência por meio da redução da produção de glucano através da diminuição da expressão de Gtfs. (YOO; JWA, 2018) Esse sesquiterpeno também pode suprimir a atividade de deterioração de *P. fluorescens* em alface minimamente processada, por meio da inibição da produção de AIA (ácido indol-3-acético) e da expressão do gene AIA-relacionado TTSS (MYSZKA et al., 2017). A ação antibacteriana desse composto contra *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* é justificada pela redução da expressão de lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas, que consequentemente inibe a ligação de LPS a receptores toll-like interferindo com o complexo de LPS e CD14 ou proteína de ligação a LPS (YOO; JWA, 2019).

A atividade antibacteriana do eugenol (presente em *O. gratissimum*) foi demonstrada contra biofilmes simples e mistos de *S. mutans* resistente a antibióticos, onde foi possível observar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, o rompimento da estrutura da membrana celular e da matriz estrutural (JAFRI; KHAN; AHMAD, 2019). O mesmo resultado foi verificado por Zhang et al. (2017), quando utilizaram eugenol contra *P. gingivalis*, observando-se a lise das células do patógeno. O uso de eugenol contra *S. typhi* reduziu completamente a capacidade de reprodução bacteriana após 1 hora de exposição (DEVI et al., 2010).

A atividade antibacteriana do eugenol é baseada na sua capacidade de permeabilizar a membrana celular e interagir com as proteínas, o que é evidenciado pelo vazamento de K^+ e ATP da célula (DEVI et al., 2010;

HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; JAFRI; KHAN; AHMAD, 2019). Uma vez que a interação do eugenol ocorre principalmente com a membrana citoplasmática das bactérias, sua utilização é capaz de aumentar a atividade bactericida de antibióticos, por meio do aumentando da permeabilidade não específica destes (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009).

O geranial ou citral (presente em *C. citratus* e *L. alba*) é um aldeído monoterpênico que figura como um dos principais componentes do óleo essencial extraído de *C. citratus*, e possui atividade antibacteriana contra *S. aureus* resistente à meticilina (SADDIQ; KHAYYAT, 2010). Outro estudo verificou sua atividade antibacteriana contra biofilmes de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (ESPINA et al., 2017). Esse composto proporcionou elevação da atividade antibacteriana de biofilme à base de kafirin quando adicionado (GITERU et al., 2015).

O citral tem a capacidade de romper e penetrar na estrutura lipídica da parede celular das bactérias, ocasionando desnaturação da proteína e destruição da membrana celular, seguida por vazamento citoplasmático, lise celular e morte (SADDIQ; KHAYYAT, 2010; LU et al., 2018). A atividade antimicrobiana observada nesse composto foi significativamente afetada pela formulação de nanoemulsões, aumentando sua ação bactericida contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (LU et al., 2018). O terpenoide neral é o isômero do citral, diferindo apenas em sua conformação, e quando investigados separadamente verifica-se que induzem diferentes respostas moleculares intracelulares, como capacidade antioxidante, atividade anti-inflamatória e expressão de moléculas inflamatórias (*pro-IL-1 β* , *iNOS*, *COX-2* e *NLRP-3*) de macrófagos estimulados por LPS (LIAO et al., 2015).

O germacreno D, um hidrocarboneto sesquiterpênico, é um constituinte vegetal comumente encontrado entre plantas superiores e inferiores, micróbios e organismos marinhos (PROSSER et al., 2004), sendo considerado um intermediário chave na biossíntese de muitos sesquiterpenos (BÜLOW; KÖNIG, 2000; STELIOPOULOS et al., 2002). Pelo método da difusão em ágar o germacreno D não exibe atividade antimicrobiana contra cepas de *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. roseus*, *M. luteus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *Saccharomyces cerevisiae* (BIAVATTI et al., 2001;

DEUSCHLE et al., 2006; DEUSCHLE et al., 2007). Em outro estudo a atividade antimicrobiana de OE contendo germacreno D como composto majoritário foi moderada apenas contra *C. krusei*, sendo fraca ou inexistente contra outros microorganismos (FRANCESCATO et al., 2007). Nesse estudo esse constituinte foi encontrado apenas no OE de *P. microphyllus* (18,21%), o qual mostrou baixa atividade antibacteriana contra as cepas utilizadas neste estudo.

O geraniol (presente em *C. winterianus*), um monoterpeneo com comprovadas propriedades biológicas, ocorre em um grande número de plantas e é amplamente utilizada como fragrância química em produtos cosméticos e domésticos (CHEN; VILJOEN, 2010). Esse terpeno tem capacidade de inibir o crescimento de cepas de fungos, pelo fato de aumentar a taxa de excreção de potássio de células inteiras e aumentar a fluidez da membrana celular (BARD et al., 1988; KALEMBA; KUNICKA, 2003). Sua capacidade antibacteriana também foi comprovada contra várias bactérias (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002; ARPUTHA; SELVAMANI; LATHA, 2012).

O limoneno (presente em *C. limon*, *L. alba* e *P. guajava*) é um monoterpeneo encontrado na maioria dos óleos essenciais de espécies aromáticas e possui atividade antibacteriana comprovada contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. subtilis* (SU et al., 2018; COSTA et al., 2019). Esse composto pode provocar danos na membrana citoplasmática bacteriana, induzindo o vazamento de constituintes intercelulares (SU et al., 2018).

Utilizando membranas bacterianas artificiais, Hąc-Wydro; Flasiński; Romańczuk (2017) evidenciaram que o limoneno é capaz de incorporar ao sistema lipídico e alterar suas propriedades, contudo, a fluidização induzida pelo OE é determinada pela concentração de limoneno e composição da membrana. Quando encapsulado em lipossomas pode apresentar atividade antimicrobiana mais forte que a forma livre (UMAGILIYAGE et al., 2017).

O monoterpeneo linalol (presente em *O. basilicum*) é ligeiramente volátil, com aroma agradável (BEIER et al., 2014). Essa substância tem efeito anestésico eficaz em juvenis de *Cyprinus carpio* (MIRGHAED; GHELICHPOUR; HOSEINI, 2016; YOUSEF et al., 2018) e *Rhamdia quelen* (BIANCHINI et al., 2019). Esse composto possui atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* (ZHOU et al., 2016), *Campylobacter* spp. (DUARTE et

al., 2016) e *S. Typhimurium* (PRAKASH et al., 2019). É muito utilizado como anti-biofilme contra patógenos que contaminam alimentos, sendo uma das razões pelas quais o linalol é frequentemente utilizado pela indústria alimentícia (PEREIRA et al., 2018).

O mirceno é um monoterpene de cheiro agradável que é encontrado em muitas plantas, incluindo *C. citratus* (BONAMIN et al., 2014). Esse foi o segundo composto mais abundante no OE de *Pistacia khinjuk*, o qual apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *B. cereus*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* (TAGHIZADEH et al., 2018) e isoladamente contra *Helicobacter pylori* (BONAMIN et al., 2014). O mirceno também possui efeito anestésico em juvenis de *Cyprinus carpio* (MIRGHAED; GHELICHPOUR; HOSEINI, 2016).

O para-cimeno (p-cimeno) (presente em *L. organoides*) é um hidrocarboneto aromático com atividade antibacteriana atestada contra estirpes de *S. aureus*, *S. mutans*, *S. constellatus*, *S. feacium*, *S. feacalis* (MILADI et al., 2017) e *B. cereus* (DELGADO et al., 2004). Esse composto aumenta sinergicamente o efeito antibiótico da tetraciclina contra as estirpes orais e de referência, observando-se rompimento e perda da integridade da membrana celular bacteriana (MILADI et al., 2017).

O sabineno (presente em *M. suaveolens*), monoterpene bicíclico natural, possui atividade bactericida contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos, sendo considerado um possível modulador de resistência com potencial para ser explorado pela indústria farmacêutica em formulações combinadas (MATIAS et al., 2016). Esse composto também possui ação antifúngica (ESPINOSA-GARCIA; LANGENHEIM, 1991).

O OE de linhagens da planta *Juniperus communis* que continham como componente majoritário o sabineno foi descrito na literatura com atividade antimicrobiana contra *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Corynebacterium* sp., *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Alternaria* sp., *A. nidulans* e *A. niger* (GLIŠĆ et al., 2007). No OE da espécie vegetal *Zornia diphylla*, contendo sabineno como principal constituinte, também se verificou atividade antibacteriana contra expressivo número de cepas bacterianas (ARUNKUMAR et al., 2014).

O sulfeto, dissulfeto e trissulfeto de dialila são os principais componentes responsáveis pela atividade antibacteriana do óleo essencial de *A. sativum* (CORZO-MARTÍNEZ; CORZO; VILLAMIEL, 2007; SUNG et al., 2014). Publicações científicas relatam atividade antimicrobiana desses compostos contra *S. aureus* resistente a antibiótico e contra fungos (SHEN et al., 1996; TSAO; YIN, 2001).

O monoterpeno terpinen-4-ol (presente em *A. zerumbet*) tem capacidade de desestabilizar a membrana dos fungos *Botrytis cinerea* (HAÇ-WYDRO; BLECHARZ; WYDRO, 2018), *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum* (BRILHANTE et al., 2016). A atividade antibacteriana desse composto é atribuída à sua capacidade de aumentar a permeabilidade e despolarizar a membrana citoplasmática das bactérias (CUNHA et al., 2019). A adição de terpinen-4-ol em solução de eucaliptol, mesmo em baixa concentração, aumenta o efeito fluidificante dos terpenos em modelo de membrana bacteriana (HAÇ-WYDRO; SZYDŁO, 2016).

A Organização Mundial de Saúde apontou que o timol (presente em *L. origanoides*) adicionado em alimentos não gera nenhum dano à saúde dos consumidores (CAI et al., 2019). Esse composto possui atividade antibacteriana relatada contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CAI et al., 2019), *S. sonnei*, *S. flexneri* (BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2004), *S. aureus*, *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* (WATTANASATCHA; RENGPIPAT; WANICHWECHARUNGRUANG, 2012; LI et al., 2018; ALAVI; KARIMI, 2019) dentre outros (JESUS et al., 2015; MILADI et al., 2016; MARCET et al., 2018).

Os mecanismos antibacterianos do timol danificam a integridade da célula e esporos inibindo o processo de crescimento, impedindo a biossíntese de proteínas, aumentando a excreção de ácidos nucléicos e proteínas, causando alterações nas proteínas celulares e danos irreversíveis à morfologia bacteriana (MARCHESE et al., 2016; CAI et al., 2019).

O α e β -pineno (presentes em *A. satureioides*, *C. limon* e *V. curassavica*) são compostos orgânicos da classe dos terpenos, isômeros, e possuem atividade antibiótica de amplo espectro devido a sua capacidade de provocar vazamentos nas membranas citoplasmáticas (SILVA et al., 2012; LOŽIENÉ et al., 2018; RAMAK; TALEI, 2018).

Os mecanismos antibacterianos e antifúngicos dos componentes dos OEs estão relacionados com a capacidade destas substâncias hidrofóbicas de incorporar-se à membrana plasmática (KNOBLOCH et al., 1989; HAÇ-WYDRO; FLASIŃSKI; ROMAŃCZUK, 2017). Fica assim claro que o efeito antimicrobiano dos OEs é determinado pela composição lipídica da membrana celular do patógeno, bem como a estrutura do composto ativo que afeta as interações entre membrana lipídica e OE (HAÇ-WYDRO; FLASIŃSKI; ROMAŃCZUK, 2017).

A maioria das pesquisas considera a ruptura direta de membranas celulares e efeitos citotóxicos pró-oxidantes dependentes da concentração de OE, no entanto, alguns estudos sugerem que os componentes dos OEs podem penetrar no microorganismo e reagir com sítios ativos de enzimas e/ou interferir no metabolismo celular (CHATURVEDI et al., 2018).

Portanto, os possíveis mecanismos de ação antimicrobiana dos OEs incluem a degradação da parede celular, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, dano à membrana citoplasmática, perturbação das proteínas incorporadas na membrana, inibição da respiração, alteração dos processos de transporte de íons e excreção de materiais intracelulares, reduzindo a força motriz do próton, reduzindo o pool de ATP intracelular via diminuição da síntese de ATP (BADAWY et al., 2019).

Como os OEs são misturas complexas e impuras, suas atividades biológicas variam de acordo com sua composição e a quantidade de pequenos compostos não deve ser desprezada (NIKOLIC et al., 2014). Os constituintes majoritários e minoritários presentes nos OEs podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana, tendo em vista que possíveis propriedades sinérgicas ou antagônicas dos compostos presentes devem ser levadas em consideração (CHATURVEDI et al., 2018).

4 CONCLUSÕES

Este estudo mostra importante atividade antibacteriana dos OEs, além de relatar pela primeira vez a ação bactericida do OE de *A. satureioides*, *C. winterianus*, *L. alba*, *L. organoides*, *M. suaveolens*, *P. microphyllus* e *V.*

curassavica contra *V. parahaemolyticus*. A composição química dos OEs utilizados nesse estudo sugere que a atividade antibacteriana pode ser atribuída aos seus principais constituintes (geranial, mirceno, limoneno, neral, timol, p-cimeno, E-cariofileno, linalol, cânfora e 1,8-cineol), os quais são descritos na literatura como potenciais agentes antibacterianos, porém os compostos minoritários também devem ser levados em consideração em futuras pesquisas tendo em vista que sua interação pode resultar em efeitos sinérgicos.

Quando testados em pares, os quatro óleos com melhores resultados individuais não apresentam sinergismo e sua atividade antibacteriana. Os cinco OEs que tiveram melhor desempenho contra as cepas bacterianas de *V. parahaemolyticus* foram *C.citratu*s, *L. alba*, *L. origanoides*, *O. basilicum* e *S. officinalis*, indicando-os como potenciais agentes microbicidas contra as estirpes bacterianas testadas. Desta forma, os óleos essenciais estudados têm potenciais aplicações no controle da bactéria *V. parahaemolyticus*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 4th ed. (Allured Publ., Carol Stream, IL). 2017.

ALAVI, M.; KARIMI, N. Biosynthesis of Ag and Cu NPs by secondary metabolites of usnic acid and thymol with biological macromolecules aggregation and antibacterial activities against multi drug resistant (MDR) bacteria. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 893-901, 2019.

ALIPOUR, M.; ISSAZADEH, K.; SOLEIMANI, J. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea. **Comparative clinical pathology**, v. 23, n. 1, p. 129-133, 2014.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 05, de 15 de janeiro de 2007. Aprova a Resolução

da Diretoria Colegiada que aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. **Diário Oficial da União**, 2007.

ARPUTHA, B., M.; SELVAMANI, P.; LATHA, S. *In-vitro* antimicrobial evaluation of extracts, oil and fractionated geraniol of *Cymbopogon citratus* - an aromatic grass. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 3, n. 1, p. 583-590, 2012.

ARUNKUMAR, R. et al. The essential oil constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers, and anti-inflammatory and antimicrobial activities of the oil. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 4, 2014.

BADAWY, M. E. I. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against some foodborne pathogens through *in vitro* and *in silico* studies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. x, p. xx-xx, 2019.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food microbiology**, v. 21, n. 1, p. 33-42, 2004.

BALDIM, J. L. et al. The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. **Industrial crops and products**, v. 112, p. 821-829, 2018.

BARD, M. et al. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v. 23, n. 6, p. 534-538, 1988.

BATISTA, S. E. et al. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. **Aquaculture**, v. 495, p. 545-549, 2018.

BAYALA, B. et al. *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils have cytotoxic effects on tumor cell cultures. Identification of citral as a new putative anti-proliferative molecule. **Biochimie**, v. 153, p. 162-170, 2018.

BEGUM, A.; SAMA, V.; DODLE, Jaya Prakash. Study of antinociceptive effects on acute pain treated by bioactive fractions of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 5, p. 397-401, 2016.

BEIER, R. C. et al. Evaluation of linalool, a natural antimicrobial and insecticidal essential oil from basil: Effects on poultry. **Poultry science**, v. 93, n. 2, p. 267-272, 2014.

BENELLI, G. et al. Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. **Industrial Crops and Products**, v. 132, p. 377-385, 2019.

- BERTELLA, A. et al. *Artemisia herba-alba* Asso. essential oil antibacterial activity and acute toxicity. **Industrial crops and products**, v. 116, p. 137-143, 2018.
- BIANCHINI, A. E. et al. Pharmacokinetics of S-(+)-linalool in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath: An anesthetic for aquaculture. **Aquaculture**, v. 506, p. 302-307, 2019.
- BLAVATTI, M. W. et al. Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian Rutaceae species. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 121-124, 2001.
- BOIJINK, C. L. et al. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 457, p. 24-28, 2016.
- BONAMIN, F. et al. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-biological interactions**, v. 212, p. 11-19, 2014.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Terpinen-4-ol, tyrosol, and β -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 917-924, 2016.
- BÜLOW, N.; KÖNIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v. 55, n. 2, p. 141-168, 2000.
- CAI, R. et al. Antibacterial activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores. **LWT - Food Science and Technology**, v. 105, p. 377-384, 2019.
- CHATURVEDI, T. et al. Chemical composition, genetic diversity, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of camphor-basil (*Ocimum kilimandscharicum* Guerke). **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 246-258, 2018.
- CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol - a review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, 2010.
- CHIMNOI, N. et al. Characterization of essential oil from *Ocimum gratissimum* leaves: Antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 290-300, 2018.
- CHUNG, D.; CHO, T. J.; RHEE, M. S.. *Citrus* fruit extracts with carvacrol and thymol eliminated 7-log acid-adapted *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes*: A potential of effective natural antibacterial agents. **Food research international**, v. 107, p. 578-588, 2018.

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

CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. **Trends in food science & technology**, v. 18, n. 12, p. 609-625, 2007.

COSTA, M. S. et al. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 128, p. 158-161, 2019.

CUNHA, J. A. et al. The survival and hepatic and muscle glucose and lactate levels of *Rhombia quelen* inoculated with *Aeromonas hydrophila* and treated with terpinen-4-ol, carvacrol or thymol. **Microbial pathogenesis**, v. 127, p. 220-224, 2019.

DAMASCENO, E. T. S. et al. *Lippia origanoides* Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and p-coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 85-94, 2018.

DAMMAK, I. et al. Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Laurus nobilis* essential oils and a major monoterpene constituent 1, 8-cineole against *Aspergillus carbonarius*. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 85-93, 2019.

DĂNILĂ, E. et al. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm efficacy of *C. limon* and *L. angustifolia* EOs and of their mixtures against *Staphylococcus epidermidis* clinical strains. **Industrial crops and products**, v. 122, p. 483-492, 2018.

DE VASCONCELOS SILVA, M. G. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.

DELGADO, B. et al. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 327-334, 2004.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DEUSCHLE, R. A. N. et al. Antimicrobial activity of *Senecio desiderabilis* vellozo (Asteraceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 356, 2006.

- DEUSCHLE, R. A. N. et al. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 220-223, 2007.
- DUARTE, A. et al. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. **Food Control**, v. 61, p. 115-122, 2016.
- EL EUCH, S. K. et al. *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 253-260, 2019.
- ESPINA, L. et al. Potential use of carvacrol and citral to inactivate biofilm cells and eliminate biofouling. **Food Control**, v. 82, p. 256-265, 2017.
- ESPINOSA-GARCÍA, F. J.; LANGENHEIM, J. H. Effects of sabinene and γ -terpinene from coastal redwood leaves acting singly or in mixtures on the growth of some of their fungus endophytes. **Biochemical systematics and ecology**, v. 19, n. 8, p. 643-650, 1991.
- FARHAT, M. B.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. *Salvia verbenaca* L. essential oil: Variation of yield and composition according to collection site and phenophase. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 82, p. 35-43, 2019.
- FDA (2018) - **Food and Drug Administration**. Department Of Health And Human Services. Esssential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates) In.: Substances generally recognized as safe. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=582.20>> Acessado em: 03 setembro de 2019.
- FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. Manual prático de coleta, herborização e preservação. **Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo**, 1984.
- FRANCESCATO, L. N. et al. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 239-245, 2007.
- FRANCO, A. L. P. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc.(Alfazema), *Ocimum gratissimum* L.(Alfavaca-Cravo) e *Curcuma longa* L.(Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.
- FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of food protection**, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, 2002.

GILARDÓN, E. et al. Papel da 2-tridecanona e dos tricomas glandulares tipo VI na resistência do tomateiro a *Tuta absoluta*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 929-933, 2001.

GITERU, S. G. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of citral and quercetin incorporated kafirin-based bioactive films. **Food chemistry**, v. 168, p. 341-347, 2015.

GLIŠĆ, S. B. et al. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 4, 2007.

GOLDBECK, J. C. et al. Bioactivity and morphological changes of bacterial cells after exposure to 3-(p-chlorophenyl) thio citronellal. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 813-819, 2014.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B.. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, 2003.

GUO, J. J. et al. Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 825-839, 2018.

HAÇ-WYDRO, K.; SZYDŁO, K.. The influence of environmentally friendly pesticide – Eucalyptol- alone and in combination with terpinen-4-ol - on model bacterial membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 918-923, 2016.

HAÇ-WYDRO, K.; FLASIŃSKI, M.; ROMAŃCZUK, K. Essential oils as food eco-preservatives: Model system studies on the effect of temperature on limonene antibacterial activity. **Food chemistry**, v. 235, p. 127-135, 2017.

HAÇ-WYDRO, K.; BLECHARZ, A.; WYDRO, P. The influence of eucalyptol/terpinen-4-ol mixtures on monolayers imitating plant pathogen *Botrytis cinerea* membranes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 271, p. 472-480, 2018.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 997-1005, 2009.

HOSSAIN, M. A. et al. Antibacterial properties of essential oils and methanol extracts of sweet basil *Ocimum basilicum* occurring in Bangladesh. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 5, p. 504-511, 2010.

HU, J. et al. Chemical composition and biological activity against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Artemisia brachyloba* essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 29-37, 2019.

JAFRI, H.; KHAN, M. S.; AHMAD, I. *In vitro* efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 54, p. 206-213, 2019.

JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de mycologie medicale**, v. 25, n. 2, p. e89-e93, 2015.

JORAY, M. B.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3-4, p. 258-261, 2013.

KAKARAPARTHI, P. S. et al. Variation in the essential oil content and composition of Citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) in relation to time of harvest and weather conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 240-248, 2014.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KERDUDO, A. et al. Chemical Composition, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Flowers Essential Oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm. from Martinique Island. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, n. 4, p. 16-34, 2017.

KHADHRI, A. et al. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 29-31, 2014.

KHIMMAKTHONG, U.; SUKKARUN, P. The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. **Microbial pathogenesis**, v. 113, p. 107-112, 2017.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, n. 3, p. 119-128, 1989.

KOGA, T.; HIROTA, N.; TAKUMI, K. Bactericidal activities of essential oils of basil and sage against a range of bacteria and the effect of these essential oils on *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiological research**, v. 154, n. 3, p. 267-273, 1999.

KUMAR, B. K. et al. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. **Aquaculture**, v. 433, p. 247-251, 2014.

LABUCKAS, D. O. et al. Essential Oil of *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline alata* and *Achyrocline tomentosa*. **Planta medica**, v. 65, n. 02, p. 184-186, 1999.

LAHLOU, S. et al. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 323-330, 2003.

LAWAL, B. et al. Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 4, p. 296-301, 2016.

LEAL-CARDOSO, J. H. et al. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine**, v. 11, n. 6, p. 549-553, 2004.

LI, B. et al. Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC-MS and HPLC methods. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 329-334, 2015.

LI, J. et al. Zein/gum Arabic nanoparticle-stabilized Pickering emulsion with thymol as an antibacterial delivery system. **Carbohydrate polymers**, v. 200, p. 416-426, 2018.

LIAO, P. C. et al. Anti-inflammatory activity of neral and geranial isolated from fruits of *Litsea cubeba* Lour. **Journal of functional foods**, v. 19, p. 248-258, 2015.

LIN, P. C.; LEE, J. J.; CHANG, I. J. Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. **Journal of food and drug analysis**, v. 24, n. 3, p. 464-470, 2016.

LOBO, P. L. Dantas et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary Streptococcus mutans in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8-9, p. 1043-1047, 2014.

LOEUILLE, B. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Compositae-Gnaphalieae e Inuleae. **Boletim de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 13-25, 2013.

LOŽIENĚ, K. et al. Influence of plant origin natural α -pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi. **Fitoterapia**, v. 127, p. 20-24, 2018.

LU, W. C. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82-89, 2018.

MALAR, T. R.J. J. et al. Bio-efficacy of the leaves extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit against the fish pathogens. **International Journal of Life science & Pharma Research**, v. 2, n. 1, 2012.

MARCET, I. et al. Production and characterisation of biodegradable PLA nanoparticles loaded with thymol to improve its antimicrobial effect. **Journal of Food Engineering**, v. 239, p. 26-32, 2018.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food chemistry**, v. 210, p. 402-414, 2016.

MATIAS, E. F. F. et al. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 45-53, 2016.

MENEZES, P. M. N. et al. Relaxant effect of *Lippia origanoides* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle involves potassium channels and soluble guanylyl cyclase. **Journal of ethnopharmacology**, v. 220, p. 16-25, 2018.

MERGHNI, A. et al. Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1, 8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 74-80, 2018.

MILADI, H. et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 95-100, 2016.

MILADI, H. et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 112, p. 156-163, 2017.

MIRGHAED, A. T.; GHELICHPOUR, M.; HOSEINI, S. M. Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - Comparison with eugenol. **Aquaculture**, v. 464, p. 165-170, 2016.

MOGHIMI, R.; ALIAHMADI, A.; RAFATI, H.. Ultrasonic nanoemulsification of food grade trans-cinnamaldehyde: 1,8-Cineol and investigation of the mechanism of antibacterial activity. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 35, p. 415-421, 2017.

MOHAMMADI, H. et al. Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* under well-watered and water stress conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 561-574, 2019.

MOTA, J. C. O. et al. Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais no controle in vitro de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Venezolana**, v. 15, p. 2-6, 2002.

- MULYANINGSIH, S. et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1061-1066, 2010.
- MYSZKA, K. et al. β -Caryophyllene-rich pepper essential oils suppress spoilage activity of *Pseudomonas fluorescens* KM06 in fresh-cut lettuce. **LWT-Food Science and Technology**, v. 83, p. 118-126, 2017.
- NASCIMENTO, A. R. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais Frente a bactérias isoladas de sururu, *Mytella falcata*. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 40, n. 2, p. 47-54, 2007.
- NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 225-232, 2014.
- NIST, X. ray **Photoelectron Spectroscopy Database NIST Standard Reference Database 20**. 2012.
- NUNES, M. R. et al. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 192, p. 37-43, 2018.
- OLIVEIRA, M. J. et al. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 3, p. 275-285, 2005.
- OLIVEIRA, K. Á. R. et al. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. **Food Control**, v. 47, p. 334-339, 2015.
- ORTIZ-JIMÉNEZ, M. A. Quantitative evaluation of the risk of *Vibrio parahaemolyticus* through consumption of raw oysters (*Crassostrea corteziensis*) in Tepic, Mexico, under the RCP2. 6 and RCP8. 5 climate scenarios at different time horizons. **Food research international**, v. 111, p. 111-119, 2018.
- PADALIA, R. C. et al. Productivity and essential oil quality assessment of promising accessions of *Ocimum basilicum* L. from north India. **Industrial crops and products**, v. 97, p. 79-86, 2017.
- PARTOVI, R. et al. Evaluation of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil alone and in combination with *Origanum majorana* and *Caryophyllus aromaticus* essential oils against some foodborne bacteria. **International Journal of Enteric Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 60-67, 2019.
- PEREIRA, I. et al. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 566-578, 2018.

PIRAS, A. et al. *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils. **Industrial crops and products**, v. 113, p. 89-97, 2018.

PRABU, D. L. et al. Effect of dietary *Syzygium cumini* leaf powder on growth and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) and defense against virulent strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 489, p. 9-20, 2018.

PRAKASH, A. et al. Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella* Typhimurium. **Food Bioscience**, v. 28, p. 57-65, 2019.

PROSSER, I. et al. Enantiospecific (+)-and (-)-germacrene D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, n. 2, p. 136-144, 2004.

QIN, Z. et al. Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged by *Vibrio parahaemolyticus* reveals unique immune-related genes. **Fish & shellfish immunology**, v. 77, p. 164-174, 2018.

RAJA, R. A. et al. Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 67, p. 368-381, 2017.

RAMAK, P.; TALEI, G. R. Chemical composition, cytotoxic effect and antimicrobial activity of *Stachys koelzii* Rech. f. essential oil against periodontal pathogen *Prevotella intermedia*. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 272-278, 2018.

REBOUÇAS, R. H. et al. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environmental research**, v. 111, n. 1, p. 21-24, 2011.

REYES-JURADO, F. et al. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 90-95, 2019.

ROCHA, J. A. et al. Anthelmintic, antibacterial and cytotoxicity activity of imidazole alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* leaves. **Phytotherapy research**, v. 31, n. 4, p. 624-630, 2017.

ROCHA, R. S.; DE SOUSA, O. V.; VIEIRA, F. R. H. S. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 105, n. 1, p. 337-340, 2016.

ROSS, Z. M. et al. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 1, p. 475-480, 2001.

SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 1, p. 89-93, 2010.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E. Notas sobre o gênero *Lippia* (Verbenaceae) no Brasil. **Boletim de Botânica**, v. 33, p. 45-49, 2015.

SANTOS, P. L. et al. Citronellol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological activities-A systematic review. **Food and chemical toxicology**, v. 123, p. 459-469, 2018.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SCHÖTT, G. et al. The chemical composition of the pharmacologically active *Thymus species*, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. **Fitoterapia**, v. 121, p. 118-128, 2017.

SCIARRONE, D. et al. Quali-quantitative characterization of the volatile constituents in *Cordia verbenacea* DC essential oil exploiting advanced chromatographic approaches and nuclear magnetic resonance analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1524, p. 246-253, 2017.

SEIFI, H. et al. Chemometric resolution approaches in characterisation of volatile constituents in *Plantago ovata* seeds using gas chromatography–mass spectrometry: methodology and performance assessment. **Phytochemical analysis**, v. 25, n. 3, p. 273-281, 2014.

SHARMA, A. et al. Chemical profiling, cytotoxicity and phytotoxicity of foliar volatiles of *Hyptis suaveolens*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 171, p. 863-870, 2019.

SHEN, J. et al. Enhanced diallyl trisulfide has in vitro synergy with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Planta medica**, v. 62, n. 05, p. 415-418, 1996.

SHUKLA, R. et al. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1, 8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 27-33, 2012.

SILVA, A. R. A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 2012.

- SILVA, I. P. et al. Antimicrobial resistance and potential virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from water and bivalve mollusks from Bahia, Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 131, p. 757-762, 2018.
- SILVEIRA, S. M. da et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 3, p. 462-470, 2012.
- SNOUSSI, M. et al. Chemical composition and antibiofilm activity of *Petroselinum crispum* and *Ocimum basilicum* essential oils against *Vibrio* spp. strains. **Microbial pathogenesis**, v. 90, p. 13-21, 2016.
- SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, p. 109-123, 2013.
- SOLIMAN, F. M. et al. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 54, n. 2, p. 219-225, 2016.
- SOUSA, J. P. et al. Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. **International journal of food microbiology**, v. 154, n. 3, p. 145-151, 2012.
- STELIOPOULOS, P. et al. Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ¹³C and ²H labeling studies. **Phytochemistry**, v. 60, n. 1, p. 13-20, 2002.
- SU, H. et al. Persistence and spatial variation of antibiotic resistance genes and bacterial populations change in reared shrimp in South China. **Environment international**, v. 119, p. 327-333, 2018.
- SUNG, S. Y. et al. Effects of *Allium sativum* essence oil as antimicrobial agent for food packaging plastic film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 26, p. 406-414, 2014.
- TAGHIZADEH, S. F. et al. Chemical composition, antibacterial, antioxidant and cytotoxic evaluation of the essential oil from pistachio (*Pistacia khinjuk*) hull. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 76-81, 2018.
- TAVEIRA, F. S. N. et al. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 1, p. 27-31, 2003.
- TELES, S. et al. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) NE Brown. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 247-252, 2012.

- TSAO, S. M.; YIN, M. C. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 7, p. 646-649, 2001.
- UMAGILIYAGE, A. L. et al. Antimicrobial efficacy of liposomes containing d-limonene and its effect on the storage life of blueberries. **Postharvest biology and technology**, v. 128, p. 130-137, 2017.
- VAIČIULYTĖ, V. et al. Variation of essential oil composition of *Thymus pulegioides* in relation to soil chemistry. **Industrial crops and products**, v. 95, p. 422-433, 2017.
- VARGAS-ALBORES, F.; GUZMÁN, M. A.; OCHOA, J. L. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 106, n. 2, p. 299-303, 1993.
- VERAS, H. N. H et al. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790-S2795, 2017.
- VICTORIA, F. N. et al. Further analysis of the antimicrobial activity of α -phenylseleno citronellal and α -phenylseleno citronellol. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 95-99, 2012.
- VIEIRA, G. A. B. et al. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* ("Macela-da-terra"). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 43-47, 2006.
- VILELA, G. R. et al. Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 2, p. 108-111, 2009.
- VOSOUGHI, N. et al. Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. **Industrial Crops and Products**, v. 117, p. 366-374, 2018.
- WANGMAN, P. et al. PirA & B toxins discovered in archived shrimp pathogenic *Vibrio campbellii* isolated long before EMS/AHPND outbreaks. **Aquaculture**, v. 497, p. 494-502, 2018.
- WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1-2, p. 360-365, 2012.
- WELI, A. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf. **Journal of King Saud University-Science**, 2018.

WIJESUNDARA, N. M.; RUPASINGHE, H. P. Vasantha. Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 118-127, 2018.

YANO, Y.; SATOMI, M.; OIKAWA, H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 6-11, 2006.

YEN, H. Y.; LIN, Y. C. Green extraction of *Cymbopogon citrus* essential oil by solar energy. **Industrial crops and products**, v. 108, p. 716-721, 2017.

YOO, H. J.; JWA, S. K. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. **Archives of oral biology**, v. 88, p. 42-46, 2018.

YOO, H. J.; JWA, S. K. Efficacy of β -caryophyllene for periodontal disease related factors. **Archives of oral biology**, v. 100, p. 113-118, 2019.

YOSHITOMI, K. et al. Rice terpene synthase 24 (OsTPS24) encodes a jasmonate-responsive monoterpene synthase that produces an antibacterial γ -terpinene against rice pathogen. **Journal of plant physiology**, v. 191, p. 120-126, 2016.

YOUSEFI, M. et al. Anesthetic efficacy and biochemical effects of citronellal and linalool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) juveniles. **Aquaculture**, v. 493, p. 107-112, 2018.

ZHANG, Z. et al. Evaluation of the sub-chronic toxicity of a standardized flavonoid extract of safflower in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 98-107, 2017.

ZHOU, Y. et al. Oxidized amylose with high carboxyl content: A promising solubilizer and carrier of linalool for antimicrobial activity. **Carbohydrate polymers**, v. 154, p. 13-19, 2016.

CAPÍTULO III

Atividade antioxidante *in vitro* de óleos essenciais e extratos etanólicos de espécies vegetais

RESUMO

Os processos de oxidação nos sistemas vivos ocorrem principalmente devido à produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, os quais são potencialmente prejudiciais aos tecidos, podendo danificar biomoléculas essenciais como proteínas, DNA e lipídios. Muitos compostos derivados de plantas são reconhecidos como potenciais agentes antioxidantes naturais, sendo capazes de inibir a formação de radicais livres e eliminá-los. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais (OE) das plantas *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *L. origanoides*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, e dos extratos etanólicos (AE) das espécies *Myracrodruon urundeuva*, *Spondias mombin* e *Punica granatum*. A coleta do material botânico foi realizada em Parnaíba, Piauí, Brasil (03° 05' 12,51S 041° 47' 01,21W). A atividade antioxidante dos OEs e EEs foi determinada por meio do método da atividade sequestradora de radicais livres, utilizando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Alíquotas de soluções etanólicas dos OEs e EEs, em diferentes concentrações, foram adicionadas em uma solução etanólica de DPPH (100 µM) e incubadas por 30 minutos, para posterior leitura espectrofotométrica. Os OEs foram testados nas concentrações: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 e 0,031 mg.mL⁻¹, e os EEs nas concentrações 15,62 x 10⁻³; 7,81 x 10⁻³; 3,91 x 10⁻³; 1,95 x 10⁻³; 0,98 x 10⁻³; 0,49 x 10⁻³; 0,24 x 10⁻³ e 0,12 x 10⁻³ mg.mL⁻¹. A IC₅₀ (concentração que proporciona 50% de inibição do radical livre DPPH) foi calculada graficamente pelo ajuste de uma equação linear. Avaliando-se o índice de atividade antioxidante (IAA) dos OEs, EEs e do controle (Trolox), foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05). Todos os OEs foram classificados com IAA baixo, enquanto os EEs tiveram IAA alto. A capacidade dos EEs e OEs de eliminar radicais livres sugere a presença de compostos doadores de elétrons, que podem reagir com os radicais livres para convertê-los em produtos mais estáveis. Os OEs e EEs analisados podem ser considerados fontes naturais de substâncias antioxidantes com potencial de uso nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: antioxidante natural; método DPPH; oxidação; trolox

ABSTRACT

Oxidation processes in living systems occur mainly due to the production of reactive oxygen species and free radicals, which are potentially harmful to tissues, and can damage essential biomolecules such as proteins, DNA and lipids. Many plant-derived compounds are recognized as potential natural antioxidant agents, being able to inhibit the formation of free radicals and eliminate them. The objective of this work was to evaluate the antioxidant activity of the essential oils (EO) of the *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *L. origanoides*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* and ethanolic extracts (EE) of the species *Myracrodruon urundeuva*, *Spondias mombin* and *Punica granatum*. The botanical material was collected in Parnaíba, Piauí, Brazil (03° 05 '12,5 "S 041° 47' 01,2" W). The EE of *S. officinalis* were commercially purchased. The antioxidant activity of EOs and EEs was determined using the free radical scavenger activity method using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. Aliquots of ethanolic solutions of EOs and EEs, at different concentrations, were added in a DPPH ethanolic solution (100 µM) and incubated for 30 minutes for further spectrophotometric reading. The OEs were tested at concentrations: 4; 2; 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.062 and 0.031 mg.mL⁻¹, and the EEs at concentrations 15.62 x 10⁻³; 7.81 x 10⁻³; 3.91 x 10⁻³; 1.95 x 10⁻³; 0.98

x 10⁻³; 0.49 x 10⁻³; 0.24 x 10⁻³ and 0.12 x 10⁻³ mg.mL⁻¹. The IC₅₀ (concentration giving 50% inhibition of DPPH free radical) was calculated graphically by a linear equation adjusted. Evaluating the AAI of the EOs, EEs and the control (Trolox), we found statistically significant differences (p<0.05). All EOs had low AAI while EEs had very high AAI. The ability of EE and EO to eliminate free radicals suggests the presence of electron-donor compounds, which can react with free radicals to convert them into more stable products. The OEs and EEs analyzed can be considered natural sources of antioxidant substances with potential use in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: natural antioxidant; DPPH method; oxidation; trolox

1 INTRODUÇÃO

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) são fundamentais no metabolismo celular, porém, quando presentes em excesso, podem causar estresse oxidativo, provocando alterações celulares que, em última instância, são responsáveis por afetar negativamente a saúde do organismo (TELES et al., 2014). Os processos de oxidação nos sistemas vivos ocorrem principalmente devido a produtos químicos altamente reativos e potencialmente prejudiciais aos tecidos (TSHILANDA et al., 2016). Quando os radicais livres superam o mecanismo de defesa, podem danificar biomoléculas essenciais, como proteínas, DNA e lipídios (SILVA et al., 2012).

Em camarões, por exemplo, após a ativação do sistema imunológico por agentes patogênicos, as proteínas associadas ganham atividade biológica e participam das reações de defesa celular do animal, através da produção local de quinonas citotóxicas, radicais livres e peptídeos antibacterianos (CERENIUS; LEE; SÖDERHÄLL, 2008). Essa estimulação conduz ao aumento abrupto do consumo de oxigênio, catalisado por uma enzima ligada à membrana celular, NADPH-oxidase, que dá origem ao superóxido (O_2^-), desencadeando uma série de reações que levam à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros compostos reativos, os quais são utilizados no combate aos agentes invasores (MUÑOZ et al., 2000). Posteriormente, há a elevação da síntese de superóxido dismutase, uma molécula responsável pela eliminação de ânion superóxido, para que não haja prejuízos ao hospedeiro (danos celulares ou até mesmo ao DNA) devido à elevada concentração de EROs (CHENG et al., 2005; WU et al., 2015).

Os antioxidantes desempenham um papel fundamental na captura de radicais livres e na sua estabilização pela transferência de um átomo de hidrogênio (KHIYA et al., 2018). Os antioxidantes naturais podem proteger as células contra as EROs e, portanto, podem auxiliar na neutralização dos danos nos tecidos mediados pelo estresse oxidativo (TSHILANDA et al., 2016; GHORBANI; ESMAEILIZADEH, 2017).

Nos últimos anos muitos extratos e óleos essenciais de plantas têm gerado grande interesse na medicina tradicional, uma vez que são fontes de produtos naturais e potenciais agentes alternativos na prevenção e tratamento

de muitas doenças infecciosas (KHIYA et al., 2018), na eliminação de radicais livres e desempenhando um papel importante na prevenção do declínio do sistema imunológico (EL EUCH et al., 2019).

A maioria dos compostos presentes em óleos essenciais (OEs) e extratos etanólicos (EEs) (terpenoides, flavonóides, taninos e antocianinas) é reconhecida como potenciais agentes antioxidantes naturais, sendo capazes de inibir a formação de radicais livres e eliminá-los (TELES et al., 2014; SILVA et al., 2012; BAJ; BARYLUKB; SIENIAWSKA, 2018).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson, *L. origanoides* Kunth, *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L., e dos extratos etanólicos das espécies *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Spondias mombin* L., e *Punica granatum* L. Essas foram as espécies com o melhor desempenho nos ensaios de atividade antimicrobiana descritas nos capítulos anteriores.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material botânico foi coletado no mês de março de 2018, pela manhã, em Parnaíba, Piauí, Brasil (03° 05' 12,511S 041° 47' 01,211W). O material coletado foi herborizado seguindo os procedimentos descritos por Fidalgo e Bononi (1984). As plantas (tabela 1) foram identificadas por meio de chaves de identificação específicas disponibilizadas em bibliografias especializadas (CARMELLO-GUERREIRO; PAOLI, 1999; GOMES; NEGRELLE, 2003; SALIMENA; MÚLGURA, 2015; SUZUKI, 2016; CÂNDIDO et al., 2019). Exemplos identificados depositados no herbário HDelta também foram utilizados para auxiliar na identificação. Os taxa foram classificados de acordo com o sistema estabelecido pelo Angiosperm Phylogeny Group (APG IV, 2016).

A verificação da correta grafia dos nomes científicos foi realizada no banco de dados Missouri Botanical Garden (GARDEN, 2016). Exemplos das

espécies de plantas coletadas foram depositados no acervo da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr. O óleo essencial de *S. officinalis* e *O. basilicum* foram adquiridos comercialmente e doados pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). Este estudo foi aprovado pelo Conselho Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) (acesso n° A00721D).

Tabela 1 - Identificação e número de registro do herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr) das espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo. EE = extrato etanólico; OE = óleo essencial.

Nome comum	Nome científico	Farmacógeno	Derivado	Registro HDelta
Alecrim pimenta	<i>Lippia origanoides</i> Kunth	Folhas	OE	5469
Aroeira	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Folhas	EE	5477
	Allemão	Casca/caule	EE	
Cajá	<i>Spondias mombin</i> L.	Casca/caule	EE	5465
Capim limão	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Folhas	OE	5472
Erva cidreira	<i>L. alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson	Folhas	OE	5466
Manjerição	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Folhas	OE	*
Romã	<i>Punica granatum</i> L.	Folhas	EE	5474
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	Folhas	OE	*

*Adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich).

Todos os procedimentos experimentais do presente estudo foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas Animal (LACA) da Embrapa Meio-Norte, Parnaíba, Piauí, Brasil.

2.2 Obtenção do óleo essencial

As folhas de cada espécie coletada (*Lippia origanoides*, *L. alba* e *Cymbopogon citratus*) foram desidratadas em temperatura ambiente. O óleo essencial (OE) foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo de 5000 mL, utilizando-se 600 g de folhas secas em 3500 mL água destilada. O tempo de extração foi estabelecido em 240 minutos, a partir do início da ebulição da água. O OE foi armazenado em frasco âmbar a 4°C (adaptado de YEN e LIN, 2017).

2.3 Obtenção do extrato etanólico (EE)

Para obtenção dos EEs seguiu-se metodologia descrita por Carvalho et al. (2019) e Poka et al. (2019), com adaptações. As folhas de *M. urundeuva* e *P. granatum*, e casca do caule de *M. urundeuva* e *S. mombin* foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C. O material seco foi processado em moinho de facas tipo cróton TE-650 (Tecnal). Em seguida, foi adicionado álcool etílico P.A na proporção de 1:4 (m/v) ao pó obtido de cada planta e agitado durante 1 minuto. O EE foi obtido por maceração estática durante 24 horas. Posteriormente, o macerado bruto foi filtrado e concentrado em banho Maria a 40°C. O extrato concentrado foi aquecimento em estufa a 40°C até a completa eliminação do etanol. O EE foi mantido sob refrigeração (4°C) até o momento das análises.

2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos óleos essenciais (OE) e extratos etanólicos (AE) foi determinada *in vitro* por meio do método da atividade sequestradora de radicais livres, utilizando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil – DPPH (Sigma-Aldrich, Brasil) adaptado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Alíquotas de 30µL de soluções etanólicas das amostras, em diferentes concentrações, foram adicionadas a 200 µL de solução etanólica de DPPH, em microplacas de 96 poços.

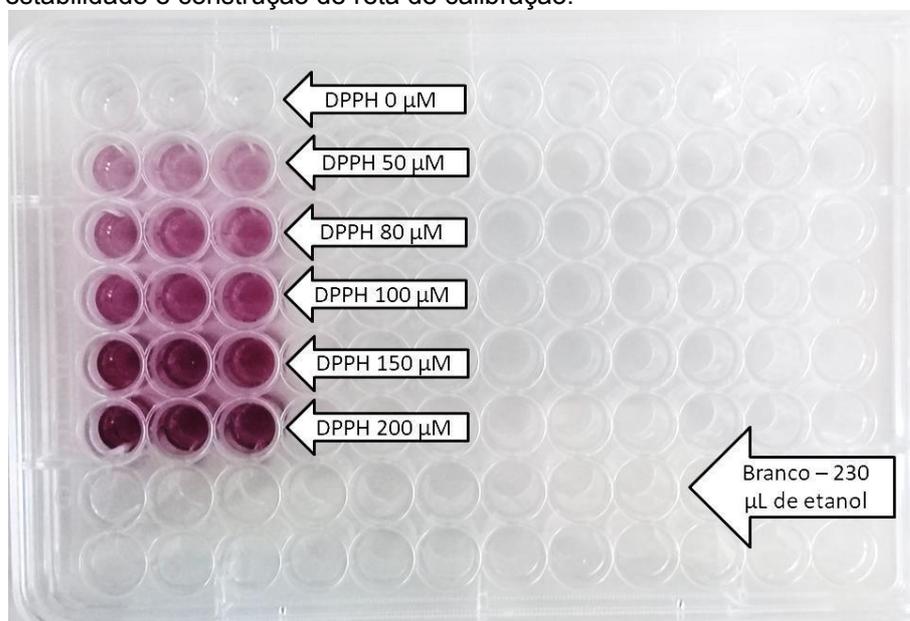
Os óleos essenciais foram testados nas concentrações: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 e 0,031 mg.mL⁻¹, e os extratos etanólicos nas concentrações 15,62 x 10⁻³; 7,81 x 10⁻³; 3,91 x 10⁻³; 1,95 x 10⁻³; 0,98 x 10⁻³; 0,49 x 10⁻³; 0,24 x 10⁻³ e 0,12 x 10⁻³ mg.mL⁻¹.

Previamente foi construída uma reta de calibração para avaliação da estabilidade das soluções de DPPH. Uma solução estoque foi preparada dissolvendo-se 9,07 mg de DPPH (MM 394,32 g/mol) em 100 mL de etanol P.A., resultando na concentração molar de 230µM. Em seguida, alíquotas da solução estoque foram pipetadas para uma microplaca de 96 poços, e diluídas em etanol P.A., para obtenção das seguintes concentrações molares: 0, 50, 80,

100, 150 e 200 μM (Figura 1). O volume final de solução em cada poço foi de 230 μL . As leituras da absorvância foram realizadas em um xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer utilizando o software Microplate Manager®, no comprimento de onda de 517nm.

Os dados referentes à absorvância e concentrações molares utilizadas foram plotados em gráfico de dispersão, e uma equação linear foi ajustada (apêndice F). Foi obtida a seguinte equação: $y = 0,0049x - 0,0051$, onde y = absorvância, e x = concentração da solução de DPPH (μM). O coeficiente de determinação foi 0,999.

Figura 1 - Microplaca de 96 poços com soluções de DPPH em diferentes concentrações para avaliação da estabilidade e construção de reta de calibração.



Fonte: próprio autor.

Na realização dos testes de verificação da atividade antioxidante o DPPH foi utilizado na concentração de 100 μM . Conforme Scherer e Godoy (2009), a concentração utilizada encontra-se dentro da faixa de linearidade das soluções de DPPH, entre 50 μM e 200 μM . A absorvância foi aferida utilizando-se comprimento de onda de 517 nm imediatamente após a adição dos compostos a serem testados (tempo 0) e após período de incubação de 30 min à temperatura ambiente na ausência de luz. As leituras de absorvância foram realizadas da mesma forma citada anteriormente.

A atividade sequestradora de radicais foi calculada da seguinte forma: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$, onde: Abs_0 = a absorvância do controle (solução etanólica de DPPH); Abs_1 = absorvância na presença do composto de teste a diferentes concentrações. A IC_{50} (concentração que proporciona 50% de inibição do radical livre DPPH) foi calculada usando uma curva de calibração na gama linear, representando a concentração do OE ou EE contra o efeito de eliminação correspondente.

A atividade antioxidante foi expressa como índice de atividade antioxidante (IAA), calculado da seguinte forma: $IAA = \text{concentração final de DPPH (mg.L}^{-1}) / IC_{50} \text{ (mg.L}^{-1})$, conforme Scherer e Godoy (2009). Assim, a IAA foi calculada considerando a massa de DPPH e a massa do composto testado na reação, resultando em uma constante para cada composto, independente da concentração de DPPH e da amostra utilizada.

O ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, Brasil) foi utilizado como controle, nas concentrações molares de 15,63; 7,81; 3,91; 1,95 e 0,98 μM ($3,91 \times 10^{-3}$; $1,96 \times 10^{-3}$; $0,98 \times 10^{-3}$; $0,49 \times 10^{-3}$ e $0,24 \times 10^{-3}$ mg.mL^{-1} , respectivamente). Para expressar os resultados em equivalentes de Trolox (mol.L^{-1} de Trolox/g de amostra ou mM de Trolox/g de amostra) foi ajustada uma reta para verificação do padrão de atividade antioxidante do composto. Alíquotas de 30 μL de solução etanólica de Trolox foram adicionadas à solução etanólica de DPPH (100 μM), com volume final de 230 μL em cada poço. Após um período de incubação de 30 min à temperatura ambiente no escuro foram realizadas leituras de absorvância, conforme descrito anteriormente.

Os resultados de absorvância juntamente com as concentrações molares de Trolox utilizadas foram plotados em gráfico de dispersão, e uma equação linear foi ajustada (apêndice G). Foi obtida a seguinte equação: $y = -0,0191x + 0,5026$, onde y = absorvância, e x = concentração da solução de Trolox (μM). O coeficiente de determinação foi de 0,999. Em seguida, foi determinada a absorvância referente à concentração de 10 μM de Trolox. O valor da absorvância obtido foi substituído na equação linear obtida de cada amostra testada, obtendo-se a diluição equivalente a 10 μM de Trolox, permitindo assim, calcular quantos mols de Trolox equivalem a 1g de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Análise estatística

Uma one-way ANOVA com posterior teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha < 0,05$) foi realizada para verificar diferenças significativas entre o Índice de Atividade Antioxidante (IAA) dos EEs e OEs das plantas e do controle (Trolox). O teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) foi utilizado para verificar a distribuição dos dados quanto à normalidade e valores extremos foram avaliados no boxplot. O software IBM-SPSS 20.0 foi utilizado para análise estatística.

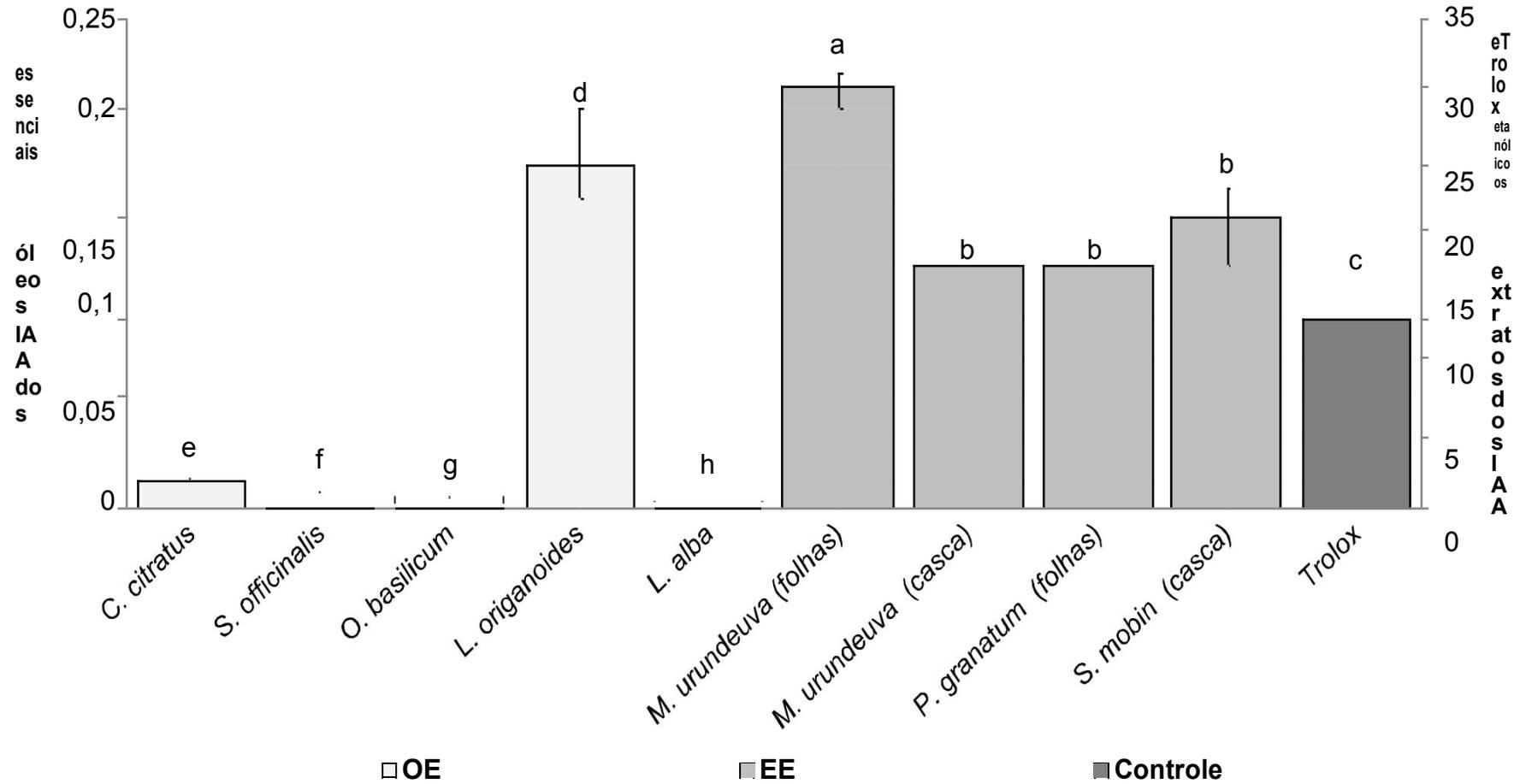
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando-se o IAA, os dados foram normalmente distribuídos para cada grupo, tal como avaliado pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significativas $F(10, 32) = 484,22$, $p < 0,05$ (Figura 2). O IAA dos EEs foi significativamente maior que o controle. Enquanto o IAA dos OEs foi significativamente menor que o Trolox. O IAA das amostras se comportou da seguinte forma: EE da Folha *M. urundeuva* > Casca *S. mombin* = Casca *M. urundeuva* = Folha *P. granatum* > Trolox > OE de *L. origanoides* > *C. citratus* > *S. officinalis* > *O. basilicum* > *L. alba*.

Segundo Scherer e Godoy (2009) os extratos vegetais podem ser classificados quanto ao grau de atividade antioxidante como: baixa atividade antioxidante, quando $IAA < 0,5$; moderada atividade antioxidante, quando IAA entre 0,5 e 1,0; forte atividade antioxidante, quando IAA entre 1,0 e 2,0; e muito forte, quando $IAA > 2,0$. Portanto, todos os OEs tiveram IAA baixa, enquanto os EEs tiveram IAA muito forte (apêndices H e I).

A taxa de inibição do radical DPPH do extrato aquoso de *L. alba*, com grande concentração de luteolina ($2,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e rutina ($1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), já foi descrita por Nunes et al. (2018), de $56,13 \pm 4,79\%$ e $2436,45 \pm 137,16 \mu\text{M}$ de trolox/g de extrato. No presente trabalho o OE dessa espécie apresentou atividade antioxidante superior ($3420 \pm 200 \mu\text{M}$ de trolox/g de OE) ao valor relatado para o extrato.

Figura 2 - Índices de Atividade Antioxidante (IAA) dos óleos essenciais (OEs), extratos etanólicos (EEs) e Trolox.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No estudo de Stashenko, Jaramillo e Martínez (2004) o OE de *L. alba*, rico em limoneno (27-77%) e carvona (14–30%), exibiu atividade antioxidante semelhante ao da vitamina E, um produto amplamente utilizado como aditivo natural e sintético. Timotéo et al. (2015), observando diferentes quimiotipos de *L. alba*, verificaram que os extratos etanólicos com maior quantidade de polifenóis, sobretudo os fenilpropanóides, possuíam a maior atividade antioxidante.

Em um ensaio de genotoxicidade, Kampke et al. (2018) constataram no OE de *L. alba* baixo nível de dano contra o DNA e proteínas, além da capacidade inibitória do óxido nítrico (NO), o que pode evidenciar a ação antioxidante desse produto.

Na presente pesquisa o valor de IC₅₀ constatado para o OE de *L. origanoides* ($0,22 \pm 0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$), utilizando-se uma solução de 100 μM de DPPH, foi menor que o valor relatado por Bedoya et al. (2012) ($5,58 \pm 0,035 \text{ mg.mL}^{-1}$), utilizando uma solução etanólica com 7 μM de DPPH. Ou seja, em uma solução mais concentrada de DPPH o OE utilizado neste estudo apresentou melhor potencial antioxidante. O OE dessa espécie, rico em timol na sua composição, em combinação com quitosano, foi descrito com maior atividade antioxidante diante do DPPH quando comparado ao quitosano utilizado isoladamente (DAMASCENO et al., 2018).

Balasubramani et al. (2018), na Índia, verificaram no OE de *O. basilicum* menor valor de IC₅₀ ($13,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diante de uma solução de DPPH (25 μM) quando comparado ao valor obtido nesse estudo ($16,49 \pm 3,88 \text{ mg.mL}^{-1}$) em solução de 100 μM de DPPH. Apesar de o presente estudo utilizar uma solução quatro vezes mais concentrada de DPPH, o valor de IC₅₀ relatado foi maior (na ordem de 10^3), indicando menor potencial antioxidante em relação à pesquisa supracitada. O potencial antioxidante do OE de *O. basilicum*, coletado na Sérvia, também foi superior na pesquisa desenvolvida por Elgndi et al., (2017), na qual foi constatado IC₅₀ de $6,94 \pm 1,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando solução de DPPH a 90 μM . Tal fato pode ilustrar a grande variação que pode ocorrer no potencial antioxidante da mesma espécie coletada em diferentes locais, além de demonstrar o grande potencial oxidante que essa espécie pode apresentar.

As diferenças na atividade antioxidante dos OEs de manjeriço podem ser explicadas pela diferença no conteúdo de eugenol, um dos principais

compostos responsáveis pela atividade antioxidante dessa espécie (ELGNDI et al. 2017), o qual foi menor no presente estudo. Comumente a atividade antioxidante mais baixa observada correlaciona-se diretamente com as menores concentrações fenólicas totais encontradas no manjericão (NGUYEN; KWEE; NIEMEYER, 2010).

A composição individual de ácido fenólico é um fator importante que influencia a capacidade antioxidante medida para cultivares de manjericão (KWEE; NIEMEYER, 2011). A presença de monoterpenos oxigenados (linalol, α -terpineol, etc.) proporciona maior atividade antioxidante que os hidrocarbonetos monoterpênicos (pinenos), hidrocarbonetos sesquiterpênicos ou seus derivados oxigenados (HAJLAOUI et al., 2016), o que pode justificar a baixa atividade antioxidante do OE de *O. basilicum*.

No OE de *S. officinalis*, rico em cânfora e 1,8-cineole, diante de solução de DPPH (200 μ M) o IC₅₀ foi de $8,31 \pm 0,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (EL EUCH et al., 2019), enquanto Adrar; Oukil; Bedjou (2016) verificaram IC₅₀ do OE dessa espécie de $1,99 \pm 0,169 \text{ mg.mL}^{-1}$, e Khiya et al. (2018), em DPPH a 60 μ M, constataram IC₅₀ de $309,42 \text{ mg.mL}^{-1}$. Na presente pesquisa foi verificado o valor de IC₅₀ de $7,52 \pm 1,07 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 100 μ M de DPPH. É comum a grande variação do potencial antioxidante da espécie, como constatado por Farhat et al. (2014), onde o IC₅₀ em solução de DPPH do extrato das folhas de *S. officinalis* em diferentes fases de vida variou de $29,20 \pm 3,70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (no estágio vegetativo) a $58,44 \pm 2,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (fase de frutificação).

O OE de *C. citratus* foi mencionado com IC₅₀ próximo de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (JAMUNA et al., 2017), enquanto IC₅₀ do extrato foi relatado com valor de $0,31 \pm 0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ (RORIZ et al., 2015), ou seja, com maior potencial, uma vez que menores quantidades são exigidas para a inibição de 50% da absorvância da solução de DPPH. Neste estudo o IC₅₀ do OE de *C. citratus* foi verificado em $3,26 \pm 0,36 \text{ mg.mL}^{-1}$. Costa et al. (2016) observaram que o poder antioxidante da infusão de *C. citratus* contra DPPH é fortemente dependente do mês da colheita, com direta relação com os níveis de ácidos fenólicos.

O OE oriundo de diferentes cultivares de manjericão (*O. basilicum*), com variados compostos majoritários em sua composição como 1,8-cineol, linalol, eugenol, neral, geranial (citral) possuem significativa atividade antioxidante em testes utilizando DPPH como radical livre, sendo eugenol o composto com

maior potencial antioxidante quando testado isoladamente, além de potencializar a atividade antioxidante de demais compostos quando testados juntos (COUTO et al., 2019). Da mesma forma, o cimeno como composto majoritário ou testado isoladamente apresenta relevante atividade antioxidante, inclusive potencializando outros compostos (MILOS; MAKOTA, 2012).

Limoneno, linalol e citral são componentes terpenóides não fenólicos comuns dos óleos essenciais, cuja cinética de sua atividade antioxidante indica que o comportamento antioxidante desses compostos ocorre por co-oxidação com o substrato, devido à auto-terminação e terminação cruzada da cadeia oxidativa (BASCHIERI et al., 2017). A atividade antioxidante dos OEs pode ser explicada pela presença dos compostos majoritários, mas também devido à presença de componentes menores, os quais podem figurar entre os mais potentes catadores de radicais livres (EL EUCH et al., 2019). Os altos valores de atividade antioxidante apresentados por compostos como o timol, carvacrol e óleos essenciais ricos dessas substâncias se devem à capacidade de doação do átomo de hidrogênio da hidroxila fenólica, formando um radical fenólico (TELES et al., 2014; BASCHIERI et al., 2017).

Seis diferentes espécies de *Juniperus* contendo diferentes compostos majoritários na composição de seu OE tiveram diferentes atividades antioxidantes, as quais tiveram correlação direta com o nível dos constituintes majoritários como α -pineno, sabineno, β -mirceno, β -cariofileno, germacreno-D, α -humuleno e terpinen-4-ol (ZHELJAZKOV et al., 2018). Da mesma forma, o OE de uma variante de *Ocimum* spp. com predomínio de eugenol e 1,8-cineol em sua composição, apresentou significativo potencial antioxidante, assim como populações dominadas pelo linalol ou cânfora (CHATURVEDI et al., 2018).

Segundo Bekir et al. (2013), os valores de IC₅₀ no teste contra o radical DPPH (200 μ M) foram de $5,62 \pm 0,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $9,25 \pm 0,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato metanólico e etanólico das folhas de romã, respectivamente, os quais são significativamente melhores que os valores verificados utilizando-se o extrato de acetato de etila, diclorometano e hexano. No presente estudo foi verificado valor muito próximo de IC₅₀ ($2,20 \pm 0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A atividade antioxidante verificada no EE de romã pode possuir correlação direta com seu conteúdo total de fenóis, como verificado em outros estudos (KHARCHOUF et

al., 2018; HANANIA; YEE; NOR-KHAIZURA, 2019). Os taninos hidrolizáveis são os polifenóis mais abundantes responsáveis pela capacidade antioxidante em romãs e incluem galotaninos, elagitaninos e ésteres de galagil, como punicalagina e punicalina (MADRIGAL-CARBALLO et al., 2009).

O extrato metanólico das folhas de *S. mombin* foi anteriormente descrito com IC₅₀ de 417 ± 10 µg.mL⁻¹ frente à solução de DPPH (65 µM) (SILVA et al., 2012). Já em solução de 300 µM de DPPH o IC₅₀ descrito foi de 11,8 ± 0,3 µg.mL⁻¹ (CRISTOFOLI et al., 2019). No presente estudo o EE da casca do caule de *S. mombin*, composto exclusivamente por procianidinas, apresentou IC₅₀ de 1,88 ± 0,17 µg.mL⁻¹, o que pode demonstrar superior potencial do extrato da casca em relação às folhas. Cabral et al. (2016) verificaram que o extrato das folhas *S. mombin* na concentração de 60 µg.mL⁻¹ reduziu aproximadamente 70% da absorvância em solução de DPPH, sugerindo que os ácidos fenólicos presentes no extrato e nas frações são responsáveis pela atividade sequestradora de radicais.

Analisando a atividade antioxidante do extrato de *M. urundeuva* fracionado por n-butanol, etanol e metanol em solução de DPPH, Machado et al. (2014) constataram que todas as frações apresentaram IC₅₀ < 4 µg.mL⁻¹. Resultados próximos foram obtidos por Vieira et al. (2015), onde o extrato metanólico das folhas e da casca do caule tiveram IC₅₀ de 12,9 ± 0,2 µg.mL⁻¹ e 10,9 ± 0,5 µg.mL⁻¹, respectivamente, em solução de DPPH, os quais apresentaram alto conteúdo de fenóis e conseqüentemente possuem grande potencial para sequestrar radicais livres.

No EE das folhas de *M. urundeuva* (rica em fenóis, flavonoides e taninos condensados) Junior et al. (2017) detectaram IC₅₀ em solução de DPPH (65 µM) de 217 ± 0,0 mg.mL⁻¹. O presente estudo também verificou forte atividade antioxidante do EE das folhas e da casca do caule dessa espécie, com IC₅₀ de 1,33 ± 0,05 e 2,16 ± 0,05 µg.mL⁻¹, respectivamente, sendo que o maior valor verificado nesta pesquisa foi para o EE das folhas. Assim como nos trabalhos citados anteriormente (VIEIRA et al., 2015; JUNIOR et al., 2017), os EEs das folhas e casca de aroeira utilizados nesta pesquisa são ricos em taninos, ácidos fenólicos flavonoides e chalconas, os quais podem ser sugeridos como principais responsáveis pelo potencial antioxidante verificado.

Os principais compostos descritos nos EEs do presente estudo (vide capítulo II) têm significativo potencial antioxidante relatado em pesquisas anteriores, como no caso dos taninos hidrolisáveis (FIGUEROA-ESPINOZA et al., 2015; BENZIDIA et al., 2018; VIGNAULT et al., 2018), derivados de ácido gálico (RAJAN; MURALEEDHARAN, 2017; LUZI et al., 2018; CHUNSHOM et al., 2019), ácidos anacárdicos (KUBO et al., 2006; GOMES JÚNIOR et al., 2018), flavonoides (CHEN et al., 2018; MOON et al., 2018; CHEN et al., 2019; DONG et al., 2019; LI et al., 2019), ácidos fenólicos (AGATONOVIC-KUSTRIN; KUSTRIN; MORTON, 2018; BOGUCKA-KOCKA et al., 2018; XIANG et al., 2019), chalconas (TAJAMMAL et al., 2017; WANG et al., 2019) e procianidinas (MIZUNO et al., 2017; ZHOU et al., 2018; MUÑOZ-LABRADOR; PRODANOV; VILLAMIEL, 2019).

Os ácidos anacárdicos atuam como antioxidantes de várias maneiras, incluindo a inibição de várias enzimas pró-oxidantes envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio e quelantes de metais divalentes, como Fe^{2+} ou Cu^{2+} (KUBO et al., 2006). O número e a posição de hidroxila fenólica mostraram grande influência na atividade antioxidante dos flavonóides, e os flavonóides que possuem ambos os grupos hidroxila C3 e catecol exibem atividade antioxidante mais forte do que com um ou nenhum deles (CHEN et al., 2018). A relação entre concentração de fenóis totais e a capacidade de sequestrar radicais livres dos extratos parece ser bastante significativa, visto que extratos com maior conteúdo de fenóis totais são os que possuem maior atividade antioxidante (VIEIRA et al., 2015).

4 CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo demonstra que a capacidade de eliminar radicais livres *in vitro* dos óleos essenciais das plantas *C. citratus*, *L. alba*, *L. origanoides*, *O. gratissimum*, *S. officinalis*, e sobretudo dos extratos etanólicos de *M. urundeuva*, *S. mombin* e *P. granatum* sugere a presença de compostos doadores de elétrons, que podem reagir com os radicais livres para convertê-los em produtos mais estáveis.

No presente trabalho os EEs demonstraram uma maior atividade oxidante que os OEs, uma tendência também verificada na literatura científica. O EE das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão apresentou o maior índice de atividade antioxidante. Futuras pesquisas são necessárias para avaliação da atividade antioxidante dos componentes majoritários de sua composição.

REFERÊNCIAS

ADRAR, N.; OUKIL, N.; BEDJOU, F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 112-119, 2016.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KUSTRIN, E.; MORTON, D. W. Phenolic acids contribution to antioxidant activities and comparative assessment of phenolic content in mango pulp and peel. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 158-163, 2018.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

BAJ, T.; BARYLUK, A.; SIENIAWSKA, E.. Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L. and *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial crops and products**, v. 115, p. 52-61, 2018.

BALASUBRAMANI, S. et al. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). **Microbial pathogenesis**, v. 125, p. 475-485, 2018.

BASCHIERI, A. et al. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. **Food chemistry**, v. 232, p. 656-663, 2017.

BEDOYA, O. A. et al. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* HBK) del Alto Patía. **INGRESAR A LA REVISTA**, v. 10, n. 2, p. 79-86, 2012.

BEKIR, J. et al. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and chemical toxicology**, v. 55, p. 470-475, 2013.

- BENZIDIA, B. et al. Chemical composition and antioxidant activity of tannins extract from green rind of *Aloe vera* (L.) Burm. F. **Journal of King Saud University-Science**, n. x, p. xx-xx, 2018.
- BOGUCKA-KOCKA, A. et al. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 4, p. 622-630, 2018.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CABRAL, B. et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 304-311, 2016.
- CÂNDIDO, J. B. et al. Chave de identificação dendrológica das espécies mais comuns de uma área de Cerrado sensu stricto, Gurupi, Tocantins. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 347-362, 2019.
- CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. S. Aspectos morfológicos e anatômicos da semente de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem.-Anacardiaceae), com notas sobre paquicalaza. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 222-228, 1999.
- CARVALHO, M. S. S. et al. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 90-98, 2019.
- CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.
- CHATURVEDI, T. et al. Chemical composition, genetic diversity, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of camphor-basil (*Ocimum kilimandscharicum* Guerke). **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 246-258, 2018.
- CHEN, X. et al. Is antioxidant activity of flavonoids mainly through the hydrogen-atom transfer mechanism?. **Food Research International**, v. x, p. xx-xx, 2018.
- CHENG, W. et al. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2005.
- CHEN, G. L. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule. **Food chemistry**, v. 277, p. 706-712, 2019.

- CHUNSHOM, N. et al. Development of gallic acid/cyclodextrin inclusion complex in freeze-dried bacterial cellulose and poly (vinyl alcohol) hydrogel: Controlled-release characteristic and antioxidant properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 232, p. 294-300, 2019.
- COSTA, G. et al. Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 738-745, 2016.
- COUTO, A. H. G. S. et al. Essential oils of basil chemotypes: Major compounds, binary mixtures, and antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 293, p. 446-454, 2019.
- CRISTOFOLI, N. L. et al. Antioxidant and antimicrobial potential of cajazeira leaves (*Spondias mombin*) extracts. **Separation Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 580-590, 2019.
- DAMASCENO, E. T. S. et al. *Lippia origanoides* Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and p-coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 85-94, 2018.
- DONG, X. et al. Anti-inflammatory and antioxidant jasmonates and flavonoids from lychee seeds. **Journal of Functional Foods**, v. 54, p. 74-80, 2019.
- EL EUCH, S. K. et al. *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 253-260, 2019.
- ELGNDI, M. A. et al. Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 128-137, 2017.
- FARHAT, M. B. et al. Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 78-85, 2014.
- FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. Manual prático de coleta, herborização e preservação. **Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo**, 1984.
- FIGUEROA-ESPINOZA, M. C. et al. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. **Food chemistry**, v. 178, p. 38-44, 2015.
- GARDEN, Missouri Botanical. Tropicos. 2016. Web page at: (<http://www.tropicos.org>) (last accessed January 2016).

GHORBANI, A.; ESMAEILIZADEH, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 7, n. 4, p. 433-440, 2017.

GOMES JÚNIOR, A. L. et al. Anticonvulsant effect of anacardic acid in murine models: Putative role of GABAergic and antioxidant mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1686-1695, 2018.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B.. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, 2003.

HAJLAOUI, H. et al. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. **Microbial pathogenesis**, v. 95, p. 86-94, 2016.

HANANI, Z. N.; YEE, F. C.; NOR-KHAIZURA, M. A. R. Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 253-259, 2019.

JAMUNA, S. et al. Potential antioxidant and cytoprotective effects of essential oil extracted from *Cymbopogon citratus* on OxLDL and H₂O₂ LDL induced Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 2, p. 60-69, 2017.

JUNIOR, Q. S. et al. Free radical scavenging activity of ethanol leaves extracts of Anacardiaceae. **Semina ciência, biologia e saúde**, v. 38, n. 1, p. 99-104, 2017.

KAMPKE, E. H. et al. Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 59, p. 163-171, 2018.

KHARCHOUFI, S. et al. Antimicrobial and antioxidant features of Gabsi' pomegranate peel extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 345-352, 2018.

KHIYA, Z. et al. Valorization of the *Salvia officinalis* L. of the Morocco bioactive extracts: Phytochemistry, antioxidant activity and corrosion inhibition. **Journal of King Saud University-Science**, 2018.

KWEE, E. M.; NIEMEYER, E. D. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 1044-1050, 2011.

KUBO, I. et al. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 555-562, 2006.

LI, D. et al. Interactions of Some Common Flavonoid Antioxidants. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 2, 2019.

LUZI, F. et al. Effect of gallic acid and umbelliferone on thermal, mechanical, antioxidant and antimicrobial properties of poly (vinyl alcohol-co-ethylene) films. **Polymer degradation and stability**, v. 152, p. 162-176, 2018.

MACHADO, A. C. et al. Antioxidant Activity of a Medicinal Plant Extract from the Brazilian Forest: *Myracrodruon urundeuva*. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 76, p. S101, 2014.

MADRIGAL-CARBALLO, S. et al. Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 324-329, 2009.

MILOS, M.; MAKOTA, D. Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. **Food chemistry**, v. 131, n. 1, p. 296-299, 2012.

MIZUNO, M. et al. Synthesis and antioxidant activity of a procyanidin B3 analogue. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 4, p. 1041-1044, 2017.

MOON, K. M. et al. Swertiajaponin as an anti-browning and antioxidant flavonoid. **Food chemistry**, v. 252, p. 207-214, 2018.

MUÑOZ, M. et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 89-107, 2000.

MUÑOZ-LABRADOR, A.; PRODANOV, M.; VILLAMIEL, M. Effects of high intensity ultrasound on disaggregation of a macromolecular procyanidin-rich fraction from *Vitis vinifera* L. seed extract and evaluation of its antioxidant activity. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 50, p. 74-81, 2019.

NGUYEN, P. M.; KWEE, E. M.; NIEMEYER, E. D. Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1235-1241, 2010.

NUNES, M. R. et al. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 192, p. 37-43, 2018.

POKA P. L. et al. Biosynthesis, characterization and acute oral toxicity studies of synthesized iron oxide nanoparticles using ethanolic extract of *Centella asiatica* plant. **Materials Letters**, v. 236, p. 256-259, 2019.

RAJAN, V. K.; MURALEEDHARAN, K. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. **Food chemistry**, v. 220, p. 93-99, 2017.

RORIZ, C. L. et al. Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. **Food chemistry**, v. 185, p. 16-24, 2015.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E. Notas sobre o gênero *Lippia* (Verbenaceae) no Brasil. **Boletim de Botânica**, v. 33, p. 45-49, 2015.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SILVA, A. R. A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 2012.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTINEZ, J. R.. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 93-103, 2004.

SUZUKI, E. T. **Avaliação fenológica, análise econômica e estudo da cadeia produtiva da romã (*Punica granatum*)**. 2016. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista — Júlio de Mesquita Filho, São Paulo.

TAJAMMAL, A. et al. Synthesis, antihyperglycemic activity and computational studies of antioxidant chalcones and flavanones derived from 2, 5-dihydroxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, v. 1148, p. 512-520, 2017.

TELES, S. et al. *Lippia origanoides* HBK essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 217-225, 2014.

TIMÓTEO, P. et al. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food chemistry**, v. 175, p. 366-373, 2015.

TSHILANDA, D. D. et al. Chemo-type of essential oil of *Ocimum basilicum* L. from DR Congo and relative in vitro antioxidant potential to the polarity of crude extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 12, p. 1022-1028, 2016.

VIGNAULT, A. et al. Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution. **Food chemistry**, v. 268, p. 210-219, 2018.

VIEIRA, L. M. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.(Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas**, v. 17, n. 4, p. 521-527, 2015.

WANG, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of chalcone analogues with novel dual antioxidant mechanisms as potential anti-ischemic stroke agents. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n 2, p. 335-350, 2019.

WU, C. C. et al. Dietary administration of *Gynura bicolor* (Roxb. Willd.) DC water extract enhances immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 1, p. 25-33, 2015.

XIANG, J. et al. Hydroxycinnamic acid amide (HCAA) derivatives, flavonoid C-glycosides, phenolic acids and antioxidant properties of foxtail millet. **Food chemistry**, v. 295, p. 214-223, 2019.

YEN, H. Y.; LIN, Y. C. Green extraction of *Cymbopogon citrus* essential oil by solar energy. **Industrial crops and products**, v. 108, p. 716-721, 2017.

ZHELJAZKOV, V. D. et al. Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activity of the galbuli of six juniper species. **Industrial crops and products**, v. 124, p. 449-458, 2018.

ZHOU, P. et al. *In vitro* evaluation of the anti-digestion and antioxidant effects of grape seed procyanidins according to their degrees of polymerization. **Journal of functional foods**, v. 49, p. 85-95, 2018.

CAPÍTULO IV

Toxicidade aguda de óleos essenciais e extratos etanólicos de plantas em náuplios de *Artemia salina*

RESUMO

Os bioensaios com *Artemia salina* oferecem uma maneira rápida, simples e econômica de testar a toxicidade de produtos naturais oriundos de vegetais, como requisitos de monitoramento industrial ou para fins regulatórios. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial (OE) das plantas *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *L. origanoides*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, e do extrato etanólico (EE) das espécies *Myracrodruon urundeuva*, *Spondias mombin* e *Punica granatum*. Uma vez que este estudo compõe de uma série de testes com intuito de utilizar OEs e/ou EEs como suplementos alimentares para camarões marinhos, também foi verificada a toxicidade de dois suplementos alimentares comerciais para camarões marinhos (aditivo A e B). A coleta do material botânico foi realizada em Parnaíba, Piauí, Brasil (03° 05' 12,51S 041° 47' 01,21W). Os OEs e EEs foram diluídos em água do mar pré-filtrada, utilizando-se 0,1% de Tween 80 U.S.P. nas soluções com OEs, e 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO) nas soluções com EE. Para realização dos testes, 10 náuplios de *A. salina* foram adicionados em 200 µL soluções com diferentes concentrações de OE e EE. O experimento teve três grupos controle: controle 1: náuplios e água do mar filtrada; controle 2: náuplios e água do mar filtrada com Tween 0,1%; e controle 3: náuplios e água do mar filtrada com DMSO 1%. Todos os testes foram realizados em quadruplicata. Após 24 horas de incubação, o número de larvas vivas e mortas em cada poço foi contado. Por não haver mortalidade significativa nos testes com EEs após 24 horas, os resultados foram verificados após 48 horas. A concentração letal média (CL₅₀) foi determinada pela análise de regressão Probit com limites de confiança estabelecidos em 95%. Posteriormente, foi realizada análise de variância seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha < 0,05$) para verificação de diferenças significativas. Todos os OEs e suplementos alimentares para camarões marinhos utilizados nesta pesquisa foram classificados como tóxicos (CL₅₀ < 1000 µg.mL⁻¹) para *A. salina*. Enquanto os EEs, mesmo após 48 horas de incubação, são classificados como não tóxicos (CL₅₀ > 1000 µg.mL⁻¹). Os baixos índices de toxicidade constatados nos EEs abrem perspectivas para sua utilização em experimentos com camarões de cativeiro, de modo a investigar seus efeitos antimicrobianos no âmbito da aquicultura.

Palavras-chave: concentração letal média; náuplios; microplaca; toxicologia

ABSTRACT

Artemia salina bioassays provide a quick, simple and cost-effective way to test the toxicity of natural plant products, such as industrial monitoring requirements or for regulatory purposes. The objective of this study was to evaluate the acute toxicity of essential oils (EO) of *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *L. organoides*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, and ethanolic extract (EE) species of *Myracrodruon urundeuva*, *Spondias mombin* and *Punica granatum*. Since this study is part of a series of tests to use EOs and/or EEs as dietary supplements for shrimps, the toxicity of two commercial seafood supplements (additive A and B) was also verified. The botanical material was collected in Parnaíba, Piauí, Brazil (03° 05 '12,5 "S 041° 47' 01,2" W). The EOs and EEs were diluted in prefiltered seawater using 0.1% Tween 80 U.S.P. in solutions with EOs, and 1% Dimethylsulfoxide (DMSO) in solutions with EE. To perform the tests, ten *A. salina* nauplii were added in 200 µL solutions with different concentrations of EO and EE. The experiment had three control groups: control 1: nauplii and filtered seawater; control 2: nauplii and 0.1% Tween filtered seawater; and control 3: nauplii and 1% DMSO filtered seawater. All tests were performed in quadruplicate. After 24 hours of incubation, the number of live and dead larvae in each well was counted. As there was no significant mortality in the tests with EEs after 24 hours, the results were verified after 48 hours. The mean lethal concentration (LC₅₀) was determined by Probit regression analysis with 95% confidence limits. Subsequently, variance analysis was performed followed by Tukey's multiple comparisons test ($\alpha < 0.05$) to verify significant differences. All EOs and food supplements for sea shrimp used in this research were classified as toxic (LC₅₀ < 1000 µg.mL⁻¹) to *A. salina*. While EEs, even after 48 hours of incubation, are classified as non-toxic (LC₅₀ > 1000 µg.mL⁻¹). The low toxicity rates found in the EEs open perspectives for its use in experiments with captive shrimps, in order to investigate its antimicrobial effects on aquaculture.

Keywords: mean lethal concentration; microplate; nauplii; toxicology

1 INTRODUÇÃO

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (COSTA et al., 2008). Os testes de toxicidade aguda abrangem um período relativamente curto da vida de um organismo, que no caso de peixes, dáfnias, ratos e aves pode ser de 24 a 48 horas, e o efeito da amostra testada é medido com base no seu efeito letal (LANDIS et al., 2003). A concentração letal média (CL₅₀) é definida como a concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste, estimada por meio gráfico ou computacional (LANDIS et al., 2003; COSTA et al., 2008).

Atualmente, muitos estudos sobre a aplicação de plantas medicinais no controle de doenças e imunoestimulação em aquicultura estão sendo realizados (DASHTIANNASB; YEGANEH, 2017; TREJO-FLORES et al., 2016; PRABU et al., 2018; ZHAI; LI, 2019). O uso de plantas para fins medicinais, terapêuticos ou agrícolas (inseticidas, larvicidas) exige a realização de ensaios de toxicidade para verificar a segurança de sua utilização (ROSA et al., 2016; ZORAL et al., 2018).

Para entender melhor o comportamento de novos agentes terapêuticos, estudos sobre toxicidade são de grande importância, tendo em vista que a exposição a agentes tóxicos pode resultar no comprometimento da saúde dos organismos (KAMPKE et al., 2018). Embora muitos produtos à base de plantas possuam relevantes atividades biológicas, podem causar alguns efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos ou danos a órgãos (HALICIOGLU et al., 2011; SHIRMOHAMMADLIA; EFHAMISISIA; PIZZI, 2018). Alguns grupos de compostos extremamente tóxicos derivados de plantas podem incluir alcalóides, glicosídeos e ésteres de forbol (NDHLALA et al., 2013).

Os invertebrados são organismos experimentais úteis para estudar questões biológicas e toxicológicas que são mais difíceis ou demoradas de investigar usando mamíferos, devido às suas características biológicas únicas, tais como estruturas e sistemas corporais relativamente simples, ciclos de vida mais curtos e diversas estratégias reprodutivas (WU; LI, 2018). Os bioensaios com o crustáceo *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) oferecem uma maneira

rápida, simples e econômica de testar a toxicidade de produtos naturais oriundos de vegetais, como requisitos de monitoramento industrial ou para fins regulatórios (NUNES et al., 2006; BUSSMANN et al., 2011).

A principal razão pela qual este crustáceo de água salgada é amplamente utilizado para testes de toxicidade é devido à disponibilidade comercial de ovos dormentes (cistos), as larvas eclodidas dos cistos são utilizadas mundialmente na aquicultura como alimento vivo, os ovos dormentes permanecem viáveis por muitos anos e são, portanto, uma fonte biológica adequada para bioensaios rápidos, simples e baratos (NUNES et al., 2006; MAYORGA et al., 2010).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda em náuplios de *Artemia salina* dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson, *L. origanoides* Kunth, *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L., do extrato etanólico das espécies *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Spondias mombin* L., *Punica granatum* L. Essas foram as plantas que apresentaram melhor desempenho nos ensaios de atividade antimicrobiana descritas nos capítulos anteriores. Também foram realizados testes de toxicidade com dois produtos comerciais indicados como suplementos alimentares para camarões marinhos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As plantas foram coletadas em Parnaíba, Piauí, Brasil (03° 05' 12,511S 041° 47' 01,211W), no mês de março de 2018, no período da manhã. A herborização do material foi realizada conforme orientações descritas por Fidalgo e Bononi (1984). As espécies foram identificadas com base em chaves de identificação específicas disponíveis em bibliografias especializadas (CARMELLO-GUERREIRO; PAOLI, 1999; GOMES; NEGRELLE, 2003; SALIMENA; MÚLGURA, 2015; SUZUKI, 2016; CÂNDIDO et al., 2019). Exemplos já identificados pertencentes à coleção botânica do herbário HDelta também foram utilizados para auxiliar na identificação.

A classificação dos grupos foi realizada conforme sistema estabelecido pelo Angiosperm Phylogeny Group (APG IV, 2016). A correta grafia dos nomes científicos foi feita com base no banco de dados Missouri Botanical Garden (GARDEN, 2016). Exemplares das espécies vegetais coletadas foram depositados no acervo da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr (tabela 1). Os óleos essenciais de *S. officinalis* e *O. basilicum* foram adquiridos comercialmente e doados pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA).

Tabela 1 - Identificação e número de registro do herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr) das espécies vegetais coletadas para utilização neste estudo. EE = extrato etanólico; OE = óleo essencial.

Nome comum	Nome científico	Farmacógeno	Derivado	Registro HDelta
Alecrim pimenta	<i>Lippia origanoides</i> Kunth	Folhas	OE	5469
Aroeira	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Folhas	EE	5477
	Allemao	Casca/caule	EE	
Cajá	<i>Spondias mombin</i> L.	Casca/caule	EE	5465
Capim limão	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Folhas	OE	5472
Erva cidreira	<i>L. alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson	Folhas	OE	5466
Manjerição	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Folhas	OE	*
Romã	<i>Punica granatum</i> L.	Folhas	EE	5474
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	Folhas	OE	*

*Adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich).

Os procedimentos experimentais do presente trabalho foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas Animal (LACA) da Embrapa Meio-Norte, Parnaíba, Piauí, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo Conselho Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) (acesso n° A00721D).

2.2 Obtenção do óleo essencial

O material vegetal coletado (*Lippia alba*, *L. origanoides* e *Cymbopogon citratus*) foi seco em temperatura ambiente. O óleo essencial (OE) foi extraído das folhas secas de cada planta por meio de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo, seguindo recomendações de Yen e Lin (2017) com modificações. Para tal, foram adicionados 600 g de

folhas secas no balão de fundo redondo juntamente com 3500mL de água destilada. Após o início da ebulição da água o processo de extração foi mantido por 240 minutos. O OE extraído foi armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração até o momento das análises.

2.3 Obtenção do extrato etanólico (EE)

Os EEs foram obtidos conforme recomendações de Carvalho et al. (2019) e Poka et al. (2019), com modificações. O material coletado (casca do caule de *S. mombin* e *M. urundeuva*, e folhas de *P. granatum* e *M. urundeuva*) foi seco em estufa a 40°C com circulação de ar. O material seco foi triturado em um moinho de facas tipo cróton TE-650 (Tecnal). O pó obtido do farmacógeno de cada espécie foi misturado com etanol P. A. na proporção 1:4 (m/v) e agitado manualmente por 1 minuto. Após permanecer sob maceração estática por 24 horas, no escuro, o macerado bruto foi filtrado, descartando-se o pó residual. A solução etanólica filtrada foi concentrada em banho Maria a 40°C. O extrato concentrado foi aquecido em estufa a 40°C até a eliminação completa do solvente. O EE final foi mantido refrigerado até o momento das análises.

2.4 Toxicidade aguda - Concentração Letal (CL₅₀)

Os cistos de *Artemia salina* (INVE Aquaculture, Bélgica) foram mantidos a 5°C até a execução do experimento. A toxicidade dos OEs/EEs foi determinada utilizando *A. salina* recém-eclodida de cistos secos. Os cistos foram incubados em água do mar natural (salinidade 35 g/L; oxigênio dissolvido 5,3 mg/L; pH 8,2; e temperatura 27,5°C) previamente filtrada através de um filtro de porosidade de 0,22 µm em condições de iluminação e aeração contínuas. Após 24 horas os náuplios de *A. salina* foram separados das cascas dos ovos usando uma pipeta Pasteur. Os ensaios de toxicidade foram realizados em microplacas de 96 poços.

Os OEs foram diluídos em água do mar com 0,1% de Tween 80 U.S.P., e os EEs foram diluídos em água do mar com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). Toda água utilizada no experimento foi pré-filtrada em filtro de porosidade de 0,22 μm . Cada linha vertical da placa de 96 poços correspondeu a uma repetição do experimento, e em cada poço foram adicionados 200 μL de solução com OE ou EE e 10 náuplios de *A. salina*.

Os OEs/EEs foram testados nas concentrações de 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; e 15,6 $\mu\text{g/mL}$. O experimento contou com 3 grupos controle: controle 1 – contendo apenas náuplios e água do mar filtrada; controle 2 – contendo náuplios e água do mar filtrada com Tween 0,1%; controle 3 - contendo náuplios e água do mar filtrada com DMSO 1%.

Uma vez que este estudo faz parte de uma série de pré-testes com intuito de utilizar OEs e/ou EEs como suplementos alimentares para camarões marinhos, também foi verificada a toxicidade de dois suplementos alimentares comerciais para camarões marinhos, identificados como aditivo A e B. Cada teste de toxicidade aguda, inclusive os controles, foi realizado em quadruplicata.

Após 24 horas de incubação, em condições normais de fotoperíodo e temperatura ambiental variando de 27 a 30°C, o número de larvas vivas e mortas em cada poço foi contado, com auxílio de um microscópio estereoscópio. Foram consideradas mortas as larvas que não exibiram nenhum movimento interno ou externo ao longo de 30 segundos de observação. Por não haver mortalidade significativa nos testes com EEs após 24 horas, os resultados foram verificados após 48 horas. A classificação dos OEs/EEs seguiu os critérios estabelecidos por Meyer et al. (1982): —tóxicoll se $CL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e —não tóxicoll se $CL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.5 Análise estatística

A determinação da CL_{50} foi realizada pelo método de análise de regressão Probit com limites de confiança estabelecidos em 95% (FINNEY, 1971). Posteriormente uma one-way ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha < 0,05$) foi realizada para verificar diferenças significativas

entre a CL₅₀ dos EEs, OEs e dos aditivos comerciais. O teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) foi utilizado para verificar a distribuição dos dados quanto à normalidade. O software IBM-SPSS 20.0 foi utilizado para análise estatística.

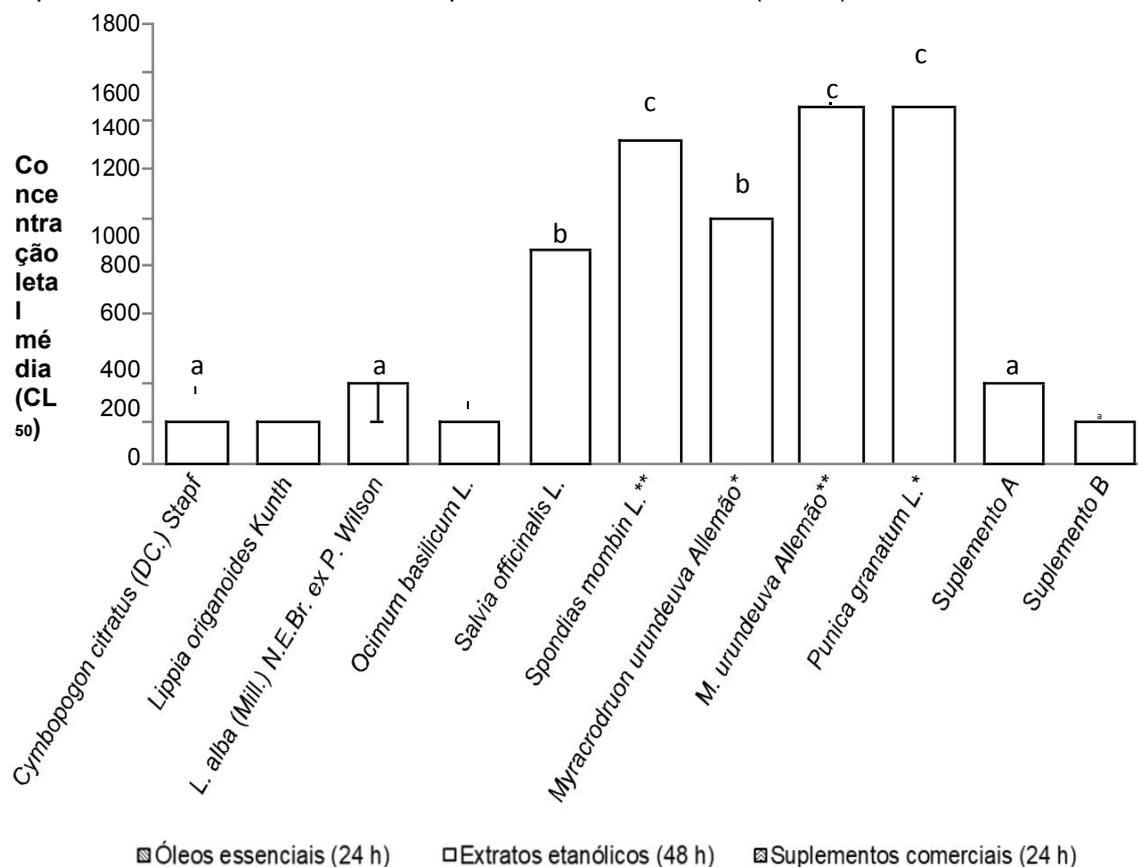
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme Meyer et al. (1982), todos os OEs e suplementos alimentares para camarões marinhos utilizados nesta pesquisa podem ser classificados como tóxicos para *A. salina* ($CL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Enquanto os EEs, mesmo após 48 horas de incubação, são classificados como não tóxicos ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Nos grupos controle não foi verificada mortalidade.

Os dados referentes à CL₅₀ dos OEs, EEs e suplementos comerciais tiveram distribuição normal, tal como avaliado pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). As diferenças entre grupos foram estatisticamente significativas $F(11, 46) = 338,83$, $p < 0,05$ (apêndice J). As CL₅₀ dos suplementos comerciais e OEs foram significativamente menores que as demais, e iguais entre si, com exceção do OE de *S. officinalis*, o qual foi estatisticamente igual a CL₅₀ do EE das folhas de *M. urundeuva* (Figura 1). A CL₅₀ do EE de *S. mombin* não teve diferença significativa entre o EE da casca do caule de *M. urundeuva* e das folhas de *P. granatum*.

Resumidamente, a CL₅₀ do aditivo A = aditivo B = OE de *C. citratus* = *L. origanoides* = *L. alba* = *O. basilicum* < *S. officinalis* = EE das folhas de *M. urundeuva* < *S. mombin* = EE da casca do caule de *M. urundeuva* = EE das folhas de *P. granatum*.

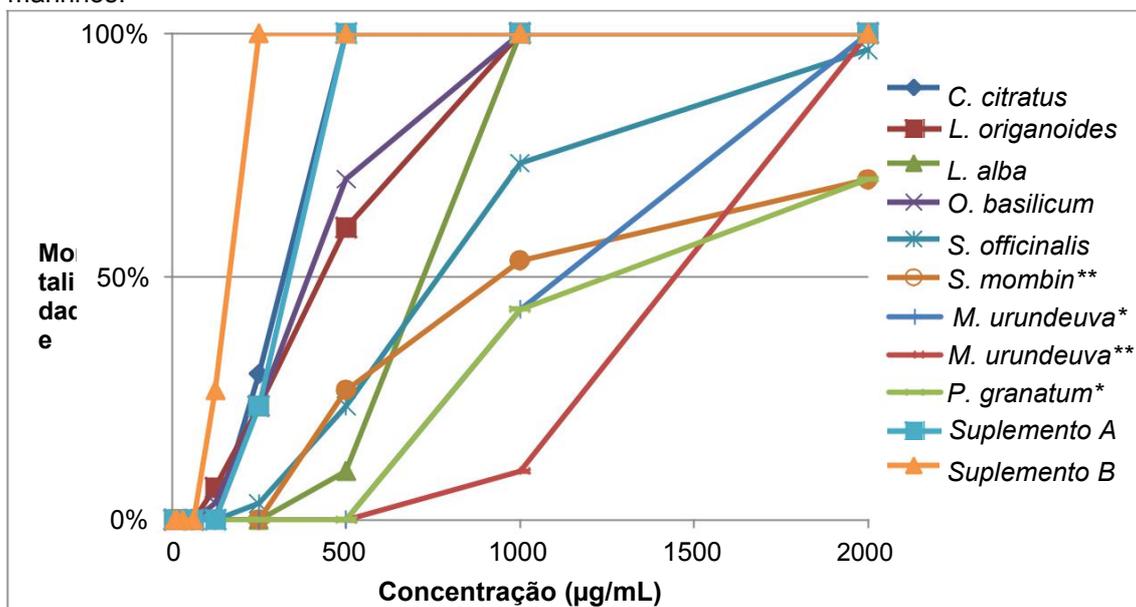
Figura 1 - CL₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) em náuplios de *Artemia salina* testando-se diferentes óleos essenciais (OE) e extratos etanólicos (EE) de plantas coletadas no Nordeste do Brasil e suplementos alimentares comerciais para camarões marinhos (SACM).



*EE das folhas; **EE da casca do caule. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Figura 2 é possível perceber que as curvas dose-resposta dos EEs são mais inclinadas, indicando maiores valores de CL₅₀, enquanto os OEs e suplementos alimentares comerciais possuem a curva mais vertical, indicando menores valores de CL₅₀, e, portanto maior toxicidade.

Figura 2 - Curva dose-resposta da mortalidade de náuplios de *Artemia salina* x concentração de óleo essencial, extrato etanólicos ou suplemento alimentar comercial para camarões marinhos.



*EE das folhas; ** EE da casca do caule.

O OE de *C. citratus* apresentou atividade biológica contra *A. salina* relatada por Queiroga et al. (2019), com CL₅₀ de 18,85 µg.mL⁻¹, enquanto o presente estudo verificou CL₅₀ de 279,46 ± 11,78 µg.mL⁻¹. O mirceno e citral, compostos comuns no OE de *C. citratus* já foram relatados com agentes tóxicos em ratos (DELGADO et al., 1993; NOGUEIRA et al., 1995).

Em testes de viabilidade de células ovarianas de hamster chinês (COHC) os OEs de *C. citratus* (rico em geranial, neral e mirceno) e *L. alba* (rico em geranial, neral e geraniol) foram classificados com baixa toxicidade durante o tratamento de 24 horas (TOFIÑO-RIVERA et al., 2016). Testando o OE de *C. citratus*, Kpoviessi et al. (2014) verificaram CL₅₀ moderada de 10,63 µg.mL⁻¹ em COHC, da mesma forma que seus constituintes majoritários, neral e geranial (CL₅₀ = 20,62 µg.mL⁻¹). Os mesmo autores também constataram forte toxicidade do β-pineno (CL₅₀ de 50 µg.mL⁻¹), outro componente encontrado no OE dessa espécie.

Efeitos tóxicos do OE de *L. origanoides* já foram relatados contra o inseto *Tribolium castaneum* de forma dose e tempo-dependente, pelo método de impregnação de papel filtro (CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2012). O OE de alecrim pimenta, tendo como constituintes

majoritários o carvacrol, timol e γ -terpineno, foi utilizado em um ensaio de toxicidade contra macrófagos peritoneais de camundongos, e não apresentou toxicidade forte contra células de mamíferos (concentração citotóxica - $CC_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (BORGES et al., 2012). Porém, em um ensaio de toxicidade utilizando *Artemia franciscana*, o OE de *L. origanoides* e *L. alba* apresentaram CL_{50} variando de $8,87-20,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10,29-34,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (OLIVERO-VERBEL; GÜETTE-FERNANDEZ; STASHENKO, 2009). No presente estudo, o OE de *L. alba* também foi considerado tóxico diante de *A. salina*.

O OE de *L. alba* já foi relatada com atividade biológica tóxica contra *A. salina* por Queiroga et al. (2019), com CL_{50} de $41,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contra $307,95 \pm 17,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ encontrada na presente pesquisa. Os efeitos tóxicos agudos do hidrolato de *L. alba* (rico em neral e geranial) foram testados por Maia et al. (2019) em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), constatando-se CL_{50-96h} de $74,3 \text{ mg.mL}^{-1}$, observando-se ao longo do período de teste a perda de íons e o aumento da densidade de células mucosas das brânquias.

A ação genotóxica do OE de erva cidreira (com predomínio de linalol, eucaliptol, γ -muuroleno e cariofileno em sua composição) foi observada por meio de um ensaio cometa nas doses de 100, 200 e 300 mg.Kg^{-1} , mostrando maior dano em peixes (*Oreochromis niloticus*) do que em mamíferos (*Mus musculus*) (KAMPKE et al., 2018). O citral e carvona, bem como OEs de *L. alba* contendo esses compostos como constituintes majoritários apresentaram efeitos tóxicos aos artrópodos *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*, sobretudo os compostos ricos em carvona, os quais podem ter sua toxicidade mediada por mecanismos neurológicos (PEIXOTO et al., 2015).

Em *A. salina*, Barbosa (2018) verificou que os efeitos tóxicos do OE de diferentes quimiotipos de *O. basilicum* proporcionaram CL_{50} variando de 47,13 a $562,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo quimiotipo rico em linalol responsável pelo CL_{50} de $520,35 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Outra pesquisa determinou CL_{50} do OE de *O. basilicum* em *A. salina* variando de 68,45 a $73,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que esses óleos também tinham predomínio de linalol (ALVES; FREIRE FILHO; MORAES, 2007). Enquanto o presente estudo verificou a dose letal capaz de eliminar 50% das amostras de *A. salina* foi de $218,10 \pm 11,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O OE dessa espécie, utilizado no presente estudo, também teve predomínio de linalol em sua

composição química. O linalol já foi descrito com capacidade de causar efeitos tóxicos em peixes, apresentando concentração letal média inferior a $46,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (PEREIRA et al., 2018), e efeitos larvicidas em *Aedes aegypti* (FUJIWARA et al., 2017).

Com predomínio de α -tujona e cânfora, o OE de *S. officinalis* foi descrito com baixa toxicidade para *A. salina*, indicando outros constituintes, presentes em menor quantidade, como responsáveis pelos efeitos tóxicos, apesar do melhor desempenho da atividade antimicrobiana dos compostos majoritários citados (RADULOVIC et al., 2017). Quando testado em suspensões de hepatócitos de ratos o OE de sálvia (rico em α -humuleno e tujona) não apresentou efeito tóxico (LIMA et al., 2004). Abd-Elmageed e Hussein (2008) verificaram forte efeito tóxico do extrato dessa planta em *A. salina* ($\text{CL}_{50} = 5,51 \pm 3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$), enquanto o presente estudo constatou efeito tóxico moderado ($\text{CL}_{50} = 896,60 \pm 32,74 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Diferentemente dos outros OEs testados, o OE de salvia apresentou o menor potencial tóxico.

Chaves et al. (2018), constataram CL_{50} do EE da casca do caule de *S. mombin* (rico em polifenóis) com moderada ação tóxica contra *A. salina* ($893,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Na presente pesquisa o EE da casca do caule dessa planta (rica em flavonas) apresentou $\text{CL}_{50} = 1339,88 \pm 32,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que segundo Meyer et al. (1982) é considerado não tóxico ($\text{CL}_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Enquanto Luna et al. (2005) constataram ação tóxica do extrato das sementes e *S. mombin* (rica em fenóis e flavonas). O referido estudo verificou correlação direta entre a toxicidade contra *A. salina* e seu efeito larvicida contra *Aedes aegypti*.

O extrato bruto hidroalcoólico da casca de *M. urundeuva* diante de *A. salina* foi mencionado como tóxico, com CL_{50} entre 20 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por Freitas et al. (2018). Utilizando náuplios de *A. salina* no 2º estágio larval, Lacerda et al. (2011) testaram a toxicidade do EE de folhas juntamente com galhos de *M. urundeuva* e observaram CL_{50} de $39,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Diferente dos trabalhos citados acima, o presente estudo verificou $\text{CL}_{50} = 1470,60 \pm 00,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (EE da casca do caule) e $\text{CL}_{50} = 1023,09 \pm 19,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (EE das folhas), considerados não tóxicos.

Os taninos, comumente presentes no EE de *M. urundeuva*, já foram mencionados por Libralato; Avezzu; Ghirardini (2011) como agentes tóxicos em *Phaeodactylum tricornutum*, uma microalga marinha, podendo causar

alterações em seu morfotipo e completa inibição do crescimento. Além disso, em mamíferos, altas doses de taninos podem causar náuseas, um provável resultado da ligação de proteínas no estômago, e quando presentes no sangue podem causar constipação, hepatotoxicidade ou danos a outros órgãos (SHIRMOHAMMADLIA; EFHAMISISIA; PIZZI, 2018).

A administração de ácido gálico, um dos principais componentes do EE de *M. urundeuva*, a ratos albinos propiciou dose letal média (DL₅₀) maior que 2000 mg.kg⁻¹, além de não causar alterações hematológicas e histopatológicas nos tecidos, indicando baixos níveis de toxicidade em mamíferos (VARIYA et al., 2019). A DL₅₀ do ácido anacárdico administrado a camundongos foi semelhante, apresentando DL₅₀ maior que 2000 mg.kg⁻¹, não produzindo quaisquer efeitos mutagênicos (CARVALHO et al., 2011).

Em outra pesquisa sobre toxicidade aguda, a fração de flavonóides de *Lithocarpus polystachyus* não causou sintomas tóxicos significativos, nem mortalidade em camundongos (LIANG et al., 2017; ZHANG et al., 2017), sendo considerado um composto pouco tóxico (NAGULA; WAIRKAR, 2019). Já as chalconas e seus derivados podem afetar células hepáticas humanas, com aumento dos efeitos pró-apoptóticos ou antiproliferativos (ZENGER et al., 2015). A baixa toxicidade verificada no EE das folhas de *M. urundeuva* obtido no presente estudo pode ser considerada reflexo de sua composição, o qual possui taninos hidrolisáveis, derivados de ácido gálico, ácidos anacárdicos e um biflavonol. Enquanto a presença de chalconas pode ser indicada como justificativa para o EE da casca dessa planta apresentar toxicidade estatisticamente maior, em relação ao EE das folhas.

Fontenele et al. (1988) verificaram que o extrato hidroalcoólico oriundo de *P. granatum* apresentou baixa toxicidade contra *A. salina*. Da mesma forma, De lima (2018) verificou CL₅₀ > 1000 µg. mL⁻¹ no EE das folhas de *P. granatum* diante de náuplios de *A. salina*. No extrato hidroalcoólico das frutas também foi verificado mesmo padrão de toxicidade contra esse microcrustáceo (HASAN et al., 2009). No presente trabalho a CL₅₀ obtida testando-se o EE das folhas de romã foi de 1504,13 ± 51,88 µg. mL⁻¹ utilizando o mesmo modelo animal. Assim, sugere-se que os produtos derivados da romã *P. granatum* podem apresentar, em geral, baixa toxicidade contra *A. salina*. Nascimento et al. (2009) considerou a presença de taninos determinante na baixa toxicidade

verificada no extrato de diferentes plantas medicinais contra *A. salina*. Tal fato foi verificado no EE das folhas de romã da presente pesquisa, com predomínio de taninos.

Os fabricantes dos suplementos alimentares A e B recomendam a dosagem de 1 mL.kg⁻¹ de ração e 1 a 5 mL.kg⁻¹ de ração, respectivamente. Tendo em vista uma taxa média de alimentação diária de 5% da biomassa de *Litopenaeus vannamei*, e a inserção de 5mL de suplemento em 1 kg de ração, significa que os animais receberiam a dose diária de suplemento de 0,25 µL.g de camarão⁻¹, e o uso de 1 mL.kg de ração⁻¹ resulta na dose de 0,05 µL.g de camarão⁻¹. Portanto, doses elevadas devem ser evitadas, a fim de não causar possíveis efeitos deletérios na saúde dos animais, tendo em vista o poder de toxicidade de tais aditivos. A composição química e bromatológica dos aditivos comerciais não são disponibilizadas no produto.

4 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que os OEs de *C. citratus*, *L. alba*, *L. origanoides*, *O. basilicum*, *S. officinalis*, bem como os suplementos alimentares comerciais possuem atividade tóxica contra náuplios de *A. salina*, e que os EEs de *M. urundeuva*, *S. mombin* e *P. granatum* não apresentam atividade toxica relevante.

Tendo em vista que os suplementos alimentares comerciais apresentaram os menores valores de CL₅₀, os demais produtos naturais testados possuem potencial de uso em camarões de aquicultura, desde que respeitada a dosagem. Pode-se sugerir que o grau de toxicidade verificado nos OEs e EES deve-se, principalmente aos compostos majoritários de sua composição.

Os baixos índices de toxicidade constatados nos EEs abrem perspectivas para sua utilização em experimentos com camarões de cativeiro, de modo a investigar seus efeitos no âmbito da aquicultura.

REFERÊNCIAS

ABD-ELMAGEED, M. A.; HUSSEIN, B. A. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Salvia officinalis* L. flowers. **Sudan Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 127-132, 2008.

ALVES, P. B.; FREIRE FLHO, P. S.; MORAES, V. R. S; Chemical composition of essential oil from seven *Ocimum basilicum* L. accessions, brine shrimp lethality bioassay and inhibitory activities against GAPDH and APRT. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 1, p. 89-92, 2007.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

BARBOSA, C. O. Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais e extratos alcoólicos das espécies *Ocimum* spp. (Manjerição) e *Curcuma longa* (açafraão da terra). 2018. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)** – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123-128, 2012.

BUSSMANN, R. W. et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 121-140, 2011.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, v. 50, p. 62-65, 2012.

CÂNDIDO, J. B. et al. Chave de identificação dendrológica das espécies mais comuns de uma área de Cerrado sensu stricto, Gurupi, Tocantins. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 347-362, 2019.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. S. Aspectos morfológicos e anatômicos da semente de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem.-Anacardiaceae), com notas sobre paquicalaza. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 222-228, 1999.

CARVALHO, A. L. N. et al. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.

CARVALHO, M. S. S. et al. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 90-98, 2019.

CHAVES, T. P. et al. Phytochemical composition and antimicrobial and toxicological activity of *Spondias mombin* L.(jobo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 23, n. 4, 2018.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DASHTIANNASAB, A.; YEGANEH, V. The effect of ethanol extract of a macroalgae *Laurencia snyderia* on growth parameters and vibriosis resistance in shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 16, n. 1, p. 210-221, 2017.

DE LIMA, D. C. A. Análise do perfil fitoquímico e da toxicidade de *Punica granatum* e *Morus nigra*. **Simpósio de Química**, [S.l.], mar. 2018. Disponível em: <<https://computacaoifg.com.br/gcisub/index.php/visimpquim/article/view/30>>. Acesso em: 08 set. 2019.

DELGADO, I. F. et al. Study on embryo-foetotoxicity of β -myrcene in the rat. **Food and chemical toxicology**, v. 31, n. 1, p. 31-35, 1993.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. Manual prático de coleta, herborização e preservação. **Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo**, 1984.

FINNEY, D. J. Probit analysis, Cambridge University Press. **Cambridge, UK**, 1971.

FONTENELE, A. de F. et al. Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina* Leach. **Ciênc. cult.(São Paulo)**, v. 40, n. 11, p. 1109-11, 1988.

FREITAS, R. F. et al. Perfil fitoquímico, ensaio microbiológico e toxicidade frente a *Artemia salina* do extrato da entrecasca da *Myracrodruon urundeuva* A. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 8, n. 3, p. 24-27, 2018.

FUJIWARA, Gislene M. et al. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 139, p. 238-244, 2017.

GARDEN, Missouri Botanical. Tropicos. 2016. Web page at: (<http://www.tropicos.org>)(last accessed January 2016).

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B.. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, 2003.

HALICIOGLU, O. et al. Toxicity of *Salvia officinalis* in a newborn and a child: an alarming report. **Pediatric neurology**, v. 45, n. 4, p. 259-260, 2011.

HASAN, R. et al. Antioxidant, antidiarrhoeal and cytotoxic properties of *Punica granatum* Linn. **Latin Am J Pharm**, v. 28, n. 5, p. 783-788, 2009.

KAMPKE, E. H. et al. Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 59, p. 163-171, 2018.

KPOVIESSI, S. et al. Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652-659, 2014.

LACERDA, A. M. et al. Screening de plantas com potencial fitotóxico. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 92, n. 4, p. 352-355, 2011.

LANDIS, Wayne et al. **Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems**. Crc Press, 2003.

LIANG, J. et al. Evaluation of toxicity studies of flavonoid fraction of lithocarpus polystachyus rehd in rodents. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 283-290, 2017.

LIBRALATO, G.; AVEZZÙ, F.; GHIRARDINI, A. V. Lignin and tannin toxicity to *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin). **Journal of hazardous materials**, v. 194, p. 435-439, 2011.

LIMA, C. F. et al. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. **Toxicology in vitro**, v. 18, n. 4, p. 457-465, 2004.

LUNA, J. de S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MAIA, J. L. S. et al. Hydrolate toxicity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) in juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its potential anaesthetic properties. **Aquaculture**, v. 503, p. 367-372, 2019.

MAYORGA, P. et al. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897-903, 2010.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

NAGULA, R. L.; WAIRKAR, S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of controlled release**, 2019.

NASCIMENTO, J. E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2009.

NDHLALA, A. R. et al. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 609-621, 2013.

NOGUEIRA, A. C. M. A. et al. Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat. **Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 105-113, 1995.

NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.

OLIVERO-VERBEL, J.; GUEETTE-FERNANDEZ, J.; STASHENKO, E. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 8, n. 5, 2009.

PEIXOTO, M. G. et al. Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 31-36, 2015.

PEREIRA, I. et al. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 566-578, 2018.

POKA P. L. et al. Biosynthesis, characterization and acute oral toxicity studies of synthesized iron oxide nanoparticles using ethanolic extract of *Centella asiatica* plant. **Materials Letters**, v. 236, p. 256-259, 2019.

PRABU, D. L. et al. Effect of dietary *Syzygium cumini* leaf powder on growth and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) and defense against virulent strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 489, p. 9-20, 2018.

QUEIROGA, I. M. B. N. et al. Characterization and application of *Lippia alba* (Mill) and *Cymbopogon citratus* DC Stapf. essential oils as natural sanitizers in coriander. **Food Science and Technology**, n. Ahead, 2019.

RADULOVIĆ, N. S. et al. Toxic essential oils. Part V: Behaviour modulating and toxic properties of thujones and thujone-containing essential oils of *Salvia officinalis* L., *Artemisia absinthium* L., *Thuja occidentalis* L. and *Tanacetum vulgare* L. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 355-369, 2017.

ROSA, C. S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2016.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E. Notas sobre o gênero *Lippia* (Verbenaceae) no Brasil. **Boletim de Botânica**, v. 33, p. 45-49, 2015.

SHIRMOHAMMADLI, Y.; EFHAMISISI, D.; PIZZI, A.. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 316-332, 2018.

SUZUKI, E. T. **Avaliação fenológica, análise econômica e estudo da cadeia produtiva da romã (*Punica granatum*)**. 2016. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filholl, São Paulo.

TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 749-754, 2016.

TREJO-FLORES, J. V. et al. Protective effect of *Aloe vera* in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 465, p. 60-64, 2016.

VARIYA, B. C. et al. Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 101, p. 71-78, 2019.

WU, J. P.; LI, M. H. The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies: Advantages and potential. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 161, p. 45-56, 2018.

YEN, H. Y.; LIN, Y. C. Green extraction of *Cymbopogon citratus* essential oil by solar energy. **Industrial crops and products**, v. 108, p. 716-721, 2017.

ZENGER, K. et al. In vitro structure-toxicity relationship of chalcones in human hepatic stellate cells. **Toxicology**, v. 336, p. 26-33, 2015.

ZHAI, Q.; LI, J. Effectiveness of traditional Chinese herbal medicine, San-Huang-San, in combination with enrofloxacin to treat AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 87, p. 360-370, 2019.

ZHANG, Z. et al. Evaluation of the sub-chronic toxicity of a standardized flavonoid extract of safflower in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 98-107, 2017.

ZORAL, M. A. et al. Toxicological effects and pharmacokinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract in common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 495, p. 955-960, 2018.

ANEXOS

ANEXO A - Comprovante de submissão de artigo para revista

Industrial Crops and Products



Luiz Gonzaga Alves dos Santos Filho <luizgonga@ufpi.edu.br>

Thank you for your submission to Industrial Crops and Products

1 mensagem

Industrial Crops and Products <eesserver@eesmail.elsevier.com>
 Responder a: Industrial Crops and Products <indcro@elsevier.com>
 Para: luizgonga@ufpi.edu.br

2 de julho de 2019 16:28

*** Automated email sent by the system ***

Dear Mr. Santos-Filho,

Thank you for sending your manuscript Essential oil composition, antioxidant and antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus* from five Lamiaceae species for consideration to Industrial Crops and Products. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for Industrial Crops and Products to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can be viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0926-6690/review_speed

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Industrial Crops and Products, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/INDCRO>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: luizgonga@ufpi.edu.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/INDCRO/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Industrial Crops and Products.

Kind regards,

Dr. Naceur Belgacem, Dr. Marisol Berti, Dr. Elisabete Frollini, Dr. Maria Pascual-Villalobos, Dr. Dennis Ray

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>

ANEXO B - Comprovante de submissão de artigo para revista

Industrial Crops and Products



Luiz Gonzaga Alves dos Santos Filho <luizgonga@ufpi.edu.br>

Thank you for your submission to Industrial Crops and Products

1 mensagem

Industrial Crops and Products <eesserver@eesmail.elsevier.com>
 Responder a: Industrial Crops and Products <indcro@elsevier.com>
 Para: luizgonga@ufpi.edu.br

24 de setembro de 2019 08:37

*** Automated email sent by the system ***

Dear Mr. Santos-Filho,

Thank you for sending your manuscript Chemical composition, antioxidant potential and acute toxicity of *Lippia alba* and *L. origanoides* essential oils and their antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus* for consideration to *Industrial Crops and Products*. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for *Industrial Crops and Products* to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0926-6690/review_speed

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of *Industrial Crops and Products*, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/INDCRO>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: luizgonga@ufpi.edu.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/INDCRO/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in *Industrial Crops and Products*.

Kind regards,

Dr. Naceur Belgacem, Dr. Marisol Berti, Dr. Elisabete Frollini, Dr. Maria Pascual-Villalobos, Dr. Dennis Ray

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and