

**RODRIGO ZEYMER AUAD**

**Efeito antibacteriano do alho e do óleo essencial de cravo da Índia sobre  
*Vibrio parahaemolyticus* e *V.vulnificus* in vitro.**

**RECIFE,  
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**Efeito antibacteriano do alho e do óleo essencial de cravo da Índia sobre  
*Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus* in vitro.**

**Rodrigo Zeymer Auad**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Emiko Shinozaki Mendes**  
Orientadora

**Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes**  
Co-orientador

**Recife,**  
**2013**

Ficha catalográfica

A887e Auad, Rodrigo Zeymer  
Efeito antibacteriano do alho e do óleo essencial de  
cravo da Índia sobre *Vibrio parahaemolyticus* e *V.vulnificus in vitro.* /  
Rodrigo Zeymer Auad. – Recife, 2013.  
39 f. : il.

Orientadora: Emiko Shinozaki Mendes.  
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e  
Aqüicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Pesca e Aquicultura Recife, 2013.  
Inclui referências e apêndice(s).

1. Alho 2. Antibacteriano 3. Óleo de cravo 4. Víbrio  
I. Mendes, Emiko Shinozaki,  
orientadora II. Título

CDD 574.018

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**Efeito antibacteriano do alho e do óleo essencial de cravo da Índia sobre**  
*Vibrio parahaemolyticus e V.vulnificus in vitro.*

**Rodrigo Zeymer Auad**

Dissertação a ser julgada para obtenção do  
título de “Mestre” em Recursos Pesqueiros e  
Aquicultura. A ser apresentada em  
27/08/2013 à seguinte banca examinadora

---

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Emiko Shinozaki Mendes**  
(Orientadora)  
Departamento de Medicina Veterinária  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes**  
(Co-Orientador)  
Departamento de Pesca e Aquicultura  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof. Dr. George Chaves Jimenez**  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos**  
Departamento de Medicina Veterinária  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos que passaram pela nossa vida e ficaram no coração.

## **Agradecimentos**

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta jornada, cada um tem a consciência da ajuda que me deu e sabe que agradeço de coração pelo apoio, pelo carinho e por nunca me deixar cair na tentação de desistir.

Agradeço à fundação Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento do projeto, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas De ensino superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão de bolsas para todos os envolvidos neste trabalho e ao PPG-RePAq pela oportunidade de transformar em realidade a idéia.

## Resumo

Foi estudada a ação antibacteriana do alho *in natura* (*Allium sativum*) e do óleo essencial do cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*), em teste de difusão em ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às bactérias *Vibrio vulnificus* (ATCC 17802) e *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 27562), que são patógenos oportunistas de camarões marinhos. O estudo *in vitro* foi realizado utilizando-se os protocolos aprovados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com algumas modificações, a fim de se ajustar ao antibacteriano testado. No teste da CIM, a turbidez do caldo Mueller-Hinton foi averiguada por espectrofotômetro em 600 nm e com inoculação em placas contendo de ágar Tiosulfato Citrato BÍlis Sacarose (TCBS) para verificar ausência ou presença das bactérias, devido ao aspecto turvo das soluções dos antibacterianos, que poderia ser confundido com proliferação bacteriana. Verificou-se uma CIM de 2560 ppm do alho para o *V. parahaemolyticus* e de 512 ppm para o *V. vulnificus*. O óleo de cravo inibiu o crescimento de ambas as bactérias em concentração superior a 128 ppm.

**Palavras-chave:** *Allium sativum*, vegetal, *Eugenia caryophyllata*, víbrios

## **Abstract**

Was studied the antibacterial action of garlic in natura (*Allium sativum*) and essential oil of clove (*Eugenia caryophyllata*) in agar diffusion test and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against the bacteria *Vibrio vulnificus* ( ATCC 17802 ) and *Vibrio parahaemolyticus* ( ATCC 27562 ) , which are opportunistic pathogens of marine shrimp . The in vitro study was performed using protocols approved by the Clinical and Laboratory Standards Institute ( CLSI ), with some modifications in order to adjust to the antibacterial test. In the MIC test , the turbidity of Mueller-Hinton broth was determined by spectrophotometer at 600 nm and inoculated agar plates containing Thiosulphate Citrate Bile Sucrose ( TCBS ) to check the presence or absence of bacteria due to turbid solutions of antibacterial that could be mistaken for bacterial proliferation . There was a MIC of 2560 ppm garlic for *V. parahaemolyticus* and 512 ppm for *V. vulnificus*. Clove oil inhibited the growth of both bacteria at concentrations greater than 128 ppm.

**Key words:** *Allium sativum*, vegetal, *Eugenia caryophyllata*, víbrios

## Sumário

	Página
Dedicatória .....	5
Agradecimento.....	6
Resumo.....	7
Abstract .....	8
1- Introdução .....	10
2- Revisão de literatura .....	13
3- Referências .....	26
4 - Artigo científico – Revista Brasileira de Ciências Agrárias .....	27
6 - Normas da Revista – Revista Brasileira de Ciências Agrárias.....	33

## 1- Introdução

O camarão branco do Pacífico, também conhecido como camarão cinza, é um dos peneídeos mais cultivados em todo o mundo, o *Litopenaeus vannamei* é um crustáceo decápoda, de boa adaptação aos meios de cultivos na zona tropical como um todo, seu sistema imune é bastante rudimentar, sendo necessário cuidado para evitar a entrada de agentes etiológicos no local de seu cultivo. Apesar disso, as doenças, antes em estado de equilíbrio com o ambiente, tiveram condições de se expressar e muitas surgiram, em focos, nas carciniculturas que praticavam densidades de estocagem muito alta (>80 animais/m<sup>2</sup>).

Na última década a carcinicultura mundial tem sofrido com a disseminação de doenças, ocasionando perdas significativas de produção e fechamento de fazendas. Os intestinos dos camarões tem microbiota bem mista podendo ser encontrados bactérias que auxiliam os processos digestórios do animal, como micro-organismos patogênicos. Estes patógenos podem estar presentes sem causar enfermidades, comportamento comum aos patógenos oportunistas, que quando em condições propícias ao seu desenvolvimento, podem causar doenças, alterando o comportamento do animal, devido ao estresse provocado pela doença, no geral o animal tende a se movimentar menos para alcançar a ração, o que causa redução do desenvolvimento. Além disso, o comportamento canibalista do camarão pode ser mais expressivo nestas condições, levando os animais sadios a predação de animais doentes, aumentando assim a disseminação do agente patogênico.

Os surtos de doenças levaram a uma redução do setor carcinícola, perdas de lotes, em casos de enfermidades mais agressivas ou por exposição excessiva dos animais aos agentes etiológicos. Para evitar que o agente etiológico se instale nos

viveiros de camarão, o carcinicultor recorre a práticas que podem ser simples manutenções dos bons parâmetros físico-químicos da água, aplicação de corretores e biorremediadores, tais como fontes de cálcio e uso de bactérias probióticas.

Atualmente há uma busca por métodos e ferramentas que auxiliem o produtor a combater os agentes patológicos. Dentre as práticas verificadas na literatura, pode-se destacar o aumento da biossegurança, para impedir a entrada de patógenos na fazenda, e redução do lançamento de efluentes no ambiente. As ferramentas desenvolvidas para substituir os produtos sintéticos são naturais, muitas vezes encontrados nas proximidades do ambiente de cultivo. Por isto a utilização de antibacterianos de origem vegetal, também denominados de fitoterápicos, podendo destacar dentre esses antibacterianos naturais, o alho comum, utilizado como tempero na culinária. O sumo liberado também serve como um tipo de cicatrizante, selando a parte lacerada, evitando assim o acesso de pragas ao interior do bulbo, e também a desidratação excessiva.

O cravo da Índia é outra especiaria que pode ser empregada com o mesmo fim, também é usada como tempero, comumente em doces. O talo é utilizado pelo seu aroma forte e característico, possui um óleo de cor âmbar e pouco denso. O principal componente, o eugenol, é um anestésico bastante usado na odontologia, principalmente por formar o cimento dentário quando misturado com óxido de zinco. É utilizado nos transportes de peixes e outros animais aquáticos, com baixa mortalidade, devido a sua propriedade anestésica.

O uso de fitoterápicos visa à redução do uso de produtos sintéticos, que podem causar resistência por parte das bactérias, os resíduos perduram no ambiente e no animal, sendo plausível a acumulação do antibiótico nos consumidores destes animais.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Carcinicultura atual**

Desde a sua introdução no Brasil, o cultivo de camarões foi vista como uma atividade lucrativa, que com o desenvolvimento tecnológico ampliou seus horizontes, melhorando cada vez mais a produtividade dos viveiros e criando raízes no mercado interno e externo (NATORI et al., 2011).

A produtividade da carcinicultura, durante a última década, apresentou um significativo incremento, no ano de 2003 a produção chegou a ultrapassar 90 mil toneladas de camarão marinho cultivado, ocorrendo um recuo para 63 mil toneladas no ano posterior, com recuperação para 69 mil toneladas, se mantendo estável até o momento (FAO, 2011).

Apesar de sua grande produção, e atual sucesso perante o mercado interno, esta é uma atividade recente, em comparação com outras atividades ligadas à produção de proteína animal, tais como bovinocultura e avicultura, a carcinicultura sofreu uma evolução muito forte na virada do milênio, que teve aumentos na produção, de mais de dois mil e quinhentos por cento, entre 1997 e 2003 (SAMPAIO, 2005), com crescimento médio de 416% ao ano. Diante desta grande expansão surgiram alguns problemas, trazidos pelo aumento das densidades de estocagem nos viveiros, que foram permitidas com a introdução das técnicas que permitem a manutenção da qualidade da água, tais como oxigênio dissolvido, nitrogênio amoniacal total, temperatura, pH, que dentre outros parâmetros fazem parte do controle limnológico de cada viveiro (SILVA et al., 2011).

## **2.2 O camarão branco do Pacífico no Brasil**

O camarão branco do Pacífico, também conhecido como camarão cinza e *white leg shrimp* tem como binômio científico *Litopennaeus vannamei*, é nativo da costa da América do Sul banhado pelo oceano Pacífico e ao ser trazido para território brasileiro se mostrou em condições de se adaptar ao ambiente de cultivo brasileiro, se reproduzir e se ter sucesso na produção em larga escala (BARBIERI; MELO, 2006; ABCC, 2011). Portanto, com sucesso se tornou o camarão de ambiente marinho de maior expressividade em produção no Brasil.

## **2.3 Doenças em camarões**

As doenças, em especial as oportunistas, podem acometer os camarões quando desencadeadas por diversos fatores estressantes, como mudanças de temperatura, e pH, baixo oxigênio dissolvido, nutrição desbalanceada, que podem ocorrer com maior facilidade em altas densidades (NUNES; MARTINS, 2002).

A definição de saúde consiste em um estado do organismo em que as funções fisiológicas ocorrem sem obstáculos, garantindo vigor e disposição do indivíduo (DICIONÁRIO MICHAELIS, 2009) mas que por outros autores, a definição é mais ampla e se modifica ao longo do avanço tecnológico e científico (SÁ JUNIOR, 2004).

## **2.4 Vibriose**

Os patógenos que infectam os camarões marinhos são em geral da ordem das *Vibrionaceae* que englobam dois gêneros, as *aeromonas* e os *vibrio*, que podem causar problemas durante todas as fases de cultivo (MORALLES-COVARRUBIAS, 2010).

O gênero *vibrio* apresenta-se naturalmente em todos os corpos d'água, com um

mínimo de salinidade, são patógenos oportunistas que se encontram, normalmente, em contato com a superfície e a mucosa do trato gastrointestinal, mas sem causar quaisquer danos á saúde do camarão.

Quando a concentração de vibrios, em contato com o camarão aumenta, ou por algum fator externo o animal se estressa pode acontecer uma infecção. Ela pode ser superficial, causando melanização da carapaça, como resposta do sistema imune primitivo para defender o organismo. Ela pode ser também uma vibriose sistêmica, infectando todos os tecidos e causando danos á produção e levando o camarão a estados de morbidez suficiente para que ele venha a falecer ou a sofrer predação quando na superfície do corpo d'água por aves, ou canibalismo por outros camarões, quando no fundo da coluna d'água (MORALLES-COVARRUBIAS, 2010; MOURIÑO et al., 2008).

Atualmente tem-se que um novo fator de estresse no camarão deve ser levado em conta, outras doenças, como no caso da Síndrome da Mancha Branca Viral (WSSV), Coutteau (2012), cita que em camarões infectados com mancha branca inicialmente são mais susceptíveis á vibriose, pois o sistema imune está deprimido, tendo como resultado uma mortalidade mais elevada e em menor tempo.

As bactérias do gênero *Vibrio* podem causar quatro enfermidades diferentes, segundo Morales-Covarrubias (2010), a vibriose sistêmica, a erosão da carapaça, a doença da luminescência e a síndrome de zoea 2. Dentre estas, a espécie *V. harveyi* causa especificamente a doença da luminescência, enquanto as outras são causadas pelas outras espécies patogênicas, dependendo do estágio de desenvolvimento do camarão e de seu estado nutricional.

A vibriose sistêmica pode ter como agentes etiológicos as espécies *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, e várias outras. Tendo como principal sintoma a presença de vibrio em todos os órgãos, que pode ser causado pela infecção na corrente da hemolinfa, dando acesso às bactérias para todo o interior do camarão. Nestes animais ocorrem mortalidades por conta da infestação, que dependendo da carga bacteriana, pode levar a óbito todos os animais de um viveiro. Em humanos, as espécies *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* provocam diarreias de intensidade branda á moderada e sepsia generalizada, respectivamente (KONEMAN, 2005).

Existem algumas medidas preventivas contra as infecções de vibrios, as quais podem ser desde ações simples como troca de água, manejo, densidades e alimentação adequadas á espécie, ambiente de cultivo e fase de crescimento (ABRAHAM; SASMAL, 2009). Outras medidas que exigem um maior nível de técnica, dentre as quais se podem destacar o uso de calagem e de probióticos ativos na água, que fazem com que o pH da água seja regulado e cria uma competição por nutrientes e sítios de aderência, respectivamente (NINAWA; JOSEPH, 2009).

## **2.5 Antibacterianos**

Uma infecção de vibriose pode ser controlada com o uso de antibióticos sintéticos, segundo Uyaguary et al. (2009) que recomendaram o uso de oxitetraciclina para reduzir a carga bacteriana de vibrio em cultivos de *Palaemonetes pugio*, também conhecido como camarão capim. Em contrapartida, Costa et al. (2008), citaram que o uso de antibióticos, com ou sem o acompanhamento de técnico responsável, tende a selecionar cepas resistentes a esses medicamentos, que em infecções futuras podem não

responder de maneira adequada, quando o mesmo tratamento for feito, exigindo doses mais fortes e em altas frequências.

Tomando como verdadeira a afirmação de Vaseeharan et al. (2010), que citaram que o uso indiscriminado de antibióticos na aquicultura levou a seleção de bactérias, em geral do gênero *víbrio*, a se tornarem resistentes, a procura por alternativas que não promovam a aquisição de resistência por parte das bactérias é um nicho de pesquisa interessante, onde muitas idéias e conceitos novos estão sendo estudados, tais como extratos herbáceos e medicinas alternativas como a homeopatia.

## **2.6 Fitoterápicos**

Fitoterápico é definido segundo a Agência de Vigilância Sanitária, (ANVISA 2004), quando o medicamento é obtido de matérias-primas exclusivamente vegetais, não se considerando medicamentos que na sua composição incluam substâncias ativas isoladas nem as associações destas com extratos vegetais. Em geral são usados óleos essenciais, que contem substâncias que inativam certas enzimas produzidas pelas bactérias ou mantem o meio impróprio para o desenvolvimento bacteriano, inibindo assim a proliferação destas, quando agem como antibacteriano. Há medicamentos que agem como inibidores de utilização de sitio de ligações, que se liga a peptídeos que seriam utilizados por vírus, bactérias e protozoários para invadirem a célula animal, evitando assim a infecção, impedindo a complicação de uma doença (ANVISA 2004).

O desenvolvimento de fitoterápicos leva em consideração o conhecimento popular adquirido ao longo de séculos de tentativas e erro, como usos como conservantes em processos de mumificação no antigo Egito, conservantes usados em alimentos, temperos, além de fortificantes e ervas utilizadas em chás, dentre outras

situações nas quais são usadas plantas de forma medicinais (PEIXOTO; CAETANO, 2005).

Diversas plantas, com potencial antibacteriano, são selecionadas para testes *in vitro* no qual o seu poder bacteriostático ou bactericida deve ser direto, ou seja, sem interferência de hospedeiros, tendo apenas como mecanismo de controle bacteriano as substancias presentes na planta. O efeito indireto é demonstrado quando o fitoterápico age como imuno-estimulante, aumentando a capacidade de defesa do hospedeiro, e assim tendo efeito bacteriostático ou bactericida. Alguns produtos herbáceos ainda podem prover as duas ações, direta e indireta, oferecendo grande auxilio na manutenção da sanidade do hospedeiro (KLEIN et al., 2009).

Para o desenvolvimento de fitoterápicos são realizadas pesquisas químicas para se identificar as substancias de caráter orgânico em espécies e variedades de plantas e sua constância durante o ano, devido a alterações sazonais. As substâncias identificadas são então comparadas com outras de caráter semelhantes, então são utilizadas para se ter conhecimento do seu poder frente á patógenos diversos, como o antibiograma e a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Com base nos dados coletados são realizados testes *in vivo*, os bioensaios os quais são destinados á animais de pequeno porte, tais como cobaias, ratos e peixes. Destes são feitos bioensaios de longa duração, para se ter conhecimento de efeitos á longo prazo (NAJJAA, 2011).

Após essa bateria de testes ainda são muitos passos antes dos testes em seres humanos, que em geral é o objetivo dessas pesquisas. Quando o organismo final a que se destina é um animal, são feitos testes no qual o principal efeito pesquisado são alterações neste animal e, no caso de animais para produção de alimentos, seu possível efeito no consumidor, como alterações na digestão, absorção e metabolização.

Como medida de prevenção ao charlatanismo e ao possível agravamento do quadro clínico dos animais, órgãos de controle de drogas possuem mecanismos para que apenas os medicamentos comprovadamente eficazes sejam produzidos e comercializados, apesar deste controle ser mais brando no caso dos fitoterápicos.

Em alguns casos como o do alho (*Allium sativum*), seu bulbo não é utilizado como um antibacteriano, mas como tempero, sendo o efeito bacteriostático colateral. Assim como no cravo, cujo óleo do talo (*Eugenia caryophyllata*), também utilizado na culinária, possui ação antibacteriana.

### **2.7 Alho (*Allium sativum*)**

O alho do gênero *Allium*, faz parte de um gênero vegetal que se destaca como um dos mais comuns e utilizados, tendo grande influência na culinária ao redor do mundo, que inclui também grande parte dos tipos de alho e de cebola, possui uma parte aérea bulbosa (cabeça de alho), formada por folhas escamiformes (dentes de alho). é comestível, possuindo sabor e odor muito característicos. A substância responsável por estas características peculiares é a alicina, um álcool de vida curta, o qual apresenta átomos de enxofre em sua estrutura. O seu emprego como planta medicinal permite classificá-la como uma das plantas medicinais mais estudadas que possui atividades e antissépticas bem documentadas. O uso medicinal remonta as civilizações egípcia, grega e romana. Atualmente, diversos remédios que possuem o alho como um de seus componentes é utilizados em problemas cardíacos, enxaquecas, tumores. Inclua-se o emprego na medicina popular em casos de aterosclerose e em prevenção de acidentes cardiovasculares (RABINOWITCH e CURRAH, 2002). O uso terapêutico do alho é

bem sucedido no tratamento de hipertensão, hepatites e colesterol em humanos (LEE; GAO, 2012).

Nos animais aquáticos os resultados são muito superiores ao esperado, além dos benefícios da sua ação antimicrobiana, o alho induz um consumo maior de ração, melhor digestão e aumenta o metabolismo (LEE; GAO, 2012). O seu uso em animais tem sido estudado extensivamente, tendo revelado resultados animadores como imunostimulantes em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), aumentando a sobrevivência e incrementando o ganho de peso com ou sem desafio biológico (ALY e MOHAMED, 2009; SANTOS, 2010). Em bioensaios utilizando a casca do alho incorporado à ração de *catfish* africano (*Clarias gariepinus*), desafiados com *Aeromonas hydrophila*, obteve-se aumento nos níveis de sobrevivência, sendo justificado pela melhora dos parâmetros hematológicos, mesmo nos níveis mais baixos de incorporação da casca de alho (THANIKACHALAM et al., 2010).

O uso como antibacteriano se deve à ação de inibição enzimática da alicina, segundo Harris et al., (2001) e também pela presença de enxofre na composição do alho. Por possuir esta composição a alicina inativa enzimas em células de leveduras, causando interrupção na atividade eletroquímica, levando ao processo de apoptose (GRUHLKE et al., 2010).

## **2.8 Óleo essencial de cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*)**

O cravo da Índia é uma planta conhecida por ser uma especiaria muito apreciada na culinária por todo o mundo, sendo nativo da Indonésia, atualmente pode ser encontrado em cultivos em outros lugares. O óleo extraído desta planta de porte arbóreo

é rico em eugenol, um composto de poder anestésico e antisséptico. (AFFONSO et al., 2012).

Sua atuação como anestésico é devido à despolarização dos nervos, através da estabilização dos condutores de sódio, mantendo assim a condução nervosa em um estado de não-condução do impulso nervoso, que em seres humanos provoca sensação de alívio á dores e perda temporária da sensibilidade no local aplicado (DE ARAUJO et al., 2008). Utilizado em ortodontia como cimento dentário, quando misturado a óxido de zinco, por possuir poder antibacteriano evita infecção em locais atacados por cáries e outras lesões bucais (AFFONSO et al., 2012).

Além de seu poder bactericida, evidencia-se seu poder anestésico em animais aquáticos, cujo uso se faz adicionando o óleo na água em concentrações suficientes para provocar letargia e relaxamento muscular em peixes e crustáceos (SILVA et al., 2009). Seu poder bactericida tem sido estudado por diversos pesquisadores, utilizado como inibidor contra diversas bactérias patogênicas, principalmente de origem alimentar (KIM et al., 1995).

Tendo seu uso direto na água, muito foi pesquisado com relação á peixes e camarões, sendo possível a confirmação como antibacteriano em patógenos de habitat aquático, marinho ou não, em especial as bactérias do gênero *Vibrio* (YANO et al., 2006).

Os principais efeitos do eugenol na bactéria são descritos por Affonso et al. (2012) o qual explica que o mecanismo é realizado pelo eugenol, principal componente do óleo essencial de cravo, que destrói o mecanismo de regulação da permeabilidade seletiva da célula, provocando rompimento da parede celular da bactéria, levando a mesma a entrar em processo de apoptose. Akbari et al. (2010) citaram que a

concentração para se atingir a anestesia de *Fenneropennaeus indicus* é de 5,2 mg/L, enquanto que a concentração inibitória mínima para *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *V. vulnificus* (ATCC 27562) encontrado por Snoussi et al (2008) foi de 0,156 mg/ml, sendo evidenciado que o uso de eugenol como antibacteriano pode influenciar o comportamento do animal, reduzindo o hábito do canibalismo ou reduzindo o consumo do animal quando alimentado com óleo de cravo incorporado a ração. Apesar do efeito anestésico não há dados que mostre que seja prejudicial ao camarão marinho.

### 3- Referências

ABCC, História da carcinicultura no Brasil, <<http://www.abccam.com.br/noticias/25-historia-da-carcinicultura-no-brasil>>, **Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, 2011.

ABRAHAM, T. J.; SASMAL, D.; Influence of salinity and management practices on the shrimp (*Penaeus monodon*) production and bacterial counts of modified extensive brackishwater ponds. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 9, p. 91-98, 2009.

AFFONSO, R. C.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n.2, p. 146-161, 2012.

AKBARI, S.; KHOSHOD, M. J.; RAJAIAN, H.; AFSHARNASAB, M. The use of eugenol as an anesthetic in transportation of with indian shrimp (*Fenneropennaeus indicus*) post larvae. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.10, p. 423-429, 2010.

ALY, S. M.; MOHAMED, M. F.; *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 94, p. 31-39, 2010.

ANVISA, Resolução-RDC Nº 48, de 16 de Março de 2004, p.8. Disponível em: <<http://migre.me/gbyjT>>. Acessado em 31/05/2011.

BARBIERI, E.; MELO, G. A. S. Biodiversidade: ocorrência da espécie exótica *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida. **O mundo da Saúde** v. 30, n. 4, p. 654-659, 2006.

COUTTEAU, P. Disease prevention in shrimp farming: What can we do through the feed? In: IX FENACAM, 2012, Natal. **Anais eletrônicos...** Disponível em <[http://www.4shared.com/office/OSC5LJUI/peter\\_couteau\\_4.html](http://www.4shared.com/office/OSC5LJUI/peter_couteau_4.html)>. Acesso em: 05 Jul. 2012.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; et al.; Susceptibilidade “*in vitro*” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio spp* isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

DE ARAUJO, D. R.; PAULA, E.; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Química Nova**. v.31, n. 7, p. 1775-1783, 2008.

FAO Fisheries and Aquaculture Department, Statistics and Information Service FishStatJ: Universal software for fishery statistical time series. Copyright 2011. Disponível em: < [ftp://ftp.fao.org/FL/STAT/FishStatJ/deployment/Windows/FishStatJ\\_2.0.0\\_win32.zip](ftp://ftp.fao.org/FL/STAT/FishStatJ/deployment/Windows/FishStatJ_2.0.0_win32.zip)>, Acessado em: 15 de dezembro de 2011.

GRUHLKE, M. C. H.; PORTZ, D.; STITZ, M.; et al.; Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1916-1924, 2010.

HARRIS, J. C.; COTTRELL, S. L.; PLUMMER, S.; LLOYD, D. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 282-286, 2001.

KIM, J.; MARSHALL, M.; R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 43, p. 2839-2845, 1995.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P.; Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; et al.; **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**, MEDSI Editora médica e científica, p. 1465, 2005.

LEE, J. Y.; GAO, Y. Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 4, p. 447-458, 2012.

MORALLES-COVARRUBIAS, M. S. **Enfermedades del camarón: detección mediante análisis em fresco e histopatología**, 2ª Ed., México, Trillas, CIAD, p. 130, 2010.

MOURIÑO, J. L. P.; BUGLIONE, C. C.; VIEIRA, F. N.; et al.; Avaliação bacteriológica aplicada à produção de pós-larvas de *Penaeus vannamei*. **Atlântica**, v. 30 n. 1, p. 9-16, 2008.

NAJJAA, H.; ZOUARI,S.; AMMAR, E.; NEFFATI, M. Phytochemical screening and antibacterial properties of *Allium roseum* L., a wild edible species in north Africa. **Journal of Food Biochemistry**. v. 35 n.3. p. 699-714, 2011.

NATORI, M. M.;SUSSEL, F. R.; SANTOS, E. C. B.; et al.; Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no Mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**, v. 42, n. 2, p. 61-73, 2011.

NINAWA, A. S.; JOSEPH, S.; Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges, Abstract...,**Critical Reviews in Microbiology**, v. 35 n.1, p.43-66, 2009.

NUNES, J. P.;MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aquicultura**. Ed. 72, p. 23-33, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; CAETANO, L. C. Plantas Medicinais: do popular ao científico. **EDUFAL**, 1ª ed, p. 90, 2005.

RABINOWITCH, H.D.; CURRAH, L. *Allium* crop: recent advances, **CABI Publishing**, 515p, 2002.

ROCHA, I. P.; ROCHA, D. M. **Análise da produção e do mercado interno e externo do camarão cultivado**. Documento da ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão), p. 6, 2010. Disponível em: [http://www.abccam.com.br/abcc/images/stories/documentos/Analise\\_da\\_Producao\\_Mundial\\_do\\_Camarao.pdf](http://www.abccam.com.br/abcc/images/stories/documentos/Analise_da_Producao_Mundial_do_Camarao.pdf), acessado em 20/05/2011.

SÁ JUNIOR, L. S. M. Desconstruindo a definição de saúde. **Jornal do Conselho Federal de Medicina**. p. 15-16, 2004.

SAMPAIO, C. M. S. Histórico da Carcinicultura Marinha: origem, fases e principais espécies cultivadas In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 57., 2005, Fortaleza. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UECE, 2005. Disponível em

<[http://www.sbpcnet.org.br/livro/57ra/programas/CONF\\_SIMP/textos/celiasampaio.htm](http://www.sbpcnet.org.br/livro/57ra/programas/CONF_SIMP/textos/celiasampaio.htm)>. Acesso em: 04 jul. 2012.

SANTOS, E. L., Aditivos naturais promotores de crescimento em dietas para tilápia do Nilo. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, p. 72, 2010.

SAÚDE. In: DICIONÁRIO Michaelis. **Editora Melhoramentos Ltda.**, 2009. Disponível em: <[www.uol.com.br/michaelis](http://www.uol.com.br/michaelis)>. Acesso em: 06 set. 2013.

SILVA, R. S.; ARAUJO, R. F.; SOUZA, A. S.; et al.; Avaliação dos parâmetros abióticos e caracterização da comunidade zooplânctônica em um viveiro de cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) em Curuçá, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n 4, p. 502-508, 2011.

SILVA, E. M. P.; OLIVEIRA, R. H. F.; RIBEIRO, M. A. R.; COPPOLA, M. P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1851-1856, 2009.

SNOUSSI, M.; HAJLAOUI, H.; NOUMI, E.; et al.; In-vitro anti-*Vibrio* spp. activity and chemical composition of some tunisian aromatic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 3071-3076, 2008.

THANIKACHALAM, K.; KASI, M.; RATHINAM, X. Effect of garlic peel on growth, hematological, parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in African catfish *Clarias gariepinus* (Bloch) fingerlings. Abstract..., **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 3, n. 8, p. 614-618, 2010.

UYAGUARY, M.; KEY, P.; MOORE, J.; et al.; Acute effects of the antibiotic oxytetracycline on the bacterial community of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 28, n.12, p.2715-2724, 2009.

VASEEHARAN, B.; PRASAD, G. S.; RAMASAMY, P.; BRENNAN, G. Antibacterial activity of *Allium sativum* against multidrug-resistant *Vibrio harveyi* isolated from black gill-diseased *Fenneropennaeus indicus*. **Aquaculture International**, v. 19, p. 531-539, 2011.

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

#### 4- Artigo científico 1 – (Revista Brasileira de Ciências Agrárias)

Ação *in vitro* do alho *in natura* e do óleo essencial de cravo frente a duas espécies de víbrios

Rodrigo Zeymer Auad, Carolina Notaro de Barros, João Menezes Guimarães, Dulcilene Lacerda do Nascimento, Emiko Shinozaki Mendes

Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, UFRPE

#### Resumo

A ação antibacteriana do alho *in natura* (*Allium sativum*) e do óleo essencial do cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*) foram avaliadas em teste de difusão em ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às bactérias *Vibrio vulnificus* (ATCC 17802) e *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 27562), os quais são notadamente patógenos oportunistas de camarões marinhos. Foram utilizados os protocolos aprovados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com algumas modificações, a fim de se ajustar ao tipo de antibacteriano testado. Foram realizados o teste de sensibilidade em ágar e o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foram observados halos variando de 2,10 a 3,40 cm e 2,67 a 3,83 cm para *V. vulnificus* e de 2,10 a 3,33 cm e 2,50 a 3,53 cm para o *V. parahaemolyticus*, frente ao alho e o óleo de cravo, respectivamente e verificadas CIM de 2560 partes por milhão (ppm) do alho frente ao *V. parahaemolyticus* e de 512 ppm para o *V. vulnificus*. O óleo de cravo inibiu o crescimento de ambas as bactérias na concentração de 128 ppm. A ação antimicrobiana do alho e do óleo de cravo da Índia foi comprovada nos testes realizados, evidenciando-

se exigência de menor quantidade do óleo de cravo para a efetividade semelhante ao do alho.

Palavras-chave: camarão, *Allium sativum*, patógeno, fitoterápico, *Eugenia caryophyllata*

In vitro effect of fresh garlic and clove essential oil against two species of vibrios

Abstract

The antibacterial fresh garlic (*Allium sativum*) and essential oil of clove (*Eugenia caryophyllata*) were evaluated in agar diffusion test and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against the bacteria *Vibrio vulnificus* (ATCC 17802) and *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 27562), which are mainly opportunistic pathogens of marine shrimp. The protocols were approved by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), with some modifications in order to adjust to the type antibacterial test. Inhibition zones were observed ranging from 2.10 to 3.40 cm and 2.67 to 3.83 cm for *V. vulnificus* and 2.10 to 3.33 cm and 2.50 to 3.53 cm for *V. parahaemolyticus*, opposite the garlic and clove oil, respectively, and was verified MIC of 2560 parts per million (ppm) of garlic against *V. parahaemolyticus* and 512 ppm against *V. vulnificus*. Clove oil inhibited the growth of both bacteria at a concentration of 128 ppm. The antimicrobial activity of garlic and clove oil was proven in tests, demonstrating demand for smaller amount of clove oil to the effectiveness similar to garlic.

Keywords: shrimp, *Allium sativum*, pathogen, phytotherapy, *Eugenia caryophyllata*

## INTRODUÇÃO

A disseminação das doenças nos parques aquícolas, obriga o setor produtivo a encontrar alternativas para melhorar a qualidade de água, da ração e do animal criado. Na carcinicultura brasileira, o aumento da incidência de doenças tem provocado grandes prejuízos econômicos, tendo ocorrido um recuo na produção de 90 mil toneladas de camarão marinho em 2003, para 63 mil toneladas no ano seguinte, apesar da recuperação em 2010 para 69 mil toneladas (FAO, 2011).

Uma doença bacteriana que vem preocupando e que provavelmente tem servido como porta de entrada para outros patógenos, é a vibriose, cujos agentes etiológicos pertencem ao gênero *Vibrio*, (KONEMAN et al., 2005). Os vibrios são bactérias notadamente oportunistas, que causam debilidade em camarões, sendo observada apatia e baixo consumo de ração, com o aparecimento de manchas de melanização na carapaça e vermelhidão nas antenulas e telson (MORALLES-COVARRUBIAS, 2010)

As ferramentas profiláticas às bacterioses em camarões a manutenção da qualidade de água e uso de antibiótico com indicação aprovada para peixes, com extensão para espécies inferiores, como o camarão, segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1999). Mas, devido à proibição dos países importadores do uso de antibióticos sintéticos em camarões, algumas alternativas começaram a ser estudadas, dentre as quais a fitoterapia, que consiste no uso de fármacos unicamente à base de plantas ou partes, visando obter o máximo de substâncias que possuem propriedades terapêuticas, em grande parte óleos.

Dentre os fitoterápicos, utilizados em animais aquáticos, destacam-se o óleo essencial do cravo da Índia e o alho. Do cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*) pode se extrair o óleo, que pode ser incorporado facilmente à ração, que é rico em eugenol, composto utilizado como anestésico (PARODI et al., 2012) e antibacteriano (SNOUSSI et al., 2008). O alho (*Allium sativum*) possui propriedades antibacterianas bem conhecidas (HARRIS et al., 2001), sendo usado em situações em que infecções passam a ser esperadas, como quando há presença de bactérias endêmicas na região de produção, altas taxas de densidade de estocagem de biomassa e biossegurança precária ou inexistente.

Objetivando comprovar a eficácia destes fitoterápicos no controle de microorganismos em camarões, foram realizados testes *in vitro*, difusão em agar e

Concentração Inibitória Mínima – MIC, para determinar as concentrações mínimas efetivas na inibição do crescimento de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

A ação antibacteriana do alho e do óleo de cravo foi verificada através do teste de difusão em ágar e da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ambos testes aceitos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e desenvolvidos pela Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS, 2003).

No teste de difusão em ágar foram utilizadas placas contendo ágar Mueller-Hinton (MH) com adição de 2% de NaCl. Foram construídos poços no ágar para que fosse possível a aplicação de antimicrobianos líquidos, sendo utilizadas duas camadas deste meio de cultura. A primeira para formar a base dos poços, que depois de solidificada foram colocadas rolhas estéreis de nº 1 para a formação do poço e colocada a segunda camada. Após a solidificação desta, as rolhas foram retiradas, deixando o poço formado, com capacidade para 250 microlitros.

As bactérias *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* foram renovadas a partir dos estoques mantidos em tubos contendo Trypic Soy Ágar (TSA) adicionado de 2% de sal e incubados por 24 horas, para se obter bactérias novas e com atividade. Estas cepas foram então suspensas em solução salina 0,85%, para que fosse possível ajustar sua concentração ao padrão de turbidez 0,5 na escala de MacFarland, que corresponde a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

Por meio de “swab” a suspensão bacteriana foi aplicada na superfície do ágar e logo em seguida O alho (*Allium sativum*) *in natura* foi descascado e macerado, sendo posteriormente pesadas alíquotas de 0,01; 0,05 e 0,5 gramas e colocadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton com 2% de NaCl e incubadas em estufa a 35-37°C por 24 horas. O óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*) foi colocado nas alíquotas em concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1; 25; 50; 75 e 100%, diluídas em solução anfótera e não volátil (dimetilsulfóxido - DMSO), sendo as placas incubadas em estufa por 24 horas na temperatura de 35-37 °C (NCCLS, 2003). Os halos de inibição resultantes foram aferidos por meio de paquímetro. O teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi realizado utilizando-se o protocolo de macrodiluição. Foram preparadas as diluições do alho e óleo de cravo em tubos contendo o caldo Mueller-

Hinton com 2% de NaCl, nas concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 ppm e também com 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120 e 10240 ppm. O alho foi descascado e triturado em água destilada estéril em proporção de quatro partes de água para uma parte de alho (VASSEHARAN et al., 2011). O óleo de cravo foi diluído nas mesmas concentrações, sem uso de DMSO.

Em tubos estéreis foi adicionado 1 mL dos patógenos diluídos em solução salina e ajustados para 0,5 na escala de MacFarland, e em seguida foi adicionado o mesmo volume do antimicrobiano diluído em caldo Mueller-Hinton com 2% de NaCl, tomando-se a precaução de se fazer controle negativo, contendo apenas o caldo, controle positivo, contendo apenas o inóculo de patógeno no caldo MH e um controle do antimicrobiano, com apenas o antimicrobiano, sendo então incubados em estufa por 24 horas, na temperatura de 35-37 °C.

Após a incubação, foram feitas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nanômetros, sendo consideradas positivas quaisquer amostras com valor de absorvância superior ao controle não incubado. Em seguida, alíquotas de todos os tubos foram inoculadas em placas de TCBS pelo método “spread plate” e incubadas em estufa por 24 horas na temperatura de 35-37 °C, para se certificar do resultado obtido na espectrofotometria

Foi considerada como a CIM do antimicrobiano o tubo contendo a menor concentração sem a turvação do meio, o que foi indicativo do não desenvolvimento do micro-organismo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No teste de difusão em ágar foram observados halos de inibição variando de 2,10 a 3,40 cm de diâmetro frente ao *V. vulnificus* e de 2,10 a 3,33 diante do *V. parahaemolyticus* quando se testou o alho. O óleo de cravo produziu halos de 2,67 a 3,83 contra o *V. vulnificus* e de 2,50 a 3,53 cm de diâmetro contra o *V. parahaemolyticus*.

As leituras no espectrofotômetro do teste da CIM foram compatíveis com o crescimento bacteriano nas placas de TCBS, não foi observada turbidez no tubo em que houve inibição do desenvolvimento bacteriano. Da mesma maneira, os tubos com as

concentrações em que não houve inibição, a turbidez foi verificada, indicando desenvolvimento bacteriano.

No teste CIM, tanto o *V. parahaemolyticus* como o *V. vulnificus* foram sensíveis ao óleo de cravo na concentração de 128 ppm, como pode ser observado na Figura 1.

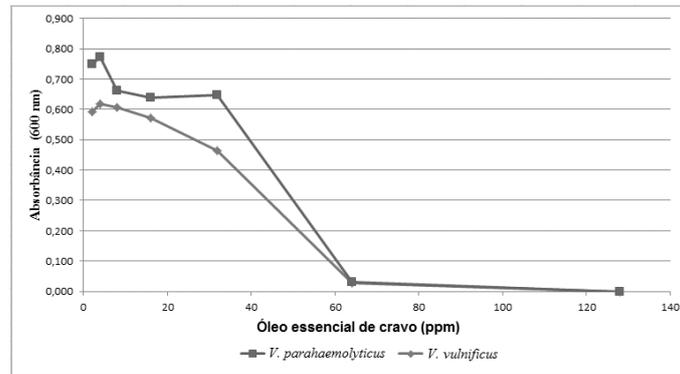


Figura 1. *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* frente ao óleo de cravo no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em (ppm)

O *V. parahaemolyticus* e o *V. vulnificus* apresentaram sensibilidade ao alho sendo, necessária uma maior concentração do que o óleo de cravo, como é apresentado nas Figuras 2 e 3.

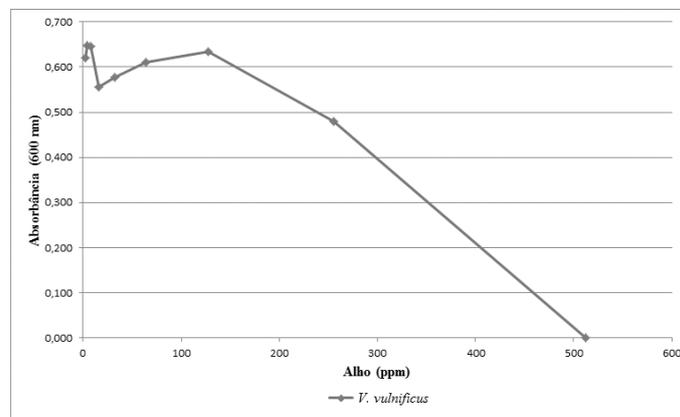


Figura 2. Ação do alho frente ao *V. vulnificus* no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em (ppm)

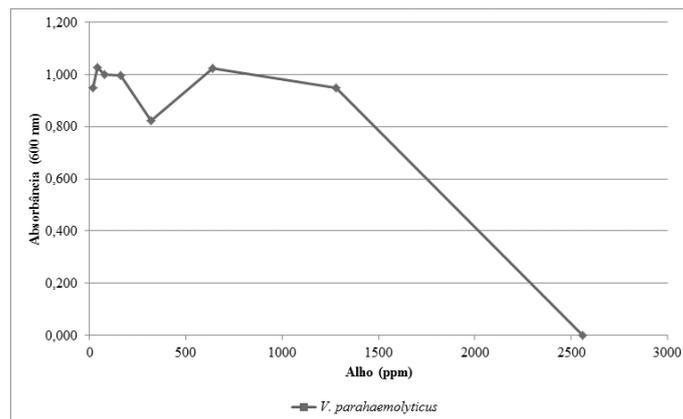


Figura 3. Ação do alho frente ao *V. parahaemolyticus* no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em (ppm)

Mesmo bactérias que possuam uma genética muito semelhante, como no caso dos vibrios utilizados, como citado por Thompson et al. (2006), é possível que sejam encontradas respostas diferentes a um mesmo antimicrobiano, evidenciando a necessidade de se testar cada espécie, pois mesmo dentro de um gênero as respostas diferenciem-se entre as espécies e dentre os sorotipos (KIM et al., 1995).

A CIM do alho e do óleo de cravo ficaram próximos aos encontrados por Yano et al. (2006) e Vuddhakul et al. (2007), quando avaliaram a ação antimicrobiana de condimentos herbáceos frente à cepas de *V. parahaemolyticus*. Os resultados obtidos por diversos autores ao realizarem pesquisas com bactérias isoladas de camarões e peixes, em relação a sensibilidade a antibióticos, antimicrobianos fitoterápicos e probióticos levam a concluir que os probióticos e fitoterápicos possuem ação superior aos testes realizados com antimicrobianos convencionais (REGO et al., 2011, VASSEHARAN et al., 2011; SILVA et al., 2011).

O alho e o óleo de cravo possuem farmacocinéticas diferentes, o que pode explicar as diferentes doses encontradas nos testes CIM. O alho atua na eletroquímica da célula, interrompendo o ciclo da cadeia respiratória, substituindo o oxigênio pelo enxofre como ultimo acceptor de elétrons, ocasionando uma molécula bioquimicamente mais estável e levando a bactéria ao falecimento por falta de energia biodisponível (ATP), como descrito por Harris et al. (2001). O óleo de cravo atua sobre a permeabilidade da célula, impedindo o controle da bactéria sobre a seletividade da parede celular, levando ao rompimento da parede celular, conhecido também como apoptose (AFFONSO et al., 2012).

Outras plantas com potencial fitoterápico já foram pesquisadas, tais como a pimenta (*Capsicum* spp.), gengibre (*Zingiber officinalis*), hortelã (*Mentha piperita*). Grande parte da pesquisa na descoberta e avaliação destes compostos é realizado no oriente médio e extremo, com o objetivo de estudar as plantas aromáticas, medicinais, temperos e especiarias, destacando-se a Tunísia, Tailândia, Japão, Índia, Arábia Saudita, e Egito (YANO et al., 2006; VUDDHAKUL et al., 2007; SNOUSSI et al., 2008; ALY & MOHAMED, 2010; VASSEHARAN et al., 2011).

Apesar do sucesso em se encontrar antimicrobianos de origem vegetal, algumas plantas pesquisadas não apresentam quaisquer ação inibitória, como o óleo essencial de algumas variedades de limão (*Citrus limonium*), soluções aquosa de erva doce (*Pimpinella anisum*), salsinha (*Coriandrum sativum*) e de cominho (*Cuminum cyminum*) (YANO et al., 2006), evidenciando que estudos ainda devem ser feitos para determinar quais vegetais possuem ação antibacteriana e qual a melhor forma extração do composto ativo (YANO et al., 2006; SANTOS, et al., 2011), bem como determinar as concentrações capazes de inibir o crescimento bacteriano.

## CONCLUSÕES

O *Allium sativum* e a *Eugenia caryophyllata* tem ação inibitória sobre os víbrios das espécies *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

## REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. C.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. Revista Virtual de Química, v. 4, n.2, p. 146-161, 2012 < <http://migre.me/gf1XF> > 13 Jun. 2013.

ALY, S. M.; MOHAMED, M. F.; *Echinacea perpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. v. 94, p. 31-39, 2010 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20455962> > 12 Fev. 2012.

BRASIL, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, 8p. < <http://migre.me/gbCXv> >, 15 Dez. 2011.

FAO Fisheries and Aquaculture Department, Statistics and Information Service FishStatJ: Universal software for fishery statistical time series. Copyright 2011. < [ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/FishStatJ/deployment/Windows/FishStatJ\\_2.0.0\\_win32.zip](ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/FishStatJ/deployment/Windows/FishStatJ_2.0.0_win32.zip) > 15 Jan. 2012.

HARRIS, J. C.; COTTRELL, S. L.; PLUMMER, S.; LLOYD, D. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Journal of Applied Microbiology Biotechnology, v. 57, p. 282-286, 2001, < <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002530100722.pdf> > 12 Fev. 2012.

KIM, J.; MARSHALL, M.; R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 43, p. 2839-2845, 1995. < <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00059a013> >

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C.; Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido, MEDSI Editora médica e científica, 5ª edição, 2005, 1465p.

MORALLES-COVARRUBIAS, M. S. Enfermedades del camarón: detección mediante análisis em fresco e histopatología, México: Trillas, 2010, 180p.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, 2003, 81p.

PARODI, T. V.; CUNHA, M. A.; HELDWEIN, C. G.; SOUZA, D. M.; MARTINS, A. C.; GARCIA, L. O.; WASIELESKY Jr, W.; MONSERRAT, J. M.; SCHMIDT, D.;

CARON, B. O.; HEINZMANN, B.; BALDISSEROTTO, B.; 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*. 155, p. 462-468, 2012 < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.003> >

REGO, M. S.; SILVA, E.; CALAZANS, N.; VOGLEY, J.; VALLE, B.; NERY, R.; SOARES, R.; PEIXOTO, S.; Análise comparativa do emprego de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. *Atlântica*, v. 34, n. 2, p. 1237-143, 2012, < <http://dx.doi.org/10.5088/atl.2012.34.2.137> >

SANTOS, J. C.; CARVALHO FILHO, C. D.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. L. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. *Ciências Agrárias*, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, 2011 < <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1557> >

SILVA, E.; FRÓES, C.; SOUZA, D.; LARA, G.; BUENO, C.; SOARES, R.; PEIXOTO, S.; WASIELESKY, W.; BALLESTER, E.; Utilização de probiótico e antibiótico na produção de pós-larvas do camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 6, p. 869-874, 2012, < [www.scielo.br/pdf/pab/v47n6/47n06a19.pdf](http://www.scielo.br/pdf/pab/v47n6/47n06a19.pdf) > 12 Fev. 2012.

SNOUSSI, M.; HAJLAOUI, H.; NOUMI, E.; USAI, D.; SECHI, L. A.; ZANETTI, S.; BAKHROUF, A.; In-vitro anti-*Vibrio* spp. activity and chemical composition of some tunisian aromatic plants. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 24, p. 3071-3076, 2008, < <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-008-9811-6> >

THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J., The biology of vibrios. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2006, 423p.

VASSEHARAN, B.; PRASAD, G. S.; RAMASAMY, P.; BRENNAN, G. Antibacterial activity of *Allium sativum* against multidrug-resistant *Vibrio harveyi* isolated from black

gill-diseased *Fenneropennaeus indicus*. Aquaculture International, v. 19, p. 531-539, 2011, <<http://dx.doi.org/10.1007/s10499-010-9369-9>>

VUDDHAKUL, V.; BHOOPONG, P.; HAYEEBILAN, F.; SUBHADHIRASAKUL, S. Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. Food Microbiology, v. 24, p. 413-418, 2007, <>, 12 Feb. 2012.

YANO, Y.; SATOMI, M.; OIKAWA, H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. International Journal of Food Microbiology, v. 111, p. 6-11, 2006, <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.010>>

Artigo científico a ser encaminhado a **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

## **6- Normas da Revista Brasileira de Ciências Agrárias**

### Objetivo e Política Editorial

A Revista Brasileira de Ciências Agrárias (RBCA) é editada pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) com o objetivo de divulgar artigos científicos, para o desenvolvimento científico das diferentes áreas das Ciências Agrárias. As áreas contempladas são: Agronomia, Engenharia Agrícola, Engenharia Florestal, Engenharia de Pesca e Aqüicultura, Medicina Veterinária e Zootecnia. Os artigos submetidos à avaliação devem ser originais e inéditos, sendo vetada a submissão simultânea em outros periódicos. A reprodução de artigos é permitida sempre que seja citada explicitamente a fonte.

### Forma e preparação de manuscritos

O trabalho submetido à publicação deverá ser cadastrado no portal da revista (<http://www.agraria.pro.br>). O cadastro deverá ser preenchido apenas pelo autor correspondente que se responsabilizará pelo artigo em nome dos demais autores. Só serão aceitos trabalhos depois de revistos e aprovados pela Comissão Editorial, e que não foram publicados ou submetidos em publicação em outro veículo. Excetuam-se, nesta limitação, os apresentados em congressos, em forma de resumo. Os trabalhos subdivididos em partes 1, 2..., devem ser enviados juntos, pois serão submetidos aos mesmos revisores. Solicita-se observar as seguintes instruções para o preparo dos artigos.

Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente deve apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.

### Composição seqüencial do artigo

- a. Título: no máximo com 15 palavras, em que apenas a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula.
- b. Os artigos deverão ser compostos por, no máximo, 7 (sete) autores;
- c. Resumo: no máximo com 15 linhas;
- d. Palavras-chave: no mínimo três e no máximo cinco, não constantes no Título;
- e. Título em inglês no máximo com 15 palavras, ressaltando-se que só a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula;
- f. Abstract: no máximo com 15 linhas, devendo ser tradução fiel do Resumo;
- g. Key words: no mínimo três e no máximo cinco;

- h. Introdução: destacar a relevância do artigo, inclusive através de revisão de literatura;
- i. Material e Métodos;
- j. Resultados e Discussão;
- k. Conclusões devem ser escritas de forma sucinta, isto é, sem comentários nem explicações adicionais, baseando-se nos objetivos da pesquisa;
- l. Agradecimentos (facultativo);
- m. Literatura Citada.

Observação: Quando o artigo for escrito em inglês, o título, resumo e palavras-chave deverão também constar, respectivamente, em português ou espanhol, mas com a seqüência alterada, vindo primeiro no idioma principal.

Edição do texto

- a. Idioma: Português, Inglês e Espanhol
- b. Processador: Word for Windows;
- c. Texto: fonte Times New Roman, tamanho 12. Não deverá existir no texto palavras em negrito;
- d. Espaçamento: duplo entre o título, resumo e abstract; simples entre item e subitem; e no texto, espaço 1,5;
- e. Parágrafo: 0,5 cm;
- f. Página: Papel A4, orientação retrato, margens superior e inferior de 2,5 cm, e esquerda e direita de 3,0 cm, no máximo de 20 páginas não numeradas;
- g. Todos os itens em letras maiúsculas, em negrito e centralizados, exceto Resumo, Abstract, Palavras-chave e Key words, que deverão ser alinhados à esquerda e apenas as primeiras letras maiúsculas. Os subitens deverão ser alinhados à esquerda, em negrito e somente a primeira letra maiúscula;
- h. As grandezas devem ser expressas no SI (Sistema Internacional) e a terminologia científica deve seguir as convenções internacionais de cada área em questão;
- i. Tabelas e Figuras (gráficos, mapas, imagens, fotografias, desenhos)
  - Títulos de tabelas e figuras deverão ser escritos em fonte Times New Roman, estilo normal e tamanho 9;
  - As tabelas e figuras devem apresentar larguras de 9 ou 18 cm, com texto em fonte Times New Roman, tamanho 9, e ser inseridas logo abaixo do parágrafo onde foram citadas pela primeira vez. Exemplo de citações no texto: Figura 1; Tabela 1.

Tabelas e figuras que possuem praticamente o mesmo título deverão ser agrupadas em uma tabela ou figura criando-se, no entanto, um indicador de diferenciação. A letra indicadora de cada sub-figura numa figura agrupada deve ser maiúscula e com um ponto (exemplo: A.), e posicionada ao lado esquerdo superior da figura e fora dela. As figuras agrupadas devem ser citadas no texto da seguinte forma: Figura 1A; Figura 1B; Figura 1C.

- As tabelas não devem ter tracejado vertical e o mínimo de tracejado horizontal.

Exemplo do título, o qual deve ficar acima: Tabela 1. Estações do INMET selecionadas (sem ponto no final). Em tabelas que apresentam a comparação de médias, mediante análise estatística, deverá existir um espaço entre o valor numérico (média) e a letra.

As unidades deverão estar entre parêntesis.

- As figuras não devem ter bordadura e suas curvas (no caso de gráficos) deverão ter espessura de 0,5 pt, e ser diferenciadas através de marcadores de legenda diversos e nunca através de cores distintas. Exemplo do título, o qual deve ficar abaixo: Figura 1. Perda acumulada de solo em função do tempo de aplicação da chuva simulada (sem ponto no final). Para não se tornar redundante, as figuras não devem ter dados constantes em tabelas. Fotografias ou outros tipos de figuras deverão ser escaneadas com 300 dpi e inseridas no texto. O(s) autor(es) deverá(ão) primar pela qualidade de resolução das figuras, tendo em vista uma boa reprodução gráfica. As unidades nos eixos das figuras devem estar entre parêntesis, mas, sem separação do título por vírgula.

Exemplos de citações no texto

a. Quando a citação possuir apenas um autor: ... Freire (2007) ou ... (Freire, 2007).

b. Quando possuir dois autores: ... Freire & Nascimento (2007), ou ... (Freire & Nascimento, 2007).

c. Quando possuir mais de dois autores: Freire et al. (2007), ou (Freire et al., 2007).

Literatura citada

O artigo deve ter, preferencialmente, no máximo 25 citações bibliográficas, sendo a maioria em periódicos recentes (últimos cinco anos).

As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

As referências citadas no texto deverão ser dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e conter os nomes de todos os autores, separados por

ponto e vírgula. As citações devem ser, preferencialmente, de publicações em periódicos, as quais deverão ser apresentadas conforme os exemplos a seguir:

a. Livros

Mello, A.C.L. de; Vêras, A.S.C.; Lira, M. de A.; Santos, M.V.F. dos; Dubeux Júnior, J.C.B; Freitas, E.V. de; Cunha, M.V. da . Pastagens de capim-elefante: produção intensiva de leite e carne. Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2008. 49p.

b. Capítulo de livros

Serafim, C.F.S.; Hazin, F.H.V. O ecossistema costeiro. In: Serafim; C.F.S.; Chaves, P.T. de (Org.). O mar no espaço geográfico brasileiro. Brasília- DF: Ministério da Educação, 2006. v. 8, p. 101-116.

c. Revistas

Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers). Quando o artigo tiver a url.

Oliveira, A. B. de; Medeiros Filho, S. Influência de tratamentos pré-germinativos, temperatura e luminosidade na germinação de sementes de leucena, cv. Cunningham. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.7, n.4, p.268-274, 2007. <<http://agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path%5B%5D=183&path%5B%5D=104>>. 29 Dez. 2012.

Quando o artigo tiver DOI.

Costa, R.B. da; Almeida, E.V.; Kaiser, P.; Azevedo, L.P.A. de; Tyszka Martinez, D. Tsukamoto Filho, A. de A. Avaliação genética em progênies de Myracrodruon urundeuva Fr. All. na região do Pantanal, estado do Mato Grosso. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.6, n.4, p.685-693, 2011. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v6i4a1277>

d. Dissertações e teses

Bandeira, D.A. Características sanitárias e de produção da caprinocultura nas microrregiões do Cariri do estado da Paraíba. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 116p. Tese Doutorado.

e. WWW (World Wide Web) e FTP (File Transfer Protocol)

Burka, L.P. A hipertext history of multi-user dimensions; MUD history. <<http://www.aka.org.cn/Magazine/Aka4/interhisE4.html>>. 29 Nov. 2012.

Não serão aceitas citações bibliográficas do tipo apud ou citado por, ou seja, as citações deverão ser apenas das referências originais.

Citações de artigos no prelo, comunicação pessoal, folder, apostila, monografia, trabalho de conclusão de curso de graduação, relatório técnico e trabalhos em congressos, não são aceitos na elaboração dos artigos.

Outras informações sobre a normatização de artigos

- 1) Os títulos das bibliografias listadas devem ter apenas a primeira letra da primeira palavra maiúscula, com exceção de nomes próprios. O título de eventos deverá ter apenas a primeira letra de cada palavra maiúscula;
- 2) O nome de cada autor deve ser por extenso apenas o primeiro nome e o último sobrenome, sendo apenas a primeira letra maiúscula;
- 3) Não colocar ponto no final de palavras-chave, key words e títulos de tabelas e figuras. Todas as letras das palavras-chave devem ser minúsculas, incluindo a primeira letra da primeira palavra-chave;
- 4) No Abstract, a casa decimal dos números deve ser indicada por ponto em vez de vírgula;
- 5) A Introdução deve ter, preferencialmente, no máximo 2 páginas. Não devem existir na Introdução equações, tabelas, figuras, e texto teórico sobre um determinado assunto;
- 6) Evitar parágrafos muito longos;
- 7) Não deverá existir itálico no texto, em equações, tabelas e figuras, exceto nos nomes científicos de animais e culturas agrícolas, assim como, nos títulos das tabelas e figuras escritos em inglês;
- 8) Não deverá existir negrito no texto, em equações, figuras e tabelas, exceto no título do artigo e nos seus itens e subitens;
- 9) Em figuras agrupadas, se o título dos eixos x e y forem iguais, deixar só um título centralizado;
- 10) Todas as letras de uma sigla devem ser maiúsculas; já o nome por extenso de uma instituição deve ter maiúscula apenas a primeira letra de cada nome;
- 11) Nos exemplos seguintes o formato correto é o que se encontra no lado direito da igualdade: 10 horas = 10 h; 32 minutos = 32 min; 5 l (litros) = 5 L; 45 ml = 45 mL;  
l/s = L.s<sup>-1</sup>; 27°C = 27 °C; 0,14 m<sup>3</sup>/min/m = 0,14 m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>; 100 g de peso/ave = 100 g de peso por ave; 2 toneladas = 2 t; mm/dia = mm.d<sup>-1</sup>; 2x3 = 2 x 3 (deve ser

separado); 45,2 - 61,5 = 45,2-61,5 (deve ser junto). A % é unidade que deve estar junta ao número (45%). Quando no texto existirem valores numéricos seguidos, colocar a unidade somente no último valor (Exs.: 20 e 40 m; 56,0, 82,5 e 90,2%).

Quando for pertinente, deixar os valores numéricos com no máximo duas casas decimais;

12) No texto, quando se diz que um autor citou outro, deve-se usar apud em vez de citado por. Exemplo: Walker (2001) apud Azevedo (2005) em vez de Walker (2001) citado por Azevedo (2005). Recomendamos evitar essa forma de citação.

13) Na definição dos parâmetros e variáveis de uma equação, deverá existir um traço separando o símbolo de sua definição. A numeração de uma equação deve estar entre parêntesis e alinhada esquerda. Uma equação deve ser citada no texto conforme os seguintes exemplos: Eq. 1; Eq. 4.;

14) Quando o artigo for submetido não será mais permitida mudança de nome dos autores, seqüência de autores e quaisquer outras alterações que não sejam solicitadas pelo editor.

Procedimentos para encaminhamento dos artigos

O autor correspondente deve se cadastrar como autor e inserir o artigo no endereço <http://www.agraria.ufrpe.br> ou <http://www.agraria.pro.br>. O autor pode se comunicar com a Revista por meio do e-mail [agrarias@prppg.ufrpe.br](mailto:agrarias@prppg.ufrpe.br), [editorgeral@agraria.pro.br](mailto:editorgeral@agraria.pro.br) ou [secretaria@agraria.pro.br](mailto:secretaria@agraria.pro.br).