

**Atividade antimicrobiana “in vitro” de óleos essenciais contra patógenos de peixes****"In vitro" antimicrobial activity of essential oils against fish pathogens**

DOI:10.34117/bjdv5n10-057

Recebimento dos originais: 10/09/2019

Aceitação para publicação: 04/10/2019

**Marina Ferreira Cardoso de Souza**Bolsista CNPq (Projeto BRS-Aqua): Graduação em Farmácia, UNIFAJ, Jaguariúna-SP  
marinacardoso373@gmail.com**Ana Lucia Penteado**Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP  
analucia.penteado@embrapa.br**Débora Renata Cassoli de Souza**Analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP  
debora.Cassoli@embrapa.br**Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz**Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP  
sonia.queiroz@embrapa.br**RESUMO**

Surto de doenças bacterianas têm atuado como importante fator limitante para a aquicultura, afetando a sua produção e, como consequência, diminuindo a produtividade. O tratamento dessas doenças é realizado por meio do uso de antibióticos sintéticos. No entanto, esses produtos estão associados ao risco de surgimento de microrganismos resistentes, além de poderem deixar resíduos das substâncias nos peixes, causando riscos potenciais à saúde humana e ao ambiente. Devido a isso, tem surgido a necessidade de realizar pesquisas por alternativas mais saudáveis e sustentáveis. Assim, extratos de plantas e óleos essenciais vêm sendo utilizados como fonte de novas moléculas bioativas. O objetivo desse trabalho foi investigar o potencial antimicrobiano de 31 óleos essenciais, adquiridos comercialmente, utilizando-se cepas referências de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) e de *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813). Para o bioensaio foi utilizado o método de disco difusão. Os resultados obtidos demonstraram alto potencial antimicrobiano de dois óleos essenciais para ambas as bactérias e as análises realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas detectaram a presença de compostos majoritários sendo: orégano (carvacrol e o-cimeno), tomilho (timol e o-cimeno).

**Palavras-chave:** Aquicultura; resistência antimicrobiana; produtos naturais; *Streptococcus agalactiae*; *Aeromonas hydrophila*.

## ABSTRACT

Outbreaks of bacterial diseases is an important limiting factor for aquaculture, affecting its production and, consequently, decreasing productivity. Synthetic antimicrobials are usually used to treat these diseases. However, these products are associated with the risk of emergence of resistant microorganisms, and may leave residues of the substances in fish, causing potential risks to human health and the environment. Consequently, there has been a need to search for healthier and more sustainable alternatives. Thus, plants extracts and essential oils have been used as a source of new bioactive molecules. The objective of this work was to investigate the antimicrobial potential of 31 commercially acquired essential oils using references strains of *Aeromonas hydrophila* (ATCC) 7966 and *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813). The diffusion disc method was used for the bioassay. The results showed high antimicrobial potential of two essential oils for both bacteria and the analyzes performed by gas chromatography coupled to-mass spectrometry detected the presence of major compounds: orégano (carvacrol and o-cymene), thyme (thymol and o-cymene).

**Keywords:** Aquaculture; microbial resistance; natural products; *Streptococcus agalactiae*; *Aeromonas hydrophila*.

## 1 INTRODUCTION

Os antimicrobianos sintéticos são fundamentais no tratamento de doenças e na proteção da saúde humana e animal, incluindo peixes produzidos por meio de sistemas aquícolas. No entanto, estão geralmente associados ao potencial risco de surgimento e disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos. Além disso, podem deixar resíduos das substâncias nos peixes, causando riscos à saúde humana devido ao consumo desses alimentos e também ao meio ambiente.

Surtos de doenças causadas por microrganismos, como as doenças bacterianas têm atuado como importante fator limitante para a aquicultura, afetando a produção com consequente queda na produtividade (WATTS et al., 2017), gerando perdas econômicas significativas. Espécies dos gêneros *Streptococcus* spp. e de *Aeromonas* spp., como cepas de *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* estão entre as bactérias mais frequentemente isoladas em peixes (FIGUEIREDO; LEAL, 2008; TURKER et al., 2009; ZAMRI-SAAD et al., 2014).

*Aeromonas hydrophila* é um patógeno oportunista gram-negativo, comumente associados com peixes de águas limpas (SAHOO et al., 2008), que ocasionam pequenas lesões superficiais, hemorragia local e septicemia (YIN et al., 1996; DA SILVA et al., 2012). Cepas de *A. hydrophila*,

isoladas de diferentes localidades, foram reportadas como resistentes a diversos antimicrobianos (VIVEKANANDHAN et al., 2002).

*Streptococcus agalactiae* é classificado como *Streptococcus* do sorogrupo B, catalase negativo, Gram-positivo, na forma de cocos, e tem sido isolado de várias espécies de peixes doentes em surtos naturais (EVANS, et al., 2002). Peixes infectados com esta bactéria apresentam sintomas clínicos como anorexia, hemorragia e anormalidades esqueléticas, que afetam a qualidade e a produção na aquicultura (PASNIK et al., 2007).

Segundo a FAO (2018), é esperado um aumento na produção de peixes originados de sistemas aquícolas, que atingirá 109 milhões de toneladas em 2030. Espera-se, ainda, que a participação de espécies cultivadas na produção mundial de pescado exceda pela primeira vez em 2020 os de espécies selvagens, e em 2030 aumente para 54%. Assim, para atender ao crescente aumento na demanda por produção de peixes, faz-se necessária a descoberta de novos compostos com propriedades antimicrobianas, que sejam eficientes e seguros, para substituir os sintéticos comerciais.

As pesquisas por substâncias bioativas de origem natural para o tratamento de doenças de peixes têm sido incentivadas, e têm sido utilizadas como fontes de novas moléculas de óleos essenciais e extratos botânicos (VALLADÃO, 2014). A vantagem de usar plantas como fonte de moléculas é que elas apresentam grande variabilidade nas estruturas dos compostos, sendo que, muitas vezes, demonstram sinergia entre as moléculas e novos mecanismos de ação, tornando-os funcionalmente versáteis (YAP et al., 2014).

Com a possibilidade de queda na produção de peixes causada pelo surgimento de cepas de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos sintéticos, é necessária a descoberta de novas substâncias com propriedade antimicrobiana. Além disso, o mercado consumidor está cada vez mais exigente com relação à ausência de resíduos desses fármacos sintéticos nos alimentos.

Assim o objetivo desse trabalho foi investigar o potencial antibacteriano de 34 óleos essenciais comerciais utilizando-se cepas de referência padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) e de *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente no período de outubro de 2018 a maio de 2019.

## 2.1 ENSAIO DISCO DIFUSÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados com cepas de *A. hydrophila* (ATCC 7966) e *S. agalactiae* (ATCC 13813) em triplicata e tomou-se a média dos resultados obtidos, observando-se a uniformidade da técnica para minimizar erros experimentais.

Utilizou-se o método de disco difusão descrito por Kirby-Bauer (CLSI, 2006; HUDZICKI, 2009) em meio Mueller Hinton (MH) para avaliação da atividade antimicrobiana de 31 óleos essenciais, adquiridos comercialmente, com seus respectivos laudos técnicos de qualidade sendo eles: abeto, alecrim cerrado, alecrim premium, anis estrelado, bergamota, camomila azul, canela do himalaia, capim limão, cedro, cipestre, citronela, cravo, erva doce, eucalipto, citrodora, eucalipto glóbulos, gengibre, gerânio, “grapefruit”, hortelã verde, jasmim sambac, junípero, limão siciliano, melaleuca, olibano, orégano, patchouli, ravensara, sálvia esclaréia, sândalo amyris, tomilho e vetiver.

As cepas bacterianas foram repicadas 24 horas antes da realização dos testes em meio Ágar triptona soja (TSA) e incubadas em estufa bacteriológica a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ajustou-se a densidade do inóculo pelo método de suspensão direta em 5,0 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) para padrão de turbidez 0,5 McFarland, ou seja, aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, com o auxílio do equipamento Densimat®.

Mergulhou-se um swab estéril no tubo de NaCl 0,85% contendo a suspensão do inóculo e comprimiu-se contra a parede interna do tubo para retirar o excesso da solução. Em uma placa contendo meio MH realizou-se espalhamento com o swab três vezes em toda a superfície do ágar, girando a placa em  $60^\circ$  três vezes para garantir uma distribuição uniforme do inóculo. A tampa da placa foi mantida aberta por 3 minutos para secagem da superfície.

Colocaram-se discos de papel-filtro estéreis sobre a superfície do ágar pressionando suavemente com uma pinça e adicionou-se a quantidade de 5  $\mu\text{L}$  de óleo essencial. Discos comerciais de florfenicol na concentração de 30  $\mu\text{g}/\text{disco}$ , que é um antibiótico comumente aplicado na aquicultura, foi utilizado como controle negativo para avaliar a sensibilidade das cepas e como controle positivo utilizou-se o meio MH com o microrganismo somente. As placas foram incubadas invertidas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas para avaliar a inibição do crescimento bacteriano, por meio da medição dos halos.

Como parâmetros para a atividade antibacteriana dos óleos essenciais foram utilizados os padrões de sensibilidade adotados por Ponce et. al. (2003) com adaptações, que classificaram a atividade dos diferentes óleos essenciais de acordo com o tamanho do halo de inibição (Tabela 1).

Nos óleos em que as bactérias foram classificadas como extremamente sensíveis e cujo tamanho de halo foi superior ao do florfenicol ( $\geq 35$  mm) realizou-se análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para identificação dos compostos presentes em cada óleo essencial.

Tabela 1. Parâmetros para a determinação da atividade antibacteriana utilizando como padrão de sensibilidade a classificação descrita por Ponce et. al. (2003) com adaptações.

**Padrão de sensibilidade para determinação da atividade antibacteriana**

Classificação	Tamanho de halo (mm)	Expressão
Não sensível	$\leq 10$	-
Sensível	11-20	+
Muito sensível	21-34	++
Extremamente sensível	$\geq 35$	+++

Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Os óleos essenciais que apresentaram melhores resultados após testes de susceptibilidade para atividade antibacteriana, foram analisados utilizando um equipamento cromatógrafo gasoso (GC) Agilent, 7890B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) com uma coluna instalada HP-5MS ultra inerte (30m x 0,25mm d.i., 0,25  $\mu$ m), também da Agilent.

A temperatura do forno foi programada inicialmente a 50°C durante 2 minutos e com rampa de 3°C/min até 230°C durante 20 minutos e 30°C/min até 300°C por 10 minutos. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi de 220°C em modo *splitless* e volume de injeção de 1  $\mu$ L.

O espectrômetro de massas, acoplado ao GC, Agilent 5977B (MSD) com fonte de ionização por elétrons (70eV) foi utilizado em modo scan (40-500 *m/z*). A temperatura da fonte foi de 280°C e da transferline 300°C. Os índices de retenção foram calculados utilizando uma série homóloga de *n*-Alcanos C7-C40, injetada nas mesmas condições das amostras.

A caracterização dos óleos essenciais foi realizada através do cálculo do índice de retenção (IR) e comparação com os valores descritos por Adams (2009). Através do *software* Agilent Mass Hunter Workstation Quantitative Analysis Unknowns Analysis (versão 10.0-2016-2018) foi

analisado o espectro de cada pico do cromatograma e comparado com os espectros de massa da base de dados NIST17- *Mass Spectral Search Program* (versão 2.3, 2017).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem aumentado a preocupação com relação ao surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos e a presença de resíduos dessas drogas veterinárias nos alimentos à base de pescado (MONTEIRO, 2014) e isso se deve principalmente ao uso indiscriminado desses produtos na aquicultura (CABELLO, 2006). Neste sentido, uma possível alternativa seriam os óleos essenciais, pois são biodegradáveis e seus componentes naturais são menos propensos ao desenvolvimento de resistência microbiana (KULKARNI et al., 2013).

Na avaliação da atividade antibacteriana para *A. hydrophila* dois (2) óleos demonstraram ser extremamente sensíveis (+++): orégano e tomilho.; nove (9) óleos demonstraram ser muito sensíveis (++) : canela do himalaia, capim limão, cravo, eucalipto citriodora, grapefruit, hortelã verde, melaleuca, ravensara e sálvia esclaréia.; nove (9) foram sensíveis: alecrim premium, anis estrelado, camomila azul, citronela, erva doce, eucalipto glóbulos, patchouli, sândalo amyris e vetiver.; e onze (11) óleos essenciais não foram sensíveis: gerânio, cedro, bergamota, cipestre, abeto, olibano, junípero, alecrim cerrado, gengibre, limão siciliano e jasmim sambac (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados da classificação da sensibilidade da cepa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) em relação à atividade antibacteriana dos óleos essenciais, classificados conforme o padrão de sensibilidade adaptado de Ponce et. al. (2003).

Óleos essenciais	Classificação
Orégano, tomilho.	Extremamente sensível (+++)
Canela do himalaia, capim limão, cravo, eucalipto citriodora, grapefruit, hortelã verde, melaleuca, ravensara, sálvia esclaréia.	Muito sensível (++)
Alecrim premium, anis estrelado, camomila azul, citronela, erva doce, eucalipto glóbulos, patchouli, sândalo amyris, vetiver.	Sensível (+)
Gerânio, cedro, bergamota, cipestre, abeto, olibano, junípero, alecrim cerrado, gengibre, limão siciliano, jasmim sambac.	Não sensível (-)

Já, em relação ao *S. agalactiae*, dois (2) óleos demonstraram ser extremamente sensíveis (+++): orégano e tomilho.; dez (10) óleos demonstraram ser muito sensíveis (++) : capim limão, cipestre, cedro, citronela, “grapefruit”, hortelã verde, junípero, olibano, patchouli e sândalo

amyris; dezesseis (16) foram sensíveis: abeto, alecrim cerrado, alecrim premium, anis estrelado, bergamota, camomila azul, cravo, erva doce, eucalipto citriodora, eucalipto glóbulos, gengibre, gerânio, limão siciliano, melaleuca, sálvia Esclaréia e vetiver.; e três (3) óleos essenciais não foram sensíveis: canela do himalaia, jamim sambac e ravensara (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da classificação da sensibilidade da cepa de *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813) em relação à atividade antibacteriana dos óleos essenciais, classificados conforme o padrão de sensibilidade adaptado de Ponte et. al. (2003).

Óleos essenciais	Classificação
Orégano, tomilho.	Extremamente sensível (++++)
Capim limão, cipestre, cedro, citronela, grapefruit, hortelã verde, nípero, olibano, patchouli, sândalo amyris.	Muito sensível (++)
Abeto, alecrim cerrado, alecrim premium, anis estrelado, bergamota, camomila azul, cravo, erva doce, eucalipto citriodora, eucalipto glóbulos, gengibre, gerânio, limão siciliano, melaleuca, sálvia Esclaréia, vetiver.	Sensível (+)
Canela do himalaia, jamim sambac, ravensara.	Não sensível (-)

Selecionaram-se os óleos essenciais, que demonstraram alto potencial antibacteriano para ambas as cepas avaliadas e classificadas como extremamente sensíveis, são: orégano e tomilho, para realizar análises por GC-MS e determinar os compostos majoritários presentes (Tabela 4), são os

óleos que têm maior potencial para serem formulados e posteriormente usados na aquicultura como terapêuticos.

Tabela 4. Composição química dos óleos essenciais, analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

N <sub>o</sub>	t <sub>ret</sub> , min	Composto	IR <sub>exp</sub> (A %)	IR <sub>exp</sub> (A %)	IR <sub>lit</sub>
			Orégano	Tomilho	
01	11,7	$\alpha$ -pineno	934 (1,3)	932 (3,0)	932
02	12,8	benzaldeido	-	-	952
03	14,1	Mirceno	991 (0,9)	991 (1,12)	998
04	14,6	Octanal	-	-	1003
05	15,7	<i>p</i> -Cimeno	1026 (18,8)	1025 (35,6)	1022
06	17,2	$\gamma$ -terpineno	1060 (3,1)	1060 (3,2)	1054

07	19,1	Linalol	1100 (2,0)	1100 (3,6)	1098
08	23,9	<i>n</i> -decanal	-	-	1201
09	25,2	Timol metil eter	-	-	1232
10	25,9	Timoquinona	-	1252 (0,53)	1248
11	26,4	2-decenal (E)	-	-	1260
12	27,0	Cinamaldeido (E)	-	-	1267
13	27,7	Timol	1292 (3,9)	1292 (45,5)	1289
14	28,1	Carvacrol	1305 (69,1)	1302 (5,23)	1298
15	28,4	undecanal	-	-	1305
16	30,8	2-undecenal	-	-	1357
17	32,7	dodecanal	-	-	1408
18	33,3	Cariofileno	1425 (0,1)	1425 (0,50)	1417
19	33,9	Cumarina			1432
20	34,2	Cinamil acetato (E)			1443
21	35,0	2-dodecenal (E)			1464
22	37,6	<i>o</i> -Metoxy cinamaldeido (E)			1527
23	39,7	Cariofileno oxido	1589 (0,8)	1589 (0,29)	1582

$t_{ret}$ : tempo de retenção;  $IR_{lit}$ - Índice de retenção da literatura (Adams, 2009).  $IR_{exp}$ , Índice de retenção determinado utilizando uma série de *n*-alcanos C7-C40. Coluna capilar HP5-MSUi (30mx0,25mm d.i., 0.25 $\mu$ m). A%: porcentagem de área considerando 100% dos picos identificados.

O óleo essencial de orégano evidenciou altas quantidades de carvacrol (69,1%) e *o*-cimeno (18,8%). Conforme descrito por Rodrigues (2002), análises de diversas amostras em diferentes lugares do mundo detectaram o carvacrol como um dos componentes majoritários no orégano. O óleo essencial de tomilho denotou maior quantidade de timol (45,5%) e *p*-Cimeno (35,6%) corroborando com os dados das análises de Rocha et al. (2012) em que avaliou-se a presença de 60% de timol e 10,10% de *p*-cimeno. Os óleos extraídos de orégano e tomilho tem potencial antimicrobiano significativo para *S. aureus* uma cepa isolada de mastite caprina (DAL POZZO et. al., 2011)

Assim, esses óleos, ou seus componentes isolados, possuem grande potencial de uso como antimicrobianos na aquicultura, podendo vir a ser tecnologias mais seguras e mais saudáveis com menor impacto ambiental, além de não induzir à geração de bactérias resistentes. Cabe salientar que esses óleos são provenientes de plantas utilizadas comumente na culinária, portanto com baixo risco à saúde humana.

#### 4 CONCLUSÃO

Os óleos de orégano e tomilho apresentaram alto potencial de inibição *in vitro* de cepas referência de *A. hydrophila* e *S. agalactiae*. Estes resultados poderão ser úteis para o



desenvolvimento de medicamentos alternativos aos antibióticos sintéticos para uso na aquicultura.

### AGRADECIMENTOS

A autora agradece o ao CNPq pela bolsa concedida e ao projeto financiado pela Embrapa e BNDES BRS-AQUA (N°0117020010308). Agradece também as orientações das pesquisadoras recebidas diariamente que contribuem para o desenvolvimento do pensamento científico.

### REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, 4th Edition, **Allured Business Media**, Illinois, USA, 2009.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2006. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard— 9th<sup>ed</sup>**. CLSI document M2-A9. 26:1. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

DA SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBA, A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 908–916, 2012.

DAL POZZO, M.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp.* isolados de mastite caprina. **Cienc. Rural** [online], v. 41, n. 4, p. 667-672, 2001.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; GILBERT, P. M.; SHOEMAKER, C. A.; SARAWI, M. A. AL.; LANDSBERG, J.; DUREMDEZ, R.; MARZOUK, A. AL.; ZENKI, S. AL. Characterization of b-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 505–513, 2002.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2018. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible.** Roma. p. 204-215.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **R. Bras. Zootec.**, v.37, suplemento especial p. 08-14, 2008.

HUDZICKI, J. **Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol.** American Society for Microbiology, 2009.

KULKARNI, R. R.; PAWAR, P. V.; JOSEPH, M. P.; AKULWAD, A. K.; SEN, A.; JOSHI, S. *P. Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 4, 2013.

MONTEIRO, S. H. **Ocorrência de antibióticos e estudo de resistência microbiana em sistemas aquaculturais do Rio Paraná, Reservatório de Ilha Solteira, na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo.** Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, University of São Paulo, Piracicaba, 2014.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H. Development of skeletal deformities in a *Streptococcus agalactiae*-challenged male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish and in its offspring. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.**, v. 27, n. 5, p. 169, 2007.

PONCE, A. G.; FRITZ, R.; VALLE, C.; ROURA, S. I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie**, v. 36, p. 679-684, 2003.

ROCHA. R. P.; MELO, E. C.; CORBÍN, J. B.; BARBOSA, L. C. A.; BERBET, P. A. Influência do processo de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de tomilho. **VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais, Ponta Grossa-PR**, 2012.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano.** Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química, 2002.

SAHOO, P.K., MAHAPATRA, K.D., SAHA, J.N., BARAT, A., SAHOO, M., MOHANTY, B.R., GJERDE, B., ODEGARD, J., RYE, R., SALTE, R.. Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, Labeo rohita. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 163–169, 2008.

TURKER, H.; YILDIRIM, A. B.; KARAKAŞ, F. P. Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants., **Turk. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 9, n. 2, p. 181-186, 2009.

VALLADÃO, G. M. R. **Potencial de óleos essenciais de plantas para o tratamento de enfermidade em peixes.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura. Jaboticabal, 2014.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, n. 1-2, p. 165–168, 2002.

WATTS, J. E. M.; SCHREIER, H. J.; LANSKA, L.; HALE, M. S. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. **Mar. Drugs**, v. 15, n. 6, p. 158, 2017.

YAP, P. S. X.; YIAP, B. C.; PING, H. C.; LIM, S. H. E. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **Open Microbiol J.**, v. 8, p. 6–14, 2014.

YIN, Z.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. The role of specific antiserum of catfish, *Clarias gariepinus* as a defence against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 6, n. 1, p. 57–69, 1996.

ZAMRI-SAAD, M.; AMAL, M. N. A.; SITI-ZAHRAH, A.; ZULKAFI, A. R. Control and Prevention of *Streptococcus* in Cultured Tilapia in Malaysia: A Review., **Pertanika J. Trop. Agric. Sci.**, v. 37, n. 4, p.389-410, 2014.