



Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* frente *Aeromonas* spp. isoladas do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Anti-bio film activity of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* and *Mentha piperita* against *Aeromonas* spp. isolated from the Amazonian fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Actividad antibiofilm de los aceites esenciales de *Melaleuca alternifolia* y *Mentha piperita* frente a *Aeromonas* spp. aisladas del pez amazónico Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Patriky Pereira da Silva¹, Gláucia Manoella de Souza Lima², Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório³, Bruno Mendes Tenório³, Ryan Cristian da Silva¹, Maria Clara Moraes Cavalcanti¹, Yasmin Antonelle Correia Lira¹, Rayssa Nilma da Silva Alves¹, Diego Santa Clara Marques², Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho¹.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a capacidade de formação de biofilme, como característica de virulência das cepas de *Aeromonas* spp. previamente isoladas do Tambaqui e a atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita*. **Métodos:** Cepas de *Aeromonas hydrophila*, *veronii*, *caviae* e *dhakensis*, anteriormente preservadas em óleo mineral, foram reativadas e preservadas em Ágar Nutriente. Para avaliação dos biofilmes, foi feita a diluição das colônias, padronização de células no espectrofotômetro e distribuição nas placas de 96 poços. Foi usado Tween 80 a 1% como diluente dos óleos e usado a CMI dos óleos na diluição seriada. Após 24h em estufa, foram feitas as lavagens das placas, fixação dos poços e coloração. As cepas foram classificadas de acordo com a capacidade de aderência. **Resultados:** Cepas de *A. veronii* e *A. caviae* não apresentaram aderência. As demais cepas de *A. dhakensis*, *A. caviae* e *A. hydrophila* foram classificadas como "fracamente aderente, 2 das 4 cepas de *A. hydrophila* se classificaram como "moderadamente aderente". **Conclusão:** Os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* apresentaram atividade antibiofilme. O óleo de *Melaleuca alternifolia* teve uma melhor atividade sobre as cepas de *A. dhakensis* tendo 78% de inibição em uma das cepas.

Palavras-chave: *Aeromonas*, Tambaqui, Biofilme, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita*

ABSTRACT

Objective: To evaluate the biofilm-forming ability, as a virulence trait, of *Aeromonas* spp. strains previously isolated from Tambaqui, and the antibiofilm activity of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* and *Mentha piperita*. **Methods:** Strains of *Aeromonas hydrophila*, *veronii*, *caviae*, and *dhakensis*, previously preserved in mineral oil, were reactivated and maintained in Nutrient Agar. For biofilm evaluation, colonies were diluted, cell density was standardized using a spectrophotometer, and samples were distributed in 96-well plates. Tween 80 at 1% was used as a diluent for the oils, and the MIC of the oils was used in serial dilution. After 24 hours of incubation, plates were washed, wells were fixed, and staining was performed. Strains were classified according to their adherence ability. **Results:** Strains of *A. veronii* and *A. caviae* showed no adherence. The remaining strains of *A. dhakensis*, *A. caviae*, and *A. hydrophila* were classified as "weakly adherent," with 2 out of 4 *A. hydrophila* strains classified as "moderately adherent." **Conclusion:** The essential oils of *Melaleuca alternifolia* and *Mentha piperita* exhibited antibiofilm activity. *Melaleuca alternifolia* oil showed higher activity against *A. dhakensis*, with 78% inhibition in one strain.

Keywords: *Aeromonas*, Tambaqui, Biofilm, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita*.

¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Bioquímica, Recife - PE.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la capacidad de formación de biofilm, como característica de virulencia, de cepas de *Aeromonas spp.* Previamente aisladas del Tambaqui, y la actividad antibiofilm de los aceites esenciales de *Melaleuca alternifolia* y *Mentha piperita*. **Métodos:** Cepas de *Aeromonas hydrophila*, *veronii*, *caviae* y *dhakensis*, previamente reservadas en aceite mineral, fueron reactivadas y mantenidas en Agar Nutriente. Para la evaluación de biofilms, las colonias fueron diluidas, la densidad celular se estandarizó en un espectro fotómetro y se distribuyeron en placas de 96 pocillos. Se utilizó Tween 80 al 1% como diluyente de los aceites, y la CIM de los aceites se utilizó en diluciones seriadas. Después de 24 horas de incubación, las placas fueron lavadas, los pocillos fijados y se realizó la tinción. Las cepas se clasificaron según su capacidad de adherencia. **Resultados:** Cepas de *A. veronii* y *A. caviae* no mostraron adherencia. Las demás cepas de *A. dhakensis*, *A. caviae* y *A. hydrophila* se clasificaron como "débilmente adherentes", con 2 de las 4 cepas de *A. hydrophila* clasificadas como "moderadamente adherentes". **Conclusión:** Los aceites esenciales de *Melaleuca alternifolia* y *Mentha piperita* presentaron actividad antibiofilm. El aceite de *Melaleuca alternifolia* mostró mayor actividad contra cepas de *A. dhakensis*, con un 78% de inhibición en una de las cepas.

Palabras clave: *Aeromonas*, Tambaqui, Biofilm, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita*.

INTRODUÇÃO

O *Colossoma macropomum* (Tambaqui) está entre as espécies mais cultivadas em países tropicais. É o segundo peixe mais cultivado no Brasil (FAO, 2020) e é apontado como dono de um grande potencial econômico no mercado não apenas nacional, como global, podendo se tornar uma verdadeira commodity brasileira (HILSDORF AW et al., 2022). Originário das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (SOUZA RGC, et al. 2016), é um dos principais produtos envolvidos na atividade aquícola nacional (CARVALHO EVMM, et al. 2014). O Tambaqui tornou-se o peixe símbolo da Amazônia porque ele incorpora, em uma única espécie, parte dos problemas que precisam ser resolvidos para se manejar a pesca e, ao mesmo tempo, desenvolver a aquicultura (KUBTZA F, 2010).

A aquicultura é uma das atividades agropecuárias que mais se desenvolve e, dentre seus ramos, a piscicultura (produção de peixes), ganha destaque (TAVARES-DIAS M e MARIANO WS, 2015). Porém o uso indiscriminado de antibióticos causa impactos negativos nos ambientes aquáticos. A classe dos antibióticos é a que desperta maior preocupação, pois mesmo uma baixa concentração de um determinado antibiótico por longos períodos pode induzir o surgimento de bactérias resistentes (HERNANDEZ F, et al., 2007). O uso excessivo e não controlado de antimicrobianos em animais tem consequências na saúde pública, tendo transformado a resistência aos antimicrobianos num preocupante problema global (GASTALHO S, et al., 2014).

O manejo inadequado dos espécimes, na piscicultura, pode ocasionar estresse aos peixes, agravando mais a saúde desses animais enfermos, que muitas vezes já estão bastante debilitados pela ação dos parasitos e patógenos (BOWER CK e DAESCHEL MA, 1999). Para isso são usados antibióticos que podem influenciar negativamente o meio ambiente. Por isso, o uso de produtos naturais derivados de plantas, como os óleos essenciais, tem sido descrito como anti estressantes, promotores de crescimento e imuno estimuladores, além de conter propriedades antimicrobianas devido a compostos presentes como terpenos e esteroides (KUMAR S, et al., 2013). Fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, como também pela constância de sua qualidade (LEITE MC e CROZARA MA, 2015).

Desde os primórdios da existência humana, os homens buscam na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida (BALLICK M e COX P, 1997). Porém pesquisas realizadas em várias partes do mundo têm demonstrado que extratos de alguns vegetais ou substâncias puras obtidas deles têm efeito positivo no controle e prevenção de doenças em animais aquáticos, bem como, melhoram a imunidade dos mesmos. O uso de fitoterápicos surge como uma alternativa ao tratamento com antibióticos, haja vista que produz um menor impacto ambiental, reduz a quantidade de resíduos químicos nos animais, são menos tóxicos e possuem diversas propriedades biológicas capazes de impedir o crescimento e disseminação de patógenos (FUJIMOTO RY, et al., 2012). Os óleos essenciais são líquidos ou semilíquidos voláteis (STRINGARO A, et al., 2018).

São extraídos de plantas aromáticas e podem ser sintetizados por qualquer parte da planta, como cavidades e canais, e são conhecidos por suas funções antissépticas, bactericidas e medicinais (BAKKALI F, et al., 2008). Além disso, são biodegradáveis e devido a seus multicomponentes naturais são menos propensos a causar o desenvolvimento de resistência bacteriana (KULKARNI RR, et al., 2013). A *Melaleuca alternifolia*, comumente conhecida como “Tea tree”, é uma árvore pequena da família Myrtaceae nativa da Austrália (BOROTOVAP, et al., 2022). Enquanto toda a estrutura acima do solo é colhida e transformada em biomassa, apenas as folhas contribuem para os constituintes no óleo de Tea tree, que são extraídos por destilação a vapor.

O OE resultante possui mais de 100 componentes, onde o terpinen-4-ol é encontrado em maior concentração, e um odor medicinal único e distinto com aroma de cânfora (GROOT AC e Smith E (2016); RHIND J, 2020). Estudos relataram benefícios positivos do OEMA (Óleo de *Melaleuca alternifolia*) contra uma variedade de bactérias, fungos e protozoários. Evidências in vitro demonstraram que o óleo possui atividade antimicrobiana de amplo espectro, bem como ações antifúngicas e antivirais, e aumenta o fluxo sanguíneo periférico.

Propõe-se que o OEMA altere a integridade e a permeabilidade da parede celular das bactérias, iniba a respiração celular e altere a capacidade das células de manter condições de equilíbrio, inibindo funções relacionadas ao crescimento e replicação celular (KAIREY L, et al., 2023). É bastante utilizado como remédio para acometimentos na pele, bem como acne, eczema, picadas de inseto (GROOTAC e SMITH E, 2016).

A *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) é uma planta perene que está amplamente distribuída pela região do Mediterrâneo e em regiões temperadas do mundo (HUSSAIN AI, et al., 2010). A hortelã-pimenta, é uma planta da família Lamiaceae e a muito tempo é considerada economicamente importante pois é amplamente utilizada na indústria alimentícia e cosmética devido às suas propriedades aromatizantes (MOGOSAN C, et al., 2017).

O OEMP (Óleo essencial de *Mentha piperita*) é composto principalmente por mentol, mentona, mentofurano, 1,8-cineol e acetato de mentila, porém fatores como condições fisiológicas e ambientais, genéticas e evolução, podem determinar a variabilidade química do óleo essencial de hortelã-pimenta (CAMELEI, et al., 2021).

A Agência Europeia de Medicamentos (AEM) reconhece várias propriedades farmacológicas do óleo essencial de *Mentha piperita*, incluindo o alívio de sintomas de tosse e resfriados, o tratamento de dores musculares e neuralgias, bem como aqueles relacionados a distúrbios gastrointestinais (alívio de dor abdominal, flatulência, sensação de repleção, obstipação e diarreia). Outros efeitos biológicos identificados para *M. piperita* incluem atividades inseticidas, antibacterianas, antivirais, antialérgicas, antioxidantes e citotóxicas (DOLGHI A, et al., 2022).

Entre as bactérias que acometem os peixes de água doce destaca-se o gênero *Aeromonas*, que são consideradas como patógenos emergentes e autóctones de ambientes aquáticos, desse modo, o contato com peixes e outros frutos do mar é desenvolvido quase que inevitavelmente (HU M, et al., 2012; IGBINOSA A, et al., 2012). Responsáveis por surtos infecciosos frequentes e durante o diagnóstico muitas vezes aparecem como o agente primário causa dor de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica nos peixes de água doce (PESSOA RGB, et al., 2019; SAHA D e PAL J, 2002; BARONY GM, et al., 2015).

O biofilme é constituído por microrganismos sésseis que produzem uma matriz composta por polímeros orgânicos e hidratados, com a finalidade de se defender das intempéries do ambiente externo (variação de pH, temperatura, ação de agentes químicos e físicos), das respostas inatas e adquiridas e da ação de antimicrobianos dentro do organismo (CLUTTERBUCK AI, et al., 2007).

A capacidade de formar biofilmes não é expressa por todas as bactérias; portanto, é importante conhecer esses microrganismos formadores de biofilmes, pois a manifestação desse fenótipo é uma forma de resistência e transmissão de doenças. Diante disso, torna-se necessário buscar novos métodos terapêuticos para a piscicultura, a fim de evitar a contaminação do meio ambiente, promover alternativas à perda de espécimes e prevenir possíveis infecções em humanos.

MÉTODOS

Reativação das cepas bacterianas

Foram utilizadas, neste trabalho, 10 cepas bacterianas isoladas das brânquias de tambaqui sem estresse (*Colossoma macropomum*) e previamente identificadas, por métodos bioquímicos e moleculares, como *Aeromonas* spp. (MARQUES DSC et al., 2016; PESSOA RBG, et al., 2020). As cepas foram repicadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubadas em estufa agitadora a 37°C por 24 horas.

Posteriormente, cada cepa foi semeada em Ágar Nutriente para obtenção de colônias puras e isoladas, incubadas a 37°C por 24 horas. Após análise das características macroscópicas, as colônias obtidas foram semeadas em placas e tubos de ensaio contendo Ágar Nutriente para serem utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho. A identificação em nível de gênero e espécie foi realizada por Marques DSC (2015) e seguiu a metodologia padrão de testes fisiológicos e bioquímicos.

Avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados

A formação do biofilme foi avaliada pela técnica descrita por Stepanovic et al. 2000. Os isolados de dez cepas de *Aeromonas* spp. isoladas do peixe tambaqui foram cultivados em caldo BHI por 24h a 37°C. Posteriormente, 200 µL de cada suspensão bacteriana foi aplicada em placas de 96 poços de fundo plano. O experimento foi realizado em triplicata utilizando também um controle negativo. As placas foram incubadas por 24h a 37°C, o conteúdo do poço foi removido e cada poço foi lavado com 250 µL de solução salina 0,9%.

Posteriormente, foi realizada fixação com 200 µL de metanol absoluto por 15 min. O metanol foi removido e as placas secaram em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram coradas com 200 µL de cristal violeta durante 5 min. Novamente, cada poço foi lavado por três vezes com solução salina 0,9% e mantido à temperatura ambiente para secagem. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA, comprimento de onda 570 nm e as amostras foram classificadas de acordo com critérios estabelecidos por Stepanovic et al. (2000).

O valor da densidade ótica (DO_i) foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro categorias: não aderente (DO_i ≤ DO_c); fracamente aderente (+) (DO_i < DO_c ≤ 2 x DO_c); moderadamente aderente (++) (2 x DO_c < DO_i ≤ 4 x DO_c) ou fortemente aderente (+++) (4 x DO_c < DO_i).

Ensaio antibiofilme

Para realização do ensaio de atividade de anti biofilme foi utilizado um protocolo adaptado de Antunes ALS, et al. (2010), que se baseia na utilização do cristal violeta em placas de micro titulação de 96 poços. Foi usado para diluição dos óleos Tween 80 a 1%. Neste ensaio foram adicionados em cada poço as suspensões decada bactéria (concentração final 10⁶ UFC/mL), 10 µL dos óleos essenciais *Melaleuca alternifoliae* *Mentha piperita* (em diferentes concentrações baseados no CMI de cada microrganismo (1x mic, 2x mic e 4x mic) e 150 µL de caldo Mueller Hinton. Um poço foi reservado para o controle de esterilidade do meio de cultura e controle de crescimento do biofilme (controle positivo).

As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e o conteúdo dos poços foi removido. Posteriormente, cada poço foi lavado três vezes com solução salina esterilizada. As bactérias que permaneceram aderidas foram fixadas com metanol absoluto por 20 min, aquecidas a 50 °C durante 60 min, e então coradas com cristal violeta a 0,4 % por 25 minutos à temperatura ambiente.

O excesso de corante foi removido com água destilada, o corante que se ligou ao biofilme foi solubilizado com etanol absoluto por 15 min e a absorbância medida com densidade ótica de 570 nm (Leitor de Elisa Polaris®). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição de formação de biofilme para cada concentração foi determinada de acordo com a fórmula descrita por Jadhav et al. 2013:

$$\% \text{inibição} = 100 - \frac{\text{OD } 570 \text{ nm amostra}}{\text{OD } 570 \text{ nm controle}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas cepas de *A. dakhensis*, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*. Segundo Pessoa RGB (2023), as espécies de *Aeromonas* mais frequentemente associadas a doenças em humanos são *A. hydrophila* (14,5%), *A. caviae* (37,6%), *A. veronii* (27,2%) e *A. dhakensis* (16,5%), representando cerca de 96% dos casos de gastroenterite. Os estudos apresentados sobre o fator de virulência das *Aeromonas* reiteram a importância da investigação da formação de biofilmes, por essas 10 cepas reativadas, nos tecidos do Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Seguindo o método de Stepanovic et al (2000), as cepas isoladas foram classificadas, como mostra a **Tabela 1**, de acordo com sua capacidade de formação de biofilme.

Tabela 1 - Classificação das cepas de *Aeromonas* spp. quanto à formação de biofilme.

Cepas bacterianas	Classificação
E2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)	Fracamente aderente
E1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)	Fracamente aderente
E1/26 (<i>Aeromonas caviae</i>)	Não aderente
E1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	Fracamente aderente
E3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	Fracamente aderente
E1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Fracamente aderente
E2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Moderadamente aderente
E2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Fracamente aderente
E2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	Moderadamente aderente
E2/24 (<i>Aeromonas veronii</i>)	Não aderente

Fonte: Silva PP, et al., 2025.

Beaz-Hidalgo (2013) relata que todas as espécies de *Aeromonas* móveis produzem um único flagelo polar, que permite que as bactérias nadem em ambientes líquidos. Quando as bactérias crescem em ambientes ou superfícies viscosas, desenvolvem múltiplos flagelos laterais que aumentam a aderência e a formação de biofilme. Esses dois sistemas flagelares foram estudados em várias cepas específicas, como *A. caviae* e *A. hydrophila*. Na **Tabela 1** pode-se observar que os resultados estão de acordo com o estudo citado.

Duas das três cepas de *A. caviae* (E 2/17 e E 1/18) se apresentaram como “fracamente aderente” e apenas a cepa E 1/26 não apresentou aderência. *A. caviae* é citada em trabalhos como Lamy B, et al. (2010) com uma das cepas capazes de interferir na saúde humana. Sua capacidade de produção de biofilme prova que a cepa apresenta um potencial de infecção e adesão a tecidos. Gallani SU, et al. (2020) diz que entre as bactérias que causam doenças em peixes, a *Aeromonas hydrophila* destaca-se como uma das principais causas de mortalidade de peixes na aquicultura. Na tabela, nota-se que todas as quatro cepas de *A. hydrophila* apresentam-se como “fracamente aderente” (E1/14 e E2/35) e “moderadamente aderente” (E2/2 e E2/15) o que corrobora com os resultados de Lynch (2002) de que *Aeromonas hydrophila* forma biofilmes em aço inoxidável com uma arquitetura característica.

El-Hossary D et al (2023) diz que as cepas de *A. hydrophila* representam um sério risco para a saúde pública pois o potencial de prever doenças está correlacionado com o número de genes de virulência presentes e a presença de genes de virulência está principalmente associada à patogenicidade da *A. hydrophila*. Adesinas, hemaglutininas e várias enzimas hidrolíticas estão envolvidas na patogênese das espécies de *Aeromonas*. Nos últimos anos, cepas de *A. dhakensis* chamaram atenção de cientistas após o relato de duas mortes por bacteremia e fascíte necrosante em Taiwan. De acordo com a **Tabela 1**, as cepas E1/45 e E3/36 foram classificadas como “fracamente aderente” porém trabalhos recentes relatam que *A. dhakensis* é mais patogênica do que outras espécies de *Aeromonas*, pois tem um efeito citotóxico mais alto demonstrado danos rápidos aos tecidos.

A cepa de *Aeromonas veronii* (E2/24) não apresentou aderência, porém Pessoa RGB (2020) analisou que *A. veronii* é uma potencial produtora de hemolisinas e até foi a causa de uma pneumonia letal que culminou com a síndrome hemofagocítica em um paciente imunocompetente em histórico de contato com fontes conhecidas de contaminação. Depois de analisadas a capacidade de formação de biofilme dos isolados, as cepas que apresentaram aderência foram submetidas ao teste anti biofilme com os óleos essenciais

Melaleuca alternifolia *Mentha piperita*. As cepas que não apresentaram aderência não foram submetidas ao teste. Para essa etapa, foram utilizados os resultados da CMI (Concentração Mínima Inibitória) de cada óleo anteriormente testada por Lima RO (2019). Os valores da CMI obtidos nos testes estão apresentados na (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração Mínima Inibitória (%) dos óleos essenciais frente *Aeromonas*.

Concentração mínima inibitória (%)		
Cepas bacterianas	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Mentha piperita</i>
E2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)	0,125	0,25
E1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)	0,125	0,25
E1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	0,125	0,125
E2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0,125	0,25
E3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	0,125	0,25
E1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0,25	0,25
E1/26 (<i>Aeromonas caviae</i>)	0,125	0,25
E2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0,5	0,5
E2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0,25	0,25
E2/24 (<i>Aeromonas veronii</i>)	0,125	0,125

Fonte: Lima RO, 2019 (adaptado).

As Tabelas 3 e 4 mostrarão os resultados dos ensaios com a *Melaleuca alternifolia* e a *Mentha piperita* respectivamente. Vários estudos indicam o terpinen-4-ol, presente em mais de 30% da composição do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, como o principal constituinte responsável pela atividade antimicrobiana em diferentes microrganismos, o que é reforçada em estudos como o de Francisconi RS (2020) que comprovou a inibição de biofilmes de *Candida albicans* pelo óleo essencial.

É notável a capacidade de inibição que OEMA apresenta sobre parte das cepas descritas na (Tabela 3). *A. dhakensis*, anteriormente dita como uma das mais citotóxicas, sofreu inibição. Vê-se que a E1/45 já sofre uma inibição importante com apenas 1x o CMI porém a cepa E3/36 apresenta um resultado intrigante pois o percentual de inibição cai de 22,4% (1x CMI) para 21,7% (2x CMI) e sobe de maneira discreta para 21,9% (4x CMI). As duas cepas de *A. caviae* responderam ao teste de maneiras distintas. A cepa E2/17 teve uma inibição leve de apenas 23,3% em 1x CMI, caiu para 22,6% (2x CMI) e sobe, de maneira significativa, para 45,2% em 4x CMI. Já a cepa E1/18 não sofreu inibição.

As quatro cepas de *A. hydrophila* também apresentaram resultados diferentes. A cepa E2/2, que sofreu maior inibição, apresentou uma queda de 70,3% (1x CMI) para 53,7% (2x CMI) e, em seguida, subiu para 86,6% (4x CMI). A cepa E 1/14 teve um aumento expressivo de 44,4% (1x CMI) para 85,4% (2x CMI) porém caiu para 84,8% (4x CMI). Ambas as cepas apresentaram resultados satisfatórios. E 2/35 não sofreu inibição em 1x CMI e apresentou uma discreta inibição de apenas 23,4% (2x CMI). E2/15 não sofreu inibição em 1x e 2x o CMI, mas sofreu uma leve inibição de 23,4% em 4x CMI.

Tabela 3 - Valores de inibição (%) de biofilmes pelo óleo essencial *Melaleuca alternifolia*.

Valores de inibição (%) - <i>Melaleuca alternifolia</i>			
Cepas bacterianas	1x CMI	2x CMI	4x CMI
E 2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)	23,3	22,6	45,2
E 1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)	S/A	S/A	S/A
E 1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	78	82,9	85
E 2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	70,3	53,7	86,6
E 3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	22,4	21,7	21,9
E 1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	44,4	85,4	84,8
E 2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	S/A	23,4	S/R
E 2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	S/A	S/A	23,4

Fonte: Silva PP, et al., 2025. Legenda: - S/A: Sem atividade; N/T: Não testado.

O mentol, presente no OEMP, é um terpenóide que é o principal agente bioativo da família das mentas, possui propriedades antissépticas, antibacterianas, antitumorais e antialérgicas. Sua propriedade antibacteriana foi extensivamente estudada contra algumas cepas patogênicas e não patogênicas por vários

autores. Na **Tabela 4**, pode-se ver que o OEMP apresenta atividade anti biofilme frente às cepas. Diferente dos valores apresentados com o OEMA, as cepas de *A.caviae* foram as que apresentaram o maior índice de inibição. E2/17 e E1/18 tiveram resultados parecidos em 1x CMI (65,3% e 65% respectivamente), 2x CMI (70,4% e 70% respectivamente) e uma pequena diferença em 4x CMI (72,7% e 82,3% respectivamente) demonstrando, assim, uma boa atividade do óleo.

As cepas de *A. dhakensis*, E1/45 e E3/36, sofreram inibição de maneira diferente. E1/45 apresentou uma crescente nos valores de inibição de acordo com o aumento da CMI (34,7%(1x);46,6% (2x); 70,4%(4x)) apresentando resultados satisfatórios. A cepa E3/36 manteve-se em uma constante com pouca variação de índice de inibição. Os resultados caíram, de maneira discreta, entre 1x e 2x (72,9% e 72,1% respectivamente) e aumento em 4x CMI (74,2%). As cepas de *A. hydrophila* foram as que sofreram menos inibição, porém se apresentam de maneiras diferentes.

E 2/2 sofreu apenas 12,6% de inibição na concentração 1x do CMI, porém apresentou um crescimento em 2x (43,3%) e 4x (46%). E 1/14 também apresentou uma baixa inibição na concentração 1x (11,4%), teve um aumento em 2x (34,6%) mas caiu em 4x (31,7%). As cepas E 2/35 e E 2/15 obtiveram resultados não tão satisfatórios. E 2/35 teve um decaimento de, pelo menos, 50% entre as concentrações 1x e 2x (11,1% e 5,5% respectivamente). E 2/15 também houve queda de acordo com o aumento das concentrações (14,8% (1x); 8,9% (2x)) e não sofreu inibição na concentração 4x.

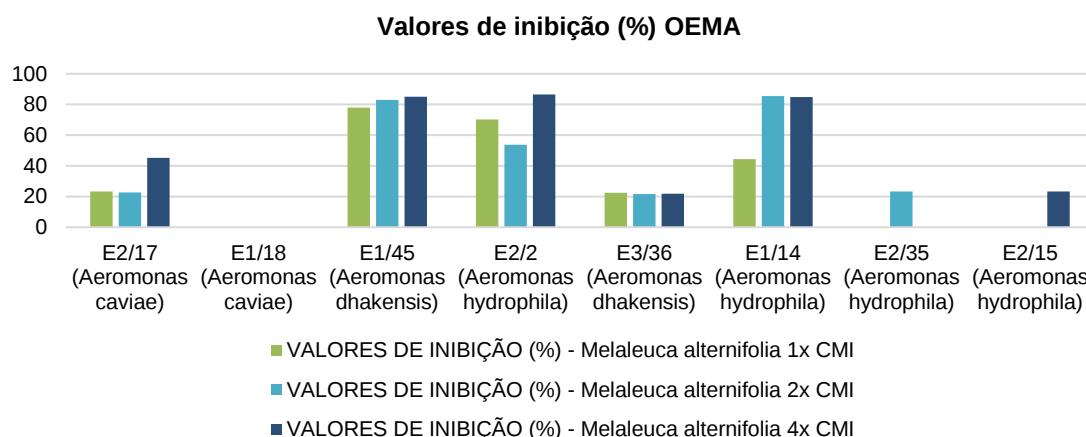
Tabela 4 - Valores de inibição (%) de biofilmes pelo óleo essencial *Menthapiperita*.

Valores de inibição (%) - <i>Menthapiperita</i>			
Cepas bacterianas	1x CMI	2x CMI	4x CMI
E 2/17 (<i>Aeromonas caviae</i>)	65,3	70,4	72,7
E 1/18 (<i>Aeromonas caviae</i>)	65	70	82,3
E 1/45 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	34,7	46,6	70,4
E 2/2 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	12,6	43,3	46
E 3/36 (<i>Aeromonas dhakensis</i>)	72,9	72,1	74,2
E 1/14 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	11,4	34,6	31,7
E 2/35 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	11,1	5,5	N/T
E 2/15 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	14,8	8,9	S/A

Fonte: Silva PP, et al., 2025. **Legenda:** - S/A: Sem atividade; N/T: Não testado.

Analisando o **Gráfico 1**, vê-se que em algumas cepas inibidas pelo OEMA, houve queda na porcentagem de inibição na concentração 2x (E2/17, E2/2 e E3/36).

Gráfico 1 - Valores de inibição (%) de biofilmes pelo OEMA.



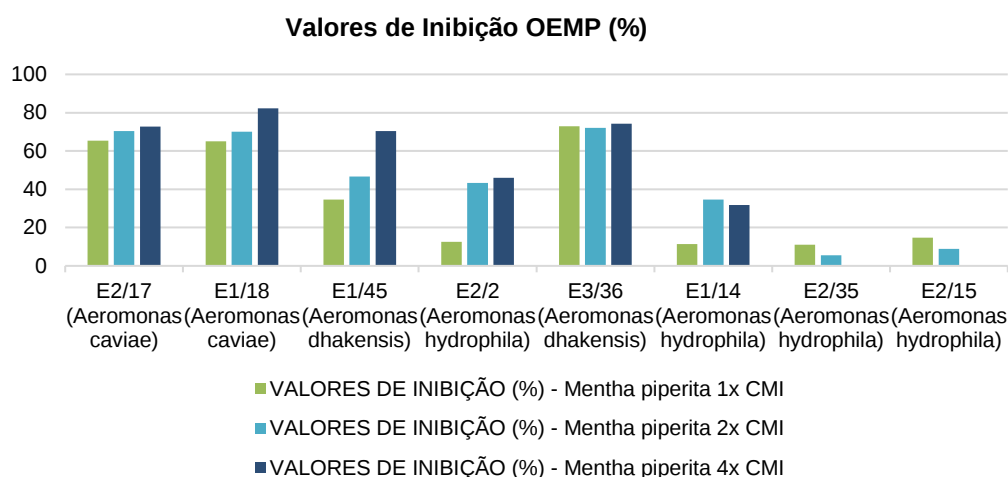
Fonte: Silva PP, et al., 2025.

Mesmo apresentando uma queda na concentração 2x, essas três cepas voltam a apresentar aumento na inibição concentração 4x elas. El-Hossary D (2023), diz que as bactérias *Aeromonas* formam biofilmes como

resposta a circunstâncias ambientais específicas, o que pode explicar tais quedas nas porcentagens em concentração 2x uma vez que é característico das *Aeromonas* spp. se adequarem ao ambiente em que estão inseridas. É visto que cepas como E1/18, E2/15 e E2/35 não apresentaram a inibição desejada pelo OEMA. A falta de atividade do óleo pode estar relacionada a fatores como a patogenicidade das cepas, mas também a questões de interação bioquímica entre o óleo e a cepa no processo de inibição.

Outro caso de inatividade na inibição de biofilme pelo OEMA foi citado por Silva CDS et al (2019) que testou a inibição de *Listeria monocytogenes* pelo OEMA em carne moída. O estudo apontou que o OEMA não foi eficaz em amostras inoculadas com suspensão a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, independentemente do tempo de armazenamento. No entanto, com suspensões em menor concentração como de suspensão, como $4,6 \times 10^4$ UFC/mL, o número de células viáveis diminui sendo, assim, uma compensação entre a interação do óleo com a matriz e o espaço livre para atuar contra o menor número de cepas inoculadas na amostra. No caso do OEMP os resultados foram mais consistentes como mostra o **Gráfico 2**.

Gráfico 2 - Valores de inibição (%) de biofilmes pelo OEMA.



Fonte: Silva PP, et al., 2025.

O óleo apresentou uma inibição satisfatória sobre as oito cepas com destaques para E2/17e E1/18 (*Aeromonas caviae*). Ejaz R, et al. (2020) avaliou a atividade do mentol, componente antimicrobiano presente no OEMP, frente às cepas de *P. aeruginosa* e *B. subtilis* e concluiu que o mentol, presente no óleo, apresentou uma inibição razoável do biofilme, enquanto a inibição máxima de 99,5% foi alcançada pelo extrato bruto de mentol. Esse resultado ilustra que o OEMP pode ser usado para alterar a resistência aos antibióticos de muitos micróbios causadores de doenças. Mesmo como uma baixa porcentagem de inibição, o OEMP também mostra potencial para inibição das cepas de *A. hydrophyla*.

CONCLUSÃO

Os óleos essenciais *Melaleuca alternifolia* e *Mentha piperita* apresentaram resultados satisfatórios de inibição das cepas, porém estudos são necessários para entender, de uma forma mais clara, a relação dos óleos com a inibição dos biofilmes. Testes bioquímicos, genéticos e microscopia eletrônica, por exemplo, podem ajudara entender como os óleos essenciais escolhidos atuam na estrutura da bactéria e os danos causados ao biofilme.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Agradecimento à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

REFERÊNCIAS

1. ANTUNES A, et al. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *Apmis*, 2010; 118(11): 873-877.
2. BAKKALI F, et al. Biological effects of essential oils– A review. *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.], 2008; 46(2): 446-475.
3. BALLICK M e COX P. *Plants, people and culture: the Science of ethnobotany*. New York. Scientific American Library, 1997.
4. BARONYG, et al. New hosts and genetic diversity of flavo bacterium columnare isolated from Brazilian native species and Niletilapia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015; 117(1): 1-11.
5. BOROTOVÁ P, et al. Chemical and biological characterization of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Plants*, 2022; 11(4): 558.
6. BOWER CK e DAESCHEL MA. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal Of Food Microbiology*, [s.l.], 1999; 50(1-2): 33-44.
7. CAMELE I, et al. Chemical composition and antimicrobial Properties of *Mentha × piperita* cv. Kristinka essential oil. *Plants*, 2021; 10(8): 1567.
8. CARVALHO EVMM, et al. Physiological and biotechnological approaches of the amazonian tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). *Marine biology series*. Nova Science, New York, 2014; 50.
9. CLUTTERBUCKAI, et al. Bio films and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, [s.l.], 2007; 121(1-2): 1-17.
10. DOLGHI A, et al. Chemical and antimicrobial characterization of *Mentha piperita* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils and in vitro potential cytotoxic effect in human colorectal carcinoma cells. *Molecules*, 2022; 27(18): 6106.
11. EJAZ R, et al. Anti-biofilm potential of menthol purified from *Mentha piperita*L. (Mint). *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2020; 1.
12. EL-HOSSARY D, et al. Antibiotic Resistance, Virulence Gene Detection, and Biofilm Formation in *Aeromonas* spp. Isolated from Fish and Humans in Egypt. *Biology*, 2023; 12(3): 421.
13. FAO. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, 2020.
14. FRANCISCONI R, et al. Antibio film efficacy of tea tree oil and of its main component terpinen-4-ol Against *Candida albicans*. *Brazilian oral research*, 2020; 34.
15. FUJIMOTO R, et al. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Caricapapaya*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2012; 32: 5-10.
16. GALLANI SU, et al. Motile *Aeromonas* septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for controland disinfection in aquaculture. *Microbial Pathogenesis*, 2020; 149: 104512.
17. GASTALHO S, et al. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, [s.l.] centro de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2014; 3(1): 29-45.
18. GROOT AC e SCHMIDT E. Tea tree oil: contact allergy and Chemical composition. *Contact dermatitis*, 2016; 75(3): 129-143.
19. HERNÁNDEZ F, et al. Antibiotic residue determination in environment al waters by LC-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007; 26(6): 466-485.
20. HILSDORF A, et al. The farming and husban dry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian Waters to sustainable production. *Reviews in Aquaculture*, 2022; 14(2): 993-1027.
21. HU M, et al. Identity and virulence Properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. *Letters in Applied microbiology*, 2012; 55(3): 224-233.
22. HUSSAIN AI, et al. Season alvariation in content, Chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha*species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010; 90(11): 1827- 1836.

23. IGBINOSA I, et al. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*, 2012.
24. KAIREY L, et al. Efficacy and safety of *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil for human health—A systematic review of randomized controlled trials. *Frontiers in pharmacology*, 2023; 14: 1116077.
25. KUBITZA F. Os caminhos para uma piscicultura sustentável. *Panorama da Aquicultura*, 2010; 20(119): 16-23.
26. KULKARNI R, et al. *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*, [s.l.], Springer Nature, 2013; 86(4): 713-718.
27. KUMAR S, et al. Effect of orally administered *azadirachtin* on non-specific immune parameters of gold fish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance Against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shell fish immunology*, 2013; 34(2): 564-573.
28. LAMY B, et al. Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2010; 67(1): 9-14.
29. LEITE MC e CROZARAMA. Fitoterapia e o uso indiscriminado do chá de *Cannabis sativa*. *Simpósio. São Camilo*: 2015; 1- 3.
30. LIMA ROHA. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Aeromonas* spp. isoladas do peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*), 2019.
31. MARQUES DSC, et al. Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge. *Environmental technology*, 2016; 37(233030-3035).
32. MARQUES DSC. Isolamento e Identificação Taxonômica de *Aeromonas* sp. em Tambaquis (*Colossoma macropomum*) e Análise do Perfil de Lectinas Séricas Frente a um Desafio com os Isolados Endógenos, 2015.
33. MOGOSAN C, et al. A comparative analysis of the Chemical composition, anti-inflammatory, and antinociceptive effects of the essential oils from three species of *Mentha* cultivated in Romania. *Molecules*, 2017; 22(2): 263.
34. PESSOA RBG, et al. *Aeromonas* and human health disorders: Clinical approaches. *Frontiers in microbiology*, 2022; 13: 868890.
35. PESSOA RBG, et al. Fluorescent nanoprobe based on quantum dots conjugated to Cramollto assess surface carbohydrates of *Aeromonas* spp. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2023; 1867(7): 130373.
36. PESSOA RBG, et al. Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. Isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). *Microbial pathogenesis*, 2020; 147: 104273.
37. PESSOA RBG, et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, [s.l.], 2019; 130: 81-94.
38. RHIND J. *Essential Oils: A Comprehensive Handbook for Aromatic Therapy*. Singing Dragon, 2020.
39. SAHA D e PAL J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. *Letters in Applied Microbiology*, 2002; 34(5): 311-316.
40. SOUSA RGC, et al. Avaliação do ganho de peso de tambaqui cultivado com diferentes taxas de proteínas na alimentação. *Biota Amazônia (Biota Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 2016; 6(1): 40-45.
41. STEPANOVIĆ S, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 2000; 40(2): 175-179.
42. STRINGARO A, et al. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha* spp. Essential Oils. *Medicines*, 2018; 5(4): 112.
43. TAVARES-DIAS M e MARIANOWS. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015.