

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

TOXICIDADE DOS EXTRATOS VEGETAIS DE JATOBÁ E CHAPÉU-DE-SOL AO OOMICETO PATÓGENO *Saprolegnia ferax*

Débora Rodrigues da Silva Colombo
Orientadora: Prof^a Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério
Coorientadora: Dra. Cíntia Badaró-Pedroso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca

São Paulo
Novembro-2020

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

TOXICIDADE DOS EXTRATOS VEGETAIS DE JATOBÁ E CHAPÉU-DE-SOL AO
OOMICETO PATÓGENO *Saprolegnia ferax*

Débora Rodrigues da Silva Colombo

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Coorientadora: Profa. Dra. Cíntia Badaró- Pedroso

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto
Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Aquicultura e Pesca**

São Paulo

Novembro-2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

C683t Colombo, Débora Rodrigues da Silva.
Toxicidade dos extratos vegetais de jatobá e chapéu-de-sol ao oomiceto patógeno *saprolegnia ferax*/ Débora Rodrigues da Silva – São Paulo, 2020.
v; 44f.; il.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e
Abastecimento.

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério. Coorientadora: Cíntia Badaró Pedroso.

1. Extratos de plantas. 2. Saprolegniose. 3. Ação inibitória. 4. Micélio. 5. Zoósporos. 6.
Teste *in vitro*.

I. Mostério, Claudia Maris. II. Título.

CDD 571.95

Não foi pela espada que conquistaram a terra nem pela força do seu braço que alcançaram a vitória; foi pela tua mão direita, pelo teu braço e pela luz do teu rosto, por causa do teu amor para com eles. És tu, meu Rei e meu Deus! És tu que decretas vitórias para Jacó!

Salmo 44; 3-4

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Cláudia Maris Ferreira e coorientadora Dra. Cíntia Badaró Pedroso por compartilharem seus conhecimentos e por me acolherem de maneira tão carinhosa. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio com a bebê e por não duvidarem, mesmo quando cheguei a duvidar, que eu era capaz. Fui muito abençoada em tê-las em minha vida.

A pesquisadora do Instituto de Pesca Dra. M^a José Tavares Ranzani de Paiva por permitir que utilizasse a sua sala, pela amizade, ajuda e fornecimento de insumos laboratoriais que foram tão essenciais no desenvolvimento deste trabalho. A Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli e M^a. Sarah Cristina de Oliveira da Paixão do IBt por todo carinho, afeto, confiança em permitir que utilizasse o Laboratório de Fungos Aquáticos, equipamentos e as cepas cedidas, e pelo ensino da morfologia do organismo alvo do presente estudo. A querida e amada Dra. Erna Elisabeth Bach, que me presenteou com sua paciência e tempo ao me ensinar as técnicas para análises dos compostos dos extratos assim como na confecção dos extratos percolados. Ao Dr. Marco Aurélio Sivero Mayworm pelo preparo e ensino da técnica de extração dos extratos aquosos.

Ao querido Ocimar, pelo apoio e paciência durante esta trajetória e aos estagiários Caio, Camila Mendonça, Camila Xavier, Livia e Ariele, e a M^a. Cristina Viriato do IP, que com seu carinho e simplicidade me agraciaram com tempo de qualidade em vossas companhia e amizade, sempre demonstrando força e coragem durante esses dois anos.

A todos estes profissionais, muito obrigado. Sem a ajuda de vocês este trabalho não teria ficado tão rico em conhecimento. Foi um imenso prazer ter tido a oportunidade de conhecê-los e presenciar o que o amor a ciência é capaz de trazer: Amizade, sabedoria e trabalho em equipe.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Brasil – 37551657835, ao apoio e pela concessão da bolsa de estudos.

Quero agradecer também à minha família, que sempre me apoiaram incondicionalmente. Obrigado por serem minha força e por me amarem assim como eu os amo. A existência de vocês me faz uma pessoa melhor, só tenho a agradecer a Deus pelo presente que são em minha vida. E pela minha bebê, que mesmo sem a conhecer sei que virá para somar. Seja bem-vinda minha princesa.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	I
Abreviaturas.....	III
Resumo Geral.....	IV
Abstract.....	V
1. Introdução Geral.....	1
1.2. Oomicetos.....	1
1.3. <i>Saprolegnia ferax</i>	2
1.4. A procura de tratamentos alternativos.....	3
2. Referências Bibliográficas.....	5

CAPÍTULO 1:

Ação Oomicetocida dos Extratos de Plantas *Hymenaea* sp. e *Terminalia* sp. sobre *Saprolegnia ferax*

Resumo.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 Produção dos extratos aquosos de folhas de <i>Terminalia</i> sp. e da casca lenhosa de <i>Hymenaea</i> sp.....	15
2.1.1 Determinação do rendimento da massa seca dos extratos	16
2.2 Produção de extratos por percolação da casca lenhosa e do exocarpo (casca lenhosa do fruto) de <i>Hymenaea</i> sp.	16
2.2.1 Análise dos compostos secundários.....	17
2.3 Obtenção e manutenção de <i>Saprolegnia ferax</i>	18
2.3.1 Zoosporogênese.....	18
2.4 Ensaios <i>in vitro</i> com <i>Saprolegnia ferax</i>	19
2.5 Análise estatística.....	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1 Extratos.....	21
3.2 Zoosporogênese.....	24
3.3 Ensaio <i>in vitro</i>	24
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÃO.....	37
6. APOIO FINANCEIRO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	38

ABREVIATURAS

EAT	Extratos aquosos das folhas de <i>Terminalia</i> sp.
EAJ	Extratos aquosos da casca do caule Jatobá
EPCA	Extratos hidroalcoólico da casca do caule de Jatobá
EPEJ	Extratos hidroalcoólico do exocarpo de jatobá
MP ₅	Meio de cultura Maltose-Peptona
CI50	Concentração Inibitória de 50%
CIM100	Concentração Inibitória Mínima de 100%
<i>S. ferax</i>	<i>Saprolegnia ferax</i>

RESUMO GERAL

TOXICIDADE DOS EXTRATOS VEGETAIS DE JATOBÁ E CHAPÉU-DE-SOL AO OOMICETO PATÓGENO *Saprolegnia ferax*

A utilização de quimioterápicos auxilia no controle e profilaxia de patógenos na aquicultura, mas o uso e o descarte incorretos podem apresentar perigo aos usuários e ao meio ambiente. Compostos secundários de plantas vêm despertando o interesse devido apresentarem menor risco de seleção artificial de cepas de resistência e diminuir a exposição a agentes químicos. O presente estudo verificou a ação oomiceticida dos extratos aquosos das folhas de *Terminalia* sp. (EAT) e, da casca do caule de Jatobá (EAJ), e dos extratos hidroalcoólicos da casca do caule (EPCA) e do exocarpo de jatobá (EPEJ) no desenvolvimento micelial e viabilidade dos zoósporos do oomiceto *Saprolegnia ferax*. O cobre foi usado como substância de referência junto aos ensaios realizados em meio Maltose-Peptona (MP5) com inoculo de 0,5 cm para o micélio, enquanto que nos ensaios de viabilidade foram inoculados 2000 zoósporos ao centro das placas com meio de cultura. A avaliação do crescimento das colônias durou 72h, em triplicata. Foram realizadas análises quantitativas de fenóis para os extratos, e para análise estatística utilizou-se o programa Clp para determinar a Concentração Inibitória de 50% do crescimento micelial e viabilidade dos zoósporos, e análise de variância seguida do teste de Dunnet para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 100% para ambas as estruturas. A menor concentração de fenóis, presentes nos extratos, responsáveis pela inibição de 100% (CIM100; 72h) do crescimento micelial e da viabilidade dos zoósporos foram iguais a 0,745mg.mL⁻¹, para o EPEJ, 1,78mg.mL⁻¹ no EPCA e 3,029mg.mL⁻¹ para o EAJ em ambas as estruturas testadas. No EAT a CIM100 ao fenol foi de 1,651mg.mL⁻¹ para o micélio e 0,826mg.mL⁻¹ para zoósporo em 72h. E concentrações de fenol inferiores a 0,052mg.mL⁻¹ no EAT e 0,006mg.mL⁻¹ para o EAJ apresentaram maior crescimento que as culturas do grupo controle em 24h.

Palavras-chaves: Extratos de plantas, saprolegniose, ação inibitória, micélio, zoósporos, teste *in vitro*

ABSTRACT

TOXICITY OF VEGETABLE EXTRACTS FROM JATOBA AND SUN-HAT TO PATHOGEN *OOMYCETO Saprolegnia ferax*

The use of chemotherapy aid in the control and prophylaxis of pathogens in aquaculture, but the incorrect use and disposal may present a danger to users and the environment. Secondary plant compounds have been arousing interest because they present a lower risk of artificial selection of resistance strains and decrease exposure to chemical agents. The present study verified the oomycetocidal action of the aqueous extracts of the leaves of *Terminalia* sp. (EAT) and, from the bark of the Jatobá tree (EAJ), and from the hydroalcolic extracts of the tree bark (EPCA) and from the Jatobá exocarp (EPEJ) in the mycelial development and viability of the zoospores of the oomycete *Saprolegnia ferax*. Copper was used as a reference substance in the tests, which proceeded in a Maltose-Peptide (MP5) medium with a 0.5 cm inoculum for the mycelium, while the viability tests were inoculated with 2000 zoospores in the center of the plates with culture. Colony growth assessment lasted 72 hours, in triplicate. Quantitative analyzes of phenols were performed for the extracts, and for statistical analysis, the CIp program was used to identify the inhibitory concentration of 50% of the mycelial growth and viability of the zoospores, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of 100% for both structures. *S. ferax* presented CIM100 in 72h at phenol concentrations of 0.745mg.mL⁻¹, for EPEJ, 1.78mg.mL⁻¹ in EPCA and 3.029mg.mL⁻¹ for EAJ in both tested structures. In the EAT, the CIM100 for phenol was 1.651mg.mL⁻¹ for the mycelium and 0.826mg.mL⁻¹ for the zoospore in 72h. The phenol concentrations less than 0.052mg.mL⁻¹ in the EAT and 0.006mg.mL⁻¹ for the EAJ showed greater growth the cultures of the control group in 24 hours.

Keywords: Plant extracts, saprolegniosis, inhibitory action, mycelium, zoospores, *in vitro* test

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com o aumento da população humana, limitações como degradação ambiental, a dificuldade de geração de alimentos que atenda a crescente demanda populacional e a falta de recursos naturais irá favorecer o surgimento de doenças, altas taxas de mortalidade e a fome (Cazalis et al., 2018). Alternativas para suprirem a crescente demanda alimentícia vem sendo estudadas a fim de otimizar a produção e minimizar este cenário. Um dos setores que tem se mostrado promissor na erradicação da fome é a aquicultura (FAO 2018).

Do ponto de vista ambiental, a aquicultura é uma prática que contribui com a manutenção dos estoques naturais, por não ser uma atividade extrativista (Kubitza, 2003; Anjos et al., 2009; Cardoso et al., 2012). Para otimizar a produtividade de seus derivados, pode ser empregado o sistema de superestocagem. Entretanto observa-se que esta prática vem sendo associada ao surgimento de doenças oportunistas (Baldisserotto et al., 2017).

O conhecimento prévio de agentes potencialmente patogênicos nestes sistemas, possibilita a tomada de iniciativas preventivas a fim de minimizar a ocorrência e tratamento aos agentes etiológicos. Todavia, algumas destas iniciativas não são suficientes para inibir a ocorrência de doenças nos animais de cultivo, gerando perda na qualidade do produto final, mortalidade e consequentemente prejuízos econômicos (Baldisserotto et al., 2017). Entre os organismos que podem comprometer a saúde da cadeia de produção podemos citar os oomicetos, como os gêneros *Aphanomyces*, *Achlya*, *Pythium* e *Saprolegnia* (Phillips et al., 2007; Ke et al., 2009; Ali et al., 2011; Magray et al., 2019; Lau et al., 2020) conhecidos por ocasionar lesões dérmicas em animais aquáticos.

1.2. Oomicetos

Os oomicetos foram estudados por muitos anos como pertencentes ao Reino Fungi, mas com a análise molecular, pode se verificar que estes organismos estavam filogenicamente mais próximos das algas, pertencendo ao Reino Straminipila do que propriamente dos fungos (Dick, 2001). Eles atuam diretamente na ciclagem de nutrientes, mas alguns de seus representantes podem apresentar comportamento saprófito/oportunista e ou parasita (Sandoval-Sierra e Diéguez-Uribeondo, 2015; Rocha et al., 2016; Pires-Zottarelli et al., 2019).

Esses organismos são caracterizados pela presença de hifas cenocíticas, com exceção das estruturas de reprodução que apresentam septo, membrana celular constituída por celulose, hidroxiprolinas, β -glucanos e quitina. Na reprodução sexuada com formação de células anteridia e oogônio que em contato possibilitam a plasmogamia e cariogamia, originando o oósporo. Esta última estrutura além de conferir variabilidade genética também apresenta grande tolerância a variações ambientais, podendo ficar latente por anos aguardando condições oportunas que favoreçam o seu desenvolvimento (Johnson et al., 2002; Oliveira, 2003; Gozlan et al., 2014).

A reprodução assexuada destes organismos é identificada pela formação de zoosporângios que liberam células móveis chamadas de zoósporos (Johnson et al., 2002; Oliveira, 2003; Gozlan et al., 2014). Estas células, apesar de mais sensíveis que os oósporos, apresentam dois flagelos que auxiliam em sua locomoção, um franjado e o outro liso. E por serem capazes de identificar sinalizadores químicos, nutricionais, iônicos e elétricos presentes na água, se direcionam ao local onde se encontra o substrato para o desenvolvimento da futura colônia (El-Feki et al., 2003; Walker e Van West 2007; Gozlan et al., 2014). Devido a esta característica, esta fase é considerada responsável pela infecção.

Nas pisciculturas, os oomicetos como os do gênero *Saprolegnia* sp. são relatados como responsável por acometer animais aquáticos em diferentes estágios de vida. Caracterizado por ocasionar lesões dérmicas, conhecida como saprolegniose. Quando afeta animais aquáticos a saprolegniose apresenta formação de colônia algodonosa, com lesão que pode evoluir para necrose e dificuldade de osmoregulação. Nas brânquias podem gerar hipóxia e em ovos de peixe comprometem as trocas gasosas podendo levá-los a morte (Kubitza, 2005; van West 2006; Phillips et al. 2007; Ke et al. 2009; Ali et al., 2011; Gozlan et al., 2014; Rodrigues et al., 2013; Lau et al. 2020).

1.3. *Saprolenia ferax*

A espécie *Saprolegnia ferax* faz parte da família Saprolegniaceae, gênero *Saprolegnia*. É um oomiceto patógeno/opportunista conhecido por causar saprolegniose em diversas espécies de animais aquáticos e em diferentes estágios de vida (Johnson et al., 2002; Phillips et al., 2007; Romansic et al., 2009; Gozlan et al., 2014; El-Deen et al., 2018). A espécie pode sobreviver em diversos substratos orgânicos, uma vez que também contribui com a ciclagem de nutrientes

(Johnson et al., 2002; Gozlan et al., 2014). Esta característica pode comprometer a sua eliminação dos sistemas de criação.

Apresenta reprodução sexuada e assexuada, além da formação de gemas (clamidosporos), proveniente do espessamento de uma área delimitada da hifa. Como o oósporo, esta estrutura pode prover maior resistência a variações ambientais (Johnson et al., 2002).

Espécie didática, apresenta as principais características morfológicas para *Saprolegnia* sp., e é a espécie tipo do gênero (Johnson et al., 2002). A ocorrência do gênero como patógeno depende da sensibilidade do hospedeiro, mas algumas condições de cultivo podem propiciar o surgimento da enfermidade, dentre eles podemos citar a depreciação do sistema imunológico dos organismos afetados, a presença de injúrias, má qualidade da água e estresse nos animais no ambiente de cultivo (Pavanelli et al., 2002 ; Kubitza 2005; Gozlan et al., 2014; Baldisserotto et al., 2017).

Entre os tratamentos utilizados estão os quimioterápicos como formol, permanganato de potássio, azul de metileno, peróxido de hidrogênio, cloreto de sódio e sulfato de cobre (Gozlan et al., 2014; Baldisserotto et al., 2017; El-Deen et al., 2018; Souza-Ferreira 2018), e havendo contaminação das lesões por bactérias pode-se associar o uso de antibióticos. Todavia o uso indiscriminado e o descarte incorreto podem acarretar contaminação dos efluentes e contaminação da proteína animal, além do risco a exposição de reagentes químicos aos trabalhadores do setor (Cabello et al., 2013; Valladão et al., 2015; Pereira et al. 2016; Miller e Harbottle 2018).

1.4. A procura de tratamentos alternativos

Medidas alternativas que garantam a qualidade da proteína animal e que impacte o mínimo possível o ecossistema aquático, vem despertando o interesse da aquicultura. Entre as possibilidades avaliadas como promissoras na substituição de químicos no tratamento de enfermidades no setor, podemos citar como alvo de estudo os compostos secundários de plantas. Entre as justificativas que favorecem a utilização destes compostos estão a facilidade de obtenção, menor probabilidade de bioabsorção, degradação de seus compostos mais rápida que os químicos comumente utilizados, baixo custo e menor risco de seleção de cepas de

resistência (Cabello et al., 2013; Gozlan et al., 2014; Valladão et al., 2015; Pereira et al. 2016; Miller e Harbottle 2018).

Árvores como o Jatobá e o Chapéu-de-sol apresentam compostos que são eficientes na inibição de microrganismos patogênicos (Garcia et al., 2011; Meneses 2017; Terças et al. 2017). São plantas comumente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades e entre as partes empregadas são relatadas as folhas, casca do caule, exocarpo, sementes e seiva, na forma de chás e xaropes.

O Jatobá (*Hymenaea courbaril*) é uma árvore nativa da América Central e Sul, possuindo diversos nomes populares (Jatobá-da-serra, Jatobá-da-mata entre outros) e com variações dentro da mesma espécie. De madeira resistente, é muito apreciada na confecção de móveis, todavia a espécie encontra-se ameaçada de extinção devido redução de habitat e o extrativismo. Seus compostos apresentam ação bactericida, fungida e retroviral (Garcia et al., 2011; Cecílio et al., 2012), todavia com pouca informação sobre a utilização de seus compostos na aquicultura.

A Terminália (*Terminalia catappa*), é também conhecida como Chapéu-de-sol, Amendoeira-da-praia, Terminalia, Castanheira entre outros. É uma espécie exótica, muito resistente a diversas variações ambientais, motivo pelo qual seus exemplares são utilizados como árvore ornamental na orla das praias. Popularmente suas partes são utilizadas na forma de decocções aquosas no tratamento de má digestão e diarreia. Como o exemplar anteriormente citado, sabe-se que seu extrato apresenta compostos com propriedades antifúngicas e bactericidas, além de inibir o desenvolvimento de oomicetos e parasitas (Claudiano et al., 2009; Tavechio et al., 2009; El-Rafie1 e Hamed 2014; Meneses 2017; Terças et al., 2017).

Este estudo objetivou avaliar os efeitos tóxicos causados pelos extratos aquosos de folhas de *Terminalia* sp. e da casca do caule de *Hymenaea* sp., e de mais dois extratos hidroalcoólicos confeccionados a partir da casca da árvore e exocarpo de Jatobá em diferentes estruturas (micélio e zoósporos) do oomiceto *S. ferax*. Podendo assim contribuir com dados que auxiliem em pesquisas futuras para métodos alternativos no controle e tratamento de animais infectados com o patógeno citado, como também auxiliar na qualidade da proteína final ofertada ao consumidor e maior segurança aos profissionais do setor. Esta dissertação apresenta no “Capítulo 1” intitulado “Ação oomiceticida dos extratos de plantas *Hymenaea* sp.

e *Terminalia* sp. sobre *Saprolegnia ferax*”, que posteriormente será submetido à revista de nível A segundo Qualis CAPES.

2.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, E.H.; Hashem, M.; Al-Salahy, M.B. 2011. Pathogenicity and oxidative stress in Nile tilapia caused by *Aphanomyces laevis* and *Phoma herbarum* isolated from farmed fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 94: 17-28. doi: 10.3354/dao02290.
- Anjos, H.D.B.; Amorim, R.M.S.; Siqueira, J.A.; Anjos, C.R. 2009. Exportação de peixes ornamentais do Estado do Amazonas, Bacia Amazônica, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(2): 259-274. https://www.pesca.sp.gov.br/35_2_259-274.pdf.
- Baldisserotto, B.; Gomes, L.C.; Heinzmann, B.M.; Cunha, M.A. 2017. *Farmacologia aplicada à aquicultura*. Brasil – RS: Editora Universidade Federal de Santa Maria. 654p.
- Cabello, F.C.; Godfrey, H.P.; Tomova, A.; Ivanova, L.; Dölz, H.; Millanao, A.; Buschmann, A.H. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology* 15: 1917-1942. DOI: 10.1111/1462-2920.12134.
- Cardoso, R.S.; Lana, A.M.Q.; Teixeira, E.A.; Luz, R.K.; Faria, P.M.C. 2012. Caracterização socioeconômica da aquicultura ornamental na região da Zona da Mata Mineira. *Boletim do Instituto de Pesca*, 38(1): 89 – 96. ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/38_1_89-96.pdf
- Cazalis, V.; Loreau, M.; Henderson, K. 2018. Do we have to choose between feeding the human population and conserving nature? Modelling the global dependence of people on ecosystem services. *Science of the Total Environment*, 634:1463-1474. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.360>.
- Cecílio, A.B; Faria, D.B.; Oliveira, P.C.; Caldas, S.; Oliveira, D.A; Sobral, M.E.; Duarte, M.G.; Moreira, C.P.; Silva, C.G.; Almeida, V.L. 2012. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3): 975-981. DOI: 10.1016/j.jep.2012.03.031.
- Claudiano, G.S.; Dias Neto, J.; Sakabe, R.; Cruz, C.; Salvador, R.; Pilarski, F. 2009. Eficácia do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*10: 625-636
- Dick, M.W. 2001. *Straminipilous Fungi: Systematics of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms*. Kluwer Academic Publications, Dordrecht. 660p.

- El-Deen, A.N.; Osman, H.M.; Zaki, M.S.; AlyAbo-State, H. 2018. Mass Mortality in Cultured Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* in Kafr El-Sheikh Province, Egypt Due to Saprolegniosis with Emphasis on Treatment Trials. *Journal of Biological Sciences*, 18: 39-45. DOI: 10.3923/jbs.2018.39.45.
- El-Feki, M.; Hatai, K.; Hussein, M.M.A. 2003. Chemotactic and chemokinetic activities of *Saprolegnia parasitica* toward different metabolites and fish tissue extracts. *Mycoscience* 44:159–162. DOI 10.1007/s10267-002-0089-5.
- El-Rafie1 H.M.; Hamed M.A.A. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four Terminalia species. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol* 5: 1-11. DOI: 10.1088/2043-6262/5/3/035008.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture – Meeting The Sustainable Development Goals. Rome 227. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/I9540EN/>
- Garcia, C.S.; Ueda, S.M.Y.; Mimica, L.M.J. 2011. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 70: 589-598. URL: < http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-9852011000400022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- Gozlan, R.E.; Marshall, W.L.; Lilje, O.; Jessop, C.N.; Gleason, F.H.; Andreou, D. 2014. Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath? *Frontiers in Microbiology*, 5(62): 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00062>.
- Johnson, T.W.; Seymour, R.L.; Padgett, D.E. 2002. Biology and systematic of the Saprolegniaceae. URL: <<http://dl.uncw.edu/digilib/Biology/Fungi/Taxonomy%20and%20Systematics/Padgett%20Book/>>.
- Ke, X.L.; Wang, J.G.; Gu, Z.M.; Li, M.; Gong, X.N. 2009. Morphological and molecular phylogenetic analysis of two *Saprolegnia* sp. (Oomycetes) isolated from silver crucian carp and zebra fish. *Mycological Research* 113: 637-634. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.008>.
- Kubitza, F. 2003. Larvicultura de peixes nativos. *Panorama da aquicultura*. 13(77): 47-56. URL: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/larvicultura-de-peixes-vivos/#:~:text=Na%20maioria%20das%20esp%C3%A9cies%20de,p%C3%B3s%20larvas%20para%20os%20viveiros>>
- Kubitza, F. 2005. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. *Panorama da aquicultura* 15(89): 15-23. ISSN 1519-114.

- Lau, C.H.; Snook, E.R.; Swinford, A.K.; Bryan, L.K. 2020. *Achlya* sp. Dermatitis in an American Alligator (*Alligator mississippiensis*). Journal of Comparative Pathology 175: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.12.002>
- Magray, A.R.; Lone, S.A.; Ganai, B.A.; Ahmad, F.; Dar, G.J.; Dar, J.S.; Rehman, S. 2019. Comprehensive, classical and molecular characterization methods of *Saprolegnia* (Oomycota; Straminipila), an important fungal pathogen of fish. Fungal Biology Reviews 33: 166-179. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.12.001>.
- Meneses, J.O. 2017. Nanoterapia e fitoterapia no controle do fungo *Saprolegnia parasitica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Tiradentes, Aracajú, BR. Disponível em: <https://mestrados.unit.br/psa/wp-content/uploads/sites/6/2017/05/Dissertacao_JulianaOMeneses2017.pdf>. Acesso em 13/06/2020.
- Miller, R.A.; Harbottle, H. 2018. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. American Society for Microbiology. 501-520. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0017-2017.
- Oliveira, E.C. 2003. O grande reino dos fungos. In: OLIVEIRA, E. C. Introdução a biologia vegetal. 2. ed. São Paulo: Edusp, 2003. p. 266
- Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M. 2002. Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. Editora da Universidade Estadual de Maringá. 2. ed. Maringá.
- Pereira, L.A.; Weiss, L.A.; Besen, M.A.; Marengoni, N.G. 2016. Use of plant extracts and their prophylactic or therapeutic properties in the fish production. Scientia Agraria Paranaensis 15: 373-380.
- Phillips, A.J.; Anderson, V.L.; Robertson, E.J.; Secombes, C.J.; van West, P. 2007. New insights into animal pathogenic oomycetes. Trends in microbiology 16:13-19. doi: 10.1016/j.tim.2007.10.013.
- Pires-Zottarelli, C.L.A.; Colombo, D.R.S.; Paixão S.C.O.; Ventura, P.O.; Boro, M.C.; Jesus, A.L. 2019. *Aphanomyces brasiliensis* sp. nov. (Verrucalvaceae, Saprolegniales): a new species from Brazilian Atlantic Rainforest áreas. Phytotaxa 415(4): 208-216. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.415.4.5>.
- Rocha, S.C.O.; Sandoval-Sierra, J.V.; Diéguez-Urbeondo, J.; Gonçalves, D.R.; Jerônimo, G.H.; Jesus, A.L.; Marano, A.V.; Pires-Zottarelli, C.L.A. 2016. *Saprolegnia milanezii* sp. nov., a new species of Saprolegniales (Oomycota, Straminipila) from Brazil. Phytotaxa 270: 286-294. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.270.4.5>.

- Rodrigues, A.P.O.; Lima, A.F.; Alves, A.L.; Rosa, D.K.; Torati, L.S.; Santos, V.R.V. 2013. Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimento. EMBRAPA. 440 p. Brasília, Distrito Federal. INSS 978-85-7035-272-9.
- Romansic, J.M.; Diez, K.A.; Higashi, E.M.; Johnson, J.E.; Blaustein, A.R. 2009. Effects of the pathogenic water mold *Saprolegnia ferax* on survival of amphibian larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 83: 187-193. doi: 10.3354/dao02007.
- Sandoval-Sierra, J.V.; Diéguez-Uribeondo, J. 2015. A comprehensive protocol for improving the description of saprolegniales (Oomycota): two practical examples (*Saprolegnia aenigmatica* sp. nov. and *Saprolegnia racemosa* sp. nov.). *PLoS One* 10: e0132999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132999>.
- Souza-Ferreira, K. 2018. Fungicidas no Controle de *Aphanomyces* sp. e Seus Feitos Tóxicos no Desenvolvimento Embrionário do *Danio rerio*. Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento. 43p. Disponível em: <<https://www.pesca.sp.gov.br/pos-graduacao/dissertacoes-defendidas/category/46-ano-2018>>. Acesso em: 22/04/2020.
- Terças, A.G.; Monteiro, A.S.; Moffa, E.B.; Santos, J.R.A.; Sousa, E.M.; Pinto, A.R.B.; Costa P.C.S.; Borges A.C.R.; Torres L.M.B.; Barros Filho A.K.D.; Fernandes E.S.; Monteiro C.A. 2017. Phytochemical Characterization of *Terminalia catappa* Linn. Extracts and Their antifungal Activities against *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology* 8: 1-12. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00595.
- Tavechio, W.L.G; Guidelli, G.; Portz, L. 2009. Alternatives for the prevention and control of pathogens in fish farming. *Boletim Instituto de Pesca* 35: 335 - 341. Disponível em: <<https://www.pesca.agricultura.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/864>>. Acesso em: 22/04/2020
- Valladão, G.M.R.; Gallani, S.U.; Pilarski, F. 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38: 417 - 428. DOI: 10.1111/jvp.12202.
- van West, P. 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20: 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.mycol.2006.06.004>.
- Walker, C.A; van West, P. 2007. Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews* 21: 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.001>.

CAPÍTULO 1

AÇÃO OOMICETICIDA DOS EXTRATOS DE PLANTAS *Hymenaea* sp. E *Terminalia* sp. SOBRE *Saprolegnia ferax*

Ação oomiceticida dos extratos de plantas *Hymenaea* sp. e *Terminalia* sp. sobre *Saprolegnia ferax*.

Resumo

Doenças oomicóticas como a saprolegniose podem comprometer a manutenção de organismos aquáticos em cativeiro. O uso de extratos de plantas vem sendo estudado como medida de controle e tratamento destas enfermidades. O presente estudo buscou verificar a ação oomiceticida dos extratos aquosos das folhas de *Terminalia catappa*. (EAT) ou chapéu-de-sol, e da casca do caule de *Hymenaea courbaril* (EAJ) ou jatobá, sobre o crescimento micelial e viabilidade dos zoósporos de *Saprolegnia ferax*. Também foram testados os extratos hidroalcoólicos da casca do caule (EPCA) e do exocarpo de jatobá (EPEJ). O cobre foi usado como substância de referência nos ensaios com extratos aquosos e hidroalcoólicos, preparados em meio Maltose-Peptona (MP₅), em triplicata e inóculo de micélio com 0,5cm de diâmetro. Nos ensaios de viabilidade foram inoculados 10 μ L (2000 zoósporos) para avaliação do crescimento dos halos após 72h de exposição. Foram realizadas análises quantitativas de flavonóides e fenóis nos extratos aquosos e hidroetanólicos. A análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se o programa CIp para a determinação da Concentração Inibitória de 50% (CI₅₀; 72h) do crescimento micelial e viabilidade dos zoósporos e, a análise de variância seguida do teste de Dunnet, sob nível de significância de 5%, para determinar os valores das concentrações inibitórias mínimas de 100% (CIM₁₀₀) do crescimento micelial e dos zoósporos após 72h. A exposição da *S. ferax* aos extratos revelou inibição total em 72h nas concentrações de fenol em 0,745mg.mL⁻¹ (flavonóide-FL: 0,321mg.mL⁻¹) para o EPEJ; 1,78mg.mL⁻¹ fenol (FL: 0,187mg.mL⁻¹) para o EPCA e 3,029mg.mL⁻¹ fenol (FL: 0,177mg.mL⁻¹) para o EAJ em ambas estruturas testadas. No EAT a inibição de 100% ao fenol foi de 1,651mg.mL⁻¹ (FL: 0,913mg.mL⁻¹) para o micélio e 0,826mg.mL⁻¹ (FL: 0,456mg.mL⁻¹) para os zoósporos no mesmo período. O crescimento micelial nas concentrações de fenol

menores que $0,052 \text{ mg.mL}^{-1}$ no extrato aquoso de terminalia (EAT) e de $0,006 \text{ mg.mL}^{-1}$ no extrato aquoso de jatobá (EAJ) foi superior ao crescimento dos grupos controle após 24 h de exposição. Os extratos aquoso e hidroalcoólicos de jatobá foram eficientes na inibição de 100% do crescimento micelial e de zoósporos em concentrações de fenóis contidas nos extratos variando de 0,745 a $3,029 \text{ mg.L}^{-1}$. As concentrações de fenóis contidas no extrato aquoso de terminália inibiram 100% do crescimento micelial em $1,651 \text{ mg fenóis.L}^{-1}$ e 100% dos zoósporos em $0,826 \text{ mg fenóis.L}^{-1}$ indicando maior sensibilidade dos zoósporos, que é a fase infectante, ao extrato de terminália,

Palavras-chave: extratos aquosos; hidroalcoólico; castanheira-da-praia; jatobazeiro; cobre, ensaio *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma área que contribui com a oferta de proteína animal. Segundo a FAO (2018) o setor pode auxiliar na erradicação da fome. Para maximizar a produção muitos aquicultores optam pela intensificação da estocagem dos animais em sistemas de criação. Esta prática associada a condições de baixa qualidade da água, falta de preparo profissional, injúrias nos animais devido ao atrito ocasionado pela super estocagem, ocasionam estresse e diminuição da resposta imune que podem resultar no surgimento de doenças oportunistas como a saprolegniose (Hipolito 2009, Baldisserotto et al. 2017).

O conhecimento dos agentes etiológicos nestes sistemas possibilita a utilização de medidas mitigatórias e de tratamento específico (Baldisserotto et al. 2017). Entre os patógenos existentes, oomicetos do gênero *Achlya*, *Aphanomyces* e *Saprolegnia* podem inviabilizar o desenvolvimento de crustáceos, peixes, anfíbios e répteis em diferentes estágios de vida (Pavanelli et al. 2002, van West 2006, Phillips et al. 2007, Hipolito 2009, Ke et al. 2009, Ali et al. 2011, Rodrigues et al. 2013, Lau et al. 2020). Todavia, alguns

representantes destes gêneros podem parasitar outros grupos, como *Pythium insidiosum* que apresenta patogenicidade em mamíferos (Phillips et al. 2007, Zambrano et al. 2017) e *Pythium aphanidermatum*, patógeno de plantas (Calvano et al. 2011, Farmer et al. 2015), com relatos de ambas espécies infectando humanos (Phillips et al. 2007, Calvano et al. 2011, Farmer et al. 2015).

Os oomicotas são importantes decompositores (sapróbios), mas alguns representantes apresentam comportamento parasita ou saprófito/opportunista (Johnson et al. 2002, Hipolito 2009). Em animais aquáticos apresentam formação de colônia com aspecto algodinoso acompanhado por lesões cutâneas, que em casos graves, dificulta a osmorregulação podendo levar o organismo infectado a morte (Hatai & Hoshiai 1992, Ali et al. 2011, Rodrigues et al. 2013). Sua dispersão em sistemas de criação pode ser favorecida devido ao fluxo e qualidade da água de cultivo, contato entre animais sadios e infectados, utilização de utensílios não higienizados (fômites), pelo ar e por outros animais como as aves (Pavanelli et al. 2002, Kubitza 2005, Baldisserotto et al. 2017).

A forma como os zoósporos são liberados é utilizada como referência para a identificação do gênero. No caso do gênero saprolegnia a liberação dos zoósporos do tipo saprolegnióide é utilizada na identificação morfológica para o gênero (Johnson et al. 2002, Zambrano et al. 2017, Machado & Rocha 2019).

Os zoósporos possuem dois flagelos que auxiliam na sua locomoção, um flagelo liso e o outro franjado e por serem móveis, podem detectar sinalizadores químicos, nutricionais, iônicos ou elétricos na água atraindo-os até o local onde será formada a nova colônia (Walker & Van West 2007).

Para o tratamento de animais infectados por oomicetos são utilizados quimioterápicos como formol, permanganato de potássio, azul de metileno, sulfato de cobre e o bronopol (Hipolito 2009, Baldisserotto et al. 2017, Souza-Ferreira 2018), além

de antibacterianos que auxiliam no tratamento de outras enfermidades. Entretanto, o uso indiscriminado destes produtos pode acarretar o desenvolvimento de resistência microbiana, contaminação dos efluentes e da carne que posteriormente será comercializada, havendo evidencia que 80% dos antimicrobianos continuam ativos na água após a sua utilização (Cabello et al. 2013, Miller & Harbottle 2018).

Cabello et al. (2013) e Araujo et al. (2012) salientam que espécies distintas de peixes podem apresentar respostas diferenciadas quanto à ação das propostas terapêuticas. Esta característica também é observada em diferentes fases do ciclo de vida de oomicetos que podem apresentar respostas distintas a um mesmo produto (Alderman & Polglase 1984, Sun et al. 2014).

Os compostos secundários de plantas vêm despertando o interesse da aquicultura por apresentarem baixo custo, facilidade de obtenção, segurança na manipulação, menor risco de resíduos na carne dos animais, baixa toxicidade, menor impacto ambiental e a diminuição do risco de seleção artificial de cepas patogênicas (Cabello et al. 2013, Pereira et al. 2016).

Entre estas plantas, *Hymenaea courbaril* é uma espécie arbórea de grande porte e nativa da mata atlântica. Na natureza são encontradas algumas variedades de *H. courbaril*, entre as quais estão *H. courbaril* var. *altissima*, *H. courbaril* var. *courbaril*, *H. courbaril* var. *longifolia*, *H. courbaril* var. *stilbocarpa*, *H. courbaril* var. *subsessilis*, *H. courbaril* var. *villosa*, popularmente conhecidas como Jatobá, Jatobá-da-mata ou Jatobá-da-serra. De madeira muito resistente, a espécie apresenta como fonte de proteína a polpa que reveste suas sementes. A casca do caule, a polpa dos frutos, sementes, folhas e resina são utilizadas na medicina popular no tratamento de enfermidades. Sua ação bactericida e fungicida pode ser observada nos trabalhos de Valentim (2006) e Garcia et al. (2011),

todavia existe uma carência de informação referente a utilização de seus extratos na piscicultura.

Terminalia catappa popularmente conhecida como Castanheira, Chapéu-de-sol e Sete-copas é também uma espécie com propriedades medicinais. É uma árvore exótica originária do continente asiático muito utilizada na ornamentação da orla das praias. Na medicina popular é utilizada no tratamento de má digestão e diarreia. A planta apresenta a produção de compostos secundários como taninos (Terças et al. 2017). Em ensaios com peixes utilizando extratos feitos com as folhas desta árvore, observou-se ação antiparasitária contra monogenóides (Claudiano et al. 2009). Na literatura há relatos da utilização de seus extratos na inibição do desenvolvimento fúngico, oomicótico e microbiano, além de ação anti-inflamatória (Tavechio et al. 2009, El-Rafie1 & Hamed 2014, Meneses 2017, Terças et al. 2017).

Esse trabalho verificou a ação oomiceticida de extratos aquosos de folhas de *Terminalia* sp. e casca do caule de *Hymenaea* sp. e extratos hidroalcoólicos da casca do caule e do exocarpo de frutos de *Hymenaea* sp. sobre o crescimento micelial e viabilidade dos zoósporos do oomiceto *Saprolegnia ferax*.

2. MATERIAL & MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Unidade Laboratorial de Referência em Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Pesquisa em Aquicultura-CPA do Instituto de Pesca (IP), Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Governo do Estado de São Paulo.

2.1 Produção dos extratos aquosos das folhas de *Terminalia* sp. e da casca lenhosa de *Hymenaea* sp.

O extrato aquoso de *Terminalia* sp. foi produzido a partir das folhas verdes coletadas de um exemplar com cerca de 10 metros de altura no Parque Doutor Fernando Costa, São Paulo/Brasil em dezembro de 2019. As folhas foram lavadas com água corrente e destilada e, secas em estufa a 65 °C. O material desidratado foi triturado e submetido à extração na proporção de 20g de folha para cada 100mL de água destilada em Soxhlet mantido a temperatura de 60 °C por 2 horas. Após a extração o material foi submetido a mais duas extrações contendo a metade do volume da água inicial. Os extratos obtidos foram homogeneizados em um extrato único.

O extrato aquoso de *Hymenaea* sp. foi produzido a partir da casca lenhosa do caule do jatobá triturado da marca “A Natureza - Comércio de Produtos Naturais LTDA™” (embalado: 04/2019 validade: 04/2021) pela técnica de decocção. O material foi submetido à extração na proporção de 20g em 220 mL de água destilada em erlenmeyer fechado em banho maria a 60 °C por 2 horas. Após atingir a temperatura ambiente, o extrato foi filtrado e o resíduo sólido obtido foi submetido à nova extração com 110 mL de água destilada na mesma condição da extração anterior. Após esfriar o conteúdo filtrado foi incorporado a primeira extração.

Ambos os extratos aquosos foram armazenados em freezer até o momento de sua utilização.

2.1.1 Determinação do rendimento da massa seca dos extratos

A determinação do rendimento da massa seca dos extratos foi realizada em triplicata. Tubos ependorf contendo 1 mL do extrato foram pesados em balança analítica e mantidos em banho maria a 70 °C até a evaporação total do líquido extrator. Posteriormente foram colocados em estufa a 100°C e em dessecador com sílica gel. Os

ependorfs foram novamente pesados e o Teor de Sólidos Totais de cada extrato foi calculado em mg.mL^{-1} (Farmacopéia Brasileira 2010, 2019).

2.2 Produção de extratos por percolação da casca lenhosa e do exocarpo (casca lenhosa do fruto) de *Hymenaea* sp.

Os extratos percolados hidroalcóolicos de *Hymenaea* sp. foram preparados com a casca do caule do jatobá triturada da marca “A Natureza - Comércio de Produtos Naturais LTDA™” (embalado 04/2019 validade 04/2021) e com casca lenhosa dos frutos coletados em um sítio em Atibaia-SP. A proporção do material foi de 1:1 (g/mL) de material vegetal e álcool 70% por um período de 15 dias.

Em funil de decantação foram inseridos 12g do material vegetal hidratado por 1h com álcool 70%. Sobre este substrato foi acoplado filtro de papel e esferas de vidro com diâmetro de 20mm e posteriormente adicionados 12mL do solvente inicial (álcool 70%). Após 5 dias, 10mL do volume total foram retirados e 2 mL separados em frasco âmbar. O volume restante foi devolvido ao decantador e mais 4g do material vegetal e 4mL de solvente foram acrescidos, permanecendo em repouso por mais 5 dias. Foram subtraídos 11mL do extrato e deste total, uma alíquota de 3,6mL foi acondicionada em frasco âmbar juntamente com os 2mL anteriores. O volume restante foi realocado em funil com mais 3g de planta e 3mL de solvente. Após 5 dias o extrato foi extraído do funil de decantação e adicionado à extração que estava separada em frasco âmbar. Este processo gerou 19mL de cada extrato hidroalcóolico.

2.2.1 Análise dos compostos secundários

A quantificação de ácido clorogênico (fenóis) foi realizada utilizando alíquotas dos extratos (0,5mL) acrescidos em tubos-de-ensaio com o reagente Folin-ciocalteau

(0,25 mL) por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 0,5 mL de carbonato de sódio saturado mais acréscimo de 3,75mL de água destilada. A solução final permaneceu em repouso por 1h até leitura em espectro de absorção em 500nm (Swain & Hillis, 1959). A identificação e a quantificação de outras classes de fenóis, foram feitas utilizando-se solução previamente preparada através da leitura de comprimento de onda que variou de 240 a 600nm em equipamento da marca “BEL”.

A análise quantitativa de flavonóides totais foi feita baseando-se na técnica de Arvouet-Grand et al. (1994), que consistiu na adição de cloreto de alumínio na mesma proporção dos extratos (0,5mL para cada substância) por 10 minutos. A leitura foi feita em espectro de absorção a 425nm.

A fim de evitar a sobreposição de bandas os extratos que estavam muito concentrados foram diluídos.

2.3 Obtenção e manutenção de *Saprolegnia ferax*

A cepa de *S. ferax* foi cedida pelo Instituto de Botânica e pertence à Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do (CCIBt) SP/Brasil, com número de coleção CCIBt4099. A cultura foi mantida em meio MP₅ (Maltose-Peptona) à temperatura de 22°C.

2.3.1 Zoosporogênese

Baseando-se na técnica de Shen et al. (2002) foi utilizado o meio de cultura V8 (100mL suco de vegetais da marca “V8”, 900mL de água destilada, 1 g de CaCO₃ e 15g de ágar) para a zoosporogênese. Colônias cultivadas no meio citado tiveram 14 alíquotas de 0,5cm de diâmetro transferidas em triplicata para placas-de-Petri contendo 20mL de

água destilada por 24h em incubadora D.B.O (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. As culturas com zoósporos foram mantidas em temperatura de 4°C por 30 minutos. Após a homogeneização, cada replicata teve o volume de 1 mL retirado e acrescido 10 μL de lugol para contagem em câmara de Neubauer, em microscopia óptica, em aumento de 100 vezes.

2.4 Ensaios *in vitro* com *Saprolegnia ferax*

Foram realizados ensaios *in vitro* para verificar a sensibilidade micelial e o desenvolvimento de micélio a partir dos zoósporos de *S. ferax* ao sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), em diferentes concentrações. Em paralelo foram realizados ensaios para avaliar a toxicidade dos extratos aquosos de Terminalia e Jatobá e hidroetanólicos de Jatobá.

Os ensaios foram realizados em triplicata tendo como Controle Negativo o meio de cultura MP₅ (4g de maltose, 1g de peptona, 15g de ágar em 1000mL água destilada) sem o oomiceto; e Controle Positivo contendo o organismo em meio de cultura (Souza-Ferreira 2018).

Os ensaios de viabilidade dos zoósporos consistiram na inoculação de 10 μL de células móveis (zoósporos) no centro de placas-de-Petri contendo meio de cultura MP₅ homogeneizado com as soluções teste, o parâmetro observado foi o crescimento micelial por 72h. O ensaio realizado com micélio ocorreu pela inoculação no centro das placas-de-Petri alíquotas de 0,5 cm de diâmetro de hifas cultivadas em MP₅.

O efeito dos extratos de Terminalia, Jatobá e do sulfato de cobre sobre o crescimento micelial e viabilidade dos zoósporos de *S. ferax* foram avaliados através do diâmetro em centímetros do crescimento das hifas, após 24, 48 e 72 horas.

Os ensaios com micélio e zoósporos de *S. ferax* ocorreram através da homogeneização do meio MP₅ em diferentes diluições dos extratos aquosos. *Terminalia* sp.: 1:100000; 1:10000; 1:1000; 1:100; 1:10 e 1:2 (preliminar) e definitivo: 1:1000; 1:500; 1:250; 1:125; 1:62; 1:31; 1:16 e 1:8 para ensaio com zoósporo, e a adição de duas concentrações para o ensaio com micélio: 1:4 e 1:2. Para o extrato aquoso de *Hymenaea* sp. foram avaliadas as diluições de 1:100000; 1:10000; 1:1000; 1:100; 1:10 e 1:2 (preliminar) e 1:1000; 1:500; 1:250; 1:125; 1:62; 1:31; 1:16; 1:8; 1:4 e 1:2 (definitivo). Os testes realizados com os extratos percolados foram nas diluições de 1:100; 1:10 e 1:5. Os extratos hidroalcoólicos (percolados) foram testados em concentrações menos fracionadas devido o volume de produção ser inferior que o da extração aquosa.

Os ensaios seguiram em temperatura ambiente a 20°C±2 em paralelo aos ensaios com a solução de sulfato de cobre (substância de referência) nas concentrações nominais de Cu 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 mg.L⁻¹ por 72h em placas-de-Petri descartáveis de 8,5x 15 mm. Os tratamentos utilizados com o cobre foram baseados em concentrações pré-estabelecidas pelo Laboratório de Microbiologia de Oomicetos no Instituto de Pesca-SP.

Junto aos ensaios com os extratos foi realizada a verificação de teste microbiológico, com o propósito de identificar algum microrganismo ativo contido nos extratos (Farmacopéia Brasileira 2019). Para isto foram espalhados 10µL de cada extrato sobre a superfície do meio de cultura, permanecendo nas mesmas condições dos tratamentos.

2.5 Análise estatística

A obtenção dos valores das Concentrações de Inibição do Crescimento em 50% (CIC50) do diâmetro da cultura de *S. ferax* ao final de 72 horas e da Concentração de

Inibição da Viabilidade em 50% (CIV50), a CIC50; 72h e a CIV50; 72h foram calculadas utilizando-se o software ICp 2.0 (Norberg-King 1993). Esses valores são apresentados em mg.mL^{-1} de fenol.

A Concentração Inibitória Mínima de 100% do crescimento (CIM100) foi determinada pela menor concentração utilizada dos extratos onde não houve crescimento de hifas de *S. ferax* no meio de cultura (Fuangsawat et al. 2011). Com auxílio do software STATISTICA v. 7.0 foram realizados os testes de ANOVA para verificar se ocorreu diferença significativa entre a média dos tratamentos; Homogeneidade das Variâncias para verificar se os tratamentos são homogêneos; Normalidade dos resíduos para averiguar a distribuição residual e o Teste Posterior de Dunnett para a identificação do tratamento que é significativamente diferente do Controle Positivo.

3. RESULTADOS

3.1 Extratos

O peso de sólidos contidos nos extratos aquosos foram para Jatobá $11,25\text{mg.mL}^{-1}$ e para Chapéu-de-sol de $31,88\text{mg.mL}^{-1}$. Para os extratos hidroalcoólicos o resultado de resíduos sólidos foi maior que nos extratos aquosos, sendo de $61,5\text{mg.mL}^{-1}$ para o percolado da casca árvore de Jatobá e $55,7\text{mg.mL}^{-1}$ para o percolado da casca do fruto de Jatobá.

O espectro de absorção no UV/Visível do extrato aquoso de folhas de *Terminalia* sp. apresentou pico de absorção em 400nm (Figura 1), indicando possível presença de taninos (Liu et al. 1996, Lin et al. 2001, Ahmed et al. 2005), e na reação com cloreto de alumínio evidenciou a presença de flavonóides. O extrato aquoso e o percolado hidroetanólico feitos da casca do caule de jatobá apresentaram pico de absorção em

300nm (Figura 2). Sendo que o extrato aquoso de jatobá apresentou absorção na faixa de 390nm até 490nm, sem identificação dos compostos.

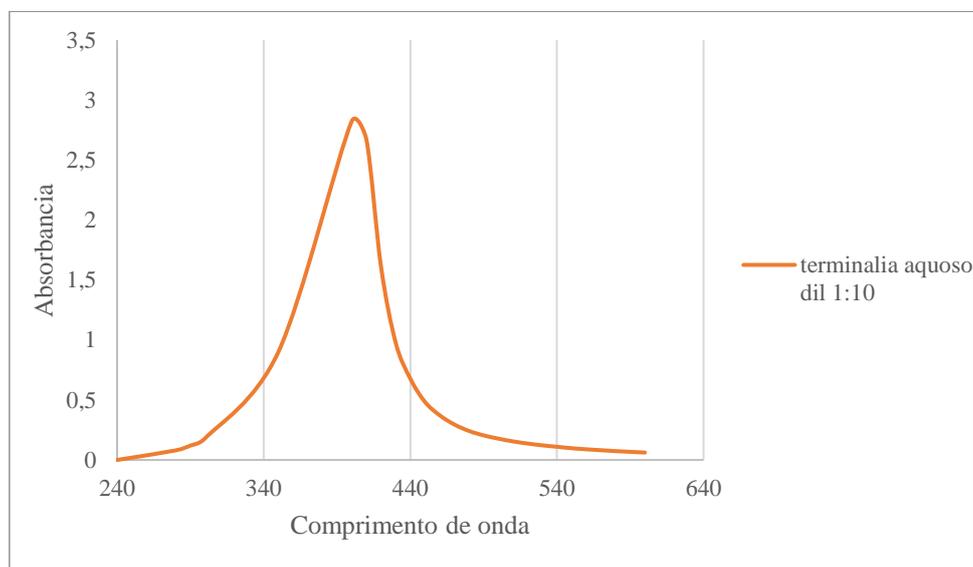


Figura 1: Espectro de varredura nos comprimentos de onda entre 240-600nm do extrato aquoso de folhas de *Terminalia* sp. diluído na concentração de 1:10.

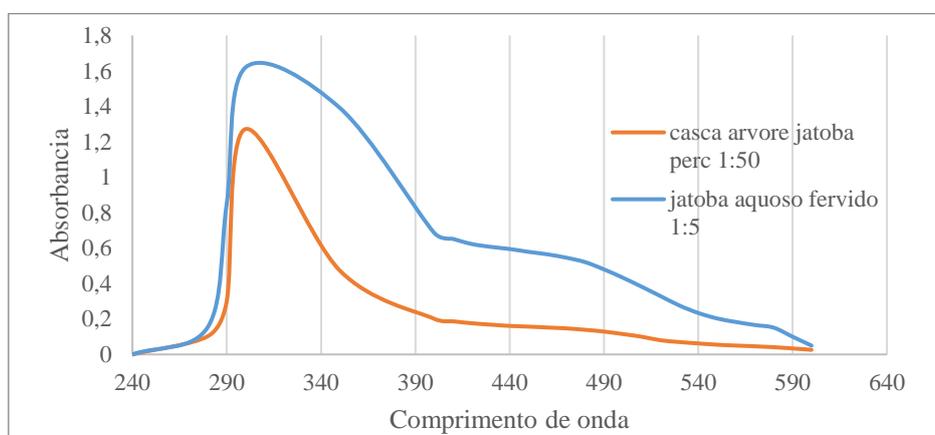


Figura 2: Espectro de absorção UV-Visível nos comprimentos de onda entre 240-600nm com extratos aquoso e hidroetanólico da casca do caule de *Hymenaea* sp.

A Figura 3 apresenta espectro de absorção UV-Visível do extrato percolado do exocarpo de *Hymenaea* sp. Observa-se um pico de absorção para o extrato percolado do exocarpo de jatobá em 350nm sugerindo uma mistura de compostos fenólicos e na quantificação com cloreto de alumínio verificou-se a presença de flavonóides (Tabela 1).

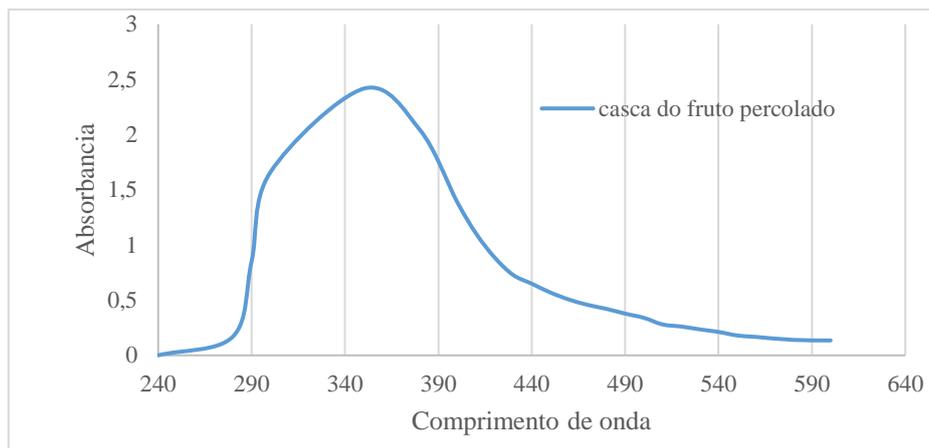


Figura 3: Espectro de varredura realizado entre os comprimentos de onda 240-600nm do extrato percolado do exocarpo de *Hymenaea* sp. Análise seguiu em diluição 1:5.

A Tabela 1 apresenta concentrações das análises em relação às amostras testadas.

Os dados da concentração de fenol foram utilizados como parâmetro comparativo entre os extratos devido tal composto estar relacionado à ação antimicrobiana.

Tabela 1. Concentrações de sólidos totais, fenóis e flavonóides (mg.mL^{-1}) dos extratos de Jatobá e Terminalia utilizados nos ensaios de toxicidade com *Saprolegnia ferax*. Concentrações obtidas dos ensaios definitivos.

Diluição dos extratos em meio de cultura	Concentração de ST e de compostos secundários em meio de cultura (mg.mL^{-1})		
	Sólidos totais	Fenóis	Flavonóides
Jatobá Aquoso			
1:1000	0,011	0,006	0,0003
1:500	0,022	0,012	0,0007
1:250	0,045	0,024	0,001
1:125	0,089	0,047	0,003
1:62	0,178	0,095	0,006
1:31	0,356	0,189	0,011
1:16	0,713	0,379	0,022
1:8	1,426	0,757	0,044
1:4	2,852	1,515	0,088
1:2	5,704	3,029	0,177
Jatobá Percolado da Casca do caule			
1:100	0,615	0,178	0,019
1:10	6,154	1,782	0,187
1:5	12,307	3,563	0,374
Jatobá Percolado do Fruto			
1:100	0,557	0,075	0,032
1:10	5,567	0,745	0,321
1:5	11,133	1,49	0,642
Terminalia Aquoso			
1:1000	0,032	0,013	0,007
1:500	0,063	0,026	0,014
1:250	0,126	0,052	0,029
1:125	0,253	0,103	0,057
1:62	0,505	0,206	0,114
1:31	1,011	0,413	0,228
1:16	2,021	0,826	0,456
1:8	4,043	1,651	0,913
1:4	8,085	3,302	1,825
1:2	16,171	6,605	3,651

Os testes microbiológicos realizados com os extratos revelaram que a técnica de extração foi suficiente para inibir ou inviabilizar o desenvolvimento de contaminantes.

3.2 Zoosporogênese

Foram produzidos em meio de indução a concentração de 2.10^5 zoósporos/mL e deste total foram usados nos ensaios 10 μ L (2000 células) por placa. O Controle Positivo do teste de viabilidade serviu como parâmetro comparativo de desenvolvimento e controle microbiológico, atestando que a técnica utilizada na aquisição das células estava livre de contaminantes.

3.3 Ensaio *in vitro*

Foram realizados dois ensaios de sensibilidade das cepas (*S. ferax*) utilizando o sulfato de cobre como substância de referência. Os resultados das CI50;72h são apresentados na Tabela 2, onde é possível observar, comparando-se os valores dos intervalos de confiança, que entre os ensaios houve diferença estatística significativa de sensibilidade nos lotes das culturas com micélio. Todavia ao compilar com as demais análises estáticas, observou-se que o resultado está dentro da normalidade e de acordo com a carta controle do laboratório, revelando que as variações estão dentro dos limites esperados para o organismo (Figura 4).

Tabela 2: Valores das Concentrações de Inibição de 50% do crescimento micelial (CIC50) e de Inibição de 50% da viabilidade dos zoósporos (CIV50) após 24, 48 e 72h. Sensibilidade do lote de *Saprolegnia ferax* exposta ao sulfato de cobre em ensaios *in vitro*. (IC= Intervalo de Confiança; ICE=Intervalo de Confiança Expandido).

	Micélio CI50 (mg.L ⁻¹)			Zoósporos CI50 (mg.L ⁻¹)		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1° ensaio						
CI50	3,89	3,91	4,18	1,4	3,39	3,48
IC	3,31-4,22	3,76-4,02	4,00-4,35	0,99-1,50	3,28-3,50	3,37-3,56
ICE	2,68-4,59	3,60-4,14	3,80-4,53	0,54-1,61	3,16-3,62	3,25-3,64
2° ensaio						
CI50	2,74	2,82	3,00	1,86	3,79	3,89
IC	2,39-2,97	2,42-3,08	2,79-3,21	1,5-2,5	3,51-4,06	3,78- 3,97
ICE	2,01-3,22	1,97-3,35	2,56-3,44	1,10-3,20	3,21-4,36	3,67-4,05

1° ensaio: Teste realizado em paralelo ao ensaio preliminar com os extratos de jatobá e terminália.

2° ensaio: Teste realizado em paralelo ao ensaio definitivo com os extratos de jatobá e terminália.

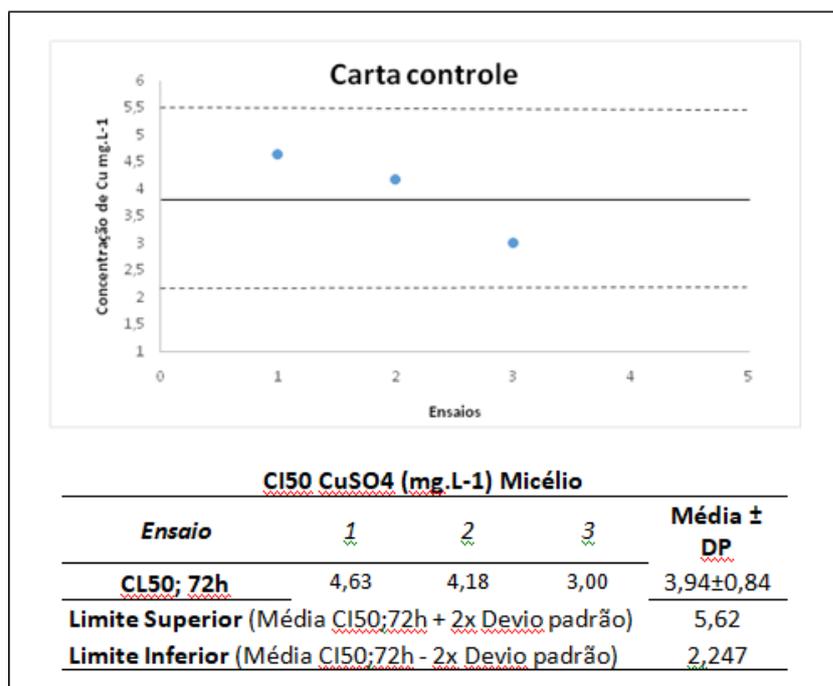


Figura 4: Imagem de carta controle utilizada em Laboratório de Microbiologia de Oomicetos dos valores de CI50;72h de culturas derivadas de micélio utilizadas como parâmetro na sensibilidade de cepas de *Saprolegnia ferax* em exposição ao reagente sulfato de cobre.

O zoósporo do ensaio definitivo (2º ensaio) apresentou CI50;24h em 1,86mg.L⁻¹ sensibilidade que se enquadra nos resultados da Tabela 2 para o mesmo período em ambos os ensaios. Todavia, as CI50;48h (3,79mg.L⁻¹) e CI50;72h (3,89mg.L⁻¹) apresentaram aumento na tolerância ao cobre. Uma hipótese para este resultado seria que com o passar das horas e o desenvolvimento do micélio acrescentaria maior tolerância ao reagente que os zoósporos.

O extrato de Jatobá aquoso apresentou em ensaio preliminar (1º ensaio) com micélio CI50;72h de 0,34 mg.mL⁻¹ (IC 0,34 – 0,39) de fenol com IC igual aos zoósporos viáveis, 0,34mg.mL⁻¹ (IC 0,34 – 0,35). No ensaio definitivo os valores no mesmo período se sobrepuseram, mas com concentração inferior de fenol: 0,16 mg.mL⁻¹ (IC 0,13 – 0,17) micélio e 0,18mg.mL⁻¹ (IC 0,17 – 0,20) zoósporos. Os extratos percolados evidenciaram CI50;72h menor que o extrato aquoso, com 0,009mg.mL⁻¹ (IC 0,008- 0,009) e 0,008mg.mL⁻¹ (IC 0,008 – 0,009) micélio e zoósporos respectivamente para o extrato percolado da casca do caule de jatobá, e para o extrato percolado da casca do fruto de jatobá a CI50;72h foi 0,010mg.mL⁻¹(IC 0,010 – 0,011) micélio e 0,009mg.mL⁻¹ (IC 0,008 - 0,009) zoósporos. O extrato aquoso de terminália apresentou CI50;72h de 0,4mg.mL⁻¹(IC 0,4 – 0,44) para os zoósporo e micélio com 0,48mg.mL⁻¹(IC 0,44 – 0,52) de fenol (preliminar) e 0,25mg.mL⁻¹ (IC 0,24 – 0,26) micélio e zoósporos viáveis em 0,2mg.mL⁻¹ (IC 0,19 – 0,22) (definitivo). Esta alteração de resultados pode estar associada ao maior fracionamento das concentrações entre os ensaios.

A inibição de 100% em 72h do extrato aquoso de jatobá ocorreu na concentração de 3,029 mg.mL⁻¹ de fenol para os ensaios com zoósporos e inibiu 95,19% das culturas oriundas do micélio. As concentrações acima de 0,047mg.mL⁻¹ de fenol inibiram o desenvolvimento do micélio, e em 0,024mg.mL⁻¹ a germinação dos zoósporos. As figuras

5 e 6 mostram que o extrato aquoso de jatobá apresentou inibição em concentrações menores no zoósporo no decorrer das 72h que no micélio.

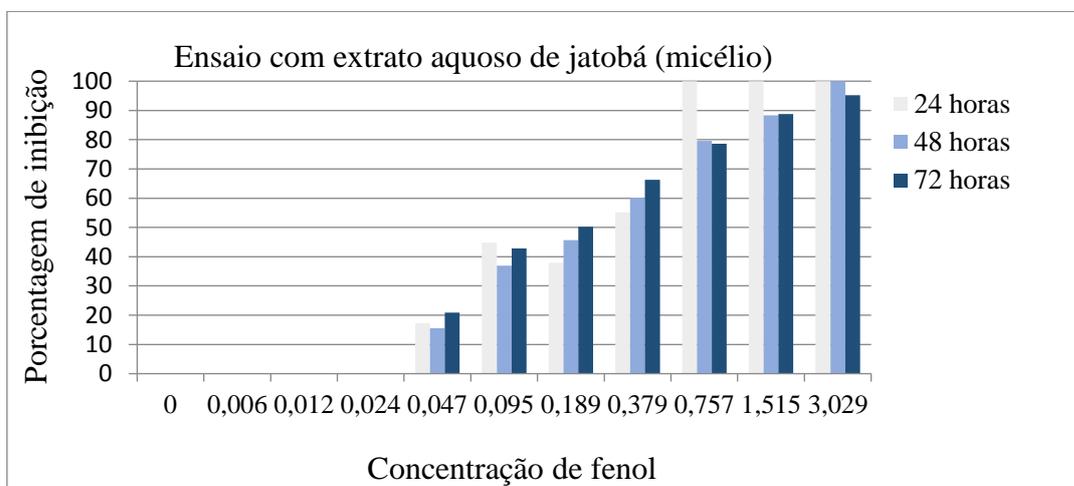


Figura 5. Porcentagem de inibição do desenvolvimento micelial de *S. ferax* após 72h de exposição a concentrações de fenol contidas no extrato aquoso da casca do caule de *Hymenaea* sp (ensaio definitivo).

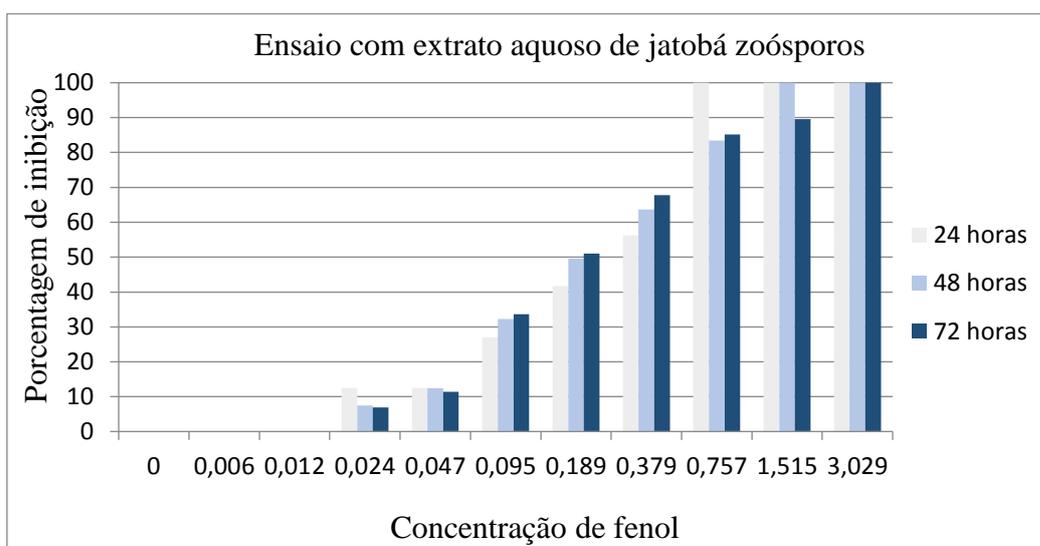


Figura 6. Porcentagem de inibição do desenvolvimento de halo micelial derivado da inoculação de zoósporos de *S. ferax* após 72h de exposição a concentrações de fenol contidas no extrato aquoso da casca do caule de *Hymenaea* sp (ensaio definitivo).

O extrato hidroalcolólico da casca do caule do jatobá apresentou inibição total em 72h na concentração de $1,78\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de fenol, enquanto que a concentração de $0,178\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ inibiu o crescimento do micélio (57,21%) e do zoósporo (58,91%) dentro do mesmo período (Figura 7) . Ao comparar com o extrato aquoso de jatobá observou

que a concentração de $0,189\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 5 e Figura 6) inibiu menos (50,27% micélio e 51% zoósporos) que o extrato hidroalcoólico.

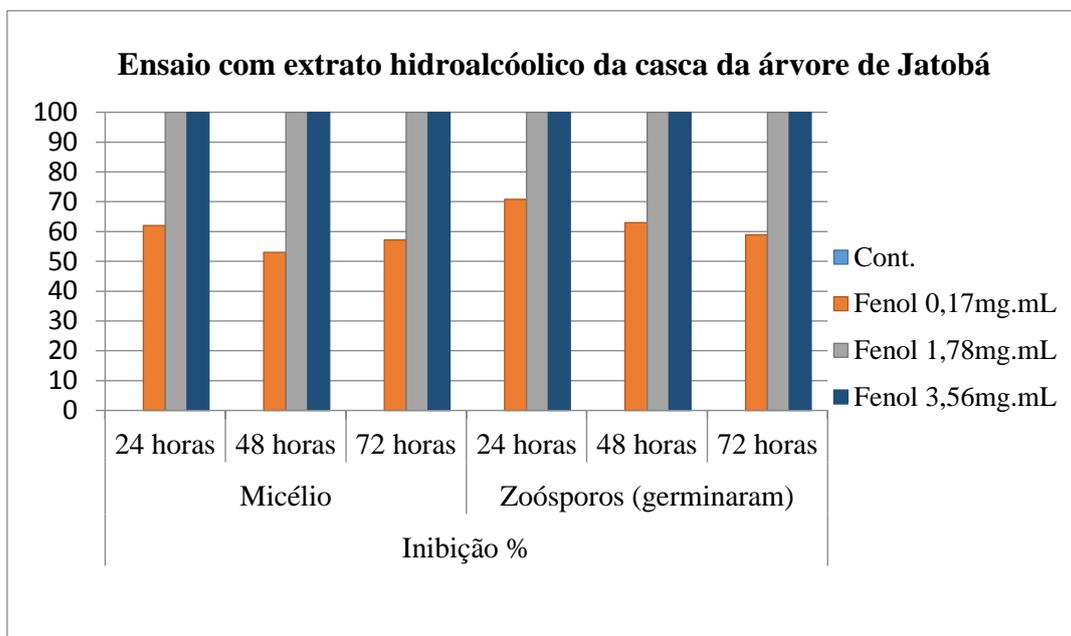


Figura 7: Inibição das culturas derivadas de micélio e zoósporos exposta a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Hymenaea* sp. das culturas.

O extrato percolado da casca do fruto de *Hymenaea* sp. apresentou ação inibidora maior que os outros extratos, com inibição total em $0,74\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de fenol em 72h. A concentração de $0,075\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou retardo no desenvolvimento dos zoósporos em 100% e do micélio em 79,31% nas primeiras 24h, e em 72h de 54,45% e 51,33%, respectivamente (Figura 8). Sugerindo haver sinergismos entre compostos do exocarpo do fruto que potencializou o seu efeito inibitório, sendo mais eficaz que os outros extratos.

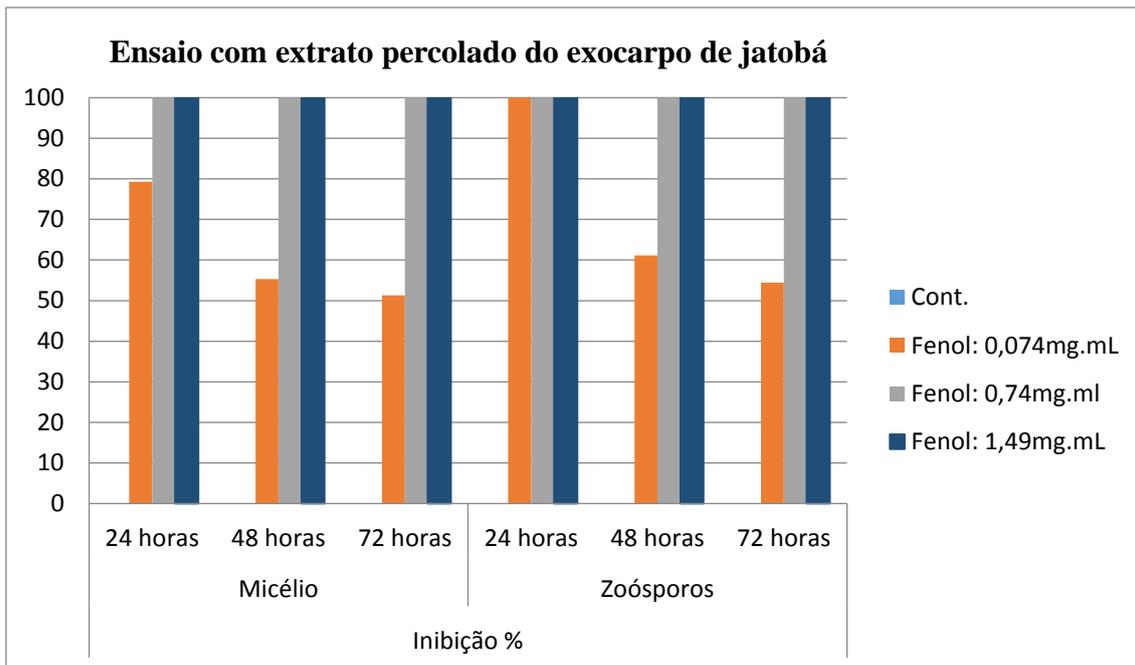


Figura 8: Porcentagem de inibição de culturas provenientes de micélio e zoósporos de *Saprolegnia ferax* expostas a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico derivado da casca do fruto de *Hymenaea* sp.

O extrato aquoso de terminália apresentou 100% de inibição em 1,651mg.mL⁻¹ de compostos fenólicos nas culturas repicadas com micélio e 0,826mg.mL⁻¹ nas culturas com zoósporos em 72h. O ensaio com zoósporos em 24h revelou crescimento superior ao controle positivo nas concentrações de 0,013mg.mL⁻¹ (2,1%), 0,026mg.mL⁻¹ (14,58%) e 0,052mg.mL⁻¹(22,92%) e para micélio (3,44%) em 0,026mg.mL⁻¹ de fenol. Cabe salientar que este resultado sugere que dependendo da concentração de extrato de terminália pode haver o favorecimento do desenvolvimento da *S. ferax* (Figura 9 e Figura 10).

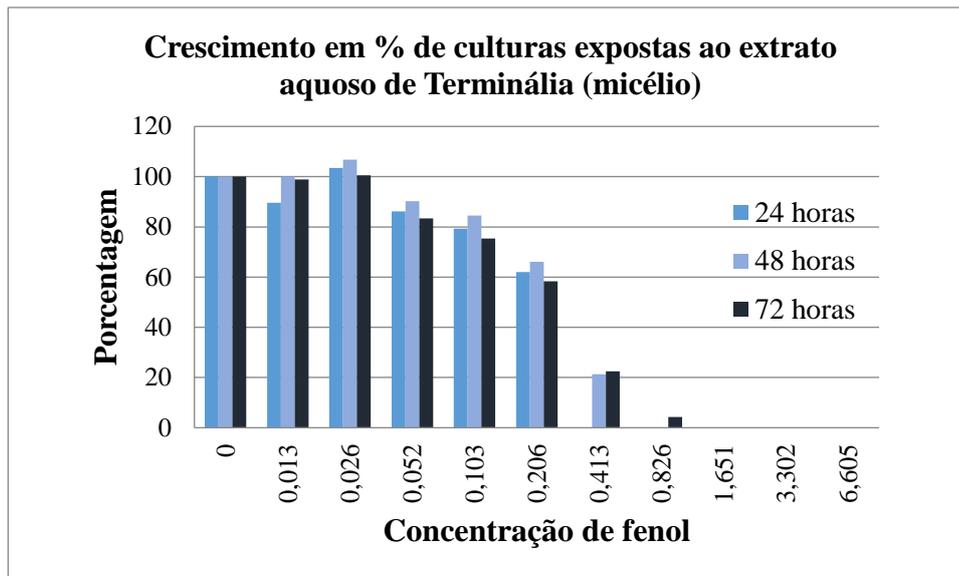


Figura 9: Porcentagem de desenvolvimento das culturas repicadas da fase micelial do oomiceto *Saprolegnia ferax* expostas a diferentes concentrações de extrato aquoso de *Terminalia* sp.

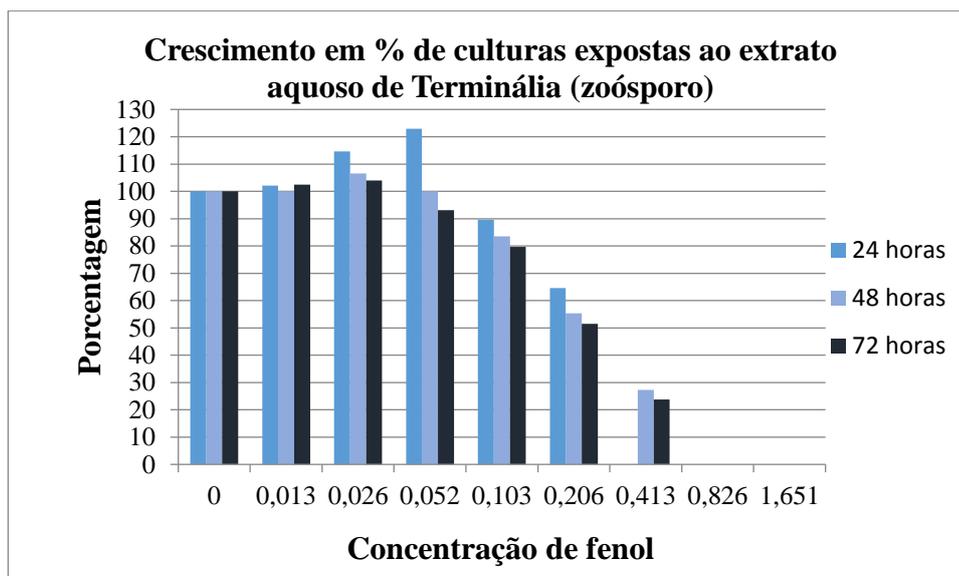


Figura 10: Crescimento em porcentagem de culturas oriundas de teste de viabilidade de zoósporos expostas ao extrato de folhas de *Terminalia* sp.

A concentração de $0,006\text{mg.mL}^{-1}$ de compostos fenólicos no extrato aquoso de jatobá favoreceu o crescimento em placa em ambos os ensaios. Em 24h esta concentração apresentou melhor desenvolvimento que o controle positivo: micélio 48,28% e zoósporo 10,42%. Estes valores sinalizam que dentro de um mesmo extrato pode haver concentrações que inibiram e favoreceram o desenvolvimento da *S. ferax*.

4. DISCUSSÃO

Ao pensarmos no bem-estar animal, a exposição a substâncias químicas exógenas gera alterações fisiológicas, como irritação de pele e mucosas, e aumento na produção de muco nas brânquias que pode comprometer as trocas gasosas (Carnevia 1993). O conhecimento prévio da sensibilidade do patógeno contribui com menor exposição animal aos compostos químicos utilizados no tratamento de enfermidades, assim como economia nos custos de produção, já que dependendo da enfermidade há a possibilidade de redução no insumo utilizado para o tratamento.

Pavanelli et al. (2002) relatam que a concentração de 15-25 mg.L⁻¹ de CuSO₄ pode ser usada em banhos de 1 hora em peixes com saprolegniose e Straus et al. (2009) verificaram que ovos de *Ictalurus punctatus* (bagre-americano) infectados por *Saprolegnia* sp. expostos ao reagente apresentaram sobrevivência de 69% na concentração 10mg.L⁻¹. Ao compararmos os dados dos autores acima citados com os obtidos no presente trabalho, pode-se observar que o tratamento químico é maior que a CI50 deste estudo.

Todavia cabe ressaltar que espécies diferentes de peixes podem apresentar tolerância variada ao sulfato de cobre. Espécies como *Xiphophorus maculatus* (Plati), *Poecilia reticulata* (Lebiste), *Carassius auratus* (Quíngüio), *Xiphophorus helleri* (Espadinha), *P. sphenops* (Molinésia Negra), *Paracheiro doninnesi* (Neón), *Otocinclus macrospilus* (Limpa-vidro), *Gymnocorymbus ternetzi* (Tetra-preto) e *Corydora aeneus* (Bonze-corydoras) apresentam diferentes respostas a exposição ao sal, Concentração Letal de 50% (CL50) em 24h de 1,56; 1,25; 1,11; 1,04; 0,919; 0,41; 0,57; 0,45 e 0,42mg.L⁻¹ respectivamente (Scotto et al. 2019). Apesar das variações de exposição ao cobre entre as espécies (Intervalo de Confiança: 0,4 – 1,8 mg.L⁻¹), observou que o

Intervalo Confiança Expandido (ICE) de 24h dos zoósporos de *S. ferax* se enquadram dentro das referidas espécies, sinalizando sensibilidade homogênea entre os organismos.

Sun et al. (2014) expuseram cepas de *Saprolegnia parasitica* cultivadas em meio PDA a água destilada com diferentes concentrações de sulfato de cobre. Os autores observaram que houve inibição no desenvolvimento micelial em 24h após exposição à concentração $\geq 0,5\text{mg.L}^{-1}$ do regente. Este resultado não foi observado nos ensaios com micélio no presente estudo (CI50; 24h $3,89\text{mg.L}^{-1}$). Uma hipótese para esta divergência seria que o meio MP₅ possui mais nutrientes, o que pode ter favorecido o seu desenvolvimento ao xenobiótico. Esses mesmos autores relatam ainda a ausência de liberação de zoósporos nas concentrações $\geq 1\text{ mg.L}^{-1}$ de CuSO₄, e se comparar com os dados dos zoósporos viáveis deste trabalho, observa-se que a CI50;24h apresenta IC (0.99 - 1.50 mg.L^{-1}), resultado semelhante ao obtido pelos autores citados. Ao associar a resposta do toxicante a CI50;24h, é possível afirmar que o sulfato de cobre nestas concentrações tem interferência direta na liberação, germinação e desenvolvimento destas células. Esta diferença também pode ser relacionada à qualidade de água de cultivo, uma vez que o excesso de matéria orgânica favorece a proliferação de oomicetos (Hipolito 2009).

O extrato foliar de *Terminalia* sp. apresenta diferentes compostos químicos. Entre os compostos fenólicos encontram-se taninos, flavonóides, antocianinas entre outros. Segundo Liu et al. (1996), Lin et al. (2001), Ahmed et al.(2005), em extratos aquosos de folhas da planta foram encontrados taninos hidrolisáveis como apunicalina, punicalagina e ácido elágico. A faixa de absorção em espectrofotometria UV/visível foi entre 350 a 400nm com pico máximo em 379nm. Os resultados apresentados pelos autores colaboram com o deste trabalho, pois apresentou resultados de banda próximos a 400nm podendo ser um indicativo de taninos.

Outros autores como Chyau et al. (2006) detectaram ácidos cumáricos e benzóicos enquanto Ibegbulem et al. (2011) demonstraram presença de taninos, flavonóides e saponinas em exemplares de Terminália. Quanto ao espectro de flavonóides geralmente a absorção ocorre próximo de 300nm (Mabry et al. 1970).

Para o doseamento dos flavonóides, a técnica mais usada é com uso da reação com cloreto de alumínio, pois alcança grande destaque devido a sua simplicidade, rapidez, baixo custo de execução e ampla disponibilidade nos laboratórios de controle de qualidade (Alves et al. 2010). Embora extremamente utilizada, a pouca seletividade tem sido um dos maiores desafios dessa técnica para análise de matrizes complexas como os extratos vegetais, pois a espectrofotometria direta pode ocasionar sobreposição das bandas, impedindo a absorção do componente de interesse (Perkampus 1992).

O cloreto de alumínio ($AlCl_3$) é usado na quantificação de flavonóides porque o cátion Al^{3+} forma complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonóides, ocasionando extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, um desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (Souza & Giovani 2005). Os resultados do presente trabalho demonstraram que o extrato aquoso de terminalia apresentou teor de flavonóide bem como no espectro fenol-tanino.

Islam (2008) cita que concentrações a partir de $100\mu g.mL^{-1}$ de extratos produzidos a partir de *Terminalia arjuna*, *T. belliricae*, e *T. chebula* tem o potencial de inibir a atividade locomotora de zoósporos de *Aphanomyces cochlioides* (patógeno de plantas), enquanto que concentrações de $500-1000\mu g.mL^{-1}$ geraram ação repelente sobre as células. No ensaio realizado com *Terminalia* sp. não foram avaliados tais parâmetros, todavia foi identificado que a concentração de $0,826mg.mL^{-1}$ de compostos fenólicos inibiu o desenvolvimento de zoósporos e em $1,65mg.mL^{-1}$ o desenvolvimento de micélio

em 100% em 72h. Estes resultados sugerem que o extrato de *Terminalia sp.* utilizado no presente estudo contém compostos que exercem atividade antioomicótica nos zoósporos. Esse mesmo autor relata que o extrato acetado da árvore *Dalbergia odorifera* apresenta ação repelente de zoósporos de *A. cochlioides* nas concentrações $200\mu\text{g.mL}^{-1}$ e imobilizadora em $100\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ao testar os compostos da *D. odorifera* isoladamente o referido autor observou que as exposições dos fenóis medicarpina, formononetina e claussequinone apresentaram respostas adversas nas células, desde repelir até mesmo atrair o patógeno. Ao reunir os três isoflavonóides na concentração de $50\mu\text{g.mL}$, o autor observou sinergismos entre os compostos ao repelir as células testadas.

Nos extratos aquosos de Terminália e de Jatobá foram observados que algumas concentrações favoreceram e outras inibiram o desenvolvimento em placa para ambas as estruturas avaliadas. Ao associar que a ocorrência de concentrações que favorecem o desenvolvimento do oomiceto do presente estudo, levanta-se a hipótese que os compostos dos extratos aquosos, dependendo da sua concentração, são degradados no meio ambiente. Uma vez que a espécie *S. ferax* é um saprófito/opportunista e como outros oomicetos sapróbios participam na ciclagem de nutrientes (Johnson et al. 2002, Rocha et al. 2016).

Camilo et al. (2019) citam que o extrato etanólico da casca do fruto de *Hymenaea courbaril* possui ação inibitória em bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Escherichia*, e o acréscimo dos antibióticos como amicacina e gentamicina podem ter as suas concentrações diminuídas quando associados ao extrato. Os autores salientam que o sinergismo entre os tratamentos está relacionado aos compostos secundários como os fenólicos e terpenos.

Veggi et al. (2014), testaram diferentes técnicas de extração de extratos com a casca da árvore de jatobá utilizando como solvente CO_2 ; $\text{CO}_2 + \text{água}$ e $\text{CO}_2 + \text{etanol}$. Os

autores relatam que a utilização da água e do etanol como solventes são amplamente utilizadas por serem considerados seguros, e em seus ensaios observaram que a extração utilizando água se mostrou mais eficiente na extração de flavonóides proantocianidinas (Taninos condensados), eliminador de radicais livres. Ao avaliar todos os extratos, os autores observaram que na casca do caule de jatobá há a presença de outros compostos secundários como terpenos (sesquiterpenos e diterpenos), alcalóides, antioxidantes e flavonóides.

No presente estudo, foi utilizado água como solvente nos extratos aquosos e hidroetanólicos (70% álcool e 30% água), e em todos os extratos pode se observar a presença de fenóis e flavonóides. A presença do álcool como solvente, corroborou para a extração de alguns compostos não identificados nas análises, dado que confirma o resultado dos autores anteriormente citados, uma vez que dependendo do solvente pode haver o favorecimento da extração de compostos distintos.

As folhas e cascas do jatobá são ricas em terpenos e fenóis com várias atividades biológicas atuando como proteção contra infecções (Marques et al. 2007), ação antimicrobiana (Martins et al. 2000), entre outras. Os resultados do trabalho demonstraram que tanto extrato da casca do caule percolado e aquoso apresentaram pico de absorção próximo a 300nm sendo sugestivo conter derivados de flavonóides. Esses espectros estão de acordo com dados da literatura (Mabry et al. 1970). Já o extrato da casca do fruto indica que os compostos são diferentes da casca do caule apresentando traço de flavonóide e sugestivo de mistura de compostos fenólicos.

Cecílio et al. (2012), encontraram em seus experimentos com culturas de células concentrações antagonistas ao rotavírus, utilizando extratos confeccionados com folhas desidratadas de jatobá. Os autores observaram que o extrato não apresentou citotoxicidade nas células em concentrações de 50 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e em análise de RT-

PCR não foram observadas a replicação do material genômico viral. Assim como em outras estruturas da árvore, anteriormente citado, compostos como flavonóides, taninos e terpenos se mostraram presentes, além de cumarina e saponinas. O resultado apresentado por eles se mostrou promissor uma vez que as células utilizadas em seus ensaios são de primatas, sinalizando que os compostos da planta apresentam concentrações seguras para a manipulação.

Apesar de cada extrato induzir respostas diferentes, foi possível observar que todos apresentaram respostas inibitórias ao oomiceto *S. ferax*. Testes *in vitro* são necessários para avaliar se o mesmo padrão ocorre em outros oomicetos, assim como testes de infecção em outros grupos de organismos aquáticos, para averiguar se os resultados obtidos do presente estudo se estendem *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

Os extratos aquoso e hidroalcolólicos de jatobá foram eficientes na inibição de 100% do crescimento micelial e de zoósporos em concentrações de fenóis contidas nos extratos variando de 0,745 a 3,029 mg.L⁻¹.

As concentrações de fenóis contidas no extrato aquoso de terminália inibiram 100% do crescimento micelial em 1,651 mg fenóis.L⁻¹ e 100% dos zoósporos em 0,826 mg fenóis.L⁻¹ indicando maior sensibilidade dos zoósporos, que é a fase infectante, ao extrato de terminália,

6. APOIO FINANCEIRO

Este estudo recebeu bolsa de mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

7. REFERÊNCIAS

- Ahmed SM, Swamy BM V, Dhanapal PGR, Chandrashekara VM (2005) Anti-diabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. Leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics 41: 36-39
- Ali EH, Hashem M, Al-Salahy MB (2011) Pathogenicity and oxidative stress in Nile tilapia caused by *Aphanomyces laevis* and *Phoma herbarum* isolated from farmed fish. Diseases of Aquatic Organisms 94: 17–28
- Alderman DJ, Polglase JL (1984) A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. Transactions of the British Mycological Society 83: 313–318
- Araujo AP, Santos FWM, Pincinato S, Silva JG (2012) Gestão participativa no comércio de animais aquáticos ornamentais (ensaio). Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV) 10: 6-15
- Alves LDS, Rolim LA, Fontes DAF, Rolim-Neto PJ, La Roca MF, Soares Sobrinho JL (2010) Desenvolvimento de método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. Quim. Nova 33: 1967-1972
- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P (1994) Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. J Pharm Belg 49:462-468
- Baldisserotto B, Gomes LC, Heinzmann BM, Cunha MA (2017) Farmacologia aplicada à aquicultura. Editora Universidade Federal de Santa Maria. Brasil – RS
- Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A, Buschmann AH (2013) Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. Environmental Microbiology 15: 1917–1942
- Calvano TP, Blatz PJ, Vento TJ, Wickes BL, Sutton DA, Thompson EH, White CE, Renz EM, Hospenthal LDR (2011) *Pythium aphanidermatum* Infection following Combat Trauma. Journal of Clinical Microbiology 49: 3710-3713

- Camilo CJ, Nonato CFA, Silva JPA, Rodrigues FFG, Salazar GJT, Costa JGM (2019) Interference of the extract of *Hymenaea courbaril* L. (jatobá) in the antibacterial activity of aminoglycosides. *Interfaces* 8: 372-379
- Carnevia D (1993) *Enfermedades de los peces ornamentales*. Editora: Agrovet S.A. Bueno Aires, Argentina. ISBN: 950-9763-09-8. 319p.
- Cecílio AB, Faria DB, Oliveira PC, Caldas S, Oliveira DA, Sobral ME, Duarte MG, Moreira CP, Silva CG, Almeida VL (2012) Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3): 975-981
- Chyau CC, Ko PT, Mau JL (2006) Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. *LWT – Food Science and Technology* 39:1099-1108
- Claudiano GS, Dias Neto J, Sakabe R, Cruz C, Salvador R, Pilarski F (2009) Eficácia do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*10: 625-636
- El-Rafie1 HM, Hamed MAA (2014) Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four *Terminalia* species. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol* 5: 1-11
- Farmacopeia Brasileira, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010) 5º edição. Página 332. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>
- Farmacopeia Brasileira, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019) 6º edição. Página 873. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>
- Farmer AR, Murray CK, Driscoll IR, Wickes BL, Wiederhold N, Sutton DA, Sanders C, Mende K, Ennis B, Feiq F, Ganesan A, Rini EA, Vento TJ (2015) Combat-related *Pythium aphanidermatum* invasive wound infection: case report and discussion of utility of molecular diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology* 53: 1968-1975
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018) *The State of World Fisheries and Aquaculture – Meeting The Sustainable Development Goals*. Rome 227

- Fuangswat W, Abking N, Lawhavinit OA (2011) Sensitivity comparison of pathogenic aquatic fungal hyphae to sodium chloride, hydrogen peroxide, acetic acid and povidone iodine. *Kasetsart J – NatSci* 45:84–89
- Garcia CS, Ueda SMY, Mimica LMJ (2011) Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 70: 589-598
- Hatai K, Hoshiai G (1992) Mass Mortality In Cultured Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Due To *Saprolegnia parasitica* Coker. *Journal of Wild life Diseases* 28: 532-536
- Hipolito M (2009) Fungos em peixes e anfíbios: diagnóstico, prevenção e tratamento. <http://www.biologico.sp.gov.br/publicacoes/comunicados-documentos-tecnicos/comunicados-tecnicos/fungos-em-peixes-e-anfibios-diagnostico-prevencao-etratamento#:~:text=Fungos%20em%20peixes%20e%20anf%C3%ADbios%3A%20odiagn%C3%B3stico%2C%20preven%C3%A7%C3%A3o%20e%20tratamento,Marcio%20Hipolito&text=Os%20fungos%20s%C3%A3o%20um%20grupo,seu%20pr%C3%B3prio%20alimento%20por%20fotoss%C3%ADntese.> Acessado em: 11/08/ 2020.
- Ibegbulem CO, Eyong EU, Essien EU (2011) Biochemical effects of drinking *Terminalia catappa* Linn. decoction in Wistar rats. *African Journal of Biochemistry Research* 5:237-243
- Islam MT (2008) Secondary metabolites from nonhost plants affect the motility and viability of phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* zoospores. *Zeitschrift für Naturforschung* 63: 233-240
- Johnson TW, Seymour RL, Padgett DE (2002). *Biology and systematic of the Saprolegniaceae.* Disponível em: <<http://dl.uncw.edu/digilib/Biology/Fungi/Taxonomy%20and%20Systematics/Padgett%20Book/>>. Visualizado: 12/03/2019.

- Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu HY (2001) Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Phytotherapy Research* 15: 206-212
- Liu TY, Ho LK, Tsai YC, Chiang SH, Chao TW, Li JH, Chi CW (1996) Modification of mitomycin C-induced clastogenicity by *Terminalia Catappa* L. *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Letters* 105: 113-118
- Ke XL, Wang JG, Gu ZM, Li M, Gong XN (2009) Morphological and molecular phylogenetic analysis of two *Saprolegnia* sp. (Oomycetes) isolated from silver crucian carp and zebra fish. *Mycological Research* 113: 637-634
- Kubitza F (2005) Antecipando-se às doenças na tilapicultura. *Panorama da Aqüicultura* 15: 15-23
- Lau CH, Snook ER, Swinford AK, Bryan LK (2020) *Achlya* sp. Dermatitis in an American Alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Comparative Pathology* 175: 1-4
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB (1970) The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer-Verlag 151-154p
- Machado JL, Rocha JRS (2019) Oomicetos (Oomycota) no Complexo Açude Joana, Pedro II, Piauí, Brasil. *Rodriguésia* 70: 1-17
- Marques LC, Pieri C, Roman-Júnior WA, Cardoso MLC, Milaneze-Gutierrez MA, Mello JCP (2007) Pharmacognostic analysis of the roots of *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 604-615
- Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE (2000) Plantas Medicinais. Viçosa: UFV 220p
- Meneses JO (2017) Nanoterapia e fitoterapia no controle do fungo *Saprolegnia parasitica*. Dissertação de Mestrado, Universidade Tiradentes, Aracaju, BR
- Miller RA, Harbottle H (2018) Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *American Society for Microbiology*. 501-520
- Norberg-King TJ (1993) A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach. Version 2.0. National Effluent Toxicity Assessment

Center. Minnesota. 39 p. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/244957876>> Acesso em: 02/07/2019.

Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM (2002) Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. Editora da Universidade Estadual de Maringá. 2. ed. Maringá.

Pereira LA, Weiss LA, Besen MA, Marengoni NG (2016) Use of plant extracts and their prophylactic or therapeutic properties in the fish production. *Scientia Agraria Paranaensis* 15: 373-380

Perkampus HH (1992) UV-Vis spectroscopy and its applications. Springer-Verlag. Berlin 98p.

Phillips AJ, Anderson VL, Robertson EJ, Secombes CJ, van West P (2007) New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in microbiology* 16:13-19

Rocha SCO, Sandoval-Sierra JV, Diéguez-Uribeondo J, Gonçalves DR, Jerônimo GH, Jesus AL, Marano AV, Pires-Zottarelli CLA. (2016) *Saprolegnia milanezii* sp. nov., a new species of Saprolegniales (Oomycota, Straminipila) from Brazil. *Phytotaxa* 270: 286–294.

Rodrigues, APO, Lima, AF, Alves AL, Rosa DK, Torati LS, Santos VRV (2013). *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimento*. EMBRAPA. 440 p. Brasília, Distrito Federal. INSS 978-85-7035-272-9.

Scotto C, Rondón R, Arriola C, Alvarez F (2019) Determination of medium lethal concentration (LC₅₀) produced by pentahydrate copper sulfate in ten species of freshwater fish bioindicators used in Perú. *Ciencia y Desarrollo* 22:49-57

Shen S, Park O, Lee S, Park C (2002) *In vitro* and *In vivo* Activities of a Biocontrol Agent, *Serratia plymuthica* A21-4, Against *Phytophthora capsici*. *The Plant Pathology Journal*. 18: 221-224

Souza-Ferreira K (2018) Fungicidas no Controle de *Aphanomyces* sp. e Seus Feitos Tóxicos no Desenvolvimento Embrionário do *Danio rerio*. Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento. 43p. Disponível em:

- <<https://www.pesca.sp.gov.br/pos-graduacao/dissertacoes-defendidas/category/46-ano-2018>>. Acesso em: 22/04/2020.
- Souza RFV, Giovani WRF (Part A 2005, 1985) *Spectrochim Acta*. 61.
- Straus DL, Mitchell AJ, Radomski AA, Carter RR, Steeby JA (2009) Laboratory Dose Confirmation of Copper Sulfate for Treating Fungus on Channel Catfish Eggs. *N Am J Aquac* 71:333–338
- Sun Q, Hu K, Yang XL (2014) The Efficacy of Copper Sulfate in Controlling Infection of *Saprolegnia parasitica*. *Journal of the World Aquaculture Society* 45: 220–225
- Swain T, Hillis WE (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10: 63-68
- Tavechio WLG, Guidelli G, Portz L (2009) Alternatives for the prevention and control of pathogens in fish farming. *Boletim Instituto de Pesca* 35: 335 - 341
- Terças AG, Monteiro AS, Moffa EB, Santos JRA, Sousa EM, Pinto ARB, Costa PCS, Borges ACR, Torres LMB, Barros Filho AKD, Fernandes ES, Monteiro CA (2017) Phytochemical Characterization of *Terminalia catappa* Linn. Extracts and Their antifungal Activities against *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology* 8: 1-12
- Valentim APT (2006) Atividade antimicrobiana, estudo fotoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne (jatobá). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 100p. Disponível em:
<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1742/1/arquivo4531_1.pdf>.
Acesso em: 15/07/2019.
- van West P (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20: 99–104
- Veggi PC, Prado JM, Bataglion GA, Eberlin MN, Meireles MAA (2014) Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* 89: 68-77

Walker CA, Van West P (2007) Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews* 21: 10-18

Zambrano CG, Fonseca AOS, Júlia SS, Valente JSS, Braga CQ, Sallis ESV, Azevedo MI, Weiblen C, Santurio JM, Botton AS, Pereira DIB (2017) Isolamento e caracterização de espécies de *Pythium* de ambientes aquáticos no Estado do Rio Grande do Sul e avaliação da patogenicidade em modelo experimental. *Brazilian Journal of Veterinary Research* 37: 459-464