



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

RENATA ALBUQUERQUE COSTA

**BIOATIVIDADE *IN VITRO* DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE SEMENTES
DE *Moringa oleifera* FRENTE A ESTIRPES DE *Vibrio* PORTADORAS DE
FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS,
ISOLADAS DA HEMOLINFA DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

FORTALEZA

2011

RENATA ALBUQUERQUE COSTA

BIOATIVIDADE *IN VITRO* DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE SEMENTES DE
Moringa oleifera FRENTE A ESTIRPES DE *Vibrio* PORTADORAS DE FATORES
DE VIRULÊNCIA E RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS, ISOLADAS DA
HEMOLINFA DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

FORTALEZA

2011

RENATA ALBUQUERQUE COSTA

BIOATIVIDADE *IN VITRO* DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* FRENTE A ESTIRPES DE *Vibrio* PORTADORAS DE FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS, ISOLADAS DA HEMOLINFA DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Tese apresentada ao Doutorado em Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 09/12/2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ernesto Hofer
Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Carlucio Roberto Alves
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais, à Maria Clara e ao Gustavo (*in
memorian*)

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de auxílio.

Ao professor Alberto Nunes, por permitir minha coleta no Centro de Estudos de Aqüicultura Costeira do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR).

Ao professor Geraldo, pela coragem e gentileza em aceitar trabalhar minhas amostras. Tem muito de sua generosidade nesse trabalho.

Ao professor Jair, pela ajuda na caracterização química das minhas amostras.

Ao Dr. Ernesto, pela generosidade de seu gênio.

A professora Silvana, pela delicadeza e amizade.

Ao Coordenador da Pós-Graduação - professor Celso, pela paciência e ajuda.

A secretária da Pós-Graduação - Rogéria, pela eficiência.

Ao professor Carlucio, por participar da banca examinadora.

À Giselle e Rayza, pela amizade e ajuda. Sem a disposição e a paciência de vocês com os meus cronogramas de bancada, esse trabalho certamente ainda estaria inconcluso.

À Cris, Edi e Gleire, por dividirem a bancada, o tempo e a amizade.

Aos muitos companheiros do laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar: Jackson, Karla, Marina, Rafael, Camilla Brandão, Camila Magalhães, Lana, Soraya, Alberto, Adalva e Ludimila.

Aos meus amigos de turma Kelma e Daniel.

Às minhas amigas Marília e Miqueline, sempre presentes.

Ao Babi, pelo carinho nesses anos todos.

À minha família – mãe, pai, irmãos, Virgínia e Fábio, pelo suporte financeiro e, sobretudo, emocional, que permitiu a realização de tudo isso.

À Maria Clara, por alegrar os dias da dinda.

Ao Jorge, pelo inglês e pela companhia.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Regine, por me fazer uma privilegiada maiúscula ao aceitar meu ingresso no seu grupo de pesquisa. No meu conceito, seus conselhos são tidos como condição *sine qua non* para minha formação acadêmica. Afora isso, sou grata a amizade e ao tempo gasto com a produção desse trabalho.

À Oscarina, que é amiga e modelo de competência profissional.

Ao Gustavo (*in memoriam*), por ter acreditado em mim. Sigo com uma saudade e admiração que desafiam o tempo.

RESUMO

A prospecção de agentes antibacterianos pode fornecer alternativa terapêutica para epizootias de etiologia bacteriana que representam risco para o desenvolvimento de atividades aquícolas. Considerando essa assertiva, o presente estudo teve como objetivo a avaliação da bioatividade *in vitro* de extratos de sementes de *Moringa oleifera* contra vibrios isolados da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*. Como critérios de seleção para os testes de atividade antibacteriana, foram determinados perfis relacionados à resistência a antimicrobianos e à expressão de exoenzimas associadas a fatores virulentos. Foram isoladas e identificadas fenotipicamente 100 cepas de *Vibrio*, verificando-se predominância das espécies de *V. navarrensis* (53%), *V. brasiliensis* (15%) e *V. parahaemolyticus* (10%). Todas as cepas testadas (n = 100) foram capazes de expressar pelo menos uma exoenzima. As atividades fosfolipolítica e lipolítica foram verificadas em 94% e 58% das cepas, respectivamente. Trinta e oito estirpes produziram β-hemólise em sangue de ovelha. A habilidade em hidrolisar caseína, gelatina e elastina foi observada em 96%, 80% e 35% dos vibrios, respectivamente. O perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos revelou um elevado índice de resistência (75%). Foram observados perfis de monoresistência (n = 42), resistência cruzada a β-lactâmicos (n = 20) e multiresistência (n = 13). No que se refere à atividade antibacteriana, os extratos obtidos por extração com etanol a frio (MOS-E) e a quente (MOS-ES) mostram-se bioativos contra 92% e 90% das cepas testadas, respectivamente. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de MOS-E e MOS-ES mais eficiente contra o maior percentual de estirpes foi a de 32 µg mL⁻¹. A triagem bioguiada de compostos bioativos revelou que a fração acetato de etila de ambos os extratos foi a única que apresentou atividade antibacteriana. A partir do fracionamento cromatográfico da fração supracitada, isolaram-se as substâncias vibriocidas niazirina e niazimicina.

Palavras-chave: *Vibrio*. Hemolinfa do *Litopenaeus vannamei*. *Moringa oleifera*. Compostos vibriocidas.

ABSTRACT

The search for antibacterial agents may provide alternative therapy for outbreaks of bacterial etiology that represents a risk to the development of aquaculture activities. Thus, the research aimed to evaluate the *in vitro* bioactivity of the *Moringa oleifera* seeds extracts against isolated vibrios from the *Litopenaeus vannamei* hemolymph. The profiles related to antibiotic resistance and exoenzyme expression associated to virulence factors were determined as criteria for antibacterial activity assays. One hundred strains of *Vibrio* were isolated and phenotypically identified, with the predominance of *V. navarrensis* (53%), *V. brasiliensis* (15%) and *V. parahaemolyticus* (10%). The expression of at least one exoenzyme was detected in all isolates (n = 100). It was found a percentage of phospholipase and lipase positive strains of 94 and 58%, respectively. Thirty-eight strains produced β -hemolysis on sheep blood. The ability to hydrolyze casein, gelatin and elastin was observed in 96%, 80% and 35% of vibrios, respectively. It was observed a high antibiotic resistance index (75%), with following phenotypic profiles: monoresistance (n = 42), cross-resistance to β -lactams (n = 20) and multiple resistance (n = 13). The antibacterial activity tests indicated bioactivity from the MOS-E and MOS-ES against 92% and 90% of strains tested, respectively. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of MOS and MOS-E-ES able to inhibit the growth of most strains was of 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The screening of bioactive compounds revealed that only a fraction of ethyl acetate from both extracts demonstrated antibacterial effect, which made possible the isolation of the vibriocidal substances niazirine and niazimicine.

Keywords: *Vibrio*. *Litopenaeus vannamei* hemolymph. *Moringa oleifera*. Vibriocidal compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Coleta de hemolinfa da região ventral do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	31
Figura 2 -	Crescimento de colônias sacarose positivas (A) e negativas (B) em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose	32
Figura 3 -	Fluxograma da técnica para determinação do perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos	40
Figura 4 -	Fluxograma dos processos de extração com solventes orgânicos a frio e a quente das sementes de <i>Moringa oleifera</i>	42
Figura 5 -	Processos de obtenção dos extratos das sementes de <i>Moringa oleifera</i> . A - a frio, B - a quente em Soxhlet	42
Figura 6 -	Cromatograma de análise por CLAE da fração ativa MOS-ES-AcOEt e isolamento das substâncias MOS-ES-1, MOS-ES-2 e MOS-ES-3	44
Figura 7 -	Placa de análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das substâncias MOS-ES-1 (1), MOS-ES-2 (2) e MOS-ES-3 (3). P = purga da coluna; eluente = CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5) e revelador = solução de vanilina	45
Figura 8 -	Fenotipagem de 100 víbrios isolados de dez amostras de hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC)	48
Figura 9 -	Halos de hidrólise da gelatina no meio de Agar Triptona Soja suplementado com 0,5% de gelatina (Difco) e 1% de NaCl	55
Figura 10 -	Halos de hidrólise da caseína no meio de Agar Leite contendo 1% de NaCl	55
Figura 11-	Halo de hidrólise da elastina no meio de Agar Noble suplementado com 0,3% de elastina (Sigma E1625) e 1% de NaCl	55
Figura 12-	Halos característicos de β-hemólise no meio de Agar Wagatsuma com modificações: suplementado com sangue de ovelha e 1% de NaCl	55
Figura 13 -	Halos de hidrólise de fosfolipídeos em meio Agar Triptona Soja suplementado com solução de gema de ovo e 1% de NaCl	55

Figura 14 -	Detecção de espectros complementares de atividade enzimática em 24 isolados de <i>Vibrio</i> provenientes da hemofinfa de espécimes de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC)..	56
Figura 15 -	Determinação do espectro de atividade enzimática das cepas 7 (<i>V. alginolyticus</i>), 13 (<i>V. navarrensis</i>) e 22 (<i>V. navarrensis</i>), através da utilização do <i>kit</i> APIzym (Biomérieux Ref 25200)	57
Figura 16 -	A: Cepa 32 com perfil fenotípico de resistência à penicilina e tetraciclina. B: Antibiograma pós-cura da cepa 32 evidenciando resistência fenotípica à penicilina, tetraciclina e ampicilina.....	60
Figura 17 -	A) Halos de inibição do MOS-ES (cepa 64 – <i>V. navarrensis</i>). B) Halos de inibição do MOS-E (cepa 64). C) Controle negativo (disco embebido com etanol PA e positivo (cloranfenicol 30 µg)	62
Figura 18 -	A) Halos de inibição do MOS-ES (cepa 70 – <i>V. brasiliensis</i>). B) Halos de inibição do MOS-E (cepa 70). C) Controle negativo (disco embebido com etanol PA) e positivo (cloranfenicol 30 µg)	62
Figura 19 -	A) Halos de inibição do MOS-ES (cepa 86 – <i>V. navarrensis</i>). B) Halos de inibição do MOS-E (cepa 86). C) Controle negativo (disco embebido com etanol PA) e positivo (cloranfenicol 30 µg)	63
Figura 20 -	A) Halos de inibição do MOS-ES e MOS-E frente à cepa padrão de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. B) Halos de inibição do MOS-ES e MOS-E frente à cepa padrão de <i>V. parahaemolyticus</i> IOC Kanagawa positiva	63
Figura 21 -	Halos de inibição de MOS-E-AcOEt frente a: a) <i>V. diazotrophicus</i> b) <i>V. alginolyticus</i> c) <i>V. xuii</i> d) <i>V. coralliilyticus</i> . e) <i>V. navarrensis</i> f) <i>V. navarrensis</i>	66
Figura 22 -	Halos de inibição MOS-ES-AcOEt frente a: a) <i>V. navarrensis</i> b) <i>V. xuii</i> c) <i>V. diazotrophicus</i> d) <i>V. coralliilyticus</i> . e) <i>V. navarrensis</i> f) <i>V. alginolyticus</i>	66
Figura 23 -	Placa da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) da análise por CLAE da fração MOS-ES-AcOEt. 1 = MOS-ES-1; 2 = MOS-ES-3; P = purga da coluna; eluente = CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5) e revelador = solução de vanilina	67

Figura 24 - Estrutura química do composto vibriocida niazirina isolado da fração acetato de etila do extrato etanólico de semente de <i>Moringa oleifera</i> - MOS-ES	68
Figura 25 - Estrutura química do composto vibriocida niazimicina isolado da fração acetato de etila do extrato etanólico de semente de <i>Moringa oleifera</i> - MOS-ES.....	69
Figura 26 - Halos de inibição das substâncias 1 (S1) e 3 (S3) contra uma cepa de <i>V. diazotrophicus</i> isolada da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Algumas espécies de <i>Vibrio</i> descritas nos anos de 2009, 2010 e 2011	21
Tabela 2 -	Número Mais Provável (NMP mL ⁻¹) de <i>Vibrio</i> em amostras de hemolinfa e variáveis morfométricas de 50 camarões marinhos <i>Litopenaeus vannamei</i>	46
Tabela 3 -	Distribuição de espécies de <i>Vibrio</i> por amostras de hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC)	48
Tabela 4 -	Expressão de proteases por víbrios isolados da hemolinfa do <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC)..	50
Tabela 5 -	Expressão de lipase, fosfolipase e atividade hemolítica por víbrios isolados da hemolinfa do <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC)	52
Tabela 6 -	Perfil enzimático de 100 estirpes de <i>Vibrio</i> isoladas da hemolinfa do <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC) ..	54
Tabela 7 -	Resistência a antimicrobianos de víbrios oriundos da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).....	58
Tabela 8 -	Perfis de resistência a antimicrobianos de víbrios isolados da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).....	59
Tabela 9 -	Mediação plasmidial da resistência antimicrobiana de víbrios isolados da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).....	60

Tabela 10 -	Distribuição, de acordo com a média do halo de inibição (mm), do número de cepas inibidas pelo extrato etanólico a frio de sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MOS-E)	62
Tabela 11 -	Distribuição, de acordo com a média do halo de inibição (mm), do número de cepas inibidas pelo extrato etanólico a quente de sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MOS-ES)	63
Tabela 12 -	Média de halos de inibição das frações diclorometano (CH ₂ Cl ₂), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) dos extratos etanólicos (MOS-E e MOS-ES) de sementes de <i>Moringa oleifera</i> contra dez estirpes de <i>Vibrio</i> isoladas da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	66
Tabela 13 -	Média de halos de inibição das substâncias 1 (S1) e 3 (S3), isoladas das frações acetato de etila (AcOEt) dos extratos etanólicos (MOS-E e MOS-ES) de sementes de <i>Moringa oleifera</i> , contra dez estirpes de <i>Vibrio</i> oriundas da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ace</i>	Gene que Codifica a Enterotoxina Acessória da Cólera
APA	Água Peptonada Alcalina
ATCC	Coleção Americana de Culturas-tipo
CEAC	Centro de Estudos de Aquicultura Costeira
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
<i>ctxA</i>	Gene que Codifica a Subunidade A da Enterotoxina da Cólera
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSMZ	Coleção Germânica de Microrganismos e Culturas de Células
ECPs	Produtos Extracelulares
G+C	Guanina+Citosina
Hly	Hemolisina
HSV-1	Vírus Herpes Simplex 1
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
K+/K-	Kanagawa positiva/Kanagawa negativa
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
LD ₅₀	Dose Letal Média
MDD	Método de Difusão em Disco
MOS-E	Extrato etanólico a frio de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-E-CH ₂ Cl ₂	Fração diclorometano do extrato etanólico a frio de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-E-AcOEt	Fração acetato de etila do extrato etanólico a frio de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-E-MeOH	Fração metanol do extrato etanólico a frio de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-ES	Extrato etanólico a quente de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-ES-1	Substância 1 isolada do extrato etanólico a quente de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-ES-2	Substância 2 isolada do extrato etanólico a quente de sementes de <i>Moringa oleífera</i>

MOS-ES-3	Substância 3 isolada do extrato etanólico a quente de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-ES- CH ₂ Cl ₂	Fração diclorometano do extrato etanólico a quente de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-ES- AcOEt	Fração acetato de etila do extrato etanólico a quente de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-ES- MeOH	Fração metanol do extrato etanólico a quente de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-H	Extrato hexânico a frio de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MOS-HS	Extrato hexânico a quente de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
MRVP	Vermelho de Metila/Voges Proskauer
NMP	Número Mais Provável
NAG-ST	Enterotoxina Termo-estável do <i>Vibrio cholerae</i> não-O1
OMP	Proteína da Membrana Externa
<i>OmpU</i>	Gene que Codifica uma Proteína da Membrana Externa
ONPG	o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo
PC	Prova Confirmatória
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PP	Prova Presuntiva
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SIM	Sulfeto Indol Motilidade
TCBS	Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TCP	Pilus Corregulador de Toxina
TDH	Hemolisina Direta Termoestável
TSA	Agar Triptona Soja
TRH	Hemolisina Relacionada à TDH
TSB	Caldo Triptona Soja
ToxR	Proteína Reguladora da Produção da Toxina Colérica
ToxS	Proteína Reguladora da Produção da Toxina Colérica
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VPI	Ilha de Patogenicidade da espécie <i>Vibrio cholerae</i>
<i>zot</i>	Gene que Codifica a Toxina da Zona Ocludens

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	<i>Vibrio</i>.....	20
2.2	Fatores de virulência em <i>Vibrio</i>.....	23
2.3	<i>Vibrio</i> com fatores de virulência no cultivo de camarão	26
2.4	<i>Moringa oleifera</i>	27
2.5	Bioatividade de moringa frente a bactérias	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICES.....	96

1. INTRODUÇÃO

O estudo de fanerógamas direcionado para triagem de bioatividade frente a bactérias que representam risco para atividades aquícolas pode constituir uma alternativa para o emprego de antimicrobianos no cultivo de camarão (RANDRIANARIVELO *et al.*, 2010). Dessa forma, a prospecção de novos agentes antimicrobianos é justificada, uma vez que o uso inadequado de fármacos antibacterianos na aquicultura vem sendo associado a impactos ambientais negativos: seleção de populações bacterianas resistentes a drogas (ZHANG; LI; SUN, 2011; REBOUÇAS *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2010; UYAGUARI *et al.*, 2009) e contaminação de ecossistemas adjacentes aos viveiros de cultivo (THUY; NGA; LOAN; 2011). Somam-se a isso, possíveis restrições a importações de camarão devido a presença de resíduos de antibióticos em seus tecidos (DANG *et al.*, 2010), e o comprometimento da segurança alimentar (GRÄSLUND; HOLMSTRÖM; WAHLSTRÖM, 2003).

As enfermidades em camarão cultivado podem ser desencadeadas por fatores de ordem física, química ou biológica e o contato com estes agentes invariavelmente resultará na redução efetiva da resistência imunológica dos animais, aumentando assim a presença de patógenos oportunistas e a incidência e/ou severidade de patologias (BROCK; MAIN, 1994). Para Lightner e Redman (1998), o equilíbrio dos ambientes cultivados envolve a estreita relação entre a degradação das condições do sistema de cultivo e a diminuição da resistência imunológica provocada pelo estresse, que concorre para o aumento no risco do surgimento de enfermidades provocadas por bactérias.

Segundo Aguirre-Guzmán, Vázquez-Juárez e Ascencio (2001), a rápida expansão do cultivo de camarões peneídeos vem sendo ameaçada por doenças bacterianas provocadas pelo gênero *Vibrio*, que afetam a sua sobrevivência e crescimento. Esses microrganismos oportunistas fazem parte da microbiota normal dos peneídeos, provocando doenças quando condições ambientais desfavoráveis se estabelecem no sistema de cultivo.

Os víbrios geram efeitos específicos nos peneídeos, incluindo mortalidade, lesões nos tecidos ou necrose, retardo no crescimento, degradação de tecidos, comprometimento das metamorfoses larvais, entre outros. As principais espécies reportadas como causadoras de infecções nos camarões de cultivo são: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. penaeicida*, *V. splendidus*, *V. damsela* e *V. harveyi* (AGUIRRE-GUZMÁN; VÁZQUEZ-JUÁREZ; ASCENCIO, 2002).

Para Mendes *et al.* (2005) os sintomas de vibriose em camarão cultivado são diferenciados de acordo com seu estágio de desenvolvimento. Na fase de engorda pode ser

observada desorientação (natação lenta), hemolinfa turva com tempo de coagulação alterado, aglomeração nas margens do viveiro atraindo aves, opacidade na musculatura, coloração avermelhada dos apêndices, flexão do terceiro apêndice abdominal, melanização nas brânquias, cutículas e apêndices, além de anorexia e apatia. Quando na larvicultura, observam-se: alimentação reduzida, ausência de filamentos fecais, atraso da muda, colonização bacteriana em diferentes regiões (cutícula, apêndices, hepatopâncreas e intestino), infecção entérica ou sistêmica, destruição das células epiteliais do hepatopâncreas e intestino médio, conseqüentemente, aumento no tempo da larvicultura e redução da sobrevivência.

O desequilíbrio ambiental associado à proliferação de víbrios portadores de mecanismos de virulência tem sido a causa de epizootias registradas nas últimas décadas na carcinicultura. Prayitno e Latchford (1995) relatam uma epizootia provocada por *Vibrio* no ano de 1991 em Java, que provocou uma perda estimada em mais de 85 milhões de dólares.

A ocorrência de víbrios com fatores de virulência na carcinicultura vem sendo relatada em estudos realizados em diferentes países (LEE *et al.*, 1996; GOARANT *et al.*, 2000; JAYASREE; JANAKIRAM; MADHAVI, 2006). Soma-se a isso a capacidade de transferência de genes de virulência entre espécies de *Vibrio*, o que pode concorrer para aquisição de fatores de patogenicidade entre bactérias autóctones de ambientes de cultivo. Nesse contexto, Sechi *et al.* (2000) observaram a distribuição do gene de virulência *toxR* e da ilha de patogenicidade (*vpi*) da espécie *V. cholerae* em cepas de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* não O1 isoladas de amostras de águas marinhas na Itália.

No cultivo de camarão, além da presença de bactérias potencialmente patogênicas, outro fator que pode concorrer para o agravamento de quadros de epizootias bacterianas é a seleção de microrganismos resistentes a antimicrobianos. Ainda nesse sentido, para Cabello (2006), o uso de fármacos antibacterianos como medida profilática na aquicultura favorece a seleção de bactérias resistentes no ambiente de cultivo e aumenta o risco de transferência de genes de resistência à patógenos humanos e de animais terrestres.

A caracterização fenotípica de resistência a antimicrobianos em víbrios isolados de ambientes de cultivo de peneídeos não é um fato inusitado (BHATTACHARYA; CHOUDHRY; KUMAR, 2000; ROQUE *et al.*, 2001; THAKUR; VAIDYA; SURYAWANSHI, 2003) e parece representar risco para viabilidade desse tipo de atividade aquícola (VASEEHARAN; RAFFIQ HUSSIAN; CHEN, 2008).

Diante do exposto, a detecção de atividades antibacterianas em vegetais superiores contra víbrios portadores de perfil virulento e resistentes a antimicrobianos merece destaque. Dessa forma, a capacidade vibriocida da angiosperma *Moringa oleifera* foi investigada devido

a sua elevada atividade medicinal (ANWAR *et al.*, 2007) e ampla distribuição no Nordeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002).

O efeito antimicrobiano da moringa vem sendo pesquisado desde a década de 1950 e parece estar relacionado a componentes específicos, que incluem 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosilóxi) benzil isotiocianato, 4-(α -L-ramnopiranosilóxi) benzil isotiocianato, niazimicina, pterigospermina, benzil isotiocianato e 4-(α -L-ramnopiranosilóxi) benzil glucosinato. Adicionalmente, a moringa também é rica em vitaminas, minerais e fitoquímicos carotenóides (β -caroteno) (FAHEY, 2005).

A despeito da extensa evidência científica sobre a bioatividade de moringa contra bactérias (SUAREZ *et al.*, 2003; SUAREZ *et al.*, 2005), estudos sobre os seus efeitos contra víbrios que ameaçam a viabilidade da carcinicultura são incipientes.

Considerando a assertiva supracitada, o presente estudo teve como objetivo precípua a pesquisa de bioatividade dos extratos de moringa frente a estirpes de *Vibrio*, portadoras de fatores de virulência e resistentes a antimicrobianos, isoladas da hemolinfa do camarão cultivado *Litopenaeus vannamei*. Como objetivos específicos, citam-se: (1) determinação do Número Mais Provável de *Vibrio* em amostras de hemolinfa do *L. vannamei*; (2) isolamento e identificação de cepas de *Vibrio* da hemolinfa; (3) detecção de fatores de virulência nos víbrios identificados; (4) determinação do perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados de *Vibrio*; (5) pesquisa do tipo de mediação da resistência aos fármacos antibacterianos; (6) obtenção de extratos de sementes de *Moringa oleifera*; (7) verificação da suscetibilidade dos víbrios (com fatores de virulência e/ou resistência a antimicrobianos) aos extratos de moringa, através do teste de Difusão em Disco e da determinação da Concentração Inibitória Mínima; (8) isolamento e caracterização química do princípio ativo vibriocida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Vibrio*

Pertencem ao gênero *Vibrio* bacilos Gram-negativos medindo entre 0,5 a 0,8 μ m de diâmetro e 1,4 a 2,4 μ m de comprimento, geralmente curvos e móveis, anaeróbios facultativos, não produtores de esporos e oxidase-positivos. Todas as espécies utilizam D-glicose, com ou sem produção de gás, como principal fonte de carbono, e geralmente os sais de amônio constituem a sua principal fonte de nitrogênio. O crescimento da maioria dos víbrios é estimulado pela presença de íons sódio (MURRAY *et al.*, 1999; RIPABELLI *et al.*, 1999). Citam-se as espécies *V. aerogenes*, *V. gazogenes*, *V. metschnikovii*, *V. rhizosphaerae* e *V. ruber* como oxidase-negativas, e *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. hepatanus*, *V. hispanicus*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus* e *V. navarrensis* como espécies capazes de crescer na ausência de sódio (NOGUEROLA; BLANCH, 2008).

Além da concentração de sódio, outros fatores são determinantes para a sobrevivência dos víbrios, destacando-se a temperatura e potencial hidrogeniônico (pH). No que tange a temperatura, a maioria das espécies é classificada como mesófila e tende a proliferar-se em águas costeiras tropicais. Segundo Hervio-Heath *et al.* (2002), o intervalo entre 20 e 30°C corresponde ao ótimo para o desenvolvimento dos víbrios, abaixo de 20°C a densidade é diminuída e a 10°C ocorre o desaparecimento na coluna d'água. Por outro lado, existem poucas espécies como *V. logei*, *V. wodanis* e *V. salmonicida*, que são adaptadas a ambientes temperados e possuem a habilidade de crescer a 4°C, pertencendo ao grupo dos víbrios psicrófilos (URAKAWA; KITA-TSUKAMOTO; OHWADA, 1999). Com relação ao pH, todas as espécies são sensíveis à acidez, possuindo capacidade de crescer em meios neutros ou alcalinos (pH até 9,0), com o ótimo de desenvolvimento em uma faixa de 8 a 8,8 (IGBINOSA; OKOH, 2008).

Ainda como características metabólicas do gênero *Vibrio*, Maugeri, Caccamo e Gugliandolo (2000) afirmam que esse grupo possui uma ampla versatilidade nutricional, e destacam que algumas espécies são capazes de crescer em mais de 150 diferentes tipos de compostos orgânicos, se equiparando a versatilidade metabólica do gênero *Pseudomonas*.

No que concerne ao *habitat*, os víbrios são ubíquos de ambientes marinhos e estuarinos, sendo amplamente distribuídos e podendo ocorrer na coluna d'água (BAIZABAL-RAMÍREZ *et al.*, 2011), coluna d'água de ambientes marinhos anóxicos (GARCÍA-AMADO *et al.*, 2011), sedimentos (XU *et al.*, 2009), associados ao zooplâncton (KIRSCHNER *et al.*,

2011), a espécies de peixes (FERNANDÉZ; AVENDAÑOS-HERRERA, 2009; SILVA-RUBIO *et al.*, 2008), e de invertebrados marinhos, como camarões (LI *et al.*, 2007; SELVIN; LIPTON, 2003; VIEIRA *et al.*, 2000), ostras (VIEIRA *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2008; PARVEEN *et al.*, 2008; DEEPANJALI *et al.*, 2005) e mexilhões (ROJAS *et al.*, 2011).

O papel ecológico dos víbrios não está completamente elucidado. É sabido que essas bactérias são importantes na decomposição da matéria orgânica através de vias fermentativas, levando à formação de pequenas moléculas orgânicas, como lactato, butirato, propionato, acetato, formiato, H₂ e CO₂. Por outro lado, esses compostos representam os principais substratos para a redução de sulfato e são usados, em parte, para a formação de metano (URAKAWA; RIVERA, 2006).

Nos últimos anos, a taxonomia do gênero *Vibrio* vem sofrendo uma série de mudanças que incluem descrição de espécies novas (Tabela 1) e reclassificação (PASCUAL *et al.*, 2009). Essas mudanças coincidem com o advento de diferentes métodos de biologia molecular utilizados para fins de identificação de espécies bacterianas, tais como PCR, multiplex PCR, nested PCR, real-time PCR, multiplex real-time PCR, PCR-DGGE e seminested RT-PCR (NISHIBUCHI, 2006).

Tabela 1 – Algumas espécies de *Vibrio* descritas nos anos de 2009, 2010 e 2011.

Espécie	Origem	Fonte
<i>V. jasicida</i>	Lagosta, haliote e salmão	Yoshizawa <i>et al.</i> , 2011
<i>V. atlanticus</i> e <i>V. artabrorum</i>	Amêijoas	Diéguez <i>et al.</i> , 2011
<i>V. stylophorae</i>	Corais	Sheu <i>et al.</i> , 2011
<i>V. communis</i>	Corais, zoantídeos e camarão	Chimetto <i>et al.</i> , 2011
<i>V. marisflavi</i>	Água do mar (China)	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>V. atypicus</i>	Camarão marinho	Wang <i>et al.</i> , 2010
<i>V. owenssii</i>	Lagosta e camarão marinho	Cano-Gómez <i>et al.</i> , 2010
<i>V. hippocampi</i>	Peixe marinho	Balcázar; Pintado; Planas, 2010
<i>V. sagamiensis</i>	Água do mar (Japão)	Yoshizawa <i>et al.</i> , 2010
<i>V. hangzhouensis</i>	Sedimento marinho (China)	Xu <i>et al.</i> , 2009
<i>V. breoganii</i>	Amêijoas	Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2009a
<i>V. gallaecicus</i>	Amêijoas	Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2009b
<i>V. azureu</i>	Água do mar (Japão)	Yoshizawa <i>et al.</i> , 2009

Ainda nesse sentido, Noguera e Blanch (2008) destacam que a taxonomia do gênero *Vibrio* é extremamente diversa. Os autores reconhecem que a identificação fenotípica ao nível de espécie vem se tornando uma tarefa cada vez mais complexa devido à rápida classificação de novas espécies, bem como à discrepância sobre o emprego de determinados testes bioquímicos específicos.

No início da década de 2000, o gênero *Vibrio* possuía 74 espécies distribuídas em quatro famílias: Enterovibrionaceae, Photobacteriaceae, Salinivibrionaceae, e Vibrionaceae. Dois novos gêneros *Enterovibrio norvegicus* e *Grimontia hollisae*, e vinte novas espécies foram descritas, a saber: *Enterovibrio corallii*, *Photobacterium euosenbergii*, *V. brasiliensis*, *V. chagasii*, *V. corallilyticus*, *V. crassostreae*, *V. fortis*, *V. gallicus*, *V. hepatarius*, *V. hispanicus*, *V. kanaloaei*, *V. neonatus*, *V. neptunius*, *V. pomeroyi*, *V. pacinii*, *V. rotiferianus*, *V. superstes*, *V. tasmaniensis*, *V. ezurae* e *V. xuii* (THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004). De acordo com Okada *et al.* (2010), mais de 100 espécies de *Vibrio* já foram descritas. Por outro lado, atualmente há 81 espécies catalogadas na Coleção Germânica de Microrganismos e Culturas de Células (DSMZ, 2011), considerando culturas pertencentes aos gêneros *Vibrio*, *Allivibrio*, *Desulfovibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia* e *Listonella*.

A despeito das recentes publicações, as espécies mais pesquisadas são as que provocam doenças em humanos e animais aquáticos. Nesse sentido, destaca-se *V. cholerae* pertencente ao sorogrupo O1 ou O139, que provoca a cólera (CHARLES; RYAN, 2011) e pode ser encontrado em águas marinhas, estuarinas e dulcícolas, na superfície e conteúdo intestinal de vertebrados e invertebrados (CAMPOS, 2005).

As espécies de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são frequentemente isoladas de invertebrados marinhos e relacionadas à infecção alimentar. Esses víbrios são classificados como invasores e atuam principalmente na região do intestino grosso conhecida como cólon. Por outro lado, o *V. cholerae* é tido como não-invasivo, afetando o intestino delgado através da secreção de enterotoxina (IGBINOSA; OKOH, 2008).

Além das espécies supracitadas, já foram citadas como agentes etiológicos de doenças em humanos: *V. mimicus* (OKADA *et al.*, 2010), *V. fluvialis* (CHOWDHURY *et al.*, 2011), *Grimontia (Vibrio) hollisae* (EDOUARD *et al.*, 2009), *V. alginolyticus* (CACCAMESE; RASTEGAR, 1999), *V. harveyi* (= *V. carchariae*), *V. furnissii* e *V. metschnikovii* (AUSTIN, 2010).

Vários víbrios encontram-se associados a doenças em animais aquáticos. De acordo com Hernández-López, Guzmán-Murillo e Vargas-Albores (1995), doenças provocadas por víbrios representam uma ameaça para o cultivo de peixes e invertebrados

marinhos. Nesse sentido, para a carcinicultura, Aguirre-Guzmán, Vázquez-Juárez e Ascencio (2002) destacam que os vibrios fazem parte da microbiota autóctone dos organismos e do meio ambiente marinhos e representam, portanto, uma fonte constante de possíveis infecções para o camarão.

As espécies de *V. anguillarum*, *Vibrio tubiashii*, *V. splendidus* e *V. nigripulchritudo* foram reportadas como agentes etiológicos de vibrioses em peixes (OISSON *et al.*, 1996), larvas de moluscos bivalves (HASEGAWA *et al.*, 2008), coral (HALL-SPENCER; PIKE; MUNN, 2007) e camarão (REYNAUD *et al.*, 2008), respectivamente.

2.2 Fatores de virulência em *Vibrio*

Fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para aumentar a capacidade bacteriana de provocar infecção, e possuem duas vias de atuação, a saber: colonização ou lesão do organismo. Os fatores envolvidos com a colonização incluem adesão e invasão, enquanto os relacionados com lesão abrangem as endo e exotoxinas (SIRCILLI; TRABULSI, 2008).

Nos últimos anos, os avanços da biologia molecular permitiram um maior entendimento a respeito da patogenicidade bacteriana. O uso de técnicas que abordam o genoma total de um organismo tem evidenciado que a sequência genômica de uma amostra bacteriana não representa totalmente os outros membros de sua espécie (BUERIS, 2005). Segundo o mesmo autor, o genoma bacteriano é constituído por cerne gênico, que seria o conjunto mínimo de genes que é compartilhado pela grande maioria das bactérias, e um conjunto flexível de genes, constituído basicamente por elementos genéticos móveis como plasmídios, transposons, bacteriófagos e ilhas genômicas. A presença de fatores de virulência em bactérias patogênicas é fortemente associada a esses elementos, tanto em espécies Gram-negativas quanto em Gram-positivas.

Estudos sobre fatores de virulência em vibrios são direcionados principalmente para as espécies que provocam doenças em humanos (HIGGINS *et al.*, 2007) e/ou representam risco para atividades aquícolas (GOARANT *et al.*, 1999).

Dentre as espécies associadas a doenças em humanos, as que mais se destacam são *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*. Pesquisas recentes indicam a ocorrência de fatores de virulência em estirpes das espécies supracitadas isoladas de ambiente (GUGLIANDOLO *et al.*, 2005; MENEZES, 2011) e alimentos de origem marinha (WONG *et al.*, 1999).

Em *V. parahaemolyticus*, o fenômeno Kanagawa (K+) e o fenótipo urease positivo são considerados os principais indicadores de patogenicidade. O fenômeno K+ parece ser induzido pela hemolisina termoestável direta (TDH), que por sua vez é codificada pelo gene *tdh* (ROBERT-PILOT *et al.*, 2004). Por outro lado, a presença da enzima urease geralmente é associada à ocorrência do gene *trh*, que codifica a “TDH-related hemolysin”. Suthienkul *et al.* (1996) observaram a existência de relação entre a produção de urease e o gene que codifica para TRH, sugerindo que a produção dessa enzima pode ser utilizada como indicador de virulência.

A assertiva de que as cepas que induzem a reação de beta hemólise nas hemácias humanas (K+) são isoladas apenas de amostras clínicas, enquanto nas amostras ambientais ocorrem cepas Kanagawa negativas (K-) vem sendo questionada. Para Lozano-Léon *et al.* (2003), mais de 90% dos isolados clínicos de *V. parahaemolyticus* e de 1 a 3% dos ambientais são K+. Outrossim, Menezes (2011) isolou estirpes de *V. parahaemolyticus* K+ de amostras de água e sedimento de estuários no Estado do Ceará. Além disso, segundo Honda, Lapuebla e Ni (1991), algumas cepas K- são capazes de provocar infecção gastroentérica em humanos, indicando a possibilidade da existência de mais de um fator de virulência incriminado no desencadeamento da infecção.

A fim de investigar *V. parahaemolyticus* potencialmente patogênicos em mexilhões, Terzi, Büyüktanir e Yurdusev (2009) pesquisaram a ocorrência dos genes *tdh* e *trh*. Outrossim, DePaola *et al.* (2003) utilizaram a detecção dos genes *tdh*, *trh* e *tlh* (hemolisina termolábel direta) e a produção de urease como parâmetros para caracterização de virulência em estirpes de *V. parahaemolyticus* oriundas de amostras clínicas, ambientais e de alimentos da América do Norte e Ásia.

Sobre *V. cholerae*, Campos (2005) afirma que essa espécie é capaz de produzir vários fatores de virulência, entretanto, a capacidade de provocar cólera depende, principalmente, da expressão da toxina colérica e do *pilus* TCP. Além da toxina colérica, relata-se a produção das toxinas Zot (toxina da zona ocludens), Ace (enterotoxina acessória da cólera), Rtx (*repeat in toxin*), Hly (hemolisina) e protease (mucinase), as quais não parecem participar da patogênese da cólera, mas apresentam atividade diarreiogênica em modelos experimentais e são tóxicas para diferentes tipos de células cultivadas.

Gonçalves *et al.* (2004) utilizaram a detecção dos genes de virulência *ctxA* (enterotoxina da cólera), *ace* e *zot* como indicadora de patogenicidade em isolados de *V. cholerae* não O1 provenientes de amostras de fitoplâncton. Por outro lado, Dalsgaard *et al.* (1996) empregaram como marcadores de virulência a pesquisa plasmídeos e genes que

codificassem para toxina colérica e para enterotoxina térmica estável (NAG-ST) em cepas de *V. cholerae* isoladas de camarão importado da Dinamarca.

Outra espécie que se destaca como causadora de infecções em humanos é *V. vulnificus*. De acordo com Huss, Ababouch e Gram (2004), a produção de uma citotoxina extracelular e uma série de enzimas hidrolíticas é responsável pela rápida degradação do tecido muscular durante a infecção extra-intestinal. Os autores sugerem que a presença da cápsula de polissacarídeo é essencial para provocar o processo infeccioso e afirmam que três diferentes biotipos de *V. vulnificus* foram identificados, sendo que aproximadamente 85% das cepas isoladas de amostras clínicas pertencem ao biotipo 1, enquanto o biotipo 2 provoca infecções em enguias e o biotipo 3, identificado recentemente, está associado com bacteremia veiculada a alimentos de origem marinha.

Citam-se a presença de algumas isoenzimas, tais como elastase, gelatinase, colagenase, DNase, condroitinase, lecitinase, amilase e quitinase, como fatores de virulências em vibrios (RODRIGUES *et al.*, 1993). A ocorrência de algumas dessas enzimas foi reportada por Lafisca *et al.* (2008), que realizaram caracterização enzimática em cepas de *V. alginolyticus* isoladas de bivalves e detectaram elastase, colagenase e condroitinase. Os mesmos autores destacaram que essas enzimas podem ser consideradas um dos principais fatores de virulência da espécie pesquisada, principalmente em casos de infecções dermatológica humana.

Uma das principais espécies reportada como patogênica no cultivo de organismos aquáticos é o *V. harveyi*. Apesar desse reconhecimento e de muitos estudos terem sido realizados, o seu mecanismo de virulência ainda não foi completamente esclarecido (OWENS; BUSICO-SALCEDO, 2006). Para Manefield *et al.* (2000), a virulência do *V. harveyi* está associada a presença de produtos extracelulares (ECPs) que são sintetizados durante a fase de crescimento exponencial e possuem uma seqüência de aminoácidos similar a proteínas associadas a virulência de *Salmonella*, *Bacillus* e *Shigella*. Liu *et al.* (1996) citam a produção de proteases, fosfolipase, hemolisina e exotoxinas como importantes mecanismos de patogenicidade desse vibrio. Soma-se a isso a produção de aproximadamente 10 tipos diferentes de quitinase, que são sintetizadas separadamente para aumentar a eficiência na hidrólise das diferentes formas de quitina e seus subprodutos encontrados no ambiente marinho (SVITIL *et al.*, 1997).

Os fatores de virulência presentes em *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e *V. penaeicida* também merecem destaque na aquicultura. Em *V. alginolyticus* e *V. penaeicida* esses fatores foram relacionados especificamente com os efeitos tóxicos de ECPs (SELVIN;

LIPTON, 2003; GOARANT *et al.*, 2000). Na espécie de *V. anguillarum*, um flagelo constituído de flagelina A, três flagelinas adicionais (FlaB, -C e -D) e um possível gene que codifica para FlaE foi indicado como importante fator de virulência (MCGEE; HORSTEDT; MILTON, 1996). Crosa, Actis e Tolmaski (2006) destacam que *V. anguillarum* possui habilidade para produzir diversos indicadores de patogenicidade, permitindo que esse microrganismo colonize e persista no hospedeiro. Os autores apontam os genes *toxR* e *toxS*, que codificam proteínas similares as ToxR e ToxS produzidas por *V. cholerae* como importantes vias de patogenicidade, além de uma OMP (proteína da membrana externa) com 38-kDa idêntica a OmpU também produzida por *V. cholerae*.

2.3 *Vibrio* com fatores de virulência no cultivo de camarão

Song, Cheng e Wang (1993) em estudo sobre o isolamento e caracterização de *V. damsela* na carcinicultura sugeriram que essa espécie fosse considerada um dos agentes etiológicos envolvidos na mortalidade de camarões cultivados sob condições de estresse. Os autores observaram que uma dose infectante de 10^5 células foi capaz de produzir hepatopancreatite e morte. Além disso, os isolados mostraram atividade hemolítica contra eritrócitos de carneiro, bem como presença do pili (responsável pela colonização), características que podem ter concorrido para a virulência detectada na pesquisa.

Liu *et al.* (2004) investigaram e confirmaram a virulência de cepas de *V. alginolyticus* isoladas de camarões doentes com sintomas que incluíam anorexia, musculatura opaca e esbranquiçada, retardo no crescimento e coloração vermelha nas antenas, urópodos e telson. A dose letal média LD₅₀ foi estimada em 3×10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por camarão ou $6,6 \times 10^4$ UFC por peso corporal.

Fatores de virulência em *V. alginolyticus* oriundos de camarões cultivados também foram relatados por Lee *et al.* (1996). Os autores afirmaram que a bactéria e suas ECPs mostraram-se letais para as espécies de *Penaeus monodon* e *P. japonicus*, com valores de LD₅₀ de $1,13 \times 10^5$ UFC g⁻¹, $2,46 \times 10^5$ UFC g⁻¹, e 0,23, 0,63 µg⁻¹ de proteína por peso corporal, respectivamente.

Goarant *et al.* (2000) avaliaram a atividade tóxica das ECPs de *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* e *V. nigripulchritudo* patógenos para camarão, através de injeções *in vivo* em camarões juvenis da espécie *L. stylirostris* e ensaios *in vitro* com culturas de células primárias de camarão e a linha de células de peixes EPC (*epithelioma papulosum cyprini*). Os resultados

demonstraram que as EPCs dos vırios testados foram tóxicas nos ensaios *in vivo* e *in vitro* para o camarão, não sendo observadas atividades nos ensaios *in vitro* com células de peixes.

Jayasree, Janakiram e Madhavi (2006) realizaram estudo de patogenicidade em *V. harveyi*, *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* isolados de camarões com sintomas de infecao bacteriana, e revelaram diferenças significativas na virulência entre as espécies. A espécie mais virulenta foi a de *V. harveyi* com uma LD₅₀ de 1×10^3 UFC g⁻¹ em 48h, seguida de *V. parahaemolyticus* com LD₅₀ de $1,5 \times 10^4$ a 3×10^5 UFC g⁻¹.

O aumento da virulência em estirpes *V. harveyi*, provenientes do cultivo de camarões, lisogenizadas pelo bacteriófago Siphoviridae (VHS1) foi demonstrado por Intaraprasong *et al.* (2009). De acordo com os autores, em alguns casos a mortalidade provocada por *V. harveyi* resulta de ECPs como proteases, fosfolipases, hemolisinas e citotoxinas que são codificadas por genes de bacteriófagos específicos integrados ao cromossomo bacteriano, esse fenomeno de aquisiçao de virulência por intervenao de bacteriófagos é conhecido como conversão lisogenica. Os mesmos autores verificaram que os extratos brutos de EPCs de culturas lisogenizadas provocaram uma rápida e elevada mortalidade no camarão tigre *P. monodon*.

A presença de vırios patogenicos também vem sendo referida no ambiente de cultivo (água e sedimento) de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*. Noriega-Orozco *et al.* (2007) revelaram a existência de cepas de *V. parahaemolyticus tdh* positivas em viveiros de cultivo do *L. vannamei* localizados em Sonora, México.

Gopal *et al.* (2005) relataram a presença dos genes de toxigenicidade *tdh* e *trh* em *V. parahaemolyticus* isolados da hemolinfa do *L. vannamei* e do sedimento do viveiro provenientes de fazendas de carcinicultura na Índia. Os autores alertaram para a presença desses genes em condioes de cultivo, uma vez que podem acarretar risco potencial para a saúde dos consumidores. Saravanan *et al.* (2007) detectaram a presença dos genes *toxR*, *OmpU* e *hlyA* em cepas de *V. cholerae* isolados de camarão proveniente da costa da Índia.

2.4 *Moringa oleifera*

Segundo Lorenzi e Matos (2002), *Moringa oleifera*, é uma planta tropical pertencente à família *Moringaceae*, nativa da Índia que foi introduzida no Brasil por volta de 1950. É encontrada na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, Piauí e

Ceará. Pode ser explorada, tanto em condições irrigadas como de sequeiro, apresentando um grande potencial em face de sua multiplicidade de usos.

A planta é decídua, pouco exigente em nutrientes do solo, cresce rapidamente, podendo atingir até 15 m de altura e um diâmetro de 20 a 40 cm. Produz frutos secos e triangulares, apresentando, portanto, dispersão de sementes pelo vento (ODEE, 1998). As populações naturais de moringa rendem em média 10,28% de frutos, e o sucesso da polinização depende de insetos pertencentes às ordens Thysanoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Coleoptera e Xylocopa (BHATTACHARYA; MANDAL, 2004).

Bezerra, Momenté e Medeiros Filho (2004) destacam que a moringa possui uma vasta gama de aplicações industriais e medicinais, além de poder ser utilizada na purificação de água para consumo humano. Outrossim, Makkar e Becker (1997) apontam a moringa como matéria prima de importância econômica na produção de diversos produtos, como os óleos, alimentos, condimentos e medicamentos.

Fahey (2005) afirma que a moringa tem sido considerada uma excelente fonte de proteína altamente digestível, cálcio, ferro, vitamina C e carotenóides, podendo ser utilizada como fonte de alimento principalmente no combate à desnutrição humana.

Ainda sobre as características nutricionais, Ferreira (2008) sugere a moringa como alternativa ao consumo de sementes leguminosas, como fonte de proteínas de alta qualidade, de óleo e de compostos antioxidantes. De acordo com o autor, todas as partes da planta constituem fontes renováveis de compostos fenólicos, tocoferóis (γ e α), β -caroteno, vitamina C e proteínas totais, inclusive os aminoácidos sulfurados metionina e cisteína. Além disso, a planta possui baixas concentrações de fatores antinutricionais, apesar da presença de glucosinolatos ($65,5 \mu\text{mol g}^{-1}$), fitatos (41 g kg^{-1}) e atividade hemaglutinante nas sementes, enquanto nas folhas existem quantidades apreciáveis de saponinas (80 g kg^{-1}), de fitatos (21 g kg^{-1}) e taninos (12 g kg^{-1}).

Além do potencial nutricional da moringa, estudos apontam resultados promissores sobre seus efeitos antiinflamatórios (SASHIDHARA *et al.*, 2009), antitumorais (GUEVARA *et al.*, 1999), antifúngicos (CHUANG *et al.*, 2007), antioxidantes (ASHOK KUMAR; PARI, 2003; SINGH *et al.*, 2009), larvicidas (COELHO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009), coagulantes (NKURUZINZA *et al.*, 2009), flocculantes (BELTRÁN-HEREDIA; SÁNCHEZ-MARTÍN, 2009) e antibacterianos (DOUGHARI; PUKUMA; DE 2007).

No que concerne à composição química, Gallão, Damasceno e Brito (2006) revelaram proteína como o composto encontrado em maior quantidade nas sementes, aproximadamente 40%, seguido de lipídios (18,8%), amido (6,02%), oligossacarídeos

(3,31%) e açúcares solúveis (3,14%). Para Lalas e Tsakins (2002), o óleo extraído das sementes de *M. oleifera* var. PKM 1 contém elevados teores de ácidos graxos insaturados, especialmente o oléico (71,6%), sendo o palmítico e o behênico (ambos com 6,4%) os ácidos graxos saturados dominantes. Esses dados estão de acordo com Serra *et al.* (2007), que revelaram a presença dos seguintes ácidos graxos no óleo essencial de moringa: palmítico (7%), palmitoléico (2%), esteárico (4%), oléico (78%), linoléico (1%), araquídico (4%) e behênico (4%).

A composição química da folha revela 27,51% de proteína, 19,25% de fibra, 2,23% de gordura, 7,13% de cinzas, 76,53% de umidade e 43,88% de carboidrato, 2,009 mg 100g^{-1} de cálcio e 28,29 mg 100g^{-1} de ferro (ODURO; ELLIS; OWUSU, 2008).

2.5 Bioatividade de moringa frente a bactérias

De acordo com Jahn, Musnad e Burgstaller (1986) as sementes de moringa contêm um princípio dotado de atividade antimicrobiana, a pterigospermina, bem como os glicosídeos moringina, 4-(α -L-ramnosilori)-isotiocianato de benzila e 4-(α -L-ramnosilori)-fenil-acetonitrila. Estes componentes antimicrobianos agem principalmente contra *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei*, *Serratia marcescens* e ainda, sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* e *Streptococcus*.

Eilert, Wolters e Nahrstedt (1981), em estudo sobre o princípio antimicrobiano ativo em sementes de moringa, apontaram uma concentração bacteriostática mínima de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para *Mycobacterium phlei* e 56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para *Bacillus subtilis*.

Cáceres *et al.* (1991) relataram atividade antibacteriana do suco fresco de folhas de *M. oleifera* contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Resultados semelhantes foram verificados por Valsaraj *et al.* (1997), que realizaram pesquisa sobre o efeito antimicrobiano de 78 plantas usadas no tratamento de doenças infecciosas da Índia, e reportaram inibição de *P. aeruginosa* e *S. aureus* por extratos da casca de moringa. Outrossim, Suarez *et al.* (2003) quando do estudo de atividade antimicrobiana da moringa, destacaram o efeito bacteriostático e bactericida de moringa frente a *S. aureus*.

Doughari, Pukuma e De (2007) verificaram halos de inibição de até 8 mm quando da utilização de extratos aquosos e etanólicos de folhas de moringa contra *Salmonella*. Os autores relacionaram o efeito antibacteriano a presença dos fitoconstituintes saponinos, taninos, fenóis e alcalóides.

A inibição de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *Pasteurella multocida* por extratos de sementes de moringa foi observada por Jabeen *et al.* (2008), que verificaram halos de inibição de 36 mm (*B. subtilis*), 31 mm (*S. aureus*), 20 mm (*E. coli*) e 21 mm (*P. multocida*). Os autores concluíram, a partir da determinação da concentração inibitória mínima (MIC), que as espécies de *P. multocida* e *B. subtilis* foram as mais sensíveis.

Ferreira (2008) cita uma lectina (WSMoL) isolada de sementes de moringa como molécula bioativa contra *S. aureus* e *E. coli*. Segundo o autor, sementes de plantas são ricas em lectinas, e a capacidade de interação dessas proteínas com moléculas de carboidratos é responsável pelo seu efeito antibacteriano.

Além da presença de compostos inibidores de microrganismos (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; ANWAR *et al.*, 2007), as sementes de *M. oleifera* possuem uma proteína recombinante capaz de flocular bactérias Gram-positivas e negativas (BROIN *et al.*, 2002).

A bioatividade de sementes de moringa contra bactérias do grupo coliforme vem sendo pesquisada como fonte alternativa no tratamento de águas contaminadas. Olayemi e Alabi (1994) verificaram uma redução de 65% na contagem de coliformes em amostras de água tratadas com sementes de moringa por vinte e quatro horas. Adicionalmente, Oluduro e Aderiye (2007) pesquisaram a eficácia antibacteriana de sementes de moringa em amostras de água de superfície e obtiveram um decaimento de 97,5% na população de coliformes após 24 horas de tratamento.

Ainda nesse sentido, Amagloh e Benang (2009) estudaram a utilização da moringa para purificação de água e também observaram uma redução de coliformes em amostras de água submetidas a tratamento com pó de suas sementes. De acordo com os autores, esse decaimento pode estar relacionado ao processo de floculação típico da moringa, uma vez que as bactérias são normalmente associadas a partículas sólidas.

Vieira *et al.* (2009) investigaram a utilização de extratos salinos de sementes de moringa para a diminuição da carga de coliformes termotolerantes em camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e obtiveram resultados promissores. Os autores observaram uma redução drástica de coliformes quando da imersão do camarão, por 5 minutos, no extrato de moringa, e destacaram que esse tratamento não prejudicou as propriedades sensoriais do crustáceo após o seu cozimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparação das amostras do camarão *Litopenaeus vannamei*

Foram coletados setenta camarões adultos no Centro de Estudos em Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os camarões foram capturados com utilização de rede e transportados vivos em recipiente com capacidade de 50 litros. O tempo entre a coleta e o início das análises não excedeu a 2 horas.

No laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do LABOMAR-UFC, os camarões foram desinfetados com álcool a 70° GL e abatidos por choque térmico durante 10 minutos, através de imersão em mistura de água e gelo na proporção de 0,6:1 (KIRSCHNIK; VIEGAS; 2004). Os camarões foram pesados (g) em balança semi-analítica (Quimis BG 2000) e medidos (cm) com paquímetro digital (Digimess). Para a coleta de hemolinfa da região ventral entre o final do cefalotórax e o primeiro segmento abdominal, foi utilizada uma seringa hipodérmica estéril de 1 mL com agulha de 12,7 mm de comprimento e 0,33 mm de calibre, contendo 0,2 mL de solução de citrato de sódio a 10% (Figura 1). A proporção entre a solução de citrato de sódio e a hemolinfa foi de 1:1 (v/v). Cada amostra tinha um volume final de 1 mL e foi constituída de um *pool* de cinco sub-amostras, sendo formada, portanto, por hemolinfa retirada de 5 camarões.

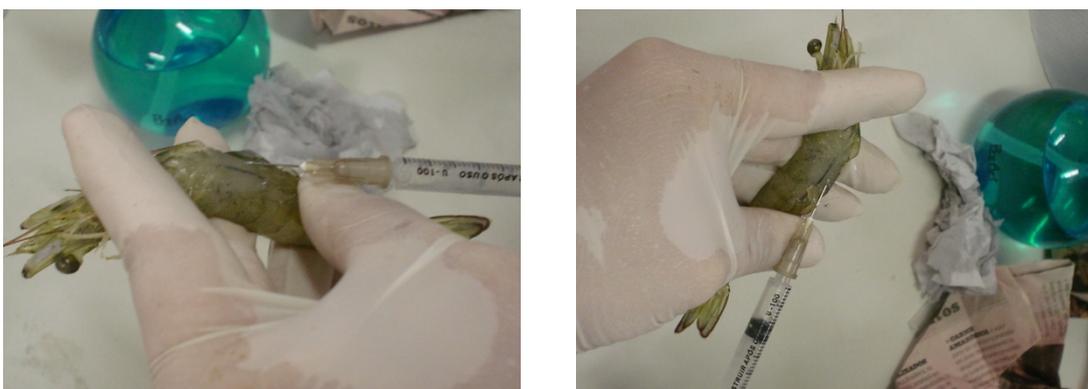


Figura 1 – Coleta de hemolinfa da região ventral do camarão *Litopenaeus vannamei*.

Do homogenato formado por 1 mL de citrato de sódio a 10% e 1 mL de hemolinfa foi retirado 1 mL e adicionado a 9 mL de solução salina 0,85%, obtendo-se assim uma

diluição de 10^{-1} , a partir da qual foram obtidas demais diluições decimais seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

3.2 Quantificação de *Vibrio* em amostras de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*

A quantificação de *Vibrio* foi feita a partir da determinação do Número Mais Provável (NMP) pela técnica dos tubos múltiplos conforme detalhamento em Elliot *et al.* (2001), com realização de Prova Presuntiva (PP) e Confirmatória (PC). Para PP, foi retirado 1 mL de cada diluição (10^{-1} a 10^{-4}) e semeado em uma série de três tubos com 9 mL de Água Peptonada Alcalina (APA) contendo 1% de NaCl, com incubação a 35°C/24 h. Dos tubos positivos (turvos) na PP, foram retiradas alíquotas e semeadas em placas contendo o meio de Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Difco), com incubação a 35°C/18 h, constituindo assim a PC. A positividade desta prova foi caracterizada pelo crescimento de colônias sacarose positivas (amarelas) e negativas (verdes) (Figura 2).

Para o cálculo do NMP foram escolhidas as séries críticas dos tubos positivos na PP e na PC, com as quais se entrava na tabela de Hoskins citada em Garthright (2001). O valor da série crítica foi multiplicado pelo fator de correção (x2), pela diluição equidistante da maior e menor diluição e dividido por 100, com o resultado expresso em NMP mL⁻¹.

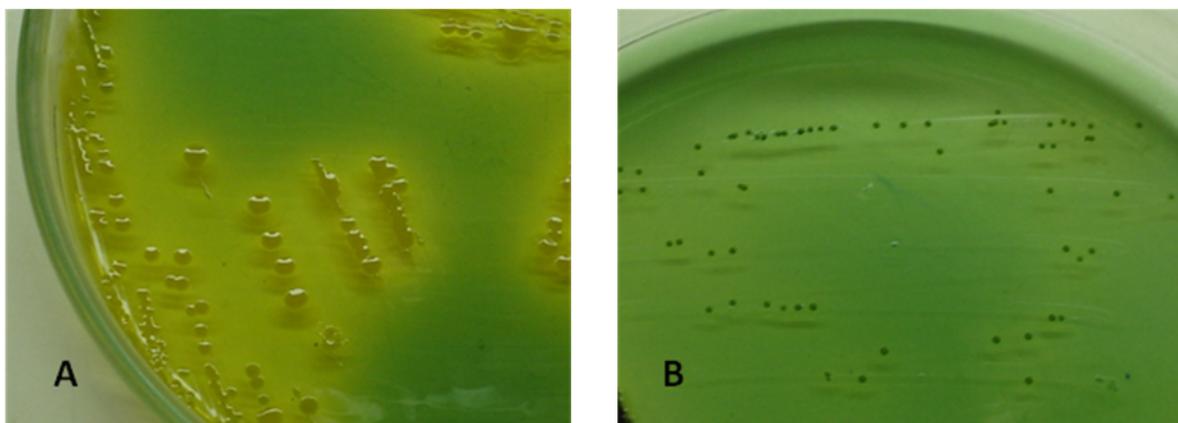


Figura 2 – Crescimento de colônias sacarose positivas (A) e negativas (B) em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose.

3.3 Isolamento e caracterização fenotípica de *Vibrio* spp

O isolamento de colônias sacarose positivas e negativas, crescidas no meio de TCBS, foi feito no meio de Ágar Triptona Soja (TSA, Difco) contendo 1% de NaCl, com incubação a 35°C por 24 h. As cepas puras isoladas foram submetidas à coloração de Gram e ao teste de motilidade para identificação morfológica. A identificação fenotípica foi realizada a partir da triagem prévia nas provas de hidrólise da arginina e descarboxilação da lisina e ornitina. A combinação dos resultados dessas provas é determinante para escolha da chave de identificação a ser seguida (NOGUEROLA; BLANCH, 2008). O conjunto de provas bioquímicas a ser empregado variou, portanto, de acordo com as seis chaves existentes. Entretanto, algumas provas foram comuns a mais de uma chave, a saber: produção de oxidase, produção de indol, Voges-Proskauer, citrato, gelatinase, fermentação de carboidratos (sacarose, arabinose, manitol, D-glucosamina e melibiose), crescimento a 40°C e 4°C, prova do o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG), tolerância ao NaCl 0%, 3%, 8% e 10%, produção de urease e resistência a O/129.

3.3.1 Caracterização morfológica

3.3.1.1 Coloração de Gram

Do crescimento no meio de TSA com 1% de NaCl foi feita esfregaço em lâminas, seguindo-se sua fixação por calor e coloração de Gram conforme detalhamento em Soares, Cassimiro e Albuquerque (1991).

3.3.1.2 Motilidade

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl foram retirados inóculos e semeados com agulha de níquel-cromo no Ágar Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM), com incubação a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação foi realizada a leitura dos tubos. A positividade foi caracterizada pelo crescimento além da linha do inóculo.

3.3.2 Identificação fenotípica

3.3.2.1 Hidrólise da arginina e descarboxilação de lisina e ornitina

As cepas em identificação no TSA contendo 1% de NaCl foram inoculadas com alça de níquel-cromo nos tubos contendo caldo púrpura de bromocresol (meio basal) e os aminoácidos a serem testados, com incubação a 35°C por 7 dias. Foram preparadas três baterias, correspondentes a 0,125% de arginina, 0,125% de ornitina e 0,125% de lisina. Todas as cepas foram inoculadas nas três baterias e no controle (meio sem aminoácido). O resultado foi considerado positivo quando houve mudança de cor de púrpura para amarelo, e em seguida, de amarelo para púrpura.

3.3.2.2 Prova de produção de citocromo-oxidase

Do crescimento das cepas em TSA contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com alça de níquel cromo e feitos esfregaços em fitas de oxidase (Laborclin). O aparecimento de uma coloração roxa foi indicativo de positividade do teste.

3.3.2.3 Produção de indol

Do crescimento das cepas no meio de TSA contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com agulha de níquel-cromo e semeada em Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM, Difco) contendo 1% de NaCl, com incubação em estufa a 35°C por 48 horas. Transcorrido o período de incubação, foi adicionado à cultura 1 mL de reativo de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeído). A positividade dessa prova foi caracterizada pelo aparecimento de uma coloração vermelha no meio logo após a adição do reagente, indicando a produção de indol pela ação da triptofanase sobre o triptofano.

3.3.2.4 Prova do Voges-Proskauer

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl foram retiradas alíquotas com alça de níquel-cromo e semeadas em Caldo MRVP, com incubação a 35°C por 96 horas. Após o período de incubação, foram adicionados para cada mililitro de cultura 0,6 mL de reativo de Barrit 1 (solução de alfa-naftol a 5%) e 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% (reativo de

Barrit 2). Essa prova foi considerada positiva através da presença de um anel vermelho no meio até 30 minutos depois da adição dos reagentes, o que indicou a produção de acetoína.

3.3.2.5 Citrato

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl foram retiradas alíquotas com alça de níquel-cromo e semeadas no meio de Agar Citrato Simmons, com incubação a 35°C por 96 horas. A prova foi considerada positiva quando ocorreu mudança da cor verde para azul, fato que caracterizou a utilização do citrato como única fonte de carbono.

3.3.2.6 Gelatinase

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl foram retiradas alíquotas com agulha de níquel-cromo e semeadas no meio de gelatinase, com incubação a 35°C por 96 horas. Passado o período de incubação, as cepas foram mantidas a 4°C por 2 horas. A consistência do meio após o período de resfriamento determinou o resultado da prova, quando o meio ficou sólido considerou-se o teste negativo, caso contrário (meio líquido) o resultado foi considerado positivo.

3.3.2.7 Fermentação de carboidratos (sacarose, arabinose, manitol, D-glucosamina e melibiose)

As cepas em identificação no TSA contendo 1% de NaCl foram inoculadas com alça de níquel-cromo nos tubos contendo caldo púrpura de bromocresol (meio basal) e os carboidratos a serem testados, com incubação a 35°C por 5 dias. Foram preparadas seis baterias de tubos, correspondentes a 0,5% de sacarose, 0,5% de arabinose, 0,5% de manitol, 0,5% de D-glucosamina, 0,5% de melibiose. Os carboidratos foram esterilizados em filtro membrana de poliétersulfona com poro de 0,22 µm. A prova foi considerada positiva quando houve mudança de coloração de púrpura para amarelo.

3.3.2.8 Crescimento a 40°C e a 4°C

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com alça de níquel-cromo e semeada em duas baterias de tubos contendo o meio de Caldo Triptona

Soja (TSB) contendo 1% de NaCl. Uma bateria foi incubada em estufa a 40°C, e a outra em banho-maria a 4°C. Os tubos foram considerados positivos quando apresentaram turvação do meio de cultura.

3.3.2.9 Prova do ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo)

Do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alíquota com alça de níquel-cromo e semeada em tubos contendo 0,25 mL de solução salina fisiológica estéril. Foi adicionada 1 gota de tolueno em cada tubo com posterior agitação. Os tubos ficaram em repouso por 5 minutos à temperatura de 35 a 37°C. Em seguida, foi adicionada 0,25 mL de solução tamponada de ONPG 13,3 mM. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C/24 h. A positividade do teste foi caracterizada pelo aparecimento da cor amarela.

3.3.2.10 Halofilismo

A partir do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl, foram retiradas alíquotas com alça de níquel-cromo e semeadas em tubos contendo APA a 1% com quatro concentrações diferentes de NaCl (0, 3, 8 e 10%). Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. A turvação do meio foi indicativa de positividade da prova.

3.3.2.11 Produção de urease

A partir do crescimento em TSA contendo 1% de NaCl, foram retiradas alíquotas com alça de níquel-cromo e semeadas em Caldo Uréia de Christensen contendo 1% de NaCl, com incubação em estufa a 35°C por 24 h. A prova foi considerada positiva quando houve mudança da coloração laranja para cor de rosa.

3.3.2.12 Resistência ao fator vibriostático O/129 (fosfato de 2,4 diamino-6, diisopropil-pteridina)

A concentração das cepas selecionadas para este teste foi previamente ajustada a 10^8 UFC mL⁻¹ a partir da comparação contra o padrão de turbidez McFarland 0,5 (HINDLER; JORGENSEN, 1995). Feito o ajuste de concentração, foram retirados inóculos com *swabs* e semeados em placas de Petri com o meio de agar Mueller-Hinton contendo 1% de NaCl. Em

seguida, foi aplicado o disco impregnado do fator vibriostático O/129 (Fiocruz). As placas foram incubadas em estufa a 35°C/24 h. Passado o período de incubação, os halos de inibição foram medidos com paquímetro digital. A cepa foi considerada resistente quando não houve formação de halo no crescimento.

3.4 Detecção de fatores de virulência nas estirpes de *Vibrio* isoladas

Todas as estirpes de *Vibrio* isoladas foram submetidas aos testes de detecção de proteases (gelatinase, elastase, caseinase), lipase, fosfolipase e atividade hemolítica (RODRIGUES *et al.*, 1993; RUST; MESSING; IGLEWSKI, 1994; LIU *et al.*, 1996; AUSTIN *et al.*, 2005). Os resultados referentes à detecção de proteases, lipase e fosfolipase foram agrupados de acordo com o diâmetro (mm) das zonas claras ou opalescentes formadas ao redor de cada colônia (AUSTIN *et al.*, 2005).

3.4.1 Detecção de gelatinase, elastase e caseinase

A produção de gelatinase foi verificada em TSA suplementado com 0,5% de gelatina e 1% de NaCl (p/v). Após o período de incubação (35°C/24h), aproximadamente 2 mL de uma solução saturada de sulfato de amônio foi utilizada para verificação de positividade (ocorrência de halo translúcido).

A detecção da caseína foi feita utilizando-se o Ágar Leite contendo 1% de NaCl, com incubação a 35°C/24 h. A positividade foi determinada pela presença de uma zona clara ao redor das colônias.

Para avaliar a habilidade da produção de elastase, foram preparadas placas com uma camada de 15 mL de meio composto por caldo nutriente e Agar Noble (Difco) suplementado por uma camada de 5 mL contendo 0,3% de elastina (Sigma E1625) (p/v) e 1% de NaCl (RUST; MESSING; IGLEWSKI, 1994). Em cada placa foram inoculados 4 µL das culturas a serem testadas, previamente cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) contendo 1% de NaCl (35°C/24 h). As placas foram incubadas a 35°C/96 h e o aparecimento de halos ao redor do crescimento bacteriano foi indicativo de positividade.

Para os testes supracitados, foram utilizadas as cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle positivo e negativo, respectivamente.

3.4.2 Detecção de lipase e fosfolipase

Para as provas de lipase e fosfolipase, foi utilizado TSA (1% de NaCl) enriquecido com 1% (v/v) de Tween 80 e 1% (v/v) de emulsão de gema de ovo, respectivamente, com incubação a 35°C/24 h. O surgimento de halos opalescentes ao redor das colônias indicou a positividade dos testes. A cepa padrão utilizada como controle positivo para a prova de lipase foi a de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Como controle positivo para o teste de produção de fosfolipase foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.4.3 Avaliação de atividade hemolítica

Foi utilizado o ágar Wagatsuma modificado (1% de NaCl) e enriquecido com 100 mL L⁻¹ de suspensão a 20% de hemácias desfibrinadas de carneiro, com incubação a 35°C/24 h. O aparecimento de halo de hemólise foi indicativo de reação positiva. Como controle positivo foi utilizada uma cepa padrão de *V. parahaemolyticus* IOC K+ (HOFER, 1983).

3.4.4 Detecção de atividades enzimáticas

Foram selecionadas 24 cepas para determinação do espectro complementar de atividade enzimática. O grupo de estirpes selecionadas possuía pelo menos um representante de cada espécie identificada, além disso, os 24 isolados foram capazes de expressar pelo menos três fatores de virulência (item 3.4, p. 37). As seguintes enzimas foram testadas: fosfatase alcalina, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucina arilamidase, valina arilamidase, tripsina, α -quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidade, β -galactosidade, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetil- β -glucosaminidase, α -manosidase e α -fucosidase.

As estirpes a serem testadas foram diluídas em solução salina a 1% até a obtenção de turbidez semelhante a da escala 5-6 McFarland. Em seguida, foram tomados 65 μ L de cada cultura e semeados nas galerias do *kit* APIzym (Biomérieux 25200), com incubação a 37°C por 4 horas. Após o período de incubação, foi colocada, em cada cúpula da galeria, uma gota do agente tensoativo ZYM A (Tris-hidroximetil-aminometano, HCl 37%, laurilsulfato de sódio, H₂O) e uma gota do reagente ZYM B (*fast blue* BB, metanol, dimetilsulfoxido-DMSO).

Para leitura dos resultados, foram esperados, no mínimo, cinco minutos, tempo suficiente para o desenvolvimento das colorações.

3.5 Perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos

Todos os isolados ($n = 100$) foram submetidos à determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em disco (CLSI, 2010) em Agar Mueller-Hinton contendo 1% de NaCl. Os seguintes antimicrobianos (Laborclin) foram testados: Ácido Nalidíxico (Nal 30 μg), Ampicilina (Amp 10 μg), Aztreonam (Atm 30 μg), Cefalotina (Cfl 30 μg), Ceftriaxona (Cro 30 μg), Ciprofloxacina (Cip 5 μg), Cloranfenicol (Clo 30 μg), Estreptomicina (Est 10 μg), Gentamicina (Gen 10 μg), Imipenem (Ipm 10 μg), Nitrofurantoína (Nit 300 μg), Penicilina (Pen 10 U), Sulfazotrim (Sut 25 μg) e Tetraciclina (Tet 30 μg).

Para o teste de antibiograma (Figura 3, p. 40), a densidade bacteriana foi previamente ajustada a uma concentração de 10^8 UFC mL^{-1} , a partir da preparação de uma suspensão bacteriana em solução salina a 1% com turvação equivalente a escala nefelométrica MacFarland 0,5. O ajuste da concentração foi feito a partir da determinação da densidade óptica das culturas diluídas em espectrofotômetro (Micronal B542) em um comprimento de onda de 625 nm. As suspensões com densidades padronizadas foram inoculadas com “swab” em placas de Petri contendo o meio de Agar Mueller-Hinton (Difco) contendo 1% de NaCl, em seguida, foram aplicados os discos dos antimicrobianos (Laborclin). As placas foram incubadas em estufa a $35^\circ/24$ h. Os halos de inibição foram medidos (mm) com paquímetro digital (Digimess) e a interpretação dos resultados foi feita de acordo com as recomendações do CLSI (2010).

3.6 Cura plasmidial pelo corante fluorogênico acidotrópico laranja de acridina

A fim de se determinar a mediação da resistência aos antimicrobianos, as cepas resistentes foram selecionadas e submetidas à cura dos plasmídeos pelo agente curagênico laranja de acridina (SIGMA A-6014) (Molina-Aja *et al.*, 2002).

Todas as estirpes resistentes foram cultivadas em caldo Luria Bertani suplementado com $0,100$ mg mL^{-1} de laranja de acridina, com incubação a 35°C por 24 h. Após o período de incubação, foram retirados inóculos e semeados em TSA contendo 1% de NaCl, com incubação a 35°C por 24 h. A partir do crescimento em TSA, foi realizado

antibiograma conforme detalhamento no item 3.5 (p. 39) A resistência foi considerada possivelmente cromossômica quando observada após o procedimento de cura do plasmídeo, em caso contrário, foi caracterizada como plasmidial.

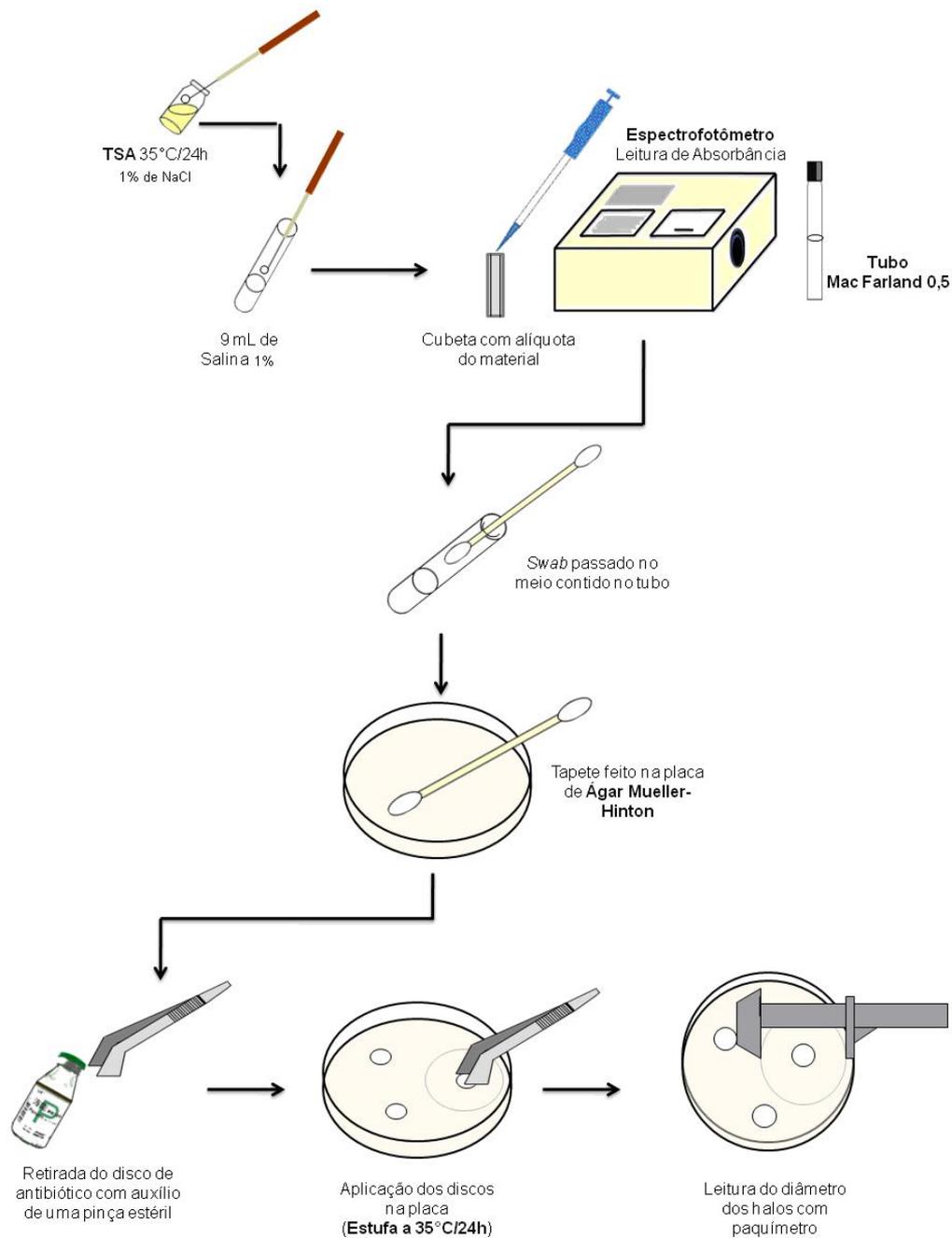


Figura 3 – Fluxograma da técnica para determinação do perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos.

3.7 Preparação dos extratos de sementes de *Moringa oleifera* Lam.

3.7.1 Coleta do material botânico

As sementes de moringa foram coletadas a partir de dois espécimes cultivados no *campus* do Pici (Fortaleza – Ceará). Após a coleta seguiu-se a separação do fruto (vagens), retirada das cascas e acondicionamento em bolsas plásticas de polietileno. Sementes íntegras foram coletadas para identificação, que foi realizada no departamento de Botânica da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA). Foi depositada exsicata sob o número 5823 no Herbário Francisco José de Abreu Matos (UVA).

3.7.2 Extração com solventes orgânicos a frio e a quente das sementes de *Moringa oleifera* Lam.

Todos os processos de extração foram realizados no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. Parte das sementes trituradas de *M. oleifera* (110 g) foi submetida a três extrações a frio com 300 mL de hexano (P.A.) em intervalos de 24 h. Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo obteve-se 15,36 g de um extrato de aspecto fluido e coloração amarelada denominado MOS-H. A torta resultante foi submetida a três extrações a frio com 300 mL de etanol (P.A.) em intervalos de 24 h, e após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo obteve-se 11,64 g de um extrato de aspecto fluido e coloração escura denominado MOS-E (Figuras 4 e 5, p. 42).

Foram utilizados 139 g de sementes trituradas de *M. oleifera* para extração a quente em aparelho Soxhlet com 800 mL de hexano (P.A.) durante 48 h. Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo, obteve-se 28,29 g de um extrato de aspecto fluido e de coloração amarelada denominado MOS-HS. Em seguida realizou-se uma extração com 800 mL de etanol (P.A.) durante 48 h, e após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo obteve-se 13,66 g de um extrato de aspecto pastoso e de coloração escura denominado MOS-ES (Figuras 4 e 5, p. 42).

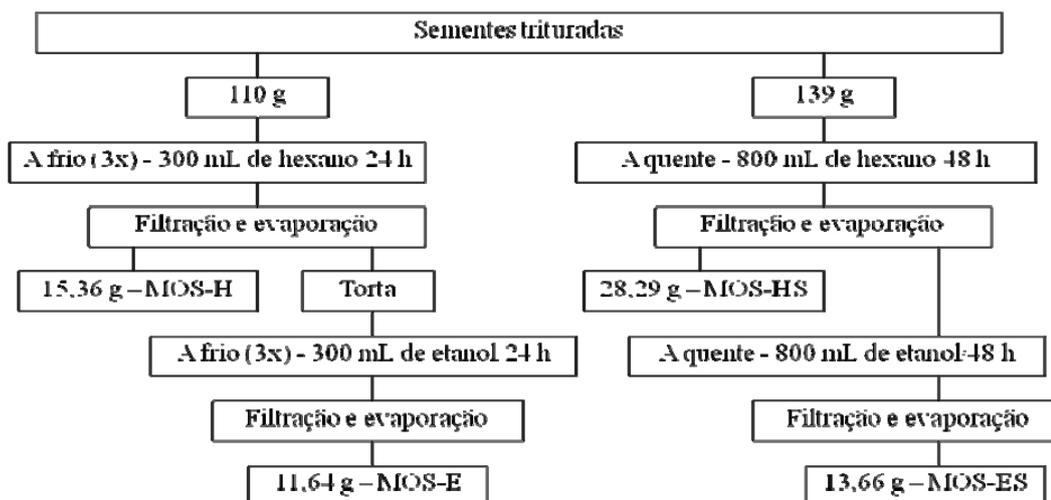


Figura 4 – Fluxograma dos processos de extração com solventes orgânicos a frio e a quente das sementes de *Moringa oleifera*.

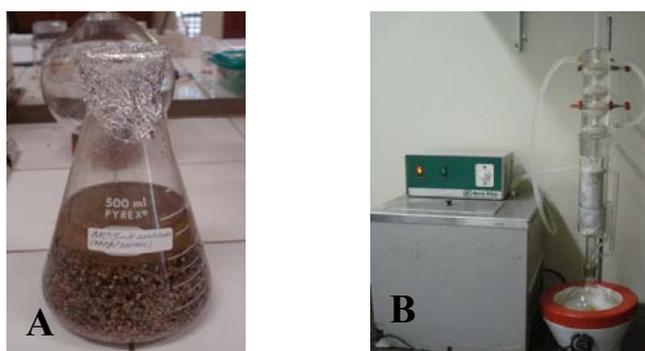


Figura 5 – Processos de obtenção dos extratos das sementes de *Moringa oleifera*. A - a frio, B - a quente em Soxhlet.

3.8 Teste de susceptibilidade *in vitro* aos extratos de *Moringa oleifera*

A susceptibilidade das estirpes de *Vibrio* aos quatro tipos extratos (MOS-H, MOS-E, MOS-HS e MOS-ES) foi avaliada através do método de difusão em disco (MDD) e da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (CLSI, 2010).

Para a realização do MDD, a concentração bacteriana foi previamente ajustada conforme descrição feita no item 3.5 (p. 39). As suspensões padronizadas foram inoculadas com “swab” em placas de Petri contendo o meio de Agar Mueller-Hinton (Difco) contendo 1% de NaCl, em seguida foram aplicados, em triplicata, discos de papel faixa branca JP 40

com 6 mm de diâmetro contendo 100 µg de cada extrato. As placas foram incubadas em estufa a 35°/24 h. A atividade antibacteriana foi determinada pela formação de halos de inibição, que foram medidos (mm) com paquímetro digital (Digmess). Como controle Gram negativo e positivo, foram utilizadas as cepas de *V. parahaemolyticus* IOC e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, respectivamente.

Para determinação da CIM, foi utilizada a técnica de macrodiluição em Caldo Mueller-Hinton contendo 1% de NaCl. Foram testadas as concentrações de 4, 8, 16, 32 e 64 µg mL⁻¹ dos extratos MOS-E (extração a frio com etanol) e MOS-ES (extração a quente com etanol) frente aos isolados sensíveis aos extratos brutos no teste de DD.

3.9 Fracionamento cromatográfico dos MOS-E e MOS-ES e obtenção da fração ativa acetato de etila (MOS-ESA)

Parte do extrato MOS-E (3,1 g) foi adsorvido em 7,3 g de gel de sílica e cromatografado sobre 52,5 g de gel de sílica em coluna aberta (Ø 5,0 cm). A eluição foi feita em ordem crescente de polaridade com diclorometano (1.200 mL) (MOS-E-CH₂Cl₂), acetato de etila (800 mL) (MOS-E-AcOEt) e metanol (600 mL) (MOS-E-MeOH). Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se as seguintes massas e rendimentos: MOS-E-CH₂Cl₂ - 1.920,8 mg, 61,96%; MOS-E-AcOEt - 231,6 mg, 7,47%; MOS-E-MeOH - 660,8 mg; 21,31%.

O extrato MOS-ES (2,6 g) foi adsorvido em 3,9 g de gel de sílica e cromatografado sobre 48,3 g de gel de sílica em coluna aberta (Ø 5,0 cm). A eluição foi feita em ordem crescente de polaridade com diclorometano (500 mL) (MOS-ES-CH₂Cl₂), acetato de etila (700 mL) (MOS-ES-AcOEt) e metanol (600 mL) (MOS-ES-MeOH). Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se as seguintes massas e rendimentos: MOS-E-CH₂Cl₂ - 34,8 mg, 1,33%; MOS-E-AcOEt - 335,3 mg, 12,89%; MOS-ES-MeOH 1.978 mg; 76,07%.

Todas as frações obtidas foram submetidas a ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco (item 3.5, p. 39). A fração bioativa foi submetida ao fracionamento cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a fim de isolar os princípios ativos.

3.9 Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (MOS-ES-AcOEt) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e isolamento de substâncias ativas

Parte da fração ativa MOE-ES-AcOEt (285 mg) foi analisada por CLAE em um cromatógrafo Shimadzu® modelo UFLC equipado com um detector UV-Vis com arranjo de diodos modelo SPD-M20A. As separações foram feitas em condições de fase reversa em coluna semi-preparativa (C-18, 5 μm) com eluição isocrática utilizando-se MeOH/H₂O (1:1) com fluxo de 4,72 mL min⁻¹.

O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila do extrato MOS-ES resultou na detecção (a 284 nm) e isolamento de três substâncias principais (Figura 6; Figura 7, p. 45), que foram obtidas como sólidos amorfos esbranquiçados: o composto referente ao pico 1 (23,3 m; $t_r = 4,99$ min) foi denominado MOS-ES-1, o referente ao pico 2 (4,0 mg; $t_r = 7,06$ min) foi denominado MOS-ES-2 e o referente ao pico 3 (65,1 mg; $t_r = 17,45$ min) foi denominado de MOS-ES-3.

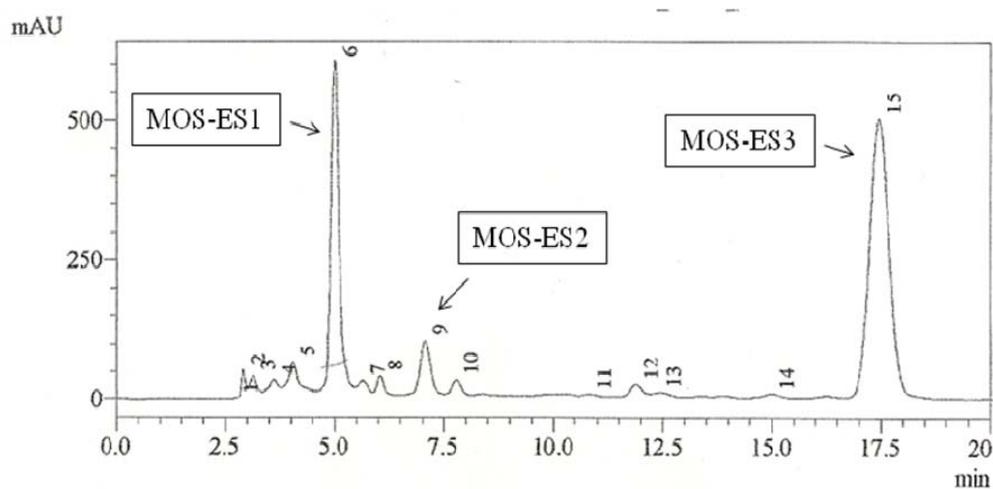


Figura 6 – Cromatograma de análise por CLAE da fração ativa MOS-ES-AcOEt e isolamento das substâncias MOS-ES-1, MOS-ES-2 e MOS-ES-3.



Figura 7 – Placa de análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das substâncias MOS-ES-1 (1), MOS-ES-2 (2) e MOS-ES-3 (3). P = purga da coluna; eluente = $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) e revelador = solução de vanilina.

As substâncias isoladas (S1 e S3) tiveram suas estruturas determinadas a partir da análise dos dados espectrométricos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Infravermelho (IV), além da comparação com os achados descritos na literatura (FAIZI *et al.*, 1992; FAIZI *et al.*, 1994).

3.10 Análise estatística

O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado entre as variáveis morfométricas (peso e tamanho dos espécimes de camarão) e as variações do Número Mais Provável (NMP) de *Vibrio* de cada amostra ($n = 10$) de hemolinfa do *L. vannamei*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação e Fenotipagem de *Vibrio* em amostras de hemolinfa de *Litopenaeus vannamei*

A assertiva de que os víbrios fazem parte da microbiota autóctone da hemolinfa de organismos aquáticos aparentemente saudáveis vem sendo sugerida em alguns estudos que realizaram isolamento dessas bactérias em fluidos de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões das espécies *Modiolus modiolus* (OLAFSEN *et al.*, 1993) e *Anodonta cygnea* (ANTUNES *et al.*, 2010). Ainda nesse sentido, Fagutao *et al.* (2009) consideram que a hemolinfa de invertebrados saudáveis pode ser colonizada por bactérias. Para Gómez-Gil *et al.* (1998), mesmo havendo relatos de isolamento de víbrios da hemolinfa de peneídeos saudáveis, o seu significado clínico ainda não está completamente elucidado. No presente estudo, foi detectado *Vibrio* em todas as amostras analisadas, com variação de NMP mL⁻¹ de 30 a 460 (Tabela 2).

Tabela 2 – Número Mais Provável (NMP mL⁻¹) de *Vibrio* em amostras de hemolinfa e variáveis morfométricas de 50 camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*.

Amostra	n	TM (cm)	PM (g)	NMP mL ⁻¹
1	5	9,3	7,8	30
2	5	10,4	11,7	150
3	5	9,1	8,1	86
4	5	9,7	8,3	186
5	5	8,7	7,7	86
6	5	9,2	8,4	86
7	5	8,7	8,6	186
8	5	10,7	11,4	460
9	5	9,3	7,8	40
10	5	9,5	8,2	86
Média/DP	5	9,5±0,7	8,8±1,5	139,6±124,9
r (NMP cm ⁻¹)			0,6609	
r (NMP g ⁻¹)			0,7157	

*n: número de camarões. TM: tamanho médio. PM: peso médio. DP: desvio padrão. r: correlação de Pearson.

Considerando as variáveis morfométricas analisadas, a oscilação na quantificação bacteriana parece estar relacionada ao peso ($r = 0,7157$) e ao tamanho médio ($r = 0,6609$) dos camarões. A relação entre o peso de espécimes de camarão e a quantificação bacteriana em seus fluidos foi pesquisada por Soto-Rodriguez *et al.* (2010). Entretanto, ao contrário do presente estudo, os autores supracitados determinaram a densidade de víbrios apenas em amostras de hemolinfa de camarões (*L. vannamei*) doentes e verificaram índices mais elevados de *Vibrio* ($8,81 \times 10^3$ Unidades Formadoras de Colônias – UFC mL⁻¹) nos peneídeos com menor peso (0,26 a 4,0 g, n = 1753).

Quando analisados os parâmetros ambientais, as amostras de água apresentaram valores de temperatura (29°C), pH (6,58) e salinidade (15‰) próximos aos limites reconhecidos como ideais para o crescimento de bactérias do gênero *Vibrio* (CASTAÑEDA-CHÁVEZ *et al.*, 2005; PADAN *et al.*, 2005).

Gomez-Gil *et al.* (1998), em pesquisa sobre a microbiota de *Vibrio* associada a hemolinfa de camarões juvenis saudáveis da espécie *L. vannamei*, observaram víbrios em apenas 14,3% das amostras de hemolinfa pesquisadas, com índice de UFC mL⁻¹ oscilando de 2×10^2 a 3×10^3 . Esses dados não podem ser comparados aos da presente pesquisa, uma vez que o método eleito para quantificação das 10 amostras de hemolinfa foi o NMP.

Para Swanson, Petran e Hanlin (2001), o NMP não fornece uma contagem direta de bactérias, mas determina a população de microrganismos viáveis na amostra e é, portanto, indicado para amostras com uma concentração esperada inferior a 10 UFC g⁻¹.

Ainda acerca da ocorrência de víbrios em hemolinfa de peneídeos, Gopal *et al.* (2005) afirmaram que os fluidos de camarões sadios podem ser considerados estéreis. Por outro lado, os mesmos autores realizaram quantificação de víbrios em unidades amostrais de hemolinfa de camarões doentes e obtiveram uma variação de $1,52 \times 10^3$ a $4,36 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Dados semelhantes foram encontrados por Costa *et al.* (1998), que só identificaram bactérias da família Vibrionaceae em amostras de hemolifa de camarões patologicamente comprometidos.

Mesmo não havendo consenso sobre a colonização da hemolinfa de camarão saudável por bactérias do gênero *Vibrio*, a ameaça que esses microrganismos constituem para o cultivo de camarões já foi reportada por pesquisas em diferentes regiões do mundo (MOHNEY; LIGHTNER; BELL, 1994; ALAPIDE-TENDENCIA; DUREZA, 1997; COSTA *et al.*, 1998; RENGPIPAT *et al.*, 2003; WALLING *et al.*, 2010).

Foram isoladas 100 cepas de *Vibrio* das dez amostras de hemolinfa analisadas, soma-se a isso a identificação fenotípica de dez espécies (Figura 8 e Tabela 3, p. 48).

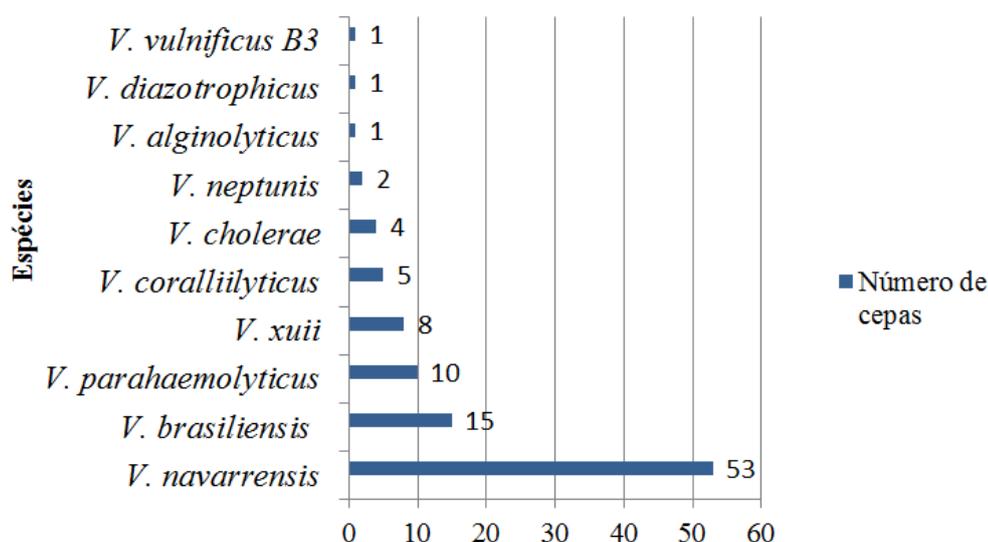


Figura 8 – Fenotipagem de 100 víbrios isolados de dez amostras de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Tabela 3 – Distribuição de espécies de *Vibrio* por amostras de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Amostra	nI	NE	Espécies (número de isolados)
1	10	3	<i>V. navarrensis</i> (8), <i>V. alginolyticus</i> (1), <i>V. coralliilyticus</i> (1)
2	10	3	<i>V. navarrensis</i> (8), <i>V. parahaemolyticus</i> (1), <i>V. coralliilyticus</i> (1)
3	10	4	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. parahaemolyticus</i> (4), <i>V. xiii</i> (1), <i>V. coralliilyticus</i> (1)
4	10	4	<i>V. navarrensis</i> (6), <i>V. parahaemolyticus</i> (2), <i>V. xiii</i> (1), <i>V. diazotrophicus</i> (1)
5	10	4	<i>V. navarrensis</i> (5), <i>V. parahaemolyticus</i> (3), <i>V. xiii</i> (1), <i>V. vulnificus</i> B3 (1)
6	10	3	<i>V. navarrensis</i> (6), <i>V. xiii</i> (3), <i>V. coralliilyticus</i> (1)
7	10	4	<i>V. navarrensis</i> (6), <i>V. xiii</i> (2), <i>V. coralliilyticus</i> (1), <i>V. brasiliensis</i> (1)
8	10	4	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. brasiliensis</i> (4), <i>V. cholerae</i> (1), <i>V. neptunis</i> (1)
9	10	4	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. brasiliensis</i> (4), <i>V. cholerae</i> (1), <i>V. neptunis</i> (1)
10	10	3	<i>V. brasiliensis</i> (6), <i>V. cholerae</i> (2), <i>V. navarrensis</i> (2)

*nI: número de isolados. nE: número de espécies.

A espécie de *V. navarrensis* foi identificada em todas as amostras de hemolinfa e correspondeu a 53% do total de isolados. Essa espécie foi descrita em 1991, com primo isolamento na região de Navarra na Espanha, a partir de amostras de água contaminadas por esgoto. As características que foram enumeradas como capazes de diferenciar *V. navarrensis* das demais espécies de *Vibrio* previamente descritas foram: cepas negativas para a arginina, ornitina e lisina descarboxilase; incapacidade de produzir acetoina no teste de Voges-Proskauer; incapacidade de utilizar putrescina, gluconato, glucuronato e histidina; capacidade de produzir ácido a partir da utilização de sacarose e crescimento a 40°C. Afora isso, o grupo de linhagens utilizadas para descrição da espécie pode ser diferenciado dos outros víbrios pelo conteúdo de ácidos graxos (presença do ácido graxo C₁₇) e pela proporção G+C do DNA (45 a 47% mol) (URDACI *et al.*, 1991).

Jores, Appel e Lewin (2007) realizaram o primeiro relato da ocorrência de *V. navarrensis* em amostras de água do mar (Alemanha). De acordo com os autores, as cepas utilizadas na pesquisa apresentaram características compatíveis com a espécie *V. vulnificus*, a saber: capacidade de utilizar a lactose como única fonte de carbono e ocorrência em ambiente com temperatura de água acima de 20°C. Por outro lado, as cepas possuíam diferenciação fenotípica e genotípica suficiente para justificar sua identificação como *V. navarrensis* biotipo *pommerensis*. Dentre essas diferenciações, destaca-se a capacidade de produzir hemólise em sangue de carneiro, reconhecida como marcador de virulência de interesse para Saúde Pública (TAKEDA, 2011) e para o cultivo de organismos aquáticos (AUSTIN *et al.*, 2005).

Com relação aos demais isolados no presente estudo, as espécies de *V. brasiliensis*, *V. xuii* e *V. neptunius* foram primeiramente isoladas de ambientes de cultivo de organismos aquáticos marinhos e descritas em 2003. Inicialmente foram associados filogeneticamente ao *V. tubiashii*, entretanto, esses víbrios podem ser diferenciados com base em características fenotípicas como composição de ácidos graxos, atividades enzimáticas e utilização de diferentes fontes de carbono (THOMPSON *et al.*, 2003).

A presença de *V. parahaemolyticus* em hemolinfa de camarão observada na presente pesquisa está de acordo com os resultados obtidos por Rojlorsakul *et al.* (1998). A detecção de quatro cepas de *V. cholerae* pode estar relacionada à sua ocorrência em ambientes aquáticos, incluindo os de cultivo. Para Worden *et al.* (2006), essa espécie é endêmica de ambientes aquáticos, entretanto, a sua proliferação e dinâmica nos ambientes marinhos não foram bem elucidadas.

As outras espécies identificadas no presente estudo vêm sendo isoladas de ambientes marinhos e, eventualmente, associadas à aquicultura (ALDAY-SANZ; ROQUE; TURNBULL, 2002; CAVALLO; STABILI, 2002; KESARCODI-WATSON *et al.*, 2009).

4.2 Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Vibrio* isoladas de hemolinfa de *Litopenaeus vannamei*

A atividade enzimática parece estar associada à virulência em diferentes espécies de *Vibrio* de interesse sanitário (KOO *et al.*, 2007) e veterinário (MA *et al.*, 2009). No presente estudo, foi observado um elevado índice de cepas capazes de hidrolisar a gelatina (n = 80; 80%) e a caseína (n = 96; 96%). Por outro lado, apenas 35 estirpes apresentaram habilidade de hidrolisar a elastina (Tabela 4; Figuras 9, 10 e 11, p. 55).

Tabela 4 – Expressão de proteases por víbrios isolados da hemolinfa do *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Espécies	n	Gelatinase				Caseínase				Elastase			
		+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-
<i>V. navarrensis</i>	53	40	1	1	11	48	4	-	1	8	6	10	29
<i>V. brasiliensis</i>	15	13	-	-	2	13	1	-	1	2	-	1	12
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	9	-	-	1	10	-	-	-	1	-	-	9
<i>V. xuii</i>	8	8	-	-	-	8	-	-	-	1	-	1	6
<i>V. coralliilyticus</i>	5	1	-	1	3	4	-	-	1	-	-	4	1
<i>V. cholerae</i>	4	3	-	-	1	3	-	-	1	-	-	-	4
<i>V. neptunis</i>	2	1	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	2
<i>V. alginolyticus</i>	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>V. diazotrophicus</i>	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> B3	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Total	100	77	1	2	20	91	5	-	4	13	6	16	65

*n: número de cepas, +++: halo com diâmetro ≥ 7 mm, ++: halo com diâmetro entre 4-6 mm, +: halo com diâmetro ≤ 3 mm, -: sem halo.

A expressão da gelatinase por estirpes de *Vibrio* oriundas de ambientes marinhos foi reportada por Baffone *et al.* (2001), que observaram esse perfil enzimático em 100% das espécies estudadas: *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* não O1, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* e *V. metshnikovii*. Outrossim, víbrios gelatinase positivos também já foram isolados de músculo do camarão *L. vannamei* (LIU *et al.*, 2004), da hemolinfa do peneídeo *Penaeus monodon* (LEE *et al.*, 1996), do hepatopâncreas dos camarões *P. japonicus* e *P. monodon* (LEE; LIU; CHEN, 1996b) e da hemolinfa de ostras cultivadas da espécie *Crassostrea gigas* (LE ROUX *et al.*, 2005).

Ainda acerca da produção de proteases, dados semelhantes aos obtidos na presente pesquisa (Tabela 4, p. 50; Figura 10, p. 55) foram reportados por Zhang e Austin (2000). Os autores observaram atividade enzimática contra caseína em víbrios isolados de camarão (*Penaeus chinensis*) e peixes marinhos. Austin *et al.* (2005) detectaram a expressão de caseinase por 92,3% das estirpes de *Vibrio* testadas e alertaram para o papel dessa enzima na patogenicidade bacteriana contra organismos aquáticos.

Masini *et al.* (2007) realizaram caracterização enzimática de víbrios provenientes de ambiente marinho com baixo impacto antrópico e obtiveram uma frequência de 82,7% de positividade para o teste de hidrólise da elastina. Ainda nesse contexto, Lafisca *et al.* (2008) revelaram atividade elastolítica em 5,8% de cepas ambientais de *V. alginolyticus*, fato que não pode ser comparado aos achados do presente estudo, uma vez que o único isolado dessa espécie mostrou-se elastase-negativo. Por outro lado, Manilal *et al.* (2010) investigaram a presença de fatores de virulência em espécies de *Vibrio* isoladas de camarão (*P. monodon*) e reportaram um índice de cepas elastase-positivas (37,9%) semelhante ao obtido na presente pesquisa (35%) (Tabela 4, p. 50; Figura 11, p. 55).

As proteases pesquisadas (gelatinase, caseínase e elastase) encontram-se envolvidas, principalmente, na obtenção de nutrientes protéicos para os microrganismos. Entretanto, a secreção dessas enzimas por bactérias pode concorrer para a instalação e agravamento de infecções sendo, por essa razão, considerada fator de virulência para peneídeos cultivados (LEE; YU; LIU, 1997; ALAVANDI *et al.*, 2006).

Há evidências de que a regulação dessas proteases em bactérias ocorre via *quorum-sensing* (ZHU; THURUTHYIL; WILLCOX, 2002; NATRAH *et al.*, 2011). Por outro lado, não há consenso sobre o tipo especificidade, uma vez que já foi relatada, em víbrios, ocorrência de expressão enzimática espécie-específica (INTARAPRASONG *et al.*, 2009) e estirpe-específicas (BAFFONE *et al.*, 2005).

Assim como a expressão de proteases, a produção das exoenzimas lipase e fosfolipase por bactérias do gênero *Vibrio* parece estar relacionada à capacidade desses microrganismos de provocar doenças em invertebrados marinhos (ZHONG *et al.*, 2006).

Na presente pesquisa, a atividade fosfolipolítica foi detectada em 94% dos isolados (Tabela 5; Figura 13, p. 55). Elevados índices de víbrios fosfolipase-positivos isolados de camarões também foram reportados em trabalhos pretéritos (LIUXY; LEE; CHEN, 1996; MANILAL *et al.*, 2010). Para Zhong *et al.* (2006), as características dos halos indicativos da expressão da fosfolipase sobre gema de ovo (Figura 13, p. 53) podem ser decorrentes da expressão do gene *vhhA*.

A detecção de lipase contra Tween 80 observada em 58% das cepas no presente estudo (Tabela 5) está de acordo com os resultados obtidos por Kumar *et al.* (2007), que verificaram atividade lipolítica em víbrios isolados de camarões cultivados na Índia. Ainda nesse contexto, a expressão de lipase por bactérias do gênero *Vibrio* isoladas de peneídeos também foi relatada Zhang e Austin (2000).

Tabela 5 – Expressão de lipase, fosfolipase e atividade hemolítica por víbrios isolados da hemofinfa do *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Espécies	n	Lipase contra Tween 80				Fosfolipase contra gema de ovo				Hemólise
		+++	++	+	-	+++	++	+	-	β
<i>V. navarrensis</i>	53	-	25	9	19	4	26	19	4	17
<i>V. brasiliensis</i>	15	-	6	1	8	4	7	4	-	11
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	-	2	-	8	8	1	-	1	1
<i>V. xuii</i>	8	-	4	1	3	6	2	-	-	5
<i>V. coralliilyticus</i>	5	-	3	1	1	1	2	2	-	3
<i>V. cholerae</i>	4	-	2	2	-	2	2	-	-	-
<i>V. neptunis</i>	2	-	-	1	1	-	1	1	-	1
<i>V. alginolyticus</i>	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-
<i>V. diazotrophicus</i>	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-
<i>V. vulnificus</i> B3	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-
Total	100	-	43	15	42	26	42	26	6	38

*n: número de cepas, +++: halo com diâmetro ≥ 7 mm, ++: halo com diâmetro entre 4-6 mm, +: halo com diâmetro <3 mm. β: β hemólise. -: sem halo.

A capacidade de produzir β -hemólise verificada em 38% dos isolados (Tabela 5, p. 52; Figura 12, p. 55) incluindo as espécies *V. navarrensis*, *V. brasiliensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. xuii* e *V. coralliilyticus* está de acordo com a sugestão de que alguns indicadores de virulência típicos de espécies, tais como *V. parahaemolyticus* já vêm sendo detectados em outros vibrios. Nishibuchi, Janda e Ezaki (1996) demonstraram que estirpes de *V. hollisae* oriundas de amostras clínicas podem carrear o gene *tdh*, responsável pela codificação de hemolisina, sendo, portanto, marcador de virulência. A evidência de que espécies, distintas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de animais de origem marinha são capazes de produzir β -hemólise também já foi reportada (AUSTIN *et al.*, 2005).

A atividade hemolítica de vibrios isolados de amostras ambientais foi verificada Baffone *et al.* (2001) nas espécies *V. vulnificus*, *V. furnissi* e *V. metshnikovii*. Outrossim, Rodrigues *et al.* (1993) isolaram cepas β -hemolíticas de *V. mimicus* e *V. fluvialis* de amostras de água do mar e de alimentos de origem marinha. A capacidade do *V. coralliilyticus* de produzir β -hemólise em sangue de carneiro (Tabela 5, p. 52) também foi reportada por Austin *et al.* (2005), que detectaram hemólise em estirpes oriundas dos invertebrados marinhos *Nodipecten nodosus* e *Pocillopora damicornis*.

Foram verificados 25 perfis enzimáticos nos 100 isolados testados (Tabela 6, p. 54; Apêndice A, p. 96). Os perfis mais recorrentes foram GelCasFosf (n = 17) e GelCasFosFLip (n = 16). A produção concomitante de gelatinase, caseínase e fosfolipase por vibrios isolados de camarão está de acordo com os achados de Alanvandi *et al.* (2006).

Todas as cepas que apresentaram atividade hemolítica mostram-se fosfolipase-positivas. Resultados semelhantes foram verificados por Manilal *et al.* (2010). A existência desse tipo de correlação foi proposta por Wang *et al.* (2007), que sugeriram a distribuição do gene *tlh* codificador da hemolisina como responsável pela expressão desses dois caracteres fenotípicos em vibrios: hemólise e atividade fosfolipolítica.

Tabela 6 – Perfil enzimático de 100 estirpes de *Vibrio* isoladas da hemolinfa do *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Fenotipagem enzimática	n	Espécies (número de isolados)
GelCasFosf	17	<i>V. parahaemolyticus</i> (6), <i>V. navarrensis</i> (6), <i>V. vulnificus</i> B3 (1), <i>V. xuii</i> (1), <i>V. brasiliensis</i> (2), <i>V. neptunis</i> (1)
GelCasFosfLip	16	<i>V. navarrensis</i> (11), <i>V. alginolyticus</i> (1), <i>V. xuii</i> (1), <i>V. cholerae</i> (2), <i>V. brasiliensis</i> (1)
GelCasFosfLipHem	11	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. coralliilyticus</i> (1), <i>V. xuii</i> (2), <i>V. parahaemolyticus</i> (1), <i>V. brasiliensis</i> (3)
GelCasFosfHem	10	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. brasiliensis</i> (4), <i>V. xuii</i> (2)
GelCasFosfLipElas	10	<i>V. navarrensis</i> (8), <i>V. xuii</i> (1), <i>V. parahaemolyticus</i> (1)
GelCasElasLipFosfHem	6	<i>V. navarrensis</i> (3), <i>V. coralliilyticus</i> (1), <i>V. xuii</i> (1), <i>V. brasiliensis</i> (1)
CasFosfLipElas	3	<i>V. navarrensis</i> (3)
GelCasFosfElas	2	<i>V. navarrensis</i> (2)
CasElas	2	<i>V. diazotrophicus</i> (1), <i>V. navarrensis</i> (1)
CasFosfHem	2	<i>V. navarrensis</i> (1), <i>V. brasiliensis</i> (1)
CasFosfLip	2	<i>V. brasiliensis</i> (1), <i>V. cholerae</i> (1)
CasFosfElas	2	<i>V. navarrensis</i> (1), <i>V. coralliilyticus</i> (1)
CasFosfElasHem	2	<i>V. navarrensis</i> (2)
CasFosfLipHem	2	<i>V. navarrensis</i> (1), <i>V. neptunis</i> (1)
GelCasLipElas	2	<i>V. navarrensis</i> (2)
CasFosfLipElasHem	2	<i>V. navarrensis</i> (1), <i>V. coralliilyticus</i> (1)
GelCasFosfElasHem	2	<i>V. navarrensis</i> (1), <i>V. brasiliensis</i> (1)
Fosf	1	<i>V. navarrensis</i> (1)
GelCas	1	<i>V. parahaemolyticus</i> (1)
CasFosf	1	<i>V. parahaemolyticus</i> (1)
GelCasLip	1	<i>V. navarrensis</i> (1)
GelFosfLip	1	<i>V. cholerae</i> (1)
FosfLipElas	1	<i>V. coralliilyticus</i> (1)
GelFosfLipHem	1	<i>V. brasiliensis</i> (1)

*n: número de cepas positivas. Gel: Gelatinase. Cas: Caseinase. Fosf: Fosfolipase. Lip: Lipase. Hem: β -hemólise. Elas: Elastase.



Figura 9 - Halos de hidrólise da gelatina no meio de Agar Triptona Soja suplementado com 0,5% de gelatina (Difco) e 1% de NaCl.



Figura 10 - Halos de hidrólise da caseína no meio de Agar Leite contendo 1% de NaCl.

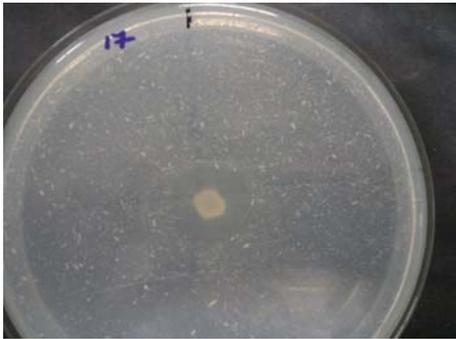


Figura 11 - Halo de hidrólise da elastina no meio de Agar Noble suplementado com 0,3% de elastina (Sigma E1625) e 1% de NaCl.



Figura 12 - Halos característicos de β -hemólise no meio de Agar Wagatsuma com modificações: suplementado com sangue de ovelha e 1% de NaCl.



Figura 13 - Halos de hidrólise de fosfolípidos em meio Agar Triptona Soja suplementado com solução de gema de ovo e 1% de NaCl.

Afora a produção de proteases, lipase, fosfolipase e detecção de atividade hemolítica, foram verificados espectros complementares de atividade enzimática em 24 isolados de *Vibrio* (Figura 14, Apêndice B, p. 99).

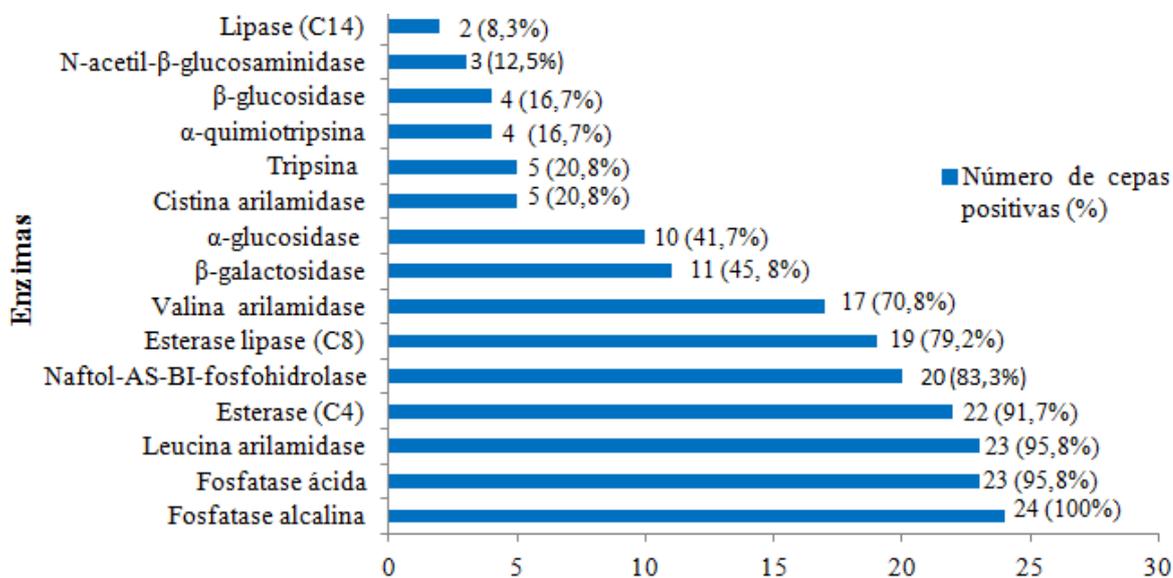


Figura 14 – Detecção de espectros complementares de atividade enzimática em 24 isolados de *Vibrio* provenientes da hemofínfa de espécimes de camarão *Litopenaeus vannamei* cultivados no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Todas as cepas foram positivas para as provas de fosfatase alcalina e negativas para α -galactosidase, β -glucuronidase, α -manosidase e α -fucosidase (Figura 15, p. 57). O mesmo comportamento foi verificado por Kahla-Nakbi, Chaieb e Bakhrouf (2009) em pesquisa sobre a ocorrência de fatores de virulência em víbrios isolados de peixes.

Ainda nesse sentido, a expressão de fosfatase ácida e alcalina, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucina arilamidase, valina arilamidase e tripsina por víbrios isolados de organismos marinhos cultivados também foi verificada por Thompson *et al.* (2003). Perfis de atividade enzimática semelhantes aos da presente pesquisa foram enumerados por Goarant *et al.* (2000), que alertaram para a relação entre a toxicidade de víbrios e as atividades de fosfatase alcalina, esterase, esterase lípase, fosfohidrolase, N-acetil- β -glucosaminidase e fosfatase ácida.



Figura 15 – Determinação do espectro de atividade enzimática das cepas 7 (*V. alginolyticus*), 13 (*V. navarrensis*) e 22 (*V. navarrensis*), através da utilização do *kit* APIzym (Biomérieux Ref 25200).

4.3 Susceptibilidade a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* isoladas de hemolinfa de *Litopenaeus vannamei*: resistência e perfil plasmidial

A literatura pretérita contempla um amplo histórico de detecção de víbrios resistentes a antimicrobianos em camarões de diferentes espécies (MOLITORIS *et al.*, 1985; ABRAHAM *et al.*, 1997; ROQUE *et al.*, 2001; TENDENCIA; DE LA PEÑA, 2001; VASEEHARAN *et al.*, 2005; UYAGUARI *et al.*, 2009; REBOUÇAS *et al.*, 2011). Não raro, a expressão desse tipo de resistência é relacionada ao uso inadequado de fármacos antibacterianos (HOLMSTROM *et al.*, 2003).

Das 100 cepas analisadas neste trabalho, 75 mostraram-se resistentes a pelo menos um antimicrobiano (Tabela 7, p. 58). A única espécie sensível a todos os fármacos foi a *V. neptunis*. Por outro lado, foi verificada resistência em todas as estirpes de *V. parahaemolyticus*, *V. xuii*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* e *V. vulnificus* B3. Dos isolados de *V. navarrensis*, *V. brasiliensis* e *V. coralliilyticus*, 71,7%, 60% e 60%, respectivamente, mostraram resistência antimicrobiana.

Tabela 7 – Resistência a antimicrobianos de vibrios oriundos da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Espécie	N	nR (%)	Resistência					
			Pen	Tet	Cfl	Amp	Atm	Cro
<i>V. navarrensis</i>	53	38 (71,7)	32	-	3	2	7	1
<i>V. brasiliensis</i>	15	9 (60)	9	-	4	1	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	10 (100)	10	9	1	3	-	-
<i>V. xuii</i>	8	8 (100)	8	-	4	2	-	-
<i>V. coralliilyticus</i>	5	3 (60)	3	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	4	4 (100)	4	3	-	2	1	-
<i>V. neptunis</i>	2	0 (0)	-	-	-	-	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	1	1 (100)	1	-	-	-	-	-
<i>V. diazotrophicus</i>	1	1 (100)	-	-	-	-	1	-
<i>V. vulnificus</i> B3	1	1 (100)	1	1	-	-	-	-
Total	100	75	68	13	12	10	9	1

*n: número de isolados. nR = número de isolados resistentes. Pen: Pencilina G. Tet: Tetraciclina. Amp: Ampicilina. Cfl: Cefalotina. Atm: Aztreonam. Cro: Ceftriaxona.

Em pesquisa sobre o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *V. parahaemolyticus* oriundos de camarão, Bhattacharya, Choudhury e Kumar (2000) revelaram a ocorrência de cepas resistentes à ampicilina e sensíveis a nitrofurantoína e ao ácido nalidíxico. Esses achados podem ser comparados aos do presente estudo, uma vez que três estirpes de *V. parahaemolyticus* mostraram-se resistentes a ampicilina, e todas foram sensíveis aos demais antimicrobianos testados.

Na Tabela 8 (p. 59) e Apêndice A (p. 96) estão descritos os dados relacionados aos nove perfis dos 75 vibrios resistentes. O perfil mais freqüente foi o de monoresistência a penicilina. Em diferentes regiões de cultivo de peneídeos, a ocorrência de vibrios penicilina-resistentes já foi reportada (VASEEHARAN *et al.*, 2005; JAYASREE; JANAKIRAM; MADHAVI, 2006). Do mesmo modo, há relatos da expressão de resistência a ampicilina (NAKAYAMA *et al.*, 2006) e tetraciclina (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2007) por vibrios provenientes de ambientes de cultivo de camarão.

Tabela 8 – Perfis de resistência a antimicrobianos de víbrios isolados da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Classificação	Perfil	n	Espécies (número de isolados resistentes)
Monoresistncia (n = 42)	Pen	38	<i>V. navarrensis</i> (28), <i>V. xiii</i> (4), <i>V. coralliilyticus</i> (3), <i>V. brasiliensis</i> (2), <i>V. alginolyticus</i> (1)
	Atm	4	<i>V. navarrensis</i> (3), <i>V. diazotrophicus</i> (1)
Resistncia cruzada a -lactmicos (n = 20)	PenCfl	9	<i>V. navarrensis</i> (3), <i>V. brasiliensis</i> (3), <i>V. xiii</i> (2), <i>V. parahaemolyticus</i> (1)
	PenAtm	5	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. cholerae</i> (1)
	PenAmp	2	<i>V. navarrensis</i> (2)
	CroAtm	1	<i>V. navarrensis</i> (1)
Resistncia mltipla (n = 13)	PenCflAmp	3	<i>V. xiii</i> (2), <i>V. brasiliensis</i> (1)
	PenTet	8	<i>V. parahaemolyticus</i> (6), <i>V. cholerae</i> (1) e <i>V. vulnificus</i> (1)
	PenTetAmp	5	<i>V. parahaemolyticus</i> (3), <i>V. cholerae</i> (2)

*n: número de isolados resistentes. Pen: Pencilina G. Tet: Tetraciclina. Amp: Ampicilina. Cfl: Cefalotina. Atm: Aztreonam. Cro: Ceftriaxona.

No Brasil, Costa *et al.* (2008) detectaram cepas de *Vibrio* resistentes à ampicilina,  sulfazotrim e  ceftriaxona em amostras do camarão *Litopenaeus vannamei* e sugeriram que os peneídeos e a área de cultivo estudada poderiam constituir fontes de bactérias resistentes. Na presente pesquisa foi verificada uma cepa com resistência cruzada a ceftriaxona e a aztreonam, entretanto, não foi observada resistência a sulfazotrim.

Com relação  caracterização da resistência, apenas 14 estirpes apresentaram resistência plasmidial (Tabela 9, p. 60). Possivelmente, a resistência das demais cepas aos antimicrobianos foi mediada por cromossomo (Figura 16, p. 60).

Tabela 9 – Mediação plasmidial da resistência antimicrobiana de vibrios isolados da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Cepa	Espécie	Perfil de resistência	Perfil pós-cura	
			Resistente	Sensível
1	<i>V. coralliilyticus</i>	Pen	-	Pen
2	<i>V. navarrensis</i>	Pen	-	Pen
3	<i>V. navarrensis</i>	PenAmp	-	PenAmp
4	<i>V. navarrensis</i>	PenAmp	Pen	Amp
10	<i>V. navarrensis</i>	Pen	-	Pen
11	<i>V. navarrensis</i>	Pen	-	Pen
17	<i>V. navarrensis</i>	PenAtm	-	PenAtm
20	<i>V. navarrensis</i>	PenAtm	Atm	Pen
44	<i>V. navarrensis</i>	Pen	-	Pen
81	<i>V. navarrensis</i>	Pen	-	Pen
96	<i>V. navarrensis</i>	PenAtm	Atm	Pen
104	<i>V. brasiliensis</i>	PenCfl	-	Pen
125	<i>V. brasiliensis</i>	Pen	-	Pen
129	<i>V. brasiliensis</i>	Pen	-	Pen

* Pen: Penicilina. Amp: Ampicilina. Atm: Aztreonam.

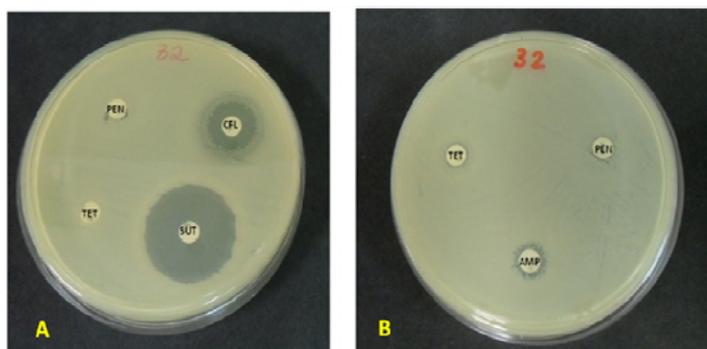


Figura 16 – A: Cepa 32 com perfil fenotípico de resistência à penicilina e tetraciclina. B: Antibiograma pós-cura da cepa 32 evidenciando resistência fenotípica à penicilina, tetraciclina e ampicilina.

Em bactérias do gênero *Vibrio*, a existência de plasmídeo codificador de resistência a penicilina foi sugerida por Reid e Amyes (1986), que descreveram o plasmídeo SAR-1 como capaz de hidrolisar os antibióticos carbenicilina e penicilina G. Segundo os autores, o mecanismo de resistência mais comum a β -lactâmicos é a produção de enzimas β -lactamases, que hidrolisam o antibiótico e o tornam inativo.

Outrossim, Teo, Suwanto e Poh (2000) relacionaram a resistência a ampicilina em víbrios a uma possível via de mediação por genes β -lactamase *blaVHW-1* e *blaVHH-1* de aproximadamente 60 kb presentes em plasmídeos.

Molina-Aja *et al.* (2002) em estudo sobre perfil plasmidial e resistência a antibióticos em cepas de *Vibrio* isoladas de peneídeos, detectaram uma incidência de isolados de hemolinfa resistentes a cefalotina superior a da presente pesquisa, com 36,1% das cepas portadoras de resistência a esse β -lactâmico. Os mesmos autores atribuíram a um plasmídeo de 21.226 pb a capacidade de codificar para a resistência à cefalotina, caracterizando, portanto, essa resistência como plasmidial. Esse achado não pode ser comparado ao do presente estudo, uma vez que a resistência a cefalotina, observada em 12 cepas, foi de natureza, possivelmente, cromossomial.

4.4 Bioatividade dos extratos etanólicos de sementes de *Moringa oleifera* frente à bactérias do gênero *Vibrio*

A atividade vibriocida da parte aérea de *M. oleifera* foi relatada por Peixoto *et al.* (2011). Os autores testaram a biotividade de extratos de folhas de moringa contra cepa padrão de *V. parahaemolyticus* e verificaram valores médios de halo de inibição de 21,9 e 20,7 para os extratos etanólicos e aquosos, respectivamente.

Estudos recentes sobre as propriedades bioativas da semente de moringa destacam os múltiplos usos dessa fanerógama, a saber: remoção de turbidez de águas contaminadas por coagulação (GOLESTANBAGH *et al.*, 2011), biossorção de metais pesados de efluentes (ARAÚJO *et al.*, 2010), atividade antiinflamatória (LEITE *et al.*, 2011) e antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* (FERREIRA *et al.*, 2011). Entretanto, a biotividade contra víbrios ainda não foi amplamente pesquisada. Nas tabelas 10 (p. 62) e 11 (p. 63) estão descritos os dados referentes à atividade vibriocida dos extratos etanólicos obtidos por extração a frio (MOS-E) e a quente (MOS-ES), respectivamente, a partir das sementes de *M. oleifera*. Por

outro lado, as figuras 17, 18, 19 (p. 63) e 20 (p. 63) mostram os halos de inibição dos extratos bioativos.

Tabela 10 – Distribuição, de acordo com a média do halo de inibição (mm), do número de cepas inibidas pelo extrato etanólico a frio de sementes de *Moringa oleifera* (MOS-E).

Espécie	n	Médias dos halos de inibição em mm						
		22-24	19-21	16-18	13-15	10-12	7-9	0
<i>V. navarrensis</i>	53	1	2	5	27	15	3	-
<i>V. brasiliensis</i>	15	-	1	2	4	2	5	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	-	-	-	-	-	9	1
<i>V. xuii</i>	8	-	-	-	1	-	5	2
<i>V. coralliilyticus</i>	5	-	-	2	1	1	1	-
<i>V. cholerae</i>	4	-	-	-	2	1	1	-
<i>V. neptunis</i>	2	-	-	1	-	1	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	1	-	-	-	1	-	-	-
<i>V. diazotrophicus</i>	1	-	1	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> B3	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>V. parahaemolyticus</i> IOC ^a	1	-	-	1	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 ^b	1	-	1	-	-	-	-	-
Total	102	1	5	11	36	20	24	5

*n: número de isolados. a: cepa padrão utilizada como controle Gram negativo. b: cepa padrão utilizada como controle Gram positivo

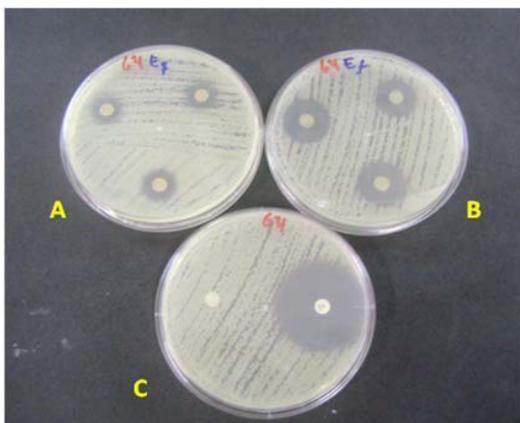


Figura 17 - A) Halos de inibição do MOS-ES (cepa 64 – *V. navarrensis*). B) Halos de inibição do MOS-E (cepa 64). C) Controle negativo (disco embebido com etanol PA) e positivo (cloranfenicol 30 µg).



Figura 18 - A) Halos de inibição do MOS-ES (cepa 70 – *V. brasiliensis*). B) Halos de inibição do MOS-E (cepa 70). C) Controle negativo (disco embebido com etanol PA) e positivo (cloranfenicol 30 µg).

Tabela 11 – Distribuição, de acordo com a média do halo de inibição (mm), do número de cepas inibidas pelo extrato etanólico a quente de sementes de *Moringa oleifera* (MOS-ES).

Espécie	N	Médias dos halos de inibição em mm					
		19-21	16-18	13-15	10-12	7-9	0
<i>V. navarrensis</i>	53	1	6	14	26	5	1
<i>V. brasiliensis</i>	15	1	2	2	4	3	3
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	-	-	-	-	9	1
<i>V. xuii</i>	8	-	-	-	1	7	-
<i>V. coralliilyticus</i>	5	-	-	1	3	1	-
<i>V. cholerae</i>	4	-	-	1	1	1	1
<i>V. neptunis</i>	2	-	-	-	2	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	1	-	-	1	-	-	-
<i>V. diazotrophicus</i>	1	-	1	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> B3	1	-	-	-	-	-	1
<i>V. parahaemolyticus</i> IOC ^a	1	-	1	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 ^b	1	-	1	-	-	-	-
Total	102	2	11	19	37	26	7

*n: número de isolados. a: cepa padrão utilizada como controle Gram negativo. b: cepa padrão utilizada como controle Gram positivo



Figura 19 - A) Halos de inibição do MOS-ES (cepa 86 – *V. navarrensis*). B) Halos de inibição do MOS-E (cepa 86). C) Controle negativo (disco embebido com etanol PA) e positivo (cloranfenicol 30 µg).

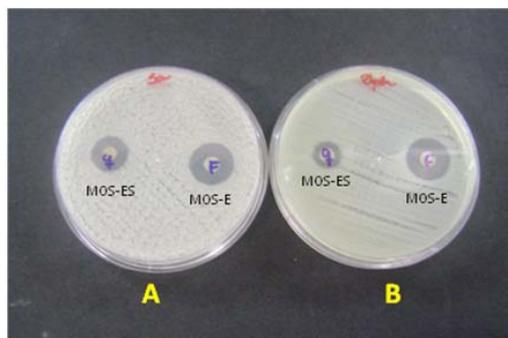


Figura 20 – A) Halos de inibição do MOS-ES e MOS-E frente à cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 . B) Halos de inibição do MOS-ES e MOS-E frente à cepa padrão de *V. parahaemolyticus* IOC Kanagawa positiva.

Apenas cinco cepas foram resistentes ao extrato MOS-E, por outro lado, 36 tiveram crescimento inibido, com médias de halos de inibição situadas na faixa de 13 a 15 mm (Tabela 10; Figuras 17 e 18, p. 62). Quando comparados os extratos, os testes com o MOS-ES demonstraram uma taxa de inibição bacteriana um pouco menor, uma vez que a maioria das cepas (n = 37) teve inibição indicada por halos com média assentada no intervalo de 10 a 12 mm (Tabela 11; Figura 19, p. 63). Soma-se a isso o fato de sete estirpes terem sido resistentes ao MOS-ES. O maior halo de inibição (22 a 24 mm) foi observado quando do teste do MOS-E contra uma cepa de *V. navarrensis* (Tabela 10, p. 62). Ambos os extratos mostram efeito antibacteriano contra o controle Gram positivo (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativo (*Vibrio parahaemolyticus*) (Tabelas 10, p. 62; Tabela 11 e Figura 20, p. 63). Os extratos MOS-H e MOS-HS não apresentaram bioatividade contra nenhum isolado (n = 100).

Chama-se a atenção para o elevado índice de inibição de ambos os extratos (95% para MOS-E e 93% para MOS-ES) (Apêndice C, p. 101) contra víbrios portadores de fatores de virulência e resistentes a antimicrobianos. Essa atividade vibriocida está de acordo com os achados de Vieira *et al.* (2010), que pesquisaram a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de sementes de moringa e verificaram halos de inibição variando de 26 a 29,5 mm contra *V. cholerae* clássico 569B.

O estudo de fanerógamas para triagem de compostos ativos contra espécies de *Vibrio* veiculadas a doenças em humanos vem sendo discutido. Thakurta *et al.* (2007) demonstraram o efeito antibacteriano de extratos de nim, espécie *Azadirachta indica*, sobre os sorotipos O1, O139, não-O1 e não-O130 de *V. cholerae*. Akinsinde e Olukoya (1995), em estudo sobre o efeito bactericida *in vitro* de 14 espécies de plantas medicinais da Nigéria, também observaram bioatividade contra *V. cholerae*. Ainda nesse sentido, Guevara, Chumpitaz e Valencia (1994) propuseram a utilização de extratos de casca de romã (*Punica granatum*) como uma alternativa para o tratamento da cólera.

Ainda nesse contexto, extratos de semente de moringa também foram utilizados em testes contra cepa padrão de *V. cholerae*. Atieno *et al.* (2011) observaram bioatividade de extratos hexânicos e metanólicos das sementes de *M. oleifera* e *M. stenopetala* contra *Salmonella* Typhi, *E. coli* e *V. cholerae*. Os autores reportaram tamanhos médios de halo de inibição para a espécie de *Vibrio* de 22,2 e 13,8 para os extratos hexânicos e metanólicos de *M. oleifera*, respectivamente. Os dados supracitados corroboram a assertiva de que as sementes de moringa possuem potencial vibriocida, entretanto, não podem ser comparados aos da presente pesquisa, uma vez que não foi detectada atividade antibacteriana nos extratos hexânicos (MOS-H e MOS-HS).

Duas espécies, *V. parahaemolyticus* (n = 1) e *V. vulnificus* (n = 1), veiculadas a etiologias bacterianas em camarões (LONGYANT *et al.*, 2008) mostraram-se resistentes a todos os extratos testados (Tabela 10, p. 62; Tabela 11, p. 63). A resistência dessas espécies a extratos de sementes de fanerógamas foi demonstrada por Penduka, Okoh e Okoh (2011).

A despeito da ocorrência de compostos com atividade antibacteriana em diferentes partes da moringa já está sendo relatada desde o início da década de 1980 (EILERT; WOLTERS; NAHRSTEDT, 1981), entretanto, a sua utilização para fins epizoóticos foi pouco explorada. Diante do exposto, somam-se aos dados obtidos pelo teste de difusão em disco (Tabela 10, p. 62; Tabela 11, p. 63) os resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) como evidência do elevado potencial antibacteriano dos extratos etanólicos de MOS-E e MOS-ES contra víbrios de interesse para carcinicultura.

A pesquisa da CIM do MOS-E revelou que 83 (90,2%) cepas foram inibidas na presença de uma concentração de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$, as concentrações de 8, 16 e $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram capazes de inibir 1, 6 e 2 cepas, respectivamente. Ainda nesse sentido, a MIC do MOS-ES capaz de inibir o maior percentual de cepas (n = 88; 97,8%) foi a de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, apenas 2 (2,2%) das cepas foram inibidas em CIM de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MOS-ES.

De acordo com Holetz *et al.* (2002), extratos de vegetais superiores que apresentam valores de CIM situados abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ possuem elevada atividade antibacteriana. Considerando esse critério de classificação, os valores obtidos para CIM sugerem que os extratos etanólicos de MOS-E e MOS-ES possuem um expressivo efeito contra víbrios portadores de fatores de virulência e resistentes a antimicrobianos.

Os resultados satisfatórios obtidos nos testes de difusão em disco e a definição da CIM foram determinantes para realização de estudos complementares, a partir da triagem bioguiada de compostos bioativos. O estudo da bioatividade das frações diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de MOS-E e MOS-ES revelou que apenas as frações MOS-E-AcOEt e MOS-ES-AcOEt apresentaram atividade antibacteriana (Tabela 12; Figuras 21 e 22, p. 66).

O efeito antimicrobiano seletivo de frações de extratos bruto de moringa também foi verificado por Nantachit (2006). O autor observou que a fração diclorometano foi ativa contra *E. coli*.

Tabela 12 – Média de halos de inibição das frações diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) dos extratos etanólicos (MOS-E e MOS-ES) de sementes de *Moringa oleifera* contra dez estirpes de *Vibrio* isoladas da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*.

Cepas	Espécies	Médias dos halos de inibição (mm)					
		Frações MOS-E			Frações MOS-ES		
		CH ₂ Cl ₂	AcOEt	MeOH	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	MeOH
1	<i>V. coralliilyticus</i>	-	14,51±0,07	-	-	12,10±0,08	-
7	<i>V. alginolyticus</i>	-	12,65±0,06	-	-	10,52±0,45	-
13	<i>V. navarrensis</i>	-	15,71±0,21	-	-	14,03±0,07	-
35	<i>V. diazotrophicus</i>	-	17,14±0,04	-	-	16,58±0,42	-
40	<i>V. navarrensis</i>	-	15,75±0,35	-	-	11,82±0,31	-
42	<i>V. xuii</i>	-	12,39±0,24	-	-	11,80±0,25	-
46	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	8,53±0,15	-	-	7,66±0,12	-
89	<i>V. neptunis</i>	-	18,54±0,42	-	-	11,18±0,09	-
97	<i>V. cholerae</i>	-	8,46±0,09	-	-	7,32±0,10	-
98	<i>V. brasiliensis</i>	-	15,01±0,05	-	-	14,61±0,15	-

* -: sem halo de inibição.

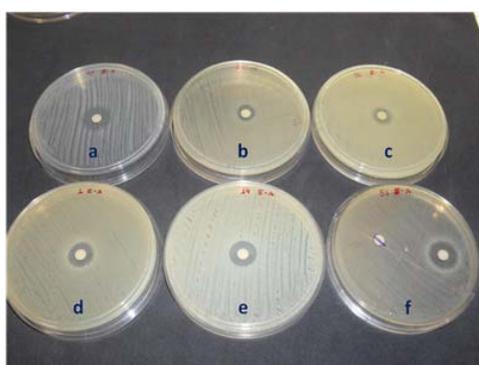


Figura 21 - Halos de inibição de MOS-E-AcOEt frente a: a) *V. diazotrophicus* b) *V. alginolyticus* c) *V. xuii* d) *V. coralliilyticus* e) *V. navarrensis* f) *V. navarrensis*.

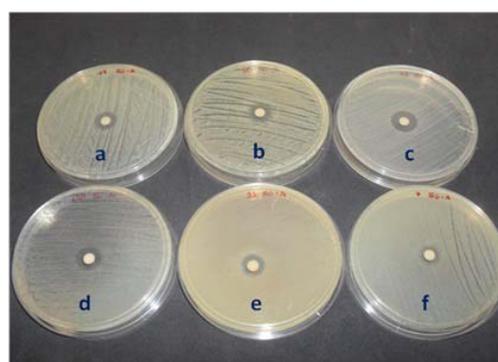


Figura 22 - Halos de inibição MOS-ES-AcOEt frente a: a) *V. navarrensis* b) *V. xuii* c) *V. diazotrophicus* d) *V. coralliilyticus* e) *V. navarrensis* f) *V. alginolyticus*.

As frações acetato de etila foram selecionadas e submetidas a fracionamento cromatográfico por CLAE para isolamento de substâncias bioativas (item 3.9, p. 44).

4.5 Identificação das substâncias isoladas

A partir da fração MOS-ES-AcOEt, foram identificadas três substâncias S1 (MOS-ES-1), S2 (MOS-ES-2) e S3 (MOS-ES-3). Devido à pequena quantidade obtida da substância MOS-ES-2 (S2) não foi possível obter dados espectroscópicos que permitissem a sua caracterização estrutural. As outras duas substâncias obtidas a partir da fração MOS-ES-AcOEt também foram obtidas em pequenas quantidades e foram identificadas apenas com base nas análises de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Além disso, a purga desta fração rendeu 23 mg de uma mistura de substâncias menos polares que não foram identificadas (Figura 23).



Figura 23 - Placa da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) da análise por CLAE da fração MOS-ES-AcOEt. 1 = MOS-ES-1; 2 = MOS-ES-3; P = purga da coluna; eluente = $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) e revelador = solução de vanilina.

4.5.1 Caracterização estrutural da substância MOS-ES-1 (S1)

A substância S1 foi isolada como sólido amorfo esbranquiçado e apresentou p.f. 129-132 °C, $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 302,1012$. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 7,28 (2H, d, $J = 8,6$ Hz); 7,07 (2H, d, $J = 8,6$ Hz); 5,43 (1H, d, $J = 1,4$ Hz); 3,84 (1H, dd, $J = 3,4$ e 9,5 Hz); 3,82 (2H, s); 3,82 (2H, m); 3,62 (1H, m); 3,46 (1H, t, $J = 9,5$ Hz); 1,21 (3H, d, $J = 6,2$ Hz). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): δ 157,4 (C-1); 118,1 (C-2 e C-6); 130,2 (C-3 e C-5); 125,8 (C-4); 22,7 (C-7); 119,8 (C-8); 99,9 (C-1'); 72,0 (C-2'); 72,0 (C-3'); 73,8 (C-4'); 70,7 (C-5'); 18,0 (C-6'). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr) 3411 ($\nu_{\text{O-H}}$), 2948 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2250 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$), 1611-1513 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 1227 ($\nu_{\text{C-O}}$).

A análise dos dados espectrométricos somada à comparação com os dados da literatura (FAIZI *et al.*, 1994) permitiram caracterizar a substância S1 como sendo a 4-[(α -L-ramnosiloxi)benzil]nitrila ou niazirina (Figura 24).

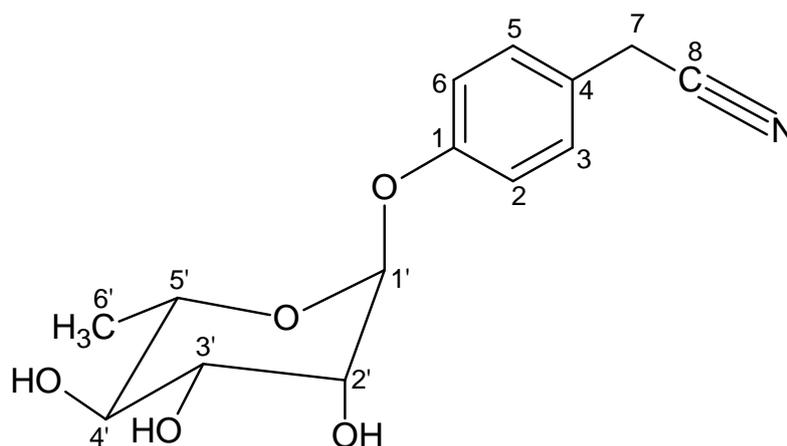


Figura 24 – Estrutura química do composto vibriocida niazirina isolado da fração acetato de etila do extrato etanólico de semente de *Moringa oleifera* - MOS-ES.

4.5.2 Caracterização estrutural da substância MOS-ES-3 (S3)

A substância S3 também foi isolada como sólido amorfo esbranquiçado e apresentou p.f. 130-133 °C, $[M + Cl]^- = 392,0951$, RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD): δ 7,25 (2H, d, $J = 8,7$ Hz); 7,01 (2H, d, $J = 8,7$ Hz); 5,40 (1H, d, $J = 1,8$ Hz); 4,63 (2H, s); 4,46 (2H, q, $J = 7,1$ Hz); 3,99 (1H, dd, $J = 1,8$ e 3,4 Hz); 3,83 (1H, dd, $J = 3,4$ e 9,5 Hz); 3,62 (1H, m); 3,45 (1H, t, $J = 9,5$ Hz); 1,29 (3H, t, $J = 7,1$ Hz); 1,21 (3H, d, $J = 6,2$ Hz), RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD): δ 157,1 (C-1); 117,6 (C-2 e C-6); 130,1 (C-3 e C-5); 133,1 (C-4); 49,0 (C-7); 192,3 (C-8); 66,9 (C-9); 14,7 (C-10); 100,2 (C-1'); 72,1 (C-2'); 72,3 (C-3'); 73,9 (C-4'); 70,6 (C-5'); 18,0 (C-6'). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr) 3405 ($\nu_{\text{O-H}}$), 2948 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1611-1513 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1233 ($\nu_{\text{C=S}}$).

A análise de todos os dados espectrométricos e comparação com dados da literatura (FAIZI *et al.*, 1992) possibilitaram caracterizar a substância S3 como sendo *O*-etil-4-[(α -L-ramnosiloxi)benzil]tiocarbamato ou niazimicina (Figura 25, p. 69).

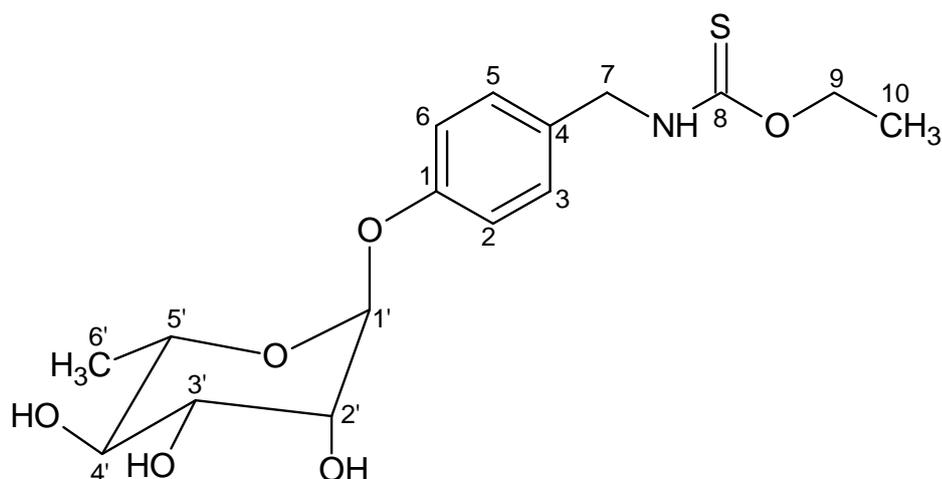


Figura 25 - Estrutura química do composto vibriocida niazimicina isolado da fração acetato de etila do extrato etanólico de semente de *Moringa oleifera* - MOS-ES.

4.6 Avaliação da atividade antibacteriana das substâncias isoladas

Os resultados da bioatividade das substâncias S1 e S3 contra dez estirpes de *Vibrio* estão sumarizados na Tabela 13 (p. 70). Quando comparadas as substâncias 1 e 3 (S1 e S3), usando como critério o tamanho do halo de inibição, verificou-se uma maior eficiência antibacteriana da S3 (Figura 26) contra todas as estirpes testadas (Tabela 13, p. 70).



Figura 26 – Halos de inibição das substâncias 1 (S1) e 3 (S3) contra uma cepa de *V. diazotrophicus* isolada da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado no Centro de Estudos de Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC).

Tabela 13 – Média de halos de inibição das substâncias 1 (S1) e 3 (S3), isoladas das frações acetato de etila (AcOEt) dos extratos etanólicos (MOS-E e MOS-ES) de sementes de *Moringa oleifera*, contra dez estirpes de *Vibrio* oriundas da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*.

Cepas	Espécies	Fração AcOEt MOS-ES		
		S1	S2	S3
1	<i>V. coralliilyticus</i>	8,11±0,09	nt	14,04±0,02
7	<i>V. alginolyticus</i>	8,32±0,02	nt	15,98±0,09
13	<i>V. navarrensis</i>	9,76±0,43	nt	19,89±0,11
35	<i>V. diazotrophicus</i>	7,42±0,24	nt	21,21±0,24
40	<i>V. navarrensis</i>	9,77±0,15	nt	17,89±0,12
42	<i>V. xuii</i>	8,76±0,29	nt	20,33±0,06
46	<i>V. parahaemolyticus</i>	7,66±0,45	nt	9,90±0,07
89	<i>V. neptunis</i>	7,14±0,11	nt	20,11±0,03
97	<i>V. cholerae</i>	7,30±0,27	nt	10,15±0,18
98	<i>V. brasiliensis</i>	7,99±0,02	nt	18,75±0,06

*nt: não testado

Barreto *et al.* (2009) determinaram os constituintes químicos voláteis e não voláteis de óleos essenciais de *M. oleifera* e isolaram derivados de niazirina e niazirinina de extratos etanólicos de suas folhas. De acordo com os autores, os dados obtidos para essas substâncias foram comparáveis aos descritos para 4-Oacetil-alfa-ramnosídeos, tratando-se, portanto, de 4-[4'-O-acetil- α -L-ramnosiloxibenzil]nitrila denominada de niazirinina. Esses dados estão de acordo com os achados da presente pesquisa no que se refere à ocorrência de nitrilas bioativas em diferentes partes da espécie *M. oleifera*.

A partir de extratos etanólicos de sementes de moringa, Guevara *et al.* (1999) descreveram as estruturas semelhantes as descritas no presente estudo, a saber: O-etil-4-(α -L-ramnosiloxi)benzil carbamatos, 4(α -L-ramnosiloxi)-benzil isotiocianato, niazimicina, 3-O-(6'-O-oleoil- β -D-glucopiranosil)- β -sitosterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosídeo, niazirina, β -sitosterol e glicerol-1-(9-octadecanoato). Os autores alertaram para a bioatividade da niazimicina e niazirina.

Outrossim, Gilani *et al.* (1994) isolaram quatro compostos bioativos, a partir do fracionamento bioguiado de extratos etanólicos de folhas de *M. oleifera*, e também obtiveram

substâncias compatíveis com aquelas descritas na presente pesquisa: niazinina A, niazinina B, niazimicina, niazinina A +B.

Somam-se as substâncias supracitadas, os compostos *O*-etil-*p*-hidroxibenzeno carbamato e *O*-metil-4-[(2',3',4'-tri-*O*-acetil- α -L-ramnosiloxi)benzil] tiocarbamato como isolados de extratos de folhas de *M. oleifera* (FAIZI *et al.*, 1995; FAIZI *et al.*, 1997). Considera-se a adição de metanol ou etanol ao isiotiocianato como via de síntese de glicosídeos tiocarbamatos em moringa (FAIZI *et al.*, 1995).

Desde a década de 1990, atividades biológicas de interesse farmacológico de nitrilas isoladas de moringa vem sendo descritas, destacando-se às funções antitumorais (MURAKAMI *et al.*, 1998), anti- hipertensivas (FAIZI *et al.*, 1994) e à prevenção na carcinogênese (GUEVARA *et al.*, 1999).

Cita-se a niazimicina presente em sementes de moringa como um potente fator antitumoral, que pode ser utilizado como medida profilática ou terapêutica no tratamento de infecção por HSV-1 (ANWAR *et al.*, 2007).

Mesmo não sendo a primo descrição de glicosídeos carbamatos em partes constituintes da espécie *M. oleifera* (MENEZES, 2006), merece destaque o seu pontencial vibriocida não explorado. No presente estudo, as substâncias niazirina e niazimicina mostram elevada eficiência antibacteriana contra víbrios com perfil fenotípico compatível com a presença de fatores de virulência (exoenzimas e produtores de β -hemólise), resistência cruzada a β -lactâmicos, mono e multirresistência a antimicrobianos. Esses achados sugerem uma nova classe de compostos vibriocidas de interesse para atividades aquícolas. Além disso, os resultados estão de acordo com a demanda de pesquisa de novos fármacos antibacterianos alternativos para a mitigação dos impactos gerados pelo uso indiscriminado de antimicrobianos em cultivos aquícolas.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo sustenta as seguintes conclusões:

- A hemolinfa de camarões (*L. vannamei*) aparentemente saudáveis pode ser colonizada por bactérias do gênero *Vibrio*.
- As espécies *V. navarrensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. xuii*, *V. coralliilyticus*, *V. cholerae*, *V. neptunis*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* e *V. vulnificus* B3 podem ser isoladas de hemolinfa de camarões (8,8±1,5 g/ 9,5±0,7 cm) aparentemente sadios.
- Estirpes de *Vibrio* portadores de fatores de virulência e resistentes a antimicrobianos podem ser utilizadas como modelo para triagem bioguiada de compostos antibacterianos em fanerogramas.
- As CIMs dos extratos MOS-E e MOS-ES não se mostraram elevadas, caracterizando, portanto, o elevado potencial antibacteriano das sementes de *Moringa oleifera* frente a víbrios autóctones do camarão *L. vannamei*.
- As substâncias niazirina e niazimicina, isoladas de sementes de *Moringa oleifera*, possuem elevado potencial vibriocida, caracterizado pela inibição de cepas de *Vibrio* resistentes a fármacos antibacterianos e produtoras de exoenzimas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, T.J.; MANLEY, R.; PALANIAPPAN, R.; DHEVENDARAN, K. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. **J Aquacult Tropics**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 1997.
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; ASCENCIO, F. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. **J Invertebr Pathol**, v. 78, n. 4, p. 215-219, 2001.
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; ASCENCIO, F. Efecto de diferentes especie de *Vibrio* sobre la sobrevivencia larval del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). **Panorama Acuícola**, v. 7, n. 5, p. 18-19, 2002.
- AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. **J Appl Microbiol**, v. 103, n. 5, p. 2016-2025, 2007.
- AKINSINDE, K.A.; OLUKOYA, D.K. Vibriocidal activities of some local herbs. **J Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 13, n. 2, p. 127-129, 1995.
- ALAPIDE-TENDENCIA, E.V., DUREZA, L.A. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* Fabricius with red disease syndrome. **Aquaculture**, v. 154, n. 2, p. 107–114, 1997.
- ALAVANDI, S.V.; MANORANJITA, V.; VIJAYAN, K.K.; KALAIMANI, N.; SANTIAGO, T.C. Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. **Lett Appl Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 566–570, 2006.
- ALDAY-SANZ, V.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Dis Aquat Organ**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2002.
- AMAGLOH, F.K.; BENANG, A. Effectiveness of *Moringa oleifera* seed as coagulant for water purification. **Afr J Agric Res.**, v. 4, n. 1, p. 119-123, 2009.
- ANTUNES, F.; HINZMANN, M.; LOPES-LIMA, M.; MACHADO, J.; MARTINS DA COSTA, P. Association between environmental microbiota and indigenous bacteria found in hemolymph, extrapallial fluid and mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). **Microb Ecol.**, v. 60, n. 2, p. 304-309, 2010.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytother Res**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007.

ARAÚJO, C.S.; ALVES, V.N.; REZENDE, H.C.; ALMEIDA, I.L.; DE ASSUNÇÃO, R.M.; TARLEY, C.R.; SEGATELLI, M.G.; COELHO, N.M. Characterization and use of *Moringa oleifera* seeds as biosorbent for removing metal ions from aqueous effluents. **Water Sci Technol**, v. 62, n. 9, p. 2198-2203, 2010.

ASHOK KUMAR, N.; PARI, L. Antioxidant action of *Moringa oleifera* Lam. (drumstick) against antitubercular drug induced lipid peroxidation in rats. **J Med Food**, v. 6, n. 3, p. 255-259, 2003.

ATIENO, W.; WAGAI, S.; ARAMA, P. OGUR, J. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala* methanol and n-hexane seed extracts on bacteria implicated in water borne diseases. **Afr J Microbiol Res**, v. 5, n. 2, p. 153-157, 2011.

AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 310-307, 2010.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D., SUTHERLAND, R.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. **Environ Microbiol**, v. 7, n. 9, p. 1488-1495, 2005.

BAFFONE, W.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; PIANETTI, A.; CAMPANA, R.; BRUSCOLINI, F. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. **Food Microbiol**, v. 18, n. 5, p. 479-488, 2001.

BAFFONE, W.; VITTORIA, E.; CAMPANA, R.; CITTERIO, B.; CASAROLI, A.; PIERFELICI, L. Occurrence and expression of virulence-related properties by environmental halophilic *Vibrio* spp. in in vitro and in vivo systems. **Food Control**, v. 16, n. 5, p. 451-457, 2005.

BAIZABAL-RAMÍREZ, O.; NEGRETE PÉREZ, M.; GUERRERO-DAZA, D.; MARTÍNEZ-HERRERA, N.; ABURTO-DESACHY, Y.; MATA-MIRANDA, P. Septic shock by *Vibrio vulnificus* at the coast Gulf of Mexico. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**, v. 49, n. 4, p. 433-436, 2011.

BALCÁZAR, J.L.; PINTADO, J. PLANAS, M. *Vibrio hippocampi* sp. nov., a new species isolated from wild seahorses (*Hippocampus guttulatus*). **FEMS Microbiol Lett**, v. 307, n. 1, p. 30-34, 2010.

BARRETO, M.B.; FREITAS J.V.B.; SILVEIRA, E.R.; BEZERRA, A.M.E.; NUNES, E.P.; GRAMOSA, N.V. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n. 4, p. 893-897, 2009.

BEAZ-HIDALGO, R.; CLEENWERCK, I.; BALBOA, S.; PRADO, S.; DE VOS, P.; ROMALDE, J.L. *Vibrio breoganii* sp. nov., a non-motile, alginolytic, marine bacterium within the *Vibrio halioticoli* clade. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 59, n. 7, p. 1589-1594, 2009a.

BEAZ-HIDALGO R.; DOCE, A.; PASCUAL, J.; TORANZO, A.E.; ROMALDE, J.L. *Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in north-western Spain. **Syst Appl Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 111-117, 2009b.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J. Improvement of water treatment pilot plant with *Moringa oleifera* extract as flocculant agent. **Environ Technol.**, v. 30, n. 6, p. 525-534, 2009.

BEZERRA, A.M.E.; MOMENTÉ, V.G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Hortic. bras.**, v. 22, . 2, p. 295-299, 2004.

BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Pollination, pollen germination and stigma receptivity in *Moringa oleifera* Lamk. **Grana**, v. 43, p. 48-56, 2004.

BHATTACHARYA, M.; CHOUDHURY, P.; KUMAR, R. Antibiotic- and metal-resistant strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimps. **Microb Drug Resist.**, v. 6, n. 2, p. 171-172, 2000.

BROCK, J.A.; MAIN, K. **A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei***. Oceanic Institute, Honolulu, 1994, 241 p.

BROIN, M.; SANTAELLA, C.; CUINE, S.; KOUKOU, K.; PELTIER, G.; JOET, T. Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera* Lam. seeds. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 1-2, p. 114-119, 2002.

BUERIS, V. Genética da Virulência. *In*: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. p.163-168.

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

CACCAMESE, S.M.; RASTEGAR, D.A. Chronic diarrhea associated with *Vibrio alginolyticus* in an immunocompromised patient. **Clin Infect Dis.**, v. 29, n. 4, p. 946–947, 1999.

CÁCERES, A.; CABRERA, O.; MORALES, O.; MOLLINEDO, P.; MENDIA, P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 33, n.3, p. 213-216, 1991.

CAMPOS, L.C. *Vibrio cholerae*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. p.337-343.

CANO-GÓMEZ, A.; GOULDEN, E.F.; OWENS, L.; HØJ, L. *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 302, n. 2, p. 175-181, 2010.

CASTAÑEDA CHÁVEZ, R.M.; PARDIO SEDAS, V.; ORRANTIA BORUNDA, E.; LANGO REYNOSO, F. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. **Mar Pollut Bull.**, v. 50, n. 12, p. 1641-1648, 2005.

CAVALLO, R.A.; STABILI, L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Water Res**, v. 36, n. 15, p. 3719-3726, 2002.

CHARLES, R.C.; RYAN, E.T. Cholera in the 21st century. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 24, n. 5, p. 472-477, 2011.

CHIMETTO, L.A.; CLEENWERCK, I.; ALVES, N JR.; SILVA, B.S.; BROCCHI, M.; WILLEMS, A.; DE VOS, P.; THOMPSON, F.L. *Vibrio communis* sp. nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. 2, p. 362-368, 2011.

CHOWDHURY, G.; PAZHANI, G.P.; NAIR, G.B.; GHOSH, A.; RAMAMURTHY, T. Transferable plasmid-mediated quinolone resistance in association with extended-spectrum β -lactamases and fluoroquinolone-acetylating aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase in clinical isolates of *Vibrio fluvialis*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 38, n. 2, p. 169-173, 2011.

CHUANG, P.H.; LEE, C.W.; CHOU, J.Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.J.; CHEN, H.M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresour Technol.**, v. 98, n. 1, p. 232-236, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Wayne, PA, USA, 2010.

COELHO, J.S.; SANTOS, N.D.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; ZINGALI, R.B.; COELHO, L.C.; LEITE, S.P.; NAVARRO, D.M.; PAIVA, P.M. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.

COSTA, R.; MERMOUD, I.; KOBLAVI, S.; MORLET, B.; HAFFNER, P.; BERTHE, F.; LEGROUMELLE, M.; GRIMONT, P. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 297-309, 1998.

COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F.; SILVA, G.C.; VIEIRA, R.H.S.F.; SAMPAIO, S.S. 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. **Braz J Vet Res Anim Sci.**, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

CROSA, J.H.; ACTIS, L.A.; TOLMASKI, M.E. The biology and pathogenicity of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalli*. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The biology of Vibrios**. Washington D.C.: ASM Press, 2006. p. 251-280.

DALSGAARD, A.; BJERGSKOV, T.; JEPPESEN, V.F.; JØRGENSEN, L.B.; ECHEVERRIA, P.; DALSGAARD, I. Prevalence and characterization of *Vibrio cholerae* isolated from shrimp products imported into Denmark. **J Food Prot**, v. 59, n. 7, p. 694-697, 1996.

DANG, P.K.; DEGAND, G.; DANYI, S.; PIERRET, G.; DELAHAUT, P.; TON, V.D.; MAGHUIN-ROGISTER, G.; SCIPPO, M.L. Validation of a two-plate microbiological method for screening antibiotic residues in shrimp tissue. **Anal Chim Acta**, v. 672, n. 1-2, p. 30-39, 2010.

DEEPANJALI, A.; KUMAR, H.S.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 7, p. 3575–3580, 2005.

DEPAOLA, A.; ULASZEK, J.; KAYSNER, C.A.; TENGE, B.J.; NORDSTROM, J.L.; WELLS, J.; PUHR, N.; GENDEL, S.M. Molecular, serological and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 7, p. 3999–4005, 2003.

DIÉGUEZ, A.L.; BEAZ-HIDALGO, R.; CLEENWERCK, I.; BALBOA, S.; DE VOS, P.; ROMALDE, J.L. *Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov., isolated from the clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. 2, p. 2406-2411, 2011.

DOUGHARI, J. H.; PUKUMA, M.S.; DE, N. Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella* Typhi. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 6, n. 19, p. 2212-2215, 2007.

DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. 2011. Disponível em: <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html#searchResult>. Acesso em: 23 de novembro de 2011.

EDOUCARD, S.; DAUMAS, A.; BRANGER, S.; DURAND, J.M.; RAOULT, D.; FOURNIER, P.E. *Grimontia hollisae*, a potential agent of gastroenteritis and bacteraemia in the Mediterranean area. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 28, n. 6, p. 705-707, 2009.

EILERT, U.; WOLTERS, B.; NAHRSTEDT, A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. **Planta Med**, v. 42, n. 5, p. 55-61, 1981.

ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; JACKSON, L.; TAMPLIN, M.L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Food and Drug Administration – FDA, **Bacteriological Analytical Manual**. FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition – CFSAN, 2001.

FAGUTAO, F.F.; KOYAMA, T.; KAIZU, A.; SAITO-TAKI, T.; KONDO, H.; AOKI, T.; HIRONO, I. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. **FEBS J.**, v. 276, n. 18, p. 5298-5306, 2009.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SALEEM, R.; SIDDIQUI, S.; AFTABA, K.; GILANI, A-UL-H. Isolation and structure elucidation of novel hypotensive agents, niazinin A, niazinin 6, niazimicin and niaziminin A + B from *Moringa oleifera*: the first naturally occurring thiocarbamates. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**, n. 23, p. 3237-3241, 1992.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B.S.; SALEEM, R.; SIDDIQUI, S.; AFTAB, K. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. **J Nat Prod**, v. 57, n. 9, p. 1256-1261, 1994.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B.S.; SALEEM, R.; SIDDIQUI, S.; AFTAB, K.; GILANI, A.H. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 957-963, 1995.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B.S.; SALEEM, R.; NOOR, F.; HUSNAIN, S. Isolation and structure elucidation of a novel glycoside niazidin from the pods of *Moringa oleifera*. **J Nat Prod**, v. 60, p. 1317-1321, 1997.

FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, n. 1, v. 5, 2005. Disponível em: <http://www.TFLJournal.org/article.php/20051201124931586>. Acesso em: 09 nov. 2009.

FERNÁNDEZ, J.; AVENDAÑO-HERRERA, R. Analysis of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* strains isolated from fish. **FEMS Microbiol Lett**, v. 299, n. 2, p. 184-194, 2009.

FERREIRA, R.S. **Moléculas bioativas extraídas de sementes de *Moringa oleifera***. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

FERREIRA, P.M.; CARVALHO, A.F.; FARIAS, D.F.; CARIOLANO, N.G.; MELO, V.M.; QUEIROZ, M.G.; MARTINS, A.M.; MACHADO-NETO, J.G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **An Acad Bras Cienc.**, v. 81, n. 2, p. 207-216, 2009.

FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, A.F.; SÁ, R.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; MORAIS, M.M.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.; COELHO, L.C.; PAIVA, P.M. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Lett Appl Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 186-192, 2011.

GALLÃO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; BRITO, E.S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 37, n. 1, p. 106-109, 2006.

GARCÍA-AMADO, M.A.; BOZO-HURTADO, L.; ASTOR, Y.; SUÁREZ, P.; CHISTOSERDOV, A. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of the vertical

distribution and diversity of *Vibrio* spp. populations in the Cariaco Basin. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 77, n. 2, p. 347-356, 2011.

GARTHRIGHT, W.E. Appendix 2: most probable number from serial dilutions. *In*: Food and Drug Administration – FDA. 2001. **Bacteriological analytical manual on line**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>. Acesso em: 15 set. 2004.

GHEBREMICHAEL, K.A.; GUNARATNA, K.R.; HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Res**, v. 39, n. 11, p. 2338-2344, 2005.

GILANI, A.H.; AFTAB, K.; SURIA, A.; SIDDIQUI, S.; SALEM, R.; SIDDIQUI, B.S.; FAIZI, S. Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of pure compounds from *Moringa oleifera*. **Phytother Res**, v. 8, n. 2, p. 87-91, 1994.

GOARANT, C.; MERIEN, F.; BERTHE, F.; MERMOUD, I.; PEROLAT, P. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 3, p. 1145-1151, 1999.

GOARANT, C.; HERLIN, J.; BRIZARD, R.; MARTEAU, A-L.; MARTIN, C.; MARTIN, B. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. **Dis Aquat Organ**, v. 40, n. 2, p. 101-107, 2000.

GOLESTANBAGH, M.; AHAMAD, I.S.; IDRIS, A.; YUNUS, R. Effect of storage of shelled *Moringa oleifera* seeds from reaping time on turbidity removal. **J Water Health.**, v. 9, n. 3, p. 597-602, 2011.

GOMEZ-GIL, B.; TRON-MAYÉN, L.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F.; INGLIS, V.; GUERRA-FLORES, A.L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 163, n. 1-2, p. 1-9, 1998.

GONÇALVES, E.G.R.; LOPES, M.J.S.; OLIVEIRA, E.G.; HOFER, E. Associação de *Vibrio cholerae* com o zooplâncton de águas estuárias da Baía de São Marcos/São Luis — MA, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 4, p.318-323, 2004.

GOPAL, S.; OTTA, S. K.; KUMAR, S.; KARUNASAGAR, I.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. **Int J Food Microbiol**, v. 102, n. 2, p. 151-159, 2005.

GRÄSLUND, S.; HOLMSTRÖM, K.; WAHLSTRÖM, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. **Mar Pollut Bull.**, v. 46, n. 1, p. 81-90, 2003.

GUEVARA, A.P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; MAOKA, T.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutat Res.**, v. 440, n. 2, p. 181-188, 1999.

GUEVARA, J.M.; CHUMPITAZ, J.; VALENCIA, E. The *in vitro* action of plants on *Vibrio cholerae*. **Rev Gastroenterol Peru**, v. 14, n. 1, p. 27-31, 1994.

GUGLIANDOLO, C.; CARBONE, M.; FERA, M.T.; IRRERA, G.P.; MAUGERI, T.L. Occurrence of potentially pathogenic vibrios in the marine environment of the Straits of Messina (Italy). **Mar Pollut Bull.**, v. 50, n. 6, p. 682-697, 2005.

HALL-SPENCER, J.M.; PIKE, J.; MUNN, C.B. Diseases affect cold-water corals too: *Eunicella verrucosa* (Cnidaria: Gorgonacea) necrosis in SW England. **Dis Aquat Organ**, v. 76, n. 2, p. 87-97, 2007.

HASEGAWA, H.; LIND, E.J.; BOIN, M.A.; HÄSE, C.C. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 13, p. 4101-4110, 2008.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; GUZMÁN-MURILLO, M.A.; VARGAS-ALBORES, F. Quantification of pathogenic marine vibrio using membrane filter technique. **J Microbial Methods**, v. 21, n. 2, p. 143-149, 1995.

HERVIO-HEATH, D.; COLWELL, R.R.; DERRIEN, A.; ROBERT-PILLOT, A.; FOURNIER, J.M.; POMMEPUY, M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. **J Appl Microbiol**, v. 92, n. 6, p. 1123-1135, 2002.

HIGGINS, D.A.; POMIANEK, M.E.; KRAML, C.M.; TAYLOR, R.K.; SEMMELHACK, M.F.; BASSLER, B.L. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 883-886, 2007.

HINDLER, J.A.; JORGENSEN, J.H. Concepts in antimicrobial therapy. Procedures in antimicrobial susceptibility testing. *In*: MAHON, C.R.; MANUSELIS JR, G. **Textbook of Diagnostic Microbiology**. W.B. Saunders Company, 1995. p. 58-89.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal. **Rev Microbiol**, v. 14, p. 174-175, 1983.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HONDA, T.; LAPUEBLA, M.A.A; NI, Y.; YAMAMOTO, K. Characterization of a new thermostable direct haemolysin produced by Kanagawa-phenomenon negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus*. **J Gen Microbiol**, v. 137, n. 2, p. 253-259, 1991.

HUSS, H.H.; ABABOUCHE, L.; GRAM, L. **Assessment and management of seafood safety and quality**. Fisheries technical paper N°44. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), Rome, 2004.

IGBINOSA, E.O.; OKOH, A.I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. **Res Microbiol**, v. 159, n. 7-8, p. 495-506, 2008.

INTARAPRASONG, A.; KHEMAYAN, K.; PASHARAWIPAS, T.; FLEGEL, T.W. Species-specific virulence of *Vibrio harveyi* for black tiger shrimp is associated with bacteriophage-mediated hemocyte agglutination. **Aquaculture**, v. 296, n. 3-4, p. 185–192, 2009.

JABEEN, R.; SHAHID, M.; JAMIL, A.; ASHRAF, M. Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*. **Pak J Bot**, v. 40, n. 6, p. 1349-1358, 2008.

JAHN, S.A.A.; MUSNAD, H.A.; BURGSTALLER, H. The tree that purifies water: Cultivating multipurpose Moringaceae in the Sudan. **Unasylva**, v.38, p.23-28, 1986.

JAYASREE, L.; JANAKIRAM, P.; MADHAVI, R. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). **J World Aquac Soc**, v. 37, n. 4, p. 523-532, 2006.

JORES, J.; APPEL, B.; LEWIN, A. *Vibrio navarrensis* biotype pommerensis: a new biotype of *V. navarrensis* isolated in the German Baltic Sea. **Syst Appl Microbiol**, v. 30, n. 1, p. 27-30, 2007.

KAHLA-NAKBI, A.B.; CHAIEB, K.; BAKHROUF, A. Investigation of several virulence properties among *Vibrio alginolyticus* strains isolated from diseased cultured fish in Tunisia. **Dis Aquat Org**, v. 86, n. 1, p. 21-28, 2009.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. Two pathogens of Greenshell mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. **J Fish Dis**, v. 32, n. 6, p. 499-507, 2009.

KIRSCHNER, A.K.; SCHAUER, S.; STEINBERG, B.; WILHARTITZ, I.; GRIM, C.J.; HUQ, A.; COLWELL, R.R.; HERZIG, A.; SOMMER, R. Interaction of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 with copepods, cladocerans and competing bacteria in the large alkaline lake Neusiedler See, Austria. **Microb Ecol.**, v. 61, n. 3, p. 496-506, 2011.

KIRSCHNIK, P.G.; VIEGAS, E.M.M. Alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante estocagem em gelo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 3, p. 407-412, 2004.

KOO, B.S.; LEE, J.H.; KIM, S.C.; YOON, H.Y.; KIM, K.A.; KWON, K.B.; KIM, H.R.; PARK, J.W.; PARK, B.H. Phospholipase A as a potent virulence factor of *Vibrio vulnificus*. **Int J Mol Med.**, v. 20, n. 6, p. 913-918, 2007.

KUMAR, S.; GEORGE, M.R.; JOHN, K.R.; JEYASEELAN, M.J.P. Molecular typing of bacteria *Vibrio harveyi* and *V. alginolyticus* from shrimp farming systems. **Indian J. Mar. Sci.**, v. 36, n. 1, p. 43-50, 2007.

LAFISCA, A.; PEREIRA, C.S.; GIACCONE, V.; RODRIGUES, D.P. Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 50, n. 4, p. 199-202, 2008.

LE ROUX, F.; GOUBET, A.; THOMPSON, F.L.; FAURY, N.; GAY, M.; SWINGS, J.; SAULNIER, D. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 2251-2255, 2005.

LEE, J-K.; JUNG, D-W.; EOM, S-Y.; OH, S-W.; KIM, Y.; KWAK, H-S.; KIM, Y-H. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. **Food Control**, v. 19, n. 10, p. 990-994, 2008.

LEE, K-K.; YU, S-R.; CHEN, F-R.; YANG, T-I.; LIU, P-C. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Curr Microbiol**, v. 32, n. 4, p. 229-231, 1996.

LEE, K-K.; LIU, P.C.; CHEN, S.N. Studies on the virulence factors of *Vibrio* for tiger prawn, *Penaeus monodon* and immunization trials. **Rep Fish Dis Res**, v. 17, p. 1-13, 1996.

- LEE, K-K.; YU, S-R-; LIU, P-C. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Curr Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 110-117, 1997.
- LEITE, M.P.; OLIVEIRA, D.H.; OLIVEIRA, T.A.; GIFONI, J.M.; ROCHA, O.R.; SOUSA, D.O.B.; VASCONCELOS, I.M. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein Pept Lett**, v. 18, n. 11, p. 1078-1085, 2011.
- LI, K.; ZHENG, T.L.; TIAN, Y.; YUAN, J.J. Bacterial community structure in intestine of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Acta Microbiol. Sin.**, v. 47, n. 4, p. 649-653, 2007.
- LIGHTER, D.V.; REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostics methods. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 201-220, 1998.
- LIU, C-H.; CHENG, W.; HSU, J-P.; CHEN, J-C. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. **Dis Aquat Organ**, v. 61, n. 1-2, p. 169–174, 2004.
- LIU, P-C.; LEE, K.K.; YIL, K-C.; KOU, G-H.; CHEN, S-N. Isolation of *Vibrio harveyi* from disease kuruma prawns *Penaeus japonicus*. **Curr Microbiol**, v. 33, n. 2, p. 129-132, 1996.
- LIUXY, P-C.; LEE, K-K.; CHEN, S-N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Lett Appl Microbiol**, v. 22, n. 6, p. 413-416, 1996.
- LONGYANT, S.; RUKPRATANPORN, S.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; SUKSAWAD, P.; SRISUK, C.; SITHIGORNGUL, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; SITHIGORNGUL, P. Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. **J Invertebr Pathol**, v. 98, n. 1, p. 63-68, 2008.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas Cultivadas**. 1. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.
- LOZANO-LEÓN, A.; TORRES, J.; OSORIO, C.R; MARTÍNEZ-URTAZA, J. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. **FEMS Microbiol Lett**, v. 226, n. 2, p. 281-284, 2003.
- MA, L.; CHEN, J.; LIU, R.; ZHANG, X.H.; JIANG, Y.A. Mutation of *rpoS* gene decreased resistance to environmental stresses, synthesis of extracellular products and virulence of *Vibrio anguillarum*. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 70, n. 2, p. 130-136, 2009.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **J Agric Sci**, v. 128, n. 3, p. 311-322, 1997.

MANEFIELD, M.; HARRIS, L.; RICE, S.A.; NYS, R.; KJELLEBERG, S. Inhibition of luminescence and virulent in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. **Appl Environ Microbiol.**, v. 66, n. 5, p. 2079-2084, 2000.

MANILAL, A.; SUJITH, S.; SELVIN, J.; SHAKIR, C.; GANDHIMATHI, R. Virulence of Vibrios isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, Fabricius. **J World Aquac Soc**, v. 41, n. 3, p. 332-343, 2010.

MASINI, L.; DE GRANDIS, G.; PRINCIPI, F.; MENGARELLI, C.; OTTAVIANI, D. Research and characterization of pathogenic vibrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy). **Water Res.**, v. 41, n. 18, p. 4031-4040, 2007.

MAUGERI, T.L., CACCAMO, D., GUGLIANDOLO, C. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. **J Appl Microbiol**, v. 89, n. 2, p. 261-266, 2000.

MCGEE, K.; HORSTEDT, P.; MILTON, D.L. Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. **J Bacteriol**, v. 178, n. 17, p. 5188-5198, 1996.

MENDES, E.S.; MENDES, P.P.; GÓES, L.M.N.B.; BEZERRA, S.S.; VIEIRA, K.P.B. A. Os víbrios na carcinicultura. **Panor. Aquic.**, v. 15, n. 91, 2005.

MENEZES, F.G.R. **Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias do gênero *Vibrio* isoladas em alguns estuários do Estado do Ceará**. 2011. 92 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MENEZES, P.R. **Abordagem para a síntese da niazimina, um glicosídeo carbamato isolado de *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae**. 2006. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOLINA-AJA, A.; GARCÍA-CASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; BOLÁN-MEJÍA, C.; ROQUE, A.; GOMEZ-GIL, B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 213, n. 1, p. 7-12, 2002.

MOLITORIS, E.; JOSEPH, S. W.; KRICHEVSKY, M.; SINDHUHARDJA, W.; R. R. COLWELL. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, n. 6, p. 1388-1395, 1985.

MOHNEY, L.L.; LIGHTNER, D.V.; BELL, T.A. An epizootic of vibriosis in ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). **J World Aquac Soc**, v. 25, n. 1, p. 116-125, 1994.

MURAKAMI, A.; KITAZONO, Y.; JIWAJINDA, S.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation. **Planta Med.**, v. 64, n. 4, p. 319-323, 1998.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. American Society for Microbiology, 1999. 1773 p.

NAKAYAMA, T.; ITO, E.; NOMURA, N.; NOMURA, N.; MATSUMURA, M. Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Lett**, v. 258, n. 2, p. 194-199, 2006.

NANTACHIT, K. Antibacterial activity of the capsules of *Moringa oleifera* Lamk. (Moringaceae). **CMU. Journal**, v. 5, n. 3, p. 365-368, 2006.

NATRAH, F.M.; RUWANDEEPIKA, H.A.; PAWAR, S.; KARUNASAGAR, I.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P.; DEFOIRDT, T. Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. **Vet Microbiol.**, v. 154, n. 1-2, p. 124-129, 2011.

NISHIBUCHI, M.; JANDA, J.M.; EZAKI, T. The thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) of *Vibrio hollisae* is dissimilar in prevalence to and phylogenetically distant from the *tdh* genes of other vibrios: implications in the horizontal transfer of the *tdh* gene. **Microbiol Immunol**, v. 40, n. 1, p. 59-65, 1996.

NISHIBUCHI, M. Molecular identification. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The biology of Vibrios**. Washington D.C.: ASM Press, 2006. p. 44-66.

NKURUNZIZA, T.; NDUWAYEZU, J.B.; BANADDA, E.N.; NHAPI, I. The effect of turbidity levels and *Moringa oleifera* concentration on the effectiveness of coagulation in water treatment. **Water Sci Technol.**, v. 59, n. 8, p. 1551-1558, 2009.

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A.R. Identification of *Vibrio* spp with a set of dichotomous keys. **J Appl Microbiol**, v. 105, n. 1, p. 175-185, 2008.

NORIEGA-OROZCO, L.; ACEDO-FÉLIX, E.; HIGUERA-CIAPARA, I.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; CANO, R. Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 49, n. 3-4, p. 60-67, 2007.

ODEE D. Forest biotechnology research in drylands of Kenya: the development of *Moringa* species. **Dryl Biodivers.**, v. 12, n. 3, p. 7-8, 1998.

ODURO, I.; ELLIS, W.O.; OWUSU, D. Nutritional potential of two leafy vegetables: *Moringa oleifera* and *Ipomoea batatas* leaves. **Sci. Res. Essays**, v. 3, n. 2, p. 57-60, 2008.

OISSON, J.C.; JÖBORN, A.; WESTERDAHL, A.; BLOMBERG, L.; KJELLEBERG, S.; CONWAY, P.L. Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? **J Fish Dis**, v. 19, n. 3, p. 225-234, 1996.

OKADA, N.; MATSUDA, S.; MATSUYAMA, J.; PARK, K.S.; DE LOS REYES, C.; KOGURE, K.; HONDA, T.; IIDA, T. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains. **BMC Microbiol.**, 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/302>. Acesso em: 10 out. 2011.

OLAFSEN, J.A.; MIKKELSEN, H.V.; GIAEVER, H.M. HØVIK, H.G. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. **Appl Environ Microbiol.**, v. 59, n. 6, p. 1848-1854, 1993.

OLAYEMI, A.B.; ALABI, L.O. Studies on traditional water purification using *Moringa oleifera* seeds. **Afr Study Monogr**, v. 15, n. 3, p. 135-142, 1994.

OLUDURU, A.O.; ADERIYE, B.I. Efficacy of *Moringa oleifera* seed extract on the microflora of surface and underground water. **J Plant Sci**, v. 2, n. 4, p. 453-458, 2007.

OWENS, L.; BUSICO-SALCEDO. *Vibrio harveyi*: pretty problems in paradise. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The biology of Vibrios**. Washington D.C.: ASM Press, 2006. p. 266-280.

PADAN, E.; BIBI, E.; ITO, M.; KRULWICH, T.A. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. **Biochim Biophys Acta**, v. 1717, n. 2, p. 67-88, 2005.

PARVEEN, S.; HETTIARACHCHI, K.A.; BOWERS, J.C.; JONES, J.L.; TAMPLIN, M.L.; MCKAY, R.; BEATTY, W.; BROHAWN, K.; DASILVA, L.V.; DEPAOLA A. Seasonal

distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. **Int J Food Microbiol**, v. 128, n. 2, p. 354–361, 2008.

PASCUAL, J.; MACIÁN, M.C.; ARAHAL, D.R.; GARAY, E.; PUJALTE, M.J. Description of *Enterovibrio nigricans* sp. nov., reclassification of *Vibrio calviensis* as *Enterovibrio calviensis* comb. nov. and emended description of the genus *Enterovibrio* Thompson *et al.* 2002. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 59, n. 4, p. 698-704, 2009.

PEIXOTO, J.R.O.; SILVA, G.C.; COSTA, R.A.; SOUSA, J.L.F.; VIEIRA, G.H.F.; FONTELES FILHO, A.A. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. **Asian Pac J Trop Med**, v. 4, n. 3, p. 201-204, 2011.

PENDUKA, D.; OKOH, O.O.; OKOH, A.I. In-vitro antagonistic characteristics of crude aqueous and methanolic extracts of *Garcinia kola* (Heckel) seeds against some *Vibrio* bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 2754-2765, 2011.

PRAYITNO, S. B.; LATCHFORD, J. W. Experimental infection of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquaculture**, v. 132, n. 1-2, p.105-112, 1995.

RANDRIANARIVELO, R.; DANTHU, P.; BENOIT, C.; RUEZ, P; RAHERIMANDIMBY, M.; SARTER, S. Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. **J Appl Microbiol**, v. 109, n. 2, p. 642-650, 2010.

REBOUÇAS, R.H.; SOUSA, O.V.; LIMA, A.S.; VASCONCELOS, F.R.; CARVALHO, P.B.; VIEIRA, R.H.S.F. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environ Res.**, v. 111, n. 1, p. 21-24, 2011.

REID, A.J; AMYES, S.G.B. Plasmid Penicillin resistance in *Vibrio cholerae*: identification of new 1-lactamase SAR-1. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 30, n. 2, p. 245-247, 1986.

RENGPIPAT, S.; TUNYANUN, A.; FAST, A.W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. **Dis Aquatic Organ**, v. 55, n. 2, p. 169-173, 2003.

REYNAUD, Y.; SAULNIER, D.; MAZEL, D.; GOARANT, C.; LE ROUX, F. Correlation between detection of a plasmid and high-level virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a

pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 10, p. 3038-3047, 2008.

RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M.L.; GRASSO, G.M.; FANELLI, I.; CAPRIOLI, A.; LUZZI, I. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. **Int J Food Microbiol.**, v. 49, n. 1-2, p. 43-48, 1999.

ROBERT-PILLOT, A.; GUENOLE, A.; LESNE, J.; DELESMONT, R.; FOURNIER, J.M.; QUILICI, M.L. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. **Int J Food Microbiol.**, v. 91, n. 3, p. 319–325, 2004.

RODRIGUES, D.P.; RIBEIRO, R.V.; ALVES, R.M.; HOFER, E. Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 589-592, 1993.

ROJAS, M.V.; MATTÉ, M.H.; DROPA, M.; SILVA, M.L.; MATTÉ, G.R. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 53, n. 4, p. 201-205, 2011.

ROJLORSAKUL, P.; BOONSAENG, V.; PANBANGRED, W.; SUTHIENKUL.; PASHARAWIPAS, T.; FLEGEL, T.W. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp haemolymph by DNA hybridization and PCR amplification. *In: FLEGEL, T.W. Advances in shrimp biotechnology*. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 1998.

ROQUE, A.; MOLINA-AJA, A.; BOLÁN-MEJÍA, GOMEZ-GIL, B. *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. **Int J Antimicrob Agents**, v. 15, n. 5, p. 383-387, 2001.

RUST, L.; MESSING, C.R.; IGLEWSKI, B.H. Elastase assays. **Methods Enzymol.**, v. 235, p. 554-562, 1994.

SARAVANAN, V.; SANATH KUMAR, H.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Putative virulence genes of *Vibrio cholerae* from seafoods and the coastal environment of Southwest India. **Int J Food Microbiol**, v.119, n. 3, p. 329-33, 2007.

SASHIDHARA, K.V.; ROSAIAH, J.N.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; RAGHUBIR, R.; RAJENDRAN, S.M. Rare dipeptide and urea derivatives from roots of *Moringa oleifera* as

potential anti-inflammatory and antinociceptive agents. **Eur J Med Chem.**, v. 44, n. 1, p. 432-436, 2009.

SECHI, L.A.; DUPRÈ, I.; DERIU, A.; FADDA, G.; ZANETTI, S. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. **J Appl Microbiol**, v. 88, n. 3, p. 475–481, 2000.

SELVIN, J.; LIPTON, A.P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Dis Aquat Organ**, v. 57, n. 1-2, p. 147-150, 2003.

SHEU, S.Y.; JIANG, S.R.; CHEN, C.A.; WANG, J.T.; CHEN, WM. *Vibrio stylophorae* sp. nov., isolated from the reef-building coral *Stylophora pistillata*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. 9, p. 2180-2185, 2011.

SILVA-RUBIO, A.; ACEVEDO, C.; MAGARIÑOS, B.; JAUREGUIBERRY, B.; TORANZO, A.E.; AVENDAÑO-HERRERA R. Antigenic and molecular characterization of *Vibrio ordalii* strains isolated from Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. **Dis Aquat Organ**, v. 79, n. 1, p. 27-35, 2008.

SINGH, B.N.; SINGH, B.R.; SINGH, R.L.; PRAKASH, D.; DHAKAREY, R.; UPADHYAY, G.; SINGH, H.B. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. **Food Chem Toxicol.**, v. 47, n. 6, p. 1109-1116, 2009.

SIRCILLI, M. P.; TRABULSI, L.R. Fatores de virulência I: adesão, invasão e sideroforos. *In*: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. p.143-148.

SOARES, J.B.; CASSIMIRO, A.R.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B. **Microbiologia Básica**. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1991.

SONG, Y-L.; CHENG, W.; WANG, C-H. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. **J Invertebr Pathol**, v. 61, n. 1, p. 24-31, 1993.

SOTO-RODRIGUEZ, S.; GOMEZ GIL, B.; LOZANO, R.; ROQUE, A. Density of vibrios in Hemolymph and hepatopancreas of diseased pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Northwestern Mexico. **J World Aquac Soc**, v. 41, n. supl. 1, p. 76-83, 2010.

SUAREZ, M.; ENTENZA, J. M.; DOERRIES, C.; MEYER, E.; BOURQUIN, L.; SUTHERLAND, J.; MARISON, I.; MOREILLON, P.; MERMOD, N. Expression of a plant-

derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. **Biotechnol Bioeng**, v. 81, n. 1, p. 13-20, 2003.

SUAREZ, M.; HAENNI, M.; CANARELLI, S.; FISCH, F.; CHODANOWSKI, P.; SERVIS, C.; MICHIELIN, O.; FREITAG, R.; MOREILLON, P.; MERMOD, N. Structure-function characterization and optimization of a plant-derived antibacterial peptide. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 9, p. 3847-3857, 2005.

SUTHIENKUL, O.; ISHIBASHI, M.; IIDA, T.; NETTIP, N.; SUPAVEJ, S.; EAMPOKALAP, B.; MANKINO, M.; HONDA, T. Urease production correlates with the possession of the TRH gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. **J. Infect. Dis.**, v. 172, n. 5, p. 1405-1408, 1996.

SWANSON, K.M.J., PETRAN, R.L., HANLIN J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. *In*: Downes, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association. 2001. p. 53-62

SVITIL, A.L., NI' CHADHAIN, S.M.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitin degradation proteins produced by marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 408-413, 1997.

TAKEDA, Y. *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.**, v. 87, n. 1, p. 1-12, 2011.

TENDENCIA, E.A.; DE LA PENA, L.D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, v. 195, n. 3-4, p.193-204, 2001.

TEO, J.W.P.; SUWANTO, A.; POH, C.L. Novel β -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 5, p. 1309-1314, 2000.

TERZI, G.; BÜYÜKTANIR, O.; YURDUSEV, N. Detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates in fish and mussels from Middle Black Sea coast of Turkey. **Lett App Microbiol**. 2009. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119882127/issue>. Acesso em: 09 nov. 2009.

THAKUR, A.B.; VAIDYA, R.B.; SURYAWANSHI, S.A. Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from moribund shrimps. **Indian J Mar Sci**, v. 32, n. 1, p. 71-75, 2003.

THAKURTA, P.; BHOWMIK, P.; MUKHERJEE, S.; HAJRA, T.K.; PATRA, A.; BAG, P.K. Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India. **J Ethnopharmacol.**, v. 111, n. 3, p. 607-612, 2007

THOMPSON, F.L.; LI, Y.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, C.C.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; RUPP, G.S.; PEREIRA, A.; DE BEM, M.M.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xiii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 245-252, 2003.

THOMPSON, F.L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 3, p. 403-431, 2004.

THUY, H.T.; NGA, P.; LOAN, T.T. Antibiotic contaminants in coastal wetlands from Vietnamese shrimp farming. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 18, n. 6, p. 835-41, 2011.

URAKAWA, H.; KITA-TSUKAMOTO, K.; OHWADA, K. Restriction fragment length polymorphism analysis of psychrophilic and psychrotrophic *Vibrio* and *Photobacterium* from the north-western Pacific Ocean and Otsuchi Bay, Japan. **Can J Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 67-76, 1999.

URAKAWA, H.; RIVERA, I.N.G. Aquatic environment. *In*: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The biology of Vibrios**. Washington D.C.: ASM Press, 2006. p. 175-189.

URDACI, M.C.; MARCHAND, M.; AGERON, E.; ARCOS, J.M.; SESMA, B.; GRIMONT, P.A.D. *Vibrio navarrensis* sp. nov., a species from sewage. **Int J Syst Bacteriol**, v. 41, n. 2, p. 290-294, 1991.

UYAGUARI, M.; KEY, P.; MOORE, J.; JACKSON, K.; SCOTT, G. Acute effects of the antibiotic oxytetracycline on the bacterial community of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Environ Toxicol Chem**, v. 28, n. 12, p. 2715-2724, 2009.

VALSARAJ, R.; PUSHPANGADAN, P.; SMITT, U.W.; ADSERSEN, A.; NYMAN, U. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. **J Ethnopharmacol**, v. 58, n. 2, p. 75-83, 1997.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMAY, P.; MURUGAN, T.; CHEN, J.C. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, n. 4, p. 285-291, 2005.

VASEEHARAN, B.; RAFFIQ HUSSIAN, M.; CHEN, J.C. RpoN gene, RAPD profile, antimicrobial resistance and plasmids of *Vibrio anguillarum* isolates from vibriosis infected *Penaeus monodon*. **Lett Appl Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 380-385, 2008.

VIEIRA, R.H.F.; GESTEIRA, T.C.V.; MARQUES, L.C.; MARTINS, P.C.C.; MONTEIRO, C.M.; CARVALHO, R.L. *Vibrio* spp e suas implicações sobre larviculturas de camarões marinhos. **Arq. Ciên. Mar**, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2000.

VIEIRA, R.H.S.F.; VIEIRA, C.B.; SOUSA, O.V.; VIEIRA, G.H.F.; FONTELES-FILHO, A.A. Uso de extrato de sementes de moringa, *Moringa oleifera*, na redução de coliformes termotolerantes em camarão-sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*. **Arq. Ciên. Mar**, v. 42, n. 1, p. 101-105, 2009.

VIEIRA, G.H.F.; MOURÃO, J.A.; ANGELO, A.M.; COSTA, R.A.; VIEIRA, R.H.S.F. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129-132, 2010.

VIEIRA, R.H.S.F.; CARVALHO, E.M.R.; CARVALHO, F.C.T.; SILVA, C.M.; SOUSA, O.V.; RODRIGUES, D.P. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil. **J Environ Sci Health B**, v. 45, n. 3, p. 198-203, 2010.

VIEIRA, R.H.S.F.; COSTA, R.A.; MENEZES, F.G.R.; SILVA, G.C.; THEOPHILO, G.N.D.; RODRIGUES, D.P.; MAGGIONI, R. Kanagawa-negative, *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. **Curr Microbiol.**, v. 63, n. 2, p. 126-130, 2011.

WALLING, E.; VOUREY, E.; ANSQUER, D.; BELIAEFF, B.; GOARANT, C. *Vibrio nigripulchritudo* monitoring and strain dynamics in shrimp pond sediments. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 2003-2011, 2010.

WANG, S-X.; ZHANG, X-H.; SUN, B-G.; CHEN, J-X. Distribution of five kinds of haemolysin genes in different vibrios and their correlation with activities of haemolytic and phospholipase. **J Fish Sci China**, 2007. Disponível em: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZSCK200704006.htm. Acesso em: 10 nov. 2011.

WANG, Y.; ZHANG, X.H.; YU, M. WANG, H.; AUSTIN, B. *Vibrio atypicus* sp. nov., isolated from the digestive tract of the Chinese prawn (*Penaeus chinensis* O'sbeck). **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n. 11, p. 2517-2523, 2010.

WONG, H-C.; CHEN, M-C.; LIU, S-H.; LIU, D-P. Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. **Int J Food Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 181–188, 1999.

WORDEN, A. Z.; SEIDEL, M.; SMRIGA, S.; WICK, A.; MALFATTI, F.; BARTLETT, D.; AZAM, F. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. **Environ Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 21-29, 2006.

XU, X.W.; WU, Y.H.; WANG, C.S.; OREN, A.; WU, M. *Vibrio hangzhouensis* sp. nov., isolated from sediment of the East China Sea. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 59, n. 8, p. 2099-2103, 2009.

YOSHIZAWA, S.; WADA, M.; KITA-TSUKAMOTO, K.; IKEMOTO, E.; YOKOTA, A.; KOGURE, K. *Vibrio azureus* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 59, n. 7, p. 1645-1649, 2009.

YOSHIZAWA, S.; WADA, M.; YAKOTA, A.; KOGURE, K. *Vibrio sagamiensis* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from sea water. **J Gen Appl Microbiol.**, v. 56, n. 6, p. 499-507, 2010.

YOSHIZAWA, S.; TSURUYA, Y.; FUKUI, Y.; SAWABE, T.; YOKOTA, A.; KOGURE, K.; HIGGINS, M.; CARSON, J.; THOMPSON, F.L. *Vibrio jasicida* sp. nov., a member of the Harveyi clade, from marine animals (packhorse lobster, abalone, and Atlantic salmon). **Int J Syst Evol Microbiol.**, 2011. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/content/early/2011/10/04/ijs.0.025916-0.long>. Acesso em: 10 nov. 2011.

ZHANG, X-H.; AUSTIN, B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. **J Fish Dis**, v. 23, n. 2, p. 93–102, 2000.

ZHANG, Y.B.; LI, Y.; SUN, X.L. Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China. **Mar Pollut Bull.**, v. 62, n. 11, p. 2299-2307, 2011.

ZHONG, Y.; ZHANG, X.H.; CHEN, J.; CHI, Z.; SUN, B.; LI, Y.; AUSTIN, B. Overexpression, purification, characterization, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* hemolysin VHH. **Infect Immun.**, v. 74, n. 10, p. 6001-6005, 2006.

ZHU, H.; THURUTHYIL, S.J.; WILLCOX, M.D. Determination of quorum-sensing signal molecules and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from contact lens-induced microbial keratitis. **J Med Microbiol.**, v. 51, n. 12, p. 1063-1070, 2002.

APÊNDICE A - Fatores de virulência e perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos vibrios (n = 100) isolados da hemolinfa do *Litopenaeus vannamei*.

Código da cepa	Espécie	Fatores de virulência	Resistente a
1	<i>V. coralliilyticus</i>	FosLipElas	Pen
2	<i>V. navarrensis</i>	CasFosLipElas	Pen
3	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipElas	PenAmp
4	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	PenAmp
5	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosElasHem	-
6	<i>V. navarrensis</i>	Fosf	Pen
7	<i>V. alginolyticus</i>	GelCasFosLip	Pen
8	<i>V. navarrensis</i>	CasFosLipHem	-
10	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	Pen
11	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	Pen
12	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosElas	Pen
13	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipElas	Pen
14	<i>V. navarrensis</i>	CasFosLipElas	Pen
16	<i>V. navarrensis</i>	CasFosElas	PenCfl
17	<i>V. navarrensis</i>	GelCasLipElas	PenAtm
18	<i>V. coralliilyticus</i>	CasFosLipElasHem	-
19	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	Pen
20	<i>V. navarrensis</i>	GelCasLipElas	PenAtm
21	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCasFosf	PenTet
22	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipElas	Pen
23	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	Pen
24	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipHem	-
25	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipHem	-
26	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipElas	Pen
28	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCasFosf	PenTetAmp
30	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCasFosf	PenTet
31	<i>V. parahaemolyticus</i>	CasFosf	PenTetAmp
32	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCasFosf	PenTetAmp
35	<i>V. coralliilyticus</i>	GelCasFosLipHem	Pen
36	<i>V. xuii</i>	GelCasFosLip	PenAmpCfl
37	<i>V. navarrensis</i>	CasFosLipElas	Pen
38	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	Pen
40	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosHem	-
42	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipElas	Pen
43	<i>V. diazotrophicus</i>	CasElas	Atm
44	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	Pen
46	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipHem	-
47	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCasFosf	PenTet
48	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCasFosf	PenTet
51	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfHem	-

Continuação - APÊNDICE A - Fatores de virulência e perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos víbrios (n = 100) isolados da hemolinfa do *Litopenaeus vannamei*.

Código da cepa	Espécie	Fatores de virulência	Resistente a
55	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosf	Atm
56	<i>V. xuii</i>	GelCasFosfLipElas	Pen
57	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosf	Pen
58	<i>V. navarrensis</i>	CasFosfHem	PenAtm
59	<i>V. xuii</i>	GelCasFosfLipHem	PenCflAmp
60	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCas	PenTet
62	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCasFosfLipHem	PenCfl
64	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfLip	Pen
65	<i>V. vulnificus B3</i>	GelCasFosf	PenTet
69	<i>V. parahaemolyticus</i>	GelCasFosfLipElas	PenTet
70	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfLipElas	-
71	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfLipElas	Pen
73	<i>V. navarrensis</i>	CasElas	Atm
78	<i>V. xuii</i>	GelCasFosfLipHem	Pen
79	<i>V. xuii</i>	GelCasFosfHem	Pen
81	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfLip	Pen
82	<i>V. navarrensis</i>	CasFosfElasHem	-
83	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfLipElas	Pen
84	<i>V. coralliilyticus</i>	GelCasFosfLipElasHem	-
86	<i>V. coralliilyticus</i>	CasFosfElas	Pen
87	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfElas	Atm
88	<i>V. xuii</i>	GelCasFosfHem	Pen
89	<i>V. xuii</i>	GelCasFosfLipElasHem	PenCfl
90	<i>V. xuii</i>	GelCasFosf	PenCfl
91	<i>V. navarrensis</i>	CasFosfLipElasHem	-
92	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfHem	Pen
93	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfLipElasHem	Pen
94	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfLipElasHem	Pen
95	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosf	Pen
96	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosf	PenAtm
98	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosfHem	PenCfl
99	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosfLipElasHem	-
100	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosfHem	PenCfl
101	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosf	-
103	<i>V. brasiliensis</i>	CasFosfLip	-
104	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosfLipHem	PenCfl
105	<i>V. neptunis</i>	CasFosfLipHem	-
106	<i>V. navarrensis</i>	CasFosfElasHem	CroAtm
107	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosf	Pen

Continuação - APÊNDICE A - Fatores de virulência e perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos vibrios (n = 100) isolados da hemolinfa do *Litopenaeus vannamei*.

Código da cepa	Espécie	Fatores de virulência	Resistente a
108	<i>V. cholerae</i>	CasFosLip	PenAtm
109	<i>V. navarrensis</i>	GelCasLip	Pen
110	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosHem	Pen
112	<i>V. cholerae</i>	GelCasFosLip	PenTetAmp
113	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosLipHem	PenCflAmp
114	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	Pen
115	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLipHem	PenCfl
116	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosLip	-
118	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosLip	-
119	<i>V. brasiliensis</i>	GelFosLipHem	-
120	<i>V. neptunis</i>	GelCasFosf	-
121	<i>V. navarrensis</i>	GelCasFosf	PenCfl
122	<i>V. cholerae</i>	GelCasFosLip	PenTet
123	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosElasHem	-
124	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosLipElasHem	-
125	<i>V. brasiliensis</i>	CasFosHem	Pen
126	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosHem	-
127	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosf	-
128	<i>V. cholerae</i>	GelFosLip	PenTetAmp
129	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosHem	Pen
130	<i>V. brasiliensis</i>	GelCasFosLipHem	-

APÊNDICE B - Espectro de atividade enzimática de 24 isolados de *Vibrio*.

Atividade Enzimática	Espécie (código das cepas positivas)
Fosfatase alcalina (n = 24)	<i>V. navarrensis</i> (13, 22, 46, 91, 93, 94, 99), <i>V. brasiliensis</i> (104, 113, 123, 124, 130), <i>V. parahaemolyticus</i> (28, 30, 62, 69), <i>V. xuii</i> (79, 89), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. diazotrophicus</i> (43), <i>V. vulnificus</i> B3 (65), <i>V. coralliilyticus</i> (84), <i>V. neptunis</i> (105) e <i>V. cholerae</i> (112)
Fosfatase ácida (n = 23)	<i>V. navarrensis</i> (13, 22, 46, 91, 93, 99), <i>V. brasiliensis</i> (104, 113, 123, 124, 130), <i>V. parahaemolyticus</i> (28, 30, 62, 69), <i>V. xuii</i> (79, 89), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. diazotrophicus</i> (43), <i>V. vulnificus</i> B3 (65), <i>V. coralliilyticus</i> (84), <i>V. neptunis</i> (105) e <i>V. cholerae</i> (112)
Leucina arilamidase (n = 23)	<i>V. navarrensis</i> (13, 22, 46, 91, 93, 94, 99), <i>V. brasiliensis</i> (104, 113, 123, 124, 130), <i>V. parahaemolyticus</i> (28, 30, 62, 69), <i>V. xuii</i> (79 e 89), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. vulnificus</i> B3 (65), <i>V. coralliilyticus</i> (84), <i>V. neptunis</i> (105) e <i>V. cholerae</i> (112)
Esterase (C4) (n = 22)	<i>V. navarrensis</i> (13, 22, 46, 91 e 93), <i>V. brasiliensis</i> (104, 113, 123, 124, 130), <i>V. parahaemolyticus</i> (28, 30, 62, 69), <i>V. xuii</i> (79, 89), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. diazotrophicus</i> (43), <i>V. vulnificus</i> B3 (65), <i>V. coralliilyticus</i> (84), <i>V. neptunis</i> (105) e <i>V. cholerae</i> (112)
Naftol-AS-BI- fosfohidrolase (n = 20)	<i>V. navarrensis</i> (13, 22, 46, 91, 93, 94, 99), <i>V. brasiliensis</i> (104, 113, 123, 124, 130), <i>V. parahaemolyticus</i> (28, 69), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. diazotrophicus</i> (43), <i>V. vulnificus</i> B3 (65), <i>V. coralliilyticus</i> (84), <i>V. neptunis</i> (105) e <i>V. cholerae</i> (112)
Esterase lipase (C8) (n = 19)	<i>V. navarrensis</i> (13, 22, 46, 91, 93), <i>V. brasiliensis</i> (104, 113, 123), <i>V. parahaemolyticus</i> (28, 30, 62, 69), <i>V. xuii</i> (79, 89), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. diazotrophicus</i> (43), <i>V. vulnificus</i> B3 (65), <i>V. coralliilyticus</i> (84), <i>V. neptunis</i> (105)
Valina arilamidase (n = 17)	<i>V. navarrensis</i> (13, 22, 46, 91), <i>V. brasiliensis</i> (104, 123, 124, 130), <i>V. parahaemolyticus</i> (28, 62, 69), <i>V. xuii</i> (79, 89), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. vulnificus</i> B3 (65), <i>V. neptunis</i> (105) e <i>V. cholerae</i> (112)
β -galactosidase (n = 11)	<i>V. navarrensis</i> (22, 46, 91), <i>V. parahaemolyticus</i> (28, 62, 69), <i>V. xuii</i> (79, 89), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. diazotrophicus</i> (43) e <i>V. coralliilyticus</i> (84)
α -glucosidase (n = 10)	<i>V. navarrensis</i> (13, 22, 46, 94), <i>V. parahaemolyticus</i> (62, 69), <i>V. xuii</i> (89), <i>V. alginolyticus</i> (07), <i>V. diazotrophicus</i> (43) e <i>V. coralliilyticus</i> (84)
Cistina arilamidase (n = 5)	<i>V. navarrensis</i> (22, 46, 91), <i>V. xuii</i> (79) e <i>V. alginolyticus</i> (07)
Tripsina (n = 5)	<i>V. parahaemolyticus</i> (28, 30, 69), <i>V. vulnificus</i> B3 (65) e <i>V. navarrensis</i> (94)

Continuação - APÊNDICE B - Espectro de atividade enzimática de 24 isolados de *Vibrio*.

Atividade Enzimática	Espécie (código das cepas positivas)
α -quimiotripsina (n = 4)	<i>V. parahaemolyticus</i> (28, 30, 69) e <i>V. vulnificus</i> B3 (65)
β -glucosidase (n = 4)	<i>V. navarrensis</i> (22), <i>V. parahaemolyticus</i> (62) e <i>V. xiii</i> (79 e 89)
N-acetil- β - glucosaminidase (n = 3)	<i>V. navarrensis</i> (22, 94) e <i>V. diazotrophicus</i> (43)
Lipase (C14) (n = 2)	<i>V. xiii</i> (79, 89)

APÊNDICE C - Média dos halos de inibição dos extratos MOS-ES e MOS-E e resultado do controle positivo (cloranfenicol 30 µg) frente às 100 cepas de *Vibrio* spp.

Código da cepa	Espécie	Média/DP (mm) dos halos de inibição		Controle positivo Cloranfenicol (30 µg)
		MOS-ES	MOS-E	
1	<i>V. coralliilyticus</i>	13,11 ± 0,09	12,52 ± 0,84	40,45
2	<i>V. navarrensis</i>	11,72 ± 0,30	12,57 ± 0,23	37,13
3	<i>V. navarrensis</i>	12,35 ± 0,10	10,67 ± 0,35	36,62
4	<i>V. navarrensis</i>	12,18 ± 0,04	13,24 ± 0,16	39,82
5	<i>V. navarrensis</i>	19,33 ± 1,12	14,35 ± 0,09	48,54
6	<i>V. navarrensis</i>	13,32 ± 0,16	13,80 ± 0,21	36,02
7	<i>V. alginolyticus</i>	15,61 ± 0,13	15,44 ± 0,37	41,55
8	<i>V. navarrensis</i>	11,39 ± 0,22	11,46 ± 0,50	36,11
10	<i>V. navarrensis</i>	7,64 ± 0,04	7,43 ± 0,13	32,5
11	<i>V. navarrensis</i>	16,58 ± 0,11	13,90 ± 0,03	41,24
12	<i>V. navarrensis</i>	17,65 ± 0,60	17,19 ± 0,17	35,82
13	<i>V. navarrensis</i>	10,68 ± 0,30	12,63 ± 0,13	33,96
14	<i>V. navarrensis</i>	18,02 ± 0,38	16,25 ± 0,55	39,67
16	<i>V. navarrensis</i>	10,67 ± 0,12	14,46 ± 4,76	33,15
17	<i>V. navarrensis</i>	16,14 ± 0,56	13,62 ± 0,17	34,11
18	<i>V. coralliilyticus</i>	11,43 ± 0,33	10,53 ± 0,21	37,13
19	<i>V. navarrensis</i>	14,83 ± 0,44	24,43 ± 0,96	40,5
20	<i>V. navarrensis</i>	13,97 ± 0,12	15,52 ± 0,03	37,52
21	<i>V. parahaemolyticus</i>	7,68 ± 0,34	8,53 ± 0,22	31,99
22	<i>V. navarrensis</i>	10,93 ± 0,48	15,17 ± 0,69	37,02
23	<i>V. navarrensis</i>	10,92 ± 0,23	12,85 ± 0,20	36,95
24	<i>V. navarrensis</i>	13,31 ± 0,42	15,31 ± 0,50	38,71
25	<i>V. navarrensis</i>	10,22 ± 0,08	12,46 ± 0,31	36,75
26	<i>V. navarrensis</i>	10,88 ± 0,01	13,87 ± 0,71	35,62
28	<i>V. parahaemolyticus</i>	7,88 ± 0,10	7,67 ± 0,07	30,96
30	<i>V. parahaemolyticus</i>	8,13 ± 0,11	8,08 ± 0,24	30,04
31	<i>V. parahaemolyticus</i>	6,85 ± 0,24	7,94 ± 0,50	31,64
32	<i>V. parahaemolyticus</i>	8,30 ± 0,06	8,65 ± 0,07	33,38
35	<i>V. coralliilyticus</i>	8,37 ± 0,14	7,53 ± 0,05	36,01
36	<i>V. xuii</i>	7,44 ± 0,31	7,31 ± 0,34	35,93
37	<i>V. navarrensis</i>	11,38 ± 0,22	12,46 ± 0,46	38,65
38	<i>V. navarrensis</i>	13,21 ± 0,69	13,05 ± 0,38	38,24
40	<i>V. navarrensis</i>	12,48 ± 0,34	14,04 ± 0,39	33,74
42	<i>V. navarrensis</i>	14,65 ± 0,43	16,40 ± 0,69	39,1
43	<i>V. diazotrophicus</i>	17,98 ± 0,80	19,99 ± 0,89	31,94
44	<i>V. navarrensis</i>	10,76 ± 0,49	14,29 ± 0,41	36,63
46	<i>V. navarrensis</i>	12,84 ± 0,24	12,64 ± 0,06	34,47
47	<i>V. parahaemolyticus</i>	7,66 ± 0,48	0,00 ± 0,00	32,97

Continuação - APÊNDICE C – Média dos halos de inibição dos extratos MOS-ES e MOS-E e resultado do controle positivo (cloranfenicol 30 µg) frente às 100 cepas de *Vibrio* spp.

Código da cepa	Espécie	Média/DP (mm) dos halos de inibição		Controle positivo Cloranfenicol (30 µg)
		MOS-ES	MOS-E	
48	<i>V. parahaemolyticus</i>	8,74 ± 0,31	8,49 ± 0,28	33,84
51	<i>V. navarrensis</i>	14,25 ± 0,08	18,09 ± 0,37	40,77
55	<i>V. navarrensis</i>	10,01 ± 0,14	13,28 ± 0,35	33,71
56	<i>V. xuii</i>	11,38 ± 0,09	15,76 ± 1,05	38,44
57	<i>V. navarrensis</i>	9,16 ± 0,13	14,72 ± 1,47	35,77
58	<i>V. navarrensis</i>	10,84 ± 0,36	14,33 ± 0,31	36,43
59	<i>V. xuii</i>	7,12 ± 0,18	0,00 ± 0,00	33,62
60	<i>V. parahaemolyticus</i>	9,75 ± 0,27	9,15 ± 0,22	37,5
62	<i>V. parahaemolyticus</i>	0,00 ± 0,00	8,45 ± 0,06	30,59
64	<i>V. navarrensis</i>	11,26 ± 0,61	19,13 ± 1,32	34,1
65	<i>V. vulnificus B3</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	30,19
69	<i>V. parahaemolyticus</i>	6,90 ± 0,18	7,51 ± 0,45	27,63
70	<i>V. navarrensis</i>	13,41 ± 0,34	18,45 ± 0,28	35,17
71	<i>V. navarrensis</i>	10,33 ± 0,25	13,69 ± 0,60	32,55
73	<i>V. navarrensis</i>	15,27 ± 0,13	14,14 ± 0,55	29,41
78	<i>V. xuii</i>	8,29 ± 0,21	0,00 ± 0,00	34,54
79	<i>V. xuii</i>	7,31 ± 0,32	8,85 ± 0,13	30,01
81	<i>V. navarrensis</i>	14,79 ± 0,42	14,18 ± 0,27	36,64
82	<i>V. navarrensis</i>	11,99 ± 0,07	13,53 ± 0,53	36,68
83	<i>V. navarrensis</i>	12,84 ± 0,21	16,26 ± 0,38	40
84	<i>V. coralliilyticus</i>	11,55 ± 0,55	18,26 ± 0,07	35,29
86	<i>V. coralliilyticus</i>	18,19 ± 0,27	13,73 ± 0,57	32,56
87	<i>V. navarrensis</i>	9,04 ± 0,06	7,21 ± 0,08	34,73
88	<i>V. xuii</i>	7,80 ± 0,02	7,66 ± 0,09	36,81
89	<i>V. xuii</i>	7,75 ± 0,11	7,68 ± 0,12	35,26
90	<i>V. xuii</i>	14,70 ± 0,31	12,75 ± 0,19	39,06
91	<i>V. navarrensis</i>	10,67 ± 0,15	12,39 ± 0,22	39,17
92	<i>V. navarrensis</i>	10,14 ± 0,14	14,91 ± 0,14	33,5
93	<i>V. navarrensis</i>	13,56 ± 0,23	12,55 ± 0,40	35,83
94	<i>V. navarrensis</i>	11,58 ± 0,46	12,90 ± 0,11	40,38
95	<i>V. navarrensis</i>	11,62 ± 0,18	12,43 ± 0,41	35,15
96	<i>V. navarrensis</i>	7,88 ± 0,26	7,69 ± 0,14	31,28
98	<i>V. brasiliensis</i>	17,21 ± 0,68	14,59 ± 0,48	31,28
99	<i>V. navarrensis</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	32,62
100	<i>V. brasiliensis</i>	12,56 ± 0,33	17,00 ± 0,26	38,19
101	<i>V. brasiliensis</i>	12,13 ± 0,07	12,79 ± 0,27	38,82
103	<i>V. brasiliensis</i>	7,59 ± 0,34	7,80 ± 0,19	35,8
104	<i>V. brasiliensis</i>	10,22 ± 0,43	11,87 ± 0,41	39,08
105	<i>V. neptunis</i>	15,60 ± 0,08	12,14 ± 0,20	22,97
106	<i>V. navarrensis</i>	10,61 ± 0,06	14,56 ± 0,24	35,76
107	<i>V. navarrensis</i>	12,59 ± 0,17	15,41 ± 0,67	36,84
108	<i>V. cholerae</i>	10,30 ± 0,17	14,29 ± 0,13	31,63
109	<i>V. navarrensis</i>	10,18 ± 0,12	12,63 ± 0,49	34,41

Continuação - APÊNDICE C – Média dos halos de inibição dos extratos MOS-ES e MOS-E e resultado do controle positivo (cloranfenicol 30 µg) frente às 100 cepas de *Vibrio* spp.

Código da cepa	Espécie	Média/DP (mm) dos halos de inibição		Controle positivo Cloranfenicol (30 µg)
		MOS-ES	MOS-E	
110	<i>V. navarrensis</i>	8,49 ± 0,70	9,42 ± 0,07	32,3
112	<i>V. cholerae</i>	0,00 ± 0,00	7,58 ± 0,37	27,95
113	<i>V. brasiliensis</i>	9,41 ± 0,08	14,67 ± 0,14	32,64
114	<i>V. navarrensis</i>	7,10 ± 0,18	7,30 ± 0,11	28
115	<i>V. navarrensis</i>	15,55 ± 0,06	20,57 ± 0,41	38,79
116	<i>V. navarrensis</i>	10,31 ± 0,19	15,76 ± 0,20	33,09
118	<i>V. brasiliensis</i>	0,00 ± 0,00	7,46 ± 0,06	27,64
119	<i>V. brasiliensis</i>	11,58 ± 0,42	16,26 ± 0,26	36,47
120	<i>V. neptunis</i>	0,00 ± 0,00	7,20 ± 0,02	28,73
121	<i>V. navarrensis</i>	0,00 ± 0,00	11,35 ± 0,36	27,87
122	<i>V. cholerae</i>	21,17 ± 0,22	13,25 ± 0,39	26,21
123	<i>V. brasiliensis</i>	13,98 ± 0,03	19,38 ± 0,60	37,72
124	<i>V. brasiliensis</i>	18,11 ± 0,18	13,95 ± 0,56	32,99
125	<i>V. brasiliensis</i>	12,81 ± 0,12	12,77 ± 0,38	38,5
126	<i>V. brasiliensis</i>	15,97 ± 0,38	13,47 ± 0,10	28,48
127	<i>V. brasiliensis</i>	15,58 ± 0,38	15,58 ± 0,07	35,39
128	<i>V. cholerae</i>	18,65 ± 0,25	16,12 ± 0,11	29,84
129	<i>V. brasiliensis</i>	6,96 ± 0,19	7,59 ± 0,45	33,25
130	<i>V. brasiliensis</i>	12,05 ± 0,40	13,02 ± 0,45	31,20
ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	17,33 ± 0,45	21,05 ± 0,03	34,92
IOC	<i>V. parahaemolyticus</i>	16,66 ± 0,44	18,77 ± 0,21	34,06

**S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.