

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Victor Dos Santos Barboza**

**CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-OOMICETO DE**  
**ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS FRENTE**  
*Saprolegnia parasitica.*

Santa Maria, RS  
2018

**Victor Dos Santos Barboza**

**CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-OOMICETO DE  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS FRENTE**

*Saprolegnia parasitica.*

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia aplicada à Produção Animal na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em farmacologia.**

Orientadora: Maria Amália Pavanato

Santa Maria, RS  
2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Barboza, Victor Dos Santos Barboza  
CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI  
OOMICETO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS MEDICINAIS  
BRASILEIRAS FRENTE Saprolegnia parasitica. / Victor Dos  
Santos Barboza Barboza.- 2018.  
47 p.; 30 cm

Orientadora: Maria Amália Pavanato Pavanato  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Oomiceto 2. Óleos essenciais 3. Atividade  
antimicrobiana 4. Salmonídeos 5. Zoósporos I. Pavanato,  
Maria Amália Pavanato II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

---

©2018

Todos os direitos autorais reservados a Victor Dos Santos Barboza. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: victorbarboza10@gmail.com

**Victor Dos Santos Barboza**

**CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-OOMICETO DE  
ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS FRENTE  
*Saprolegnia parasitica*.**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia aplicada à Produção Animal na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em farmacologia**.

**Aprovado em 29, de maio de 2018**

---

**Maria Amália Pavanato, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UFPel) - Parecer**

---

**Érico Silva de Loreto, Dr. (SOBRESP)**

Santa Maria, RS  
2018

## **AGRADECIMENTOS**

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente, pela colaboração, compreensão, dedicação de diversas pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para conclusão deste trabalho e, de maneira especial, agradeço:

- à minha orientadora Maria Amália Pavanato, pela orientação e oportunidade concedida no Programa de Pós- Graduação em Farmacologia Toxicológica, pela confiança depositada em mim.

- ao Bernardo Baldiserrotto, por estabelecer o contato entre os LabFox e Lapemi, que ocasionou a execução deste estudo.

- à Deus por me guiar e iluminar minha caminhada pela vida.

- aos meus colegas do LabFox, pelo incentivo.

- ao meu co-orientador Jânio Santurio e à Francielli de Jesus, por terem me auxiliado desde da execução prática do experimento até a parte com sugestão de leituras.

- à Berta Heinzmann, pela colaboração e parceria no presente estudo

- à Zeli , Secretária do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, que sempre estava à disposição para me atender.

- aos meus amigos (as).

- aos meus pais e irmão, por serem à base de tudo para mim.

Enfim a todos àqueles que fazem parte da minha vida e que são essenciais para eu ser, a cada dia um ser humano melhor.

A Mãe Natureza é um serial killer. Não há melhor que ela. Nem mais criativa. E como todos os outros... Não resiste à tentação de ser pega... Então ela deixa migalhas. Estudamos décadas para reconhecer essas migalhas como pistas. E, às vezes, o que achávamos ser o aspecto mais brutal do vírus... Nada mais é que sua vulnerabilidade. E ela adora disfarçar a fraqueza em força.

(Filme- Guerra Mundial Z)

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-OOMICETO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* E *Ocimum americanum* FRENTE À *Saprolegnia parasitica*.

AUTOR: Victor Dos Santos Barboza  
ORIENTADORA: Maria Amália Pavanato

Objetivou-se caracterizar os óleos essenciais de *Alpinia speciosa* (EOAS), *Eremanthus erythropappus* (EOEE), *Schinus lentiscifolius* (EOSL), *Hesperozygis ringens* (EOHR) e *Ocimum americanum* (EOOA), e investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Saprolegnia parasitica*. zoósporos (estirpe CBS 223.65). A composição dos óleos foi analisada por cromatografia gasosa / espectrometria de massa (CG /MS) utilizando detector de ionização de chama para CG. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio de uma adaptação do método do CLSI M38-A2. Os principais compostos químicos identificados foram: eucaliptol (30,58%) e terpinen-4-ol (20,04%) em EOAS;  $\alpha$ -bisabolol (71,47%) em EOEE; 3-careno (55,51%) e  $\alpha$ -thujone (11,03%) em EOSL; pulegona (88,31%) em EOHR; e linalol (28,96%), eucaliptol (17,83%) e eugenol (16,22%) na EOOA. A concentração inibitória mínima foi  $> 300 \mu\text{g} / \text{mL}$  para EOAS, EOHR e EOOA;  $320 \mu\text{g}/\text{mL}$  para EOEE; e  $160 \mu\text{g}/\text{mL}$  para EOSL. A avaliação da concentração mínima oomicetocidal identificou valores  $> 320 \mu\text{g}/\text{mL}$  para EOAS, EOEE, EOHR e EOOA, enquanto  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  foi a menor concentração letal de EOSL contra *Saprolegnia parasitica*. Os presentes resultados indicam a suscetibilidade de *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65 aos óleos essenciais testados. Este é o primeiro relato da propriedade antioomicótica de EOAS, EOEE, EOSL, EOHR e EOOA contra *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65, indicando que esta classe de produtos naturais poderia ser uma alternativa viável para prevenir e/ou tratar a saprolegniose causada pela *Saprolegnia parasitica*. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a atividade antioomiceto *in vivo*.

**Palavra-chave:** Oomiceto. Óleos Essenciais. Atividade Antimicrobiana. Zoósporos.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF THE ANTIOOMYCETE ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* AND *Ocimum americanum* AGAINST *Saprolegnia parasitica*.

AUTHOR: Victor Dos Santos Barboza

ADVISOR: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Amália Pavanato

This study aimed to characterize the essential oils of *Alpinia speciosa* (EOAS), *Eremanthus erythropappus* (EOEE), *Schinus lentiscifolius* (EOSL), *Hesperozygis ringens* (EOHR) and *Ocimum americanum* (EOOA), and to investigate the *in vitro* antimicrobial activity against *Saprolegnia parasitica* zoospores (strain CBS 223.65). Composition of the oils was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using flame ionization detector for GC. Evaluation of the antimicrobial activity was performed through an adaptation of the method according to the CLSI M38-A2. The main chemical compounds identified were: eucalyptol (30.58%) and terpinen-4-ol (20.04%) in EOAS;  $\alpha$ -bisabolol (71.47%) in EOEE; 3-carene (55.51%) and  $\alpha$ -thujene (11.03%) in EOSL; pulegone (88.31%) in EOHR; and linalol (28.96%), eucalyptol (17.83%) and eugenol (16.22%) in EOOA. The minimum inhibitory concentration was  $>300$   $\mu\text{g/mL}$  for EOAS, EOHR and EOOA; 320  $\mu\text{g/mL}$  for EOEE; and 160  $\mu\text{g/mL}$  for EOSL. Evaluation of the minimum oomycetocidal concentration identified values of  $>320$   $\mu\text{g/mL}$  for EOAS, EOEE, EOHR and EOOA, while 300  $\mu\text{g/mL}$  was found as the lowest lethal concentration of EOSL against *Saprolegnia parasitica*. The present findings indicate the susceptibility of *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65 to the tested essential oils. This is the first report on the antioomycotic property of EOAS, EOEE, EOSL, EOHR and EOOA against *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65, indicating that this class of natural products could be a feasible alternative for preventing and/or treating *Saprolegnia parasitica* caused saprolegniosis. Nonetheless, further studies are required in order to assess the *in vivo* antioomycotic activity.

**Keywords:** Oomycete. Essential Oils. Antimicrobial Activity. Zoospores.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Diagrama esquemático do ciclo de vida de *Saprolegnia parasitica*.....16
- Figura 2-** Lesões necróticas causadas por *Saprolegnia parasitica* em *Oncorhynchus mykiss*.....17
- Figura 3-** Presença de Saprolegnirose em ovos embrionários do *Salmo solar*.....17

## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito

**Table 1-** Chemical composition of the essential oils of *Alpinia speciosa* (EOAS), *Eremanthus erythropappus* (EOEE), *Schinus lentiscifolius* (EOSL), *Hesperozygis ringens* (EOHR) and *Ocimum americanum* (EOOA) obtained by gas chromatography-mass spectrometry.....39

**Table 2-** Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Oomyceticidal Concentration (MOC) of the essential oils of *Alpinia speciosa* (EOAS), *Eremanthus erythropappus* (EOEE), *Schinus lentiscifolius* (EOSL), *Hesperozygis ringens* (EOHR) and *Ocimum americanum* (EOOA) against *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65.....40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
PIB	Produto Interno Bruto
OEs	Óleos essenciais
AS	<i>Alpinia speciosa</i>
EE	<i>Eremanthus erythropappus</i>
SL	<i>Schinus lentiscifolius</i> ,
HR	<i>Hesperozygis ringens</i>
OA	<i>Ocimum americanum</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa de Massas ( <i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> )
CIM	Concentração inibitória mínima
COM	Concentração oomiceticidal mínima
EOAS	Essential oil of <i>Alpinia speciosa</i>
EOEE	Essential oil of <i>Eremanthus erythropappus</i>
EOSL	Essential oil of <i>Schinus lentiscifolius</i>
EOHR	Essential oil of <i>Hesperozygis ringens</i>
EOOA	Essential oil of <i>Ocimum americanum</i>
PDA	Potato Dextrose Agar
<i>S.parastica</i>	<i>Saprolegnia parasitica</i>
EOs	<i>Essentials oils</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concetration</i>
MOC	<i>Minimum Oomyceticidal Concetration</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	15
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1. <i>Saprolegnia parasitica</i> .....	15
3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
<b>4. DESENVOLVIMENTO</b> .....	21
4.1. MANUSCRITO .....	21
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de pescado mundial tem crescido de maneira significativa nas últimas décadas. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO) no período de 2000 até o ano de 2012 a aquicultura cresceu 6,7% no mundo, enquanto que no mesmo período o milho cresceu 4,7% e a avicultura 3,3% (FAO, 2014)

A aquicultura está em constante crescimento global na área de alimentos, atualmente é responsável por mais de 50% da produção total de peixes (FAO, 2012), com uma grande proporção deste oriunda de aquicultura da água doce (WEST, 2006 e FAO, 2012). O Brasil, devido a sua grande área territorial com uma extensa bacia hidrográfica, torna-se um grande potencial para a aquicultura (VICENTE e FONSECA-ALVES, 2013). De acordo, com os últimos dados informados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2014), o país produziu 1,25 milhões de toneladas de peixe, na qual 38% trata-se de peixes cultivados. A atividade aquícola gera aproximadamente um Produto Interno Bruto (PIB) de R\$ 5 bilhões e mobiliza mais de 800 mil profissionais, proporcionando 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos (MPA, 2014).

A aquicultura é fortemente afetada por oomicetos pertencentes a ordem Saprolegniales (*Saprolegnia* spp), causando perdas econômicas de dezenas de bilhões de dólares, como ocorre em peixes de água doce criados em viveiros, como o salmão, a truta, o bagre, e até mesmo de anfíbios (WEST, 2006; VAN DEN BERG et al., 2013). Aproximadamente um em cada dez salmões criado em fazendas de peixes são infectados por *Saprolegnia* spp (WEST, 2006).

Acredita-se ser um dos principais precursores responsável pelo decréscimo na população natural de salmonídeos a nível global (WEST, 2006; BRUNO e WOO, 2011) As infecções causadas por *Saprolegnia parasitica* provoca uma doença chamada saprolegniose, caracterizada por manchas brancas ou cinzentas, crescimento de micélios sobre ovos embrionários, brânquias, pele e barbatanas, capaz de causar necrose celular, bem como danos dérmicos e epidérmicos (WEST, 2006; SCHORNACK et al., 2009). Tais circunstância como oscilações de temperaturas e diminuição de nutrientes por exemplo, prejudica a resposta do sistema imunológico em combater a agressão do oomiceto, acarretando um aumento da mortalidade e redução da reprodutibilidade do animal (BENÉITES et al., 2011; PHILLIPS et al., 2008)

Este oomiceto foi eficientemente controlado pelo uso do verde malaquita. Todavia, no ano de 2002 esta substância química foi proibida para o tratamento, por demonstrar efeitos

carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. Nos dias atuais, o controle terapêutico da saprolegniose é difícil, pois os produtos químicos eficazes tem sua utilização limitada ou banida no setor da aquicultura, como por exemplo os produtos químicos (como verde malaquita, formalina, ou peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio, ácido acético, iodo) e biocidas (Bronopol), por representarem graves problemas nocivos para saúde humana e ambiental (FUANGSAWAT, ABKING e LAWHAVINIT, 2011; SUDOVA et al., 2007; PIRBALOUTI et al., 2009). Há uma alternativa, a remoção manual periódica de ovos infectados que demonstra ser eficaz, contudo esta prática requer um grande esforço humano, pois as circunstâncias do manejo podem danificar os ovos embrionários dos peixes saudáveis (MOREIRA e BARATA, 2005).

Diversos investigadores têm avaliado a possibilidade de utilizar produtos naturais como agentes fungicidas em ovos embrionários de peixes no sistema de aquicultura (MORI et al., 2002; RAI, KAUCHAL e ACHARYA, 2002; TAMPIERI et al., 2003; CHUKANHOM, BORISUTHPETH e HATAI, 2005). Estudos anteriores com produtos naturais, demonstraram os seus efeitos inibitórios sobre *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* (KHOSRAVI et al., 2008).

Uma alternativa promissora frente a crise enfrentada no tratamento de saprolegniose, é a utilização de óleos essenciais. Diante disto, o presente estudo investiga uma nova alternativa para o tratamento da saprolegniose, através da utilização de óleos essenciais à base das plantas *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* e *Ocimum americanum*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar e investigar o potencial dos óleos essenciais de plantas *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* e *Ocimum americanum* para a geração de um produto farmacologicamente ativos e úteis para piscicultura contra a doença saprolegniose, causada por *Saprolegnia parasitica* spp.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os óleos essenciais (OEs) de plantas brasileiras como a “colônia” (*Alpinia speciosa*, AS), “candeia-da- serra” (*Eremanthus erythropappus*, EE), “aroeira-cinzenta” (*Schinus lentiscifolius*, SL), “espanta-pulga” (*Hesperozygis ringens*, HR) e “alfavaca” (*Ocimum americanum*, OA) por Cromatografia Gasosa de Massas (GC-MS).

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da *Saprolegnia parasitica* frente aos OEs de AS, EE, SL, HR e OA.

- Determinar a Concentração Oomicetocida Mínima (COM) da *Saprolegnia parasitica* frente aos OEs de AS, EE, SL, HR e OA.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

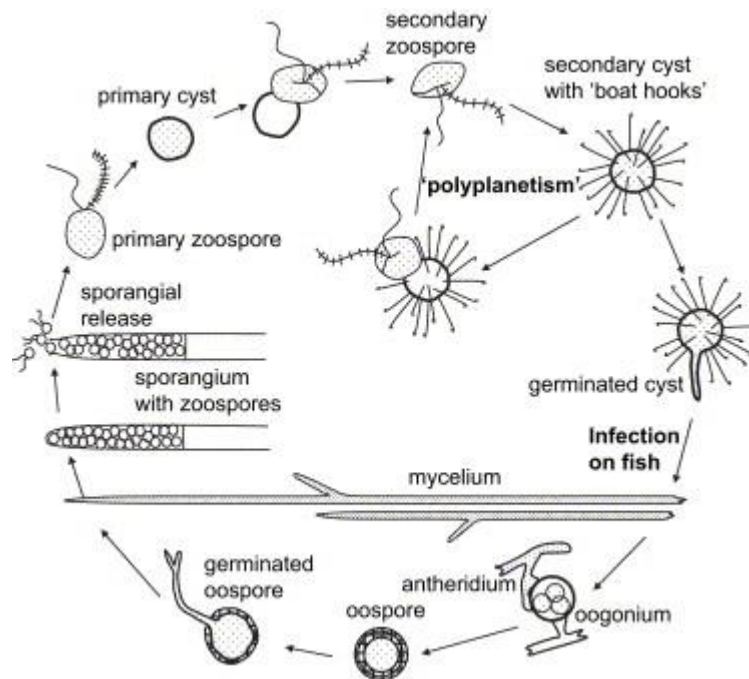
### 3.1. *Saprolegnia parasitica*

*Saprolegnia parasitica* pertence ao reino Eucarionte, filo Stramenopila, classe Oomycetes, ordem Saprolegniales, família Saprolegniaceae, gênero *Saprolegnia*, espécie *Saprolegnia parasitica*, classificado como um oomiceto oportunista, saprotrófico e necrotrófito infectando tanto organismos aquáticos vivos como mortos (STUELAND, HATAI e SKAAR, 2005; JIANG et al., 2013). Sua parede celular consiste em celulose suplementada com  $\beta$ -glucanas, aminoácidos e hidroxiprolina (HENDRIX, 1964).

West (2006), descreve o ciclo de vida de *Saprolegnia parasitica*, composto por uma reprodução assexuada, responsável por dispersão dos zoósporos a fim de encontrar um novo hospedeiro, e uma reprodução sexuada, com o objetivo de permitir a sobrevivência em condições adversas, tais como as oscilações nas temperaturas. A diminuição dos nutrientes circundantes e/ou uma redução drástica na temperatura climática da água, desencadeia um inchaço nas pontas das hifas que formam zoosporângios de *Saprolegnia parasitica*, na qual os zoósporos primários são gerados. Quando as pontas dos zoosporângios eclodem, zoósporos biflagelados são liberados para a água. Os zoósporos encistam e formam cistos primários, que liberam zoósporos secundários. Se esses zoósporos secundários encontrarem um hospedeiro em potencial, cistos secundários serão formados, iniciando a fase germinativa do cisto, que

invadem o tecido do hospedeiro, dando origem ao micélio, o qual fará parte do ciclo assexuado do oomiceto. Todavia, se esses zoósporos secundários não encontrarem um hospedeiro, um ciclo de emergência denominado “poliplantismo” é realizado até que se encontre um possível hospedeiro. Após o completo desenvolvimento do micélio na epiderme do organismo hospedeiro, começa a reprodução e produção de um gametogênio macho e fêmea, que são respectivamente o anterídio e a oogônia, respectivamente. Estes fundem-se através de um tubo de fertilização, ocorrendo a formação de um zigoto chamado de oósporo, capaz de produzir zoósporos primários, conforme descrito na Figura.1.

Figura 1- Diagrama esquemático do ciclo de vida de *Saprolegnia parasitica*.



Fonte:(WEST, 2006, p. 102).

*Saprolegnia parasitica* é responsável por grandes perdas na aquicultura, por se tratar de um patógeno endêmico de peixes de água doce, em particular, sendo um patógeno economicamente importante de peixes em viveiros, como salmão, truta, e bagres (WEST, 2006; VAN DEN BERG et al., 2013). Acredita-se ser um dos principais precursores responsável pelo decréscimo na população natural de salmonídeos a nível global (WEST, 2006 e BRUNO e WOO, 2011). A *Saprolegnia parasitica* provoca uma doença chamada saprolegnoses, frequente na estação do outono, inverno e início da primavera, em consequência da queda da temperatura da água (CERENIUS e SÖDERHÄLL, 1984; URIBEONDO, CERENIUS e



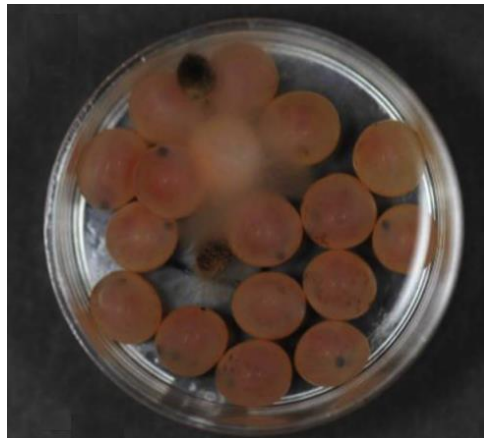
SÖDERHÄLL, 1994; BANGYEEKHUN et al ., 2001 e WEST, 2006), caracterizada por manchas brancas ou cinzentas visíveis do micélio sobre ovos embrionários, brânquias, pele e barbatanas, causando necrose celular, bem como danos dérmicos e epidérmicos(WEST, 2006; SCHORNACK et al., 2009), conforme demonstrado na Figura 2 e Figura 3.

Figura 2- Lesões necróticas causadas por *Saprolegnia parasitica* em *Oncorhynchus mykiss*.



Fonte: (ZOYSA et al, 2017 p. 301).

Figura 3- Presença de Saprolegniose em ovos embrionários do *Salmo solar*.



Fonte: (BERG et al, 2013 p. 37).

Hussein e Hatai (2001) estudando diferentes salmonídeos infectados por *Saprolegnia parasitica* e *Saprolegnia salmonis*, observaram não apenas danos na epiderme, mas que a espécie de oomiceto em questão, produzia hifas capazes de penetrar em tecido muscular e vasos sanguíneos. Nesse estudo as espécies truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), salmão masu (*Oncorhynchus masou*) e truta japonesa (*Salvelinus leucomaenis*) tiveram uma rápida

mortalidade sem aparente formação de tufo filamentosos ao longo do corpo. Também não ocorreram alterações significativas nos parâmetros sanguíneos. Sugerindo assim, a ocorrência de uma infecção rápida e sistêmica ocasionando a morte dos peixes.

Tanto os peixes quanto as ovas são susceptíveis ao patógeno, incluindo animais cultivados, e sabe-se que salmonídeos são os mais sensíveis (BRUNO e WOO, 2011). Sugere-se também que a infecção com esse oomiceto está associado a um fator predisponente, como estresse, lesões mecânicas, problemas higiênicos-sanitários, dentre outros (STUELAND, HATAI e SKAAR, 2005).

O oomiceto *Saprolegnia parasitica* é economicamente um dos mais importantes patógenos de peixes, pois infecta especialmente as espécies de salmões e trutas. Isso faz com que dezenas de milhões de perdas impactem severamente o setor da aquicultura em todo o mundo, principalmente na Escócia, Escandinávia, Chile, Japão, Canadá e Estados Unidos (BLY et al., 1994).

No Japão, há uma taxa de mortalidade anual de 50% no salmão *coho* (*Oncorhynchus kisutch*) devido a infestação do *Saprolegnia parasitica* (BLY et al., 1994; HATAI e HOSHIAI, 1992). Nos Estados Unidos, há um fenômeno denominado "Winter Kill", na qual há inúmeras mortes de peixes de água doce, devido a presença do *Saprolegnia parasitica*, resultando em perdas financeiras de até 50% aproximadamente, o que representa uma perda econômica de US\$ 40 milhões de dólares (BRUNO, WEST e BEAKES, 1999). Na Escócia, saprolegnioses também causa perdas de £ 5 milhões de libras esterlina, nas incubadoras de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) que constituem uma das espécies aquícolas mais valiosas (WEST et al., 2008).

Tradicionalmente a saprolegniose foi eficientemente controlada pelo uso do verde malaquita, no entanto, no ano de 2002 esta substância química foi proibida para tratamento, devido aos seus efeitos indesejáveis sobre a saúde animal (SRIVASTAVA, SINHA e ROY, 2004; STAMMATI et al., 2005). Diante da proibição do verde malaquita, investigações têm sido dirigidas para a descoberta e/ou a melhoria na aplicação em novas alternativas adequadas e eficazes. Apesar de vários substitutos potenciais terem sido sugeridos como seguros para o tratamento, métodos eficazes ecologicamente e economicamente aceitáveis ainda não foram encontrados (WEST, 2006).

O peróxido de hidrogênio, em concentrações de 500-1000 ppm tem sido relatado sendo altamente eficaz, contra *Saprolegnia* spp. nas infecções em ovos embrionários de salmonídeos (MARKING, RACH e SCHREIER, 1994; WATERSTRAT E MARKING, 1995; SCHREIER,

RACH e GEORGE, 1996; BARNES et al., 1998; ARNDT et al., 2001). Todavia, Gaikowski et al. (1998), constataram que um aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio na água, diminuíram a porcentagem de eclosão dos ovos embrionários da *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris).

Estudos científicos utilizando a formalina, demonstraram ser eficaz contra a saprolegnioses (MARKING, RACH e SCHREIER, 1994; WATERSTRAT E MARKING, 1995; SCHREIER, RACH e GEORGE, 1996; BARNES et al., 1998; ARNDT et al., 2001). Contudo, existe um número crescente de preocupações quanto a sua utilização nas indústrias farmacêuticas, em virtude dos riscos que representa para a saúde humana e ambiental (BURKA et al., 1997; MAGARAGGIA et al., 2006) .

Estudos estabelecendo comparações de eficácia entre a formalina e o peróxido de hidrogênio, constataram que formalina parece ser mais eficaz quanto ao peróxido de hidrogênio para o controle de saprolegnioses (RACH et al., 2005; BARNES e SOUPIE, 2006). Uma outra alternativa de tratamento, no caso o cloreto de sódio, parece haver uma concordância geral de que não é tão eficiente como a formalina ou o peróxido de hidrogênio no controle das infecções (MARKING, RACH e SCHREIER, 1994; WATERSTRAT e MARKING, 1995; SCHREIER, RACH e GEORGE, 1996).

Forneris et al. (2003) utilizou ozônio (O<sub>3</sub>) na água como um desinfetante para prevenção aos surtos das infecções de *Saprolegnia parasitica* nas incubadoras de trutas-arco-íris, porém esta estratégia de prevenção demonstrou ser tóxica e ao mesmo tempo reduziu a taxa de eclosão dos ovos embrionários.

Rezinciuc, Sierra e Uribeondo (2014), utilizando o Bronopol no tratamento de saprolegnioses em ovos de truta, constatou uma estirpe de *Saprolegnia australis* resistente ao Bronopol, que trata-se de um produto químico utilizado frequentemente em incubadoras e viveiros de peixes para suprimir infecções causadas por *Saprolegnia* spp.

### 3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS

Como uma alternativa para os fármacos convencionais, plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas em medicina veterinária e humana, e hoje em dia também têm um papel significativo na aquicultura, como agentes profiláticos e terapêuticos contra agentes patogênicos de peixe, apresentando atividade viral, antibacteriana, antifúngica e antiparasítica

(CITARUSU, 2009; SILVA et al., 2010; BUCHBAUER e LANG, 2012; GUPTA e BIRDI, 2017).

Os óleos essenciais são compostos biodegradáveis e devido a seus componentes majoritários naturais são menos propensos a causar o desenvolvimento de resistência microbiana (KULKARNI et al., 2013). Neste intuito podem fornecer uma alternativa viável aos medicamentos convencionais, minimizando as perdas econômicas resultantes das infecções e resistências microbiológicas (TAMPIERI et al., 2003; KHOSRAVI et al., 2012; PARK et al., 2011; DIDINEN et al., 2015).

Os extratos e óleos essenciais de inúmeras plantas tem sido relatados por exercer atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, o que justifica a investigação na medicina tradicional, focado sobre a caracterização de atividade antimicrobiana dessas plantas. Os países como Irã, Índia, Jordânia, Brasil e México, são exemplos de países que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição no uso de plantas medicinais para aplicação antibacteriana e antifúngica. (MENEZES et al., 2016; SHOKRI, 2016; ABU et al., 2016; AURELIO et al., 2016).

KHOSRAVI et al. (2012), avaliou a atividade anti-oomycota de óleos essenciais (OEs) de *Zataria multiflora* (ZM), *Geranium herbarium* (GH) e *Eucalyptus camaldulensis* (EC) no tratamento de ovos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas com *Saprolegnia parasitica*. Constatou-se que nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm, o OE de ZM e EC apresentaram diferenças significativas em comparação com o controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os resultados demonstraram que o verde malaquita utilizado como controle positivo, seguido por ZM, EC, e GH, relataram uma maior eficácia nos testes “*in vivo*” na eclosão dos ovos embrionários de truta arco-íris.

## 4. DESENVOLVIMENTO

### 4.1 MANUSCRITO

Characterization and investigation of the antioomycete activity of essential oils of *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* and *Ocimum americanum* against *Saprolegnia parasitica*.

Enviado para o periódico “Veterinary Microbiology”, sendo assim esse manuscrito se encontra nas normas do mesmo.

**Characterization and investigation of the antioomycete activity of essential oils of *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* and *Ocimum americanum* against *Saprolegnia parasitica*.**

V.D.S. Barboza<sup>a</sup>, F.P.K. Jesus<sup>a,d</sup>, C.G. Pinheiro<sup>c</sup>, A.M. Pereira<sup>e</sup>, B. Baldisserotto<sup>a,b</sup>, B.M. Heinzmann<sup>a</sup>, J.M. Santurio<sup>a,d</sup>, M.A. Pavanato<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Depto. Microbiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>e</sup>Universidade de Ribeirão Preto, Av. Constabile Romano, 2201, 14100-000 Ribeirão Preto, SP, Brazil

\*Corresponding author: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), AV. Roraima n° 1000, Prédio 21, sala 5116, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32209381; Fax.: +55 55 2208241.

*E-mail address:* amaliapavanato@yahoo.com.br (M.A. Pavanato)

**Abstract**

This study aimed to characterize the essential oils of *Alpinia speciosa* (EOAS), *Eremanthus erythropappus* (EOEE), *Schinus lentiscifolius* (EOSL), *Hesperozygis ringens* (EOHR) and *Ocimum americanum* (EOOA), and to investigate the *in vitro* antimicrobial activity against *Saprolegnia parasitica* (strain CBS 223.65). Composition of the oils was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using flame ionization detector for GC. Evaluation of the antimicrobial activity was performed through an adaptation of the method CLSI M38-A2. The main chemical compounds identified were: eucalyptol (30.58%) and terpinen-4-ol (20.04%) in EOAS;  $\alpha$ -bisabolol (71.47%) in EOEE; 3-carene (55.51%) and  $\alpha$ -thujene (11.03%) in EOSL; pulegone (88.31%) in EOHR; and linalol (28.96%), eucalyptol (17.83%) and eugenol (16.22%) in EOOA. The minimum inhibitory concentration was  $>300$   $\mu\text{g/mL}$  for EOAS, EOHR and EOOA; 320  $\mu\text{g/mL}$  for EOEE; and 160  $\mu\text{g/mL}$  for EOSL. Evaluation of the minimum oomycidal concentration identified values of  $>320$   $\mu\text{g/mL}$  for EOAS, EOEE, EOHR and EOOA, while 300  $\mu\text{g/mL}$  was found as the lowest lethal concentration of EOSL against *Saprolegnia parasitica*. The present findings indicate the susceptibility of *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65 to the tested essential oils. This is the first report on the antioomycete property of EOAS, EOEE, EOSL, EOHR and EOOA against *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65, indicating that this class of natural products could be a feasible alternative for preventing and/or treating *Saprolegnia parasitica* caused saprolegniosis. Nonetheless, further studies are required in order to assess the *in vivo* antioomycete activity.

**Key words:** Oomycete, essential oils, antimicrobial activity, zoospores.

## 1. INTRODUCTION

*Saprolegnia parasitica* is the causal agent of saprolegniosis in freshwater fish. The disease is characterized by visible white to grey patches of mycelium on fish eggs, gills, skin and fins, and causes cell necrosis and dermal and epidermal damage, possibly leading to death (West, 2006; Schornack et al., 2009). Control of saprolegniosis is made especially with chemical products that are effective and low cost, such as malachite green, hydrogen peroxide, formalin and bronopol, but have detrimental effect upon fish and human health, and impact the natural environment. The harm associated to the use of such substances prompts search for compounds of natural origin which do not compromise the health status of the fish and do not contaminate the ecosystems (Tampieri et al., 2003; West, 2006; Schornack et al., 2009; Berg et al., 2013).

Essential oils (EOs) and extracts from plants may be a viable alternative to conventional therapies, reducing the economic losses that result from microbiological infections. Such products contain complex mixtures of molecules which may possess antimicrobial activity (Tampieri et al., 2003; Khosavi et al., 2012; Park et al., 2011; Didinen et al., 2015).

A variety of antifungal, antiparasitic and antibacterial activities have been demonstrated for EOs through animal and human research (Silva et al., 2010). Furthermore, EOs are composed of biodegradable substances, and because they have distinct mechanisms of action and different target sites within the microbial cell, they are less likely to induce resistance (Buchbauer and Lang, 2012; Gupta and Birdi, 2017).

The EOs of “colônia” (*Alpinia speciosa*, EOAS) (Braun et al., 2003), “candeia-da-serra” (*Eremanthus erythropappus*, EOEE) (Padalia et al., 2010), “aroeira-cinzenta” (*Schinus lentiscifolius*, EOSL) (Lorenzi and Matos, 2008), “espanta-pulga” (*Hesperozygis ringens*, EOHR) (Toni et al., 2014) and “alfavaca” (*Ocimum americanum*, EOAO) (Sutili et al., 2015)



are obtained at a low-cost and generate low environmental impact. Their effectiveness in the control of saprolegniosis has not yet been studied. In view of the above, the present work aimed at exploring an alternative for the treatment of saprolegniosis through the investigation and assessment of the antioomycete activity of these EOs.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Essential oils extraction*

Leaves of HR and OA were harvested in São Francisco de Assis, Brazil (January 2013), and in São João do Polesine, Brazil (December 2014), respectively. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Departamento de Biologia at UFSM (SMDB 13.427 - HR and 13.163 - OA). Rhizomes of AS, stem wood of EE and leaves of SL were collected in Jardinópolis, Brazil (October 2016). The biological materials were placed in a forced air circulation drying oven at 45 °C for 48 h. Extraction was carried out by hydrodistillation using a modified Clevenger-type apparatus for 3 h.

### *2.2. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*

The EOs were analyzed by GC-MS with an Agilent 6890A gas chromatograph equipped with a 5973C mass selective detector using a non-polar HP5-MS fused silica capillary column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness) and electron ionization mode at 70 eV. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min; the injector and detector temperatures were set at 250 and 280 °C, respectively. Oven temperature was kept at 40 °C for 4 min and then gradually raised to 320 °C at 4 °C/min. Injections were performed in split inlet mode (ratio 1:100). Kovats retention indices were calculated using a homologous series of C7-C31 n-alkanes injected under the same conditions of the samples. The

EOs constituents were identified by comparison of the mass spectra and Kovats retention indices with literature data and with the National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Library (NIST, 2008; Adams, 2009). For quantification of the EOs components, flame ionization detector analysis was performed in an equivalent column and using the same oven parameters as described for GC-MS. Both injection and detection temperatures were set at 300 °C and the split inlet mode ratio was 1:50. The percentage of EOs constituents was calculated by peak area integration (Silvério et al., 2009; Vieira et al., 2014).

### 2.3. *Microrganism and culture*

*Saprolegnia parasitica* strain CBS223.65 was purchased from Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands. Conditions of cultivation and zoospores harvest followed the criteria described in West et al. (2010), with the oomycete being cultivated in Potato Dextrose Agar (PDA) at 18 °C for 5 days.

### 2.4. *Zoosporogenesis of Saprolegnia parasitica CBS 223.65*

The methodology used for zoosporogenesis was based and modified on the procedure described in Stueland et al. (2005), Christopher et al. (2014), Madrid et al. (2015) The sample of *S. parasitica* was cultivated in potato dextrose agar, and the dishes were incubated at 18 °C for 5 days. Subsequently, mycelial plugs were transferred to petri dishes containing 30 mL of induction medium, which was composed by 0,5 mL of solution A [ $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2HPO_4$  in 500 mL of sterile distilled water] and 0,1 mL of solution B [ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CaCl_2$  in 250 mL of sterile distilled water] in 1000 mL of sterile distilled water. The petri dishes were then incubated at 20 °C for 8 h. Regular inspection of the mycelium was performed through optical microscopy (100 and 400 X) on glass microscope slides with cover slips at intervals of

1 h. Upon maturation of zoosporangia and zoospores release, active zoospores were counted in the induction medium with the aid of a Neubauer hemocytometer.

#### 2.5. *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

The test method was based on the M38-A2 CLSI document (Rex et al., 2008) (Zahran et al., 2010) with modifications for evaluation of plant extracts. From the EOs stock solution (initial 1% concentration), ten serial dilutions were prepared in RPMI medium with concentrations ranging from 10,240 to 20  $\mu\text{g/mL}$ . A volume of 100  $\mu\text{L}$  was taken from each dilution of the EOs and added to microdilution plate wells, and an additional 100  $\mu\text{L}$  with the inoculum was put into every well. A positive control (100  $\mu\text{L}$  RPMI and 100  $\mu\text{L}$  inoculum) and a negative control (100  $\mu\text{L}$  RPMI and 100  $\mu\text{L}$  EOs) established *S. parasitica* CBS 223.65. The plates were incubated at 20 °C in an orbital shaker incubator at 40 rpm for 48 h. All tests were performed in triplicate. The results were read within 48 h of incubation and considered presence or absence of the visual hyphal growth. The lowest EOs concentration capable of inhibiting 100% of *S. parasitica* CBS 223.65 growth, compared with the positive control, was considered the MIC.

#### 2.6. *Minimum Oomyceticidal Concentration (MOC)*

The spore germination inhibition test was carried out by agar dilution adapted method (Hu et al., 2013; Madrid et al., 2015). In brief, the *S. parasitica* isolate was grown on PDA plates for 7-14 days, and then the spores were harvested from sporulating colonies and suspended in sterile distilled water. The concentration of spores in suspension was determined using a hemocytometer and adjusted to  $1 \times 10^4$  CFU/mL approximately. The agar plates were prepared with the required concentration of the active samples, added to 10 mL of molten PDA

(about 65 °C). Ten microliters of the spore suspension were spotted in triplicate on these plates, which were then incubated at 20 °C for 72 h. The MOC was defined as the lowest concentration of the EOs which prevented visible growth or germination of spores.

### 3. RESULTS

#### 3.1 Characterization of the essential oils

The amount of chemical compounds found in each oil and the corresponding percentage of identified constituents was: EOAS- 18 (85.38%); EOEE- 6 (88.88%); EOSL- 10 (95.91%); EOHR- 11 (93.90%); and EOOA- 14 (90.93%). The main compounds in each oil were: EOAS- eucalyptol (30.58%), terpinen-4-ol (20.04%), sabinene (6.37%) and carvacrol (3.59%); EOEE-  $\alpha$ -bisabolol (71.47%); EOSL- 3-carene (55.51%),  $\alpha$ -thujene (11.03%),  $\beta$ -pinene (8.00%) and  $\alpha$ -phellandrene (7.32%); EOHR- pulegone (88.31%); and EOOA- linalool (28.96%), eucalyptol (17.83%), eugenol (16.22%) and camphor (12.07%) (Table 1).

#### 3.2 *In vitro* assessment of the antimicrobial susceptibility of *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65 to the essential oils

The MIC capable of inhibiting growth of the oomycete was >300  $\mu\text{g/mL}$  for EOAS, EOHR and EOOA, 320  $\mu\text{g/mL}$  for EOEE and 160  $\mu\text{g/mL}$  for EOSL. As for MOC, values of >320  $\mu\text{g/mL}$  were found for EOAS, EOEE, EOHR and EOOA, and 300  $\mu\text{g/mL}$  for EOSL.

### 4. DISCUSSION

Identification of the compounds present in an essential oil is a requirement for its introduction in human or veterinary medical realm. Characterization of the EO chemical composition may direct the investigations on the biological mechanisms through which the

product acts. Moreover, although EOs are complex mixtures, most of them possess certain constituents that may influence more markedly upon the biological activity (Abu et al., 2016; Menezes et al., 2016; Shokri, 2016; Aurelio et al., 2017).

Most of the major constituents described herein are in accordance with previous results obtained in studies that evaluated the percentages of phenols, monoterpenes and sesquiterpenes, among other compounds which may be found in EOs. The exception was the EOSL, since the main component detected in this assessment, 3-carene, had not yet been reported (Rossini et al., 1996; Pawlowski et al., 2013).

Chemical composition variations may occur especially due to the genetic features of the vegetal species (Amaral et al., 2015). Nonetheless, additional factors as climatic and geographic conditions, part of the plant used for extraction, seasonal period of harvest and analytical methodology may also affect composition (Braun et al., 2003; Burt et al., 2005; Lorenzi and Matos, 2008; Padalia et al., 2010; Toni et al., 2014; Sutili et al., 2015).

Antioomycete activities against *S. parasitica* CBS 223.65 have been found for the EOs tested in the current *in vitro* trials. Satisfactory outcomes were obtained regarding inhibition and growth of the strain, with MICs of 160 µg/mL (EOSL), 320 µg/mL (EOEE) and >320 µg/mL (EOAS, EOHR and EOOA), and MOCs of 320 µg/mL (EOSL) and >320 µg/mL (EOAS, EOEE, EOHR and EOOA).

Complex mixtures of natural origin, as are the EOs, often present biological activities which result from the interaction among their different constituents, with the occurrence of synergistic, additive and/or antagonistic effects (Efferth and Koch, 2011). Some components of the EOs studied herein have already had their isolated antimicrobial activities reported, such as sabinene and eucalyptol (Vimal et al., 2017), terpinen-4-ol (Hac-Wydro et al., 2017) and carvacrol (Marinelli et al., 2018), which were the main constituents found in the EOAS.

Likewise, the sesquiterpene  $\alpha$ -bisabolol (Forrer et al., 2013) and the monoterpene pulegone (Božović and Ragno, 2017), the main compounds detected in the EOEE and in the EOHR, respectively, have had their antimicrobial property reported. Eucalyptol (Vimal et al., 2017), linalool (Park et al., 2012), camphor (Chen et al., 2013) and eugenol (Marinelli et al., 2018), the major constituents of the EOOA, have similarly been reported as possessing antimicrobial action. With regard to the EOSL, it was the investigated oil that presented the most intense activity against the oomycete *S. parasitica*. Interestingly, the EOSL had a high proportion of the monoterpene 3-carene (55%), which has had its antimicrobial potency described (Adal et al., 2017).

The findings presented here agree with former *in vitro* researches which explored the potential of vegetal products, EOs and extracts against pathogenic fungi, and found that some are capable of inhibiting growth or even determine death of *S. parasitica*. Tampieri et al. (2003) tested the extracts of *Origanum vulgare* (EXOV), *Thymos vulgaris* (EXTV) and *Sarcopteryx montana* (EXSM) against *S. parasitica* isolated from skin lesions of *Perca fluviatilis Linnaeus*. The authors described MIC values of 100 ppm for EXOV and EXTV, and 200 ppm for EXSM. Moreover, evaluation of the fungicidal activity of those extracts indicated values of 200  $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$  as the minimal fungicidal concentration. In another study, Gomez and Diler (2014) observed that the EOs of *Origanum onites*, *Satureja tymbra* and *Thymbra spicata* presented antimicrobial activity against strains of *S. parasitica* with MIC values of 10, 100 and 50  $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ , respectively.

Khorsavi et al. (2012) assessed the antioomycotic activity of the EOs of *Zataria multiflora* (EOZM), *Geranium herbarium* (EOGH) and *Eucalyptus camaldulensis* (EOEC) for the treatment of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs infected with *S. parasitica*. There were significant differences for EOZM and EOEC at 1, 5, 10, 25, 50 and 100 ppm when

compared to the negative control. Results also pointed to malachite green, which was the positive control, as the most effective *in vivo* treatment, followed by EOZM, EOEC and EOGH.

Didinen et al. (2015) described a strong antifungal activity at the minimum lethal concentration (MLC) for the essential oil extracted from leaves and flowers of *Satureja cuneifolia* at 250  $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$  and 500  $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$  against *S. parasitica* strains A1 and E1 infecting *O. mykiss* eggs. Another investigation assessed the activity of different EOs and ethanolic extracts against *S. parasitica* isolated from lesions on eggs of *O. mykiss* and found that the EOs of *Thymus daenensis* and *Thymus khuzestanicum* ( $\text{MIC} > 50\% = 0.63 \mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ , and minimum lethal concentration (MLC)  $> 99.9\% = 22 \mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ ), and the ethanolic extracts of *Tanacetum parthenium* and *Mentha longifolia* ( $\text{MIC} > 50\% = 31.25$  and  $62.5 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , and  $\text{MLC} > 99.9\% = 600$  and  $550 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , respectively) were the products to present the highest inhibition (Pirabulout et al., 2009).

## 5. CONCLUSION

Based on the present findings, attention must be especially drawn to the potential of the essential oil of *Schinus lentiscifolius* to treat saprolegniosis. It must also be highlighted that this is the first report on the antioomycotic property of the essential oils of *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* and *Ocimum americanum*. Further studies targeting isolation of the active compounds and elucidation of their mechanisms of action ought to be carried out. Likewise, *in vivo* trials must be performed in order to test these essential oils in fish experimentally infected with *Saprolegnia parasitica*.

## Acknowledgement

This work was supported by Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Abu, D.M.S., Cabral, C., Gonçalves M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Zulfiqar, A., Khan, I.A., Efferth, T., Salgueiro, L., 2016. Chemical Composition and Biological Activities of *Artemisia judaica* Essential Oil from Southern Desert of Jordan. *J. Ethnopharmacol.* 191, 161-168.
- Adal, A. M., Sarker, L. S., Lemke, A. S., Mahmoud, S. S. 2017. Isolation and functional characterization of a methyl jasmonate-responsive 3-carene synthase from *Lavandula x intermedia*. *Plant. Mol. Biol.* v. 93, n. 6, p 641–657.
- Adams, R.P., 2009. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation.
- Amaral, L. P., Tondolo, J. S. M., Schindler B., Silva, D. T., Pinheiro, C. G., LONGHI, S. J., Mallmann, C. A., Heinzmann, B. M. 2015. Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v. 58, n. 1, p. 12-21.
- Aurelio, M.L., Kosegarten, C.E., Ramírez-Corona, N., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A., 2017. Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and



cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. *Int. J. Food. Microbiol.* 240, 115-123.

Berg, A.H.V., McLaggan, D., Uribiondo, J.V., West, P.V., 2013. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fung. Biol.* 27, 33–42.

Božović, M., Ragno, R. 2017. *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its main essential oil constituent pulegone: biological activities and chemistry. *Molecules.* v. 22, n. 2, 290.

Braun, N.A., Meier, M., Kohlenberg., B., Hammerschmidt, F.J., 2003. Two new bisabolene oils from the stem wood essential oil of *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz-Bip (Asteraceae). *J. Essent. Oil. Res.* 15, 139–142.

Buchbauer, G., Lang, G., 2012 A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flav. Frag. J.* 27,13-39.

Burt, S.A., Vlieland, R., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J., 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *J. Food Prot.* 68, 919-926.

Chen, W., Vermaak, I., Viljoen, A. Camphor- A Fumigant during the Black Death and a Coveted Fragrant Wood in Ancient Egypt and Babylon. *Molecules.* v 18, p. 5434-5454, 2013.

Christopher, J.S., Rodrigo, B., Tiehui, W., Gary, J.D., Ida, S., Hugo, M., Vincent B., Pieter V.W., 2014. Role of Pathogen-Derived Cell Wall Carbohydrates and Prostaglandin E2 in Immune Response and Suppression of Fish Immunity by the Oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Infect. Immun.* 82,4518–4529.

Da Silva, A.C.R., Lopes, P.M., DE Azevedo, M.M.B., Costa, D.C.M., Alviano, C.S., Alviano, D.S. 2012. Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers. *Molecules.* v. 17, n. 6, p. 6305-6316.

Didinen, B.S., Metin, S., Diler, O., Terzioglu, S., Gormez, O., 2013. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Satureja cuneifolia* ten essential oil on *Saprolegnia parasitica* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) eggs. *Aquacult. Res.* 45, 1396-1402.

Efferth, T., Koch, E. 2011. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Cur. Drug. Targ.* v. 12, p. 122-132.

Forrer, M., Kulik, E.M., Filippi, A., Waltimo, T. 2013. The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated with halitosis. *Arch. Oral. Biol.* v. 58, n. 1, p. 10-16.

Gormez, O., Diler, O., 2014. *In vitro* antifungal activity of essential oils from *Tymbra*, *Origanum*, *Satureja* species and some pure compounds on the fish pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Aquacult. Res.* 45, 1196–1201.

Gupta, P. D., Birdi, T. J. 2017. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *J. Ayurveda. Interg. Med.* v. 8, n. 4, p. 266-275.

Hac-Wydro K., Flasiński, M., Broniatowski, M., Sołtys, M. 2017. Studies on the behavior of eucalyptol and terpinen-4-ol-natural food additives and ecological pesticides-in model lipid membranes. *Langmuir*, v. 33, n. 27, p. 6916–6924.

Hu, X.G., Liu, L., Yang, X.L, Wang, G.X., 2013. *In vitro* screening of fungicidal chemicals for antifungal activity against *Saprolegnia*. *J. World. Aquacult Soc.* 44, 528–535.

Khosravi, A.R., Shokri, H., Sharifrohani, M., Mousavi, H.E., Moosavi, Z., 2012 Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica* infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Foodborne. Pathog. Dis.* 9, 674–679.

Kishore, N., Mishra, A.K., Chansouria, J.P., 1993. Fungal toxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses*. 36, 211-225.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2008. *Plantas Mediciniais no Brasil - Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 2, 544.

Madrid, A., Godoy, P., González, S., Zaror, L., Moller, A., Werner, E., Cuellar, M., Villena, J., Montenegro, I., 2015. Chemical Characterization and Anti-Oomycete Activity of *Laureliopsis philippianna* Essential Oils against *Saprolegnia parasitica* and *S. australis*. *Molecules*. 20, 8033-8047.

Marinelli, L., Di Stefano, A., Cacciatore, I. 2018. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agentes. *Phytochem. Rev.* p. 1-19, ( in press). [https:// doi.org/10.1007/s11101-018-9569-x](https://doi.org/10.1007/s11101-018-9569-x).

Menezes, I.R.A. Duarte, A.E., Menezes, I.R., Bezerra, M.B.M.F., Leite, N.F., Barros, L.M., Waczuk, E.P., Silva P.M.A., Boligon, A., Rocha, T.J.B., Souza, D.O, Kamdem, J.P., Coutinho, M.H.D., Escobar, B.M., 2016 Antimicrobial Activity and Modulatory Effect of Essential Oil from the Leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on Some Antimicrobial Drugs. *Molecules*. 21, 743.

NIST/EPA/NIH mass spectral library and search/ analysis programs. Hoboken, NJ: J. Willey and Sons, 2010.

Padalia, R.C., Chanotiya, C.S., Sundaresan, V., 2010. Compositional variability in essential oil from different parts of *Alpinia speciosa* from India. *Nat. Prod. Commun.* 5, 279-282.

Park, H.M., Kim, J., Chang, K.S., Kim, B.S., Yang, Y.J., Kim, G.H., Shin, S.C., Park, I.K., 2011. Activity of myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. *J. Med. Entomol.* 48, 405-410.

Park, S. N., Lim, Y. K., Freire, M. O., Cho, E., Jin, D., Kook, J. K. 2012. Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*. v. 18, n. 3, p. 369-372.

Pawlowski, Â., Kaltchuk-Santos, E., Brasil, M. C., Caramão, E. B., Zini, C. A., Soares, G. L., G. 2013. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. *South African J. Bot.* v. 88, p. 198-203.

Pirbalouti, A.G., Taheri, M., Raisse, M., Bahrami, H.R., Abdizadeh, R., 2009. *In vitro* antifungal activity of plant extracts on *Saprolegnia parasitica* from cutaneous lesions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *J. Food. Agricult. Environ.* 7, 94– 96.

Rex, J.H., Alexander, B.D., Andes, D., Arthington S.B., Brown, S.D., Chaturveli, V., Espingel, I.A., Ghannoum, M.A., Knapp, C.C., Motyl, M.R., Ostrosky, Z.L., Pfaller, M., Sheehan, D.J., Walsh, T.J., 2008 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard, 2nd ed. Wayne: M38-A2 CLSI. 28, 1–35.

Rossini, C., Menéndez, P., Dellacasa, E., Moyna, P. 1996. Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *S. lentiscifolius* of Uruguayan origin. *J. Essent Oil Res*, v. 8, n. 1, p. 71-73.

Schornack, E.S., Huitema, E., Cano, L.M., Bozkurt, T.O., Oliva, R., Van, D.M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro, G.A., Farrer, R., Segretin, M.E., Bos, J., Haas, B.J., Zody, M.C., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M., Kamoun, S., 2009 Ten things to know about oomycete effectors. *Mol. Plant. Pathol.* 10, 795–803.

Shokri, H., 2016. A review on the inhibitory potential of *Nigella sativa* against pathogenic and toxigenic fungi. *Avicenna. J. Phytomed.* 6, 21–33.

Silva, N.C.C., Fernandes, J.A., 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 16, 402-413. 2010.

Silvério, M.S., Vieira, D.V.G.; Pinto, M.A.O., Alves, M.S., Sousa, O.V., 2013. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae). *Molecules.* 18, 9785-9796.

Stueland, S.; Hatai, K.; Skaar, I., 2005 Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases.* 28, 445-453.

Sutili, F.J., Silva, L.L., Gressler, L.T., Gressler, L.T., Battisti, E.K., Heinzmann, B.M., Vargas, A.C., Baldisserotto, B., 2015. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: in vitro activity and their use in experimentally infected fish. *J. Appl. Microbiol.* 119, 47-54.

Tampieri, M.P., Galuppi, R., Carelle, M.S., Macchioni, F., Cioni, P.L., Morelli, I., 2003. Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica*. *Pharma. Biol.* 41, 584-591.

Tampieri, M.P., Galuppi, R., Carelle, M.S., Macchioni, F., Cioni, P.L., Morelli, I., 2005. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia.* 159, 339-345.

Toni, C., Becker, A.G., Simões, L.N., Pinheiro, C.G., Lima, S.L., Heinzmann, B.M., Caron, B.O., Baldisserotto, B., 2014. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiol. Biochem.* 40, 701-714.

Vieira, P. R., Morais, S., Bezerra, H.Q.F., Travassos, F.PA., Oliveira, I.R., Silva, M.G.V., 2014. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. *Ind Crop Prod.* 55, 267-271.

Vimal, A., Pal, D., Tripathi, T., Kumar, A. 2017. Eucalyptol, sabinene and cinnamaldehyde: potent inhibitors of *salmonella* target protein L-asparaginase. 3 Biotech, v. 7, n. 4, Article Number 258.

West, P., Bruijn, I., Minor, K.L., Phillips, A.J., Robertson, E.J., Wawra, S., Bain, J., Anderson, V.L., Secombes, C.J., 2010. The putative RxIR effector protein SpHtp1 from the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica* is translocated into fish cells. FEMS. Microbiol. Lett. 1, 127-137.

West, V.P., 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. Mycologist. 8, 99-104.

Zahran, E., Noga, E., 2010. Evidence for synergism of the antimicrobial peptide piscidin 2 with antiparasitic and antioomycete drugs. Fish Dis. 33, 995–1003.

Zhang, J.H., Sun, H.I., Chen, S.Y., Zeng, I., Wang, T.T. 2017. Anti-fungal activity, mechanism studies on  $\alpha$ -phellandrene and nonanal against *Penicillium cyclopium*. Bot. Stud. 58, 458-466.

**Tables.**

**Table 1.** Chemical composition of the essential oils of *Alpinia speciosa* (EOAS), *Eremanthus erythropappus* (EOEE), *Schinus lentiscifolius* (EOSL), *Hesperozygis ringens* (EOHR) and *Ocimum americanum* (EOOA) obtained by gas chromatography-mass spectrometry.

RI Experimental Mean	RI Literature Mean <sup>a, b, c, d</sup>	Chemical Compound	Essential oils				
			EOAS	EOEE	EOSL	EOHR	EOOA
929	925 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Thujene	1.50	-	11.03	-	-
931	930 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Pinene	1.79	-	-	0.28	-
971	973 <sup>a</sup>	Sabinene	6.37	-	-	-	-
985	979 <sup>a, d</sup>	$\beta$ -Pinene	3.47	-	8.00	-	1.34
1001	1007 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Phellandrene	-	-	7.32	-	-
1007	1005 <sup>a</sup>	3-Carene	-	-	55.51	-	-
1014	1021 <sup>a</sup>	2-Carene	1.06	-	-	-	-
1022	1020 <sup>a</sup>	<i>o</i> -Cymene	4.35	-	-	-	-
1022	1027 <sup>a</sup>	Limonene	-	-	0.81	-	-
1026	1026 <sup>a</sup>	$\beta$ -Phellandrene	-	-	6.80	-	-
1027	1030 <sup>a</sup>	Limonene	-	-	-	0.93	1.86
1028	1029 <sup>a</sup>	Eucalyptol	30.58	-	-	-	17.83
1047	1046 <sup>a</sup>	<i>Z</i> - $\beta$ -ocimene	-	-	1.26	-	-
1057	1056 <sup>a</sup>	$\gamma$ -Terpinene	1.57	-	-	-	-
1086	1083 <sup>a</sup>	Terpinolene	-	-	1.54	-	-
1086	1086 <sup>c</sup>	Fenchone	-	-	-	-	1.33
1098	1101 <sup>a</sup>	Linalool	1.52	-	-	0.50	28.96
1141	1143 <sup>a</sup>	Camphor	-	-	-	-	12.07
1173	1177 <sup>a</sup>	Isopulegone	-	-	-	0.41	-
1175	1180 <sup>a</sup>	Terpinen-4-ol	20.04	-	-	-	-
1183	1187 <sup>a</sup>	<i>p</i> -Cymen-8-ol	0.31	-	-	-	-
1189	1190 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Terpineol	1.50	-	-	0.18	2.43
1237	1244 <sup>a</sup>	Pulegone	-	-	-	88.31	-
1290	1291 <sup>a</sup>	Carvacrol	3.59	-	-	-	-
1344	1344 <sup>a</sup>	$\delta$ -Elemene	-	-	-	0.64	-
1355	1351 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Terpineol acetate	-	-	-	0.32	-
1356	1356 <sup>a</sup>	Eugenol	-	-	-	-	16.22
1368	1370 <sup>a</sup>	Cyclosativene	-	-	-	-	-
1376	1375 <sup>a</sup>	Copaene	-	-	-	-	-
1385	1392 <sup>a</sup>	$\beta$ -Elemene	-	-	-	-	-
1400	1399 <sup>a</sup>	Cyperene	-	-	-	-	-
1419	1418 <sup>a</sup>	$\beta$ -Caryophyllene	2.69	-	2.02	-	1.11
1425	1434 <sup>a</sup>	$\beta$ -Cubebene	-	-	-	-	-
1435	1440 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Bergamotene	-	-	-	-	1.84
1442	1452 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Caryophyllene	-	-	-	1.22	-
1469	1471 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Himachelene	-	-	-	-	-
1474	1483 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Selinene	1.06	-	-	-	-
1479	1486 <sup>a</sup>	$\beta$ -Chamigrene	-	-	-	-	-
1482	1481 <sup>a</sup>	Germacrene D	-	-	-	-	2.67
1483	1489 <sup>a</sup>	$\beta$ -Eudesmene	-	-	-	-	-
1486	1494 <sup>a</sup>	Ledene	-	-	-	-	-
1496	1496 <sup>b</sup>	Valencene	-	0.67	1.62	-	-
1500	1491 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Muurolene	-	-	-	-	-
1500	1509 <sup>a</sup>	$\beta$ -Bisabolene	0.27	-	-	-	-

1502	1503 <sup>a</sup>	Z- $\alpha$ -Bisabolene	-	1.77	-	-	-
1506	1497 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Selinene	-	-	-	-	-
1508	1506 <sup>a</sup>	$\beta$ -Bisabolene	-	6.44	-	-	-
1508	1511 <sup>a</sup>	$\gamma$ -Cadinene	1.21	-	-	-	-
1514	1513 <sup>d</sup>	$\alpha$ -Bulnesene	-	-	-	-	0.81
1523	1517 <sup>d</sup>	$\delta$ -Amorphene	-	-	-	-	0.58
1524	1523 <sup>a</sup>	$\delta$ -Cadinene	-	-	-	-	-
1542	1540 <sup>a</sup>	Germacrene B	-	6.62	-	-	-
1543	1539 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Calacorene	-	-	-	-	-
1578	1572 <sup>a</sup>	Ent-Spathulenol	-	-	-	-	-
1579	1578 <sup>a</sup>	Spathulenol	-	-	-	0.22	-
1586	1583 <sup>a</sup>	Caryophyllene oxide	2.51	-	-	0.86	-
1629	1639 <sup>a</sup>	$\delta$ -Cadinol	-	-	-	-	-
1641	1642 <sup>a</sup>	$\tau$ -Cadinol	-	-	-	-	1.82
1655	1652 <sup>a</sup>	$\alpha$ -Bisabolol oxide B	-	1.90	-	-	-
1686	1685 <sup>b</sup>	$\alpha$ -Bisabolol	-	71.47	-	-	-
<b>Total of identified compounds (%)</b>			<b>85.38</b>	<b>88.88</b>	<b>95.91</b>	<b>93.90</b>	<b>90.93</b>

RI=Retention index; <sup>a</sup>NIST, 2010. <sup>b</sup>SILVÉRIO et al., 2013; <sup>c</sup>ADAMS, 2009; <sup>d</sup>VIEIRA et al., 2014.

**Table 2.** Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Oomycetocidal Concentration (MOC) of the essential oils of *Alpinia speciosa* (EOAS), *Eremanthus erythropappus* (EOEE), *Schinus lentiscifolius* (EOSL), *Hesperozygis ringens* (EOHR) and *Ocimum americanum* (EOOA) against *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65.

Essential oils	48 hours	72h
	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	MOC ( $\mu\text{g/mL}$ )
EOAS	>320	>320
EOEE	320	>320
EOSL	160	320
EOHR	>320	>320
EOOA	>320	>320



**Highlights.**

- *In vitro* activity of the Essentials oils of *Alpinia speciose*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens*, *Ocimum americanum* to saprolegniöse.
- Use of essentials oils can be a feasible alternative for treatment of saprolegniöse.
- Pioneer study to treat *in vitro* saprolegniöse with using essentials oils of *Alpinia speciose*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens*, *Ocimum americanum*.

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo constamos uma suscetibilidade da *Saprolegnia parasitica* frente aos óleos essenciais de *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* e *Ocimum americanum*, indicando que esta classe de produtos naturais poderia ser uma alternativa viável para prevenir e/ou tratar a saprolegniose causada pela *Saprolegnia parasitica*. Nossos resultados mostraram também que é o primeiro estudo que relata a propriedade antioomycótica dos óleos essenciais de *Alpinia speciosa*, *Eremanthus erythropappus*, *Schinus lentiscifolius*, *Hesperozygis ringens* e *Ocimum americanum*. Todavia, mais estudos visando o isolamento dos compostos ativos e a elucidação de seus mecanismos de ação devem ser executados. Da mesma forma, ensaios *in vivo* devem ser realizados para testar estes óleos essenciais em peixes experimentalmente infectados com *Saprolegnia parasitica*.

## REFERÊNCIAS

- ALALIBO, T.T. et al. Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. **BioMedCentral Microbiol**, v.46, p. 1-13. Aug, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1192801/>. Acesso em: 04 de jul. 2016. DOI: 10.1186/1471-2180-5-46.
- ARNDT, R.E. et al. Reducing or withholding hydrogen peroxide treatment during a critical stage of rainbow trout development: effects on eyed eggs, hatch, deformities, and fungal control. **North American Journal of Aquaculture**, v.63, n.2, p.161–166. Oct, 2001. Disponível em: < [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/15488454\(2001\)063%3C0161%3AROWHPT%3E2.0.CO%3B2](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/15488454(2001)063%3C0161%3AROWHPT%3E2.0.CO%3B2)>. Acesso em: 29 de mar. 2016. DOI: 10.1577/1548-8454(2001)063<0161:ROWHPT>2.0.CO;2.
- BANGYEEKHUN, E. et al. Characterisation of *Saprolegnia* sp. isolates from channel catfish. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.45, n.1, p. 53–59. May, 2001. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/11927707\\_Characterisation\\_of\\_Saprolegnia\\_sp\\_isolates\\_from\\_channel\\_catfish](https://www.researchgate.net/publication/11927707_Characterisation_of_Saprolegnia_sp_isolates_from_channel_catfish)>. Acesso em: 29 de mar. 2016. DOI: 10.3354/dao045053.
- BARNES, M.E. et al. Observations on hydrogen peroxide control of *Saprolegnia spp.* during rainbow trout egg incubation. **Progressive Fish-Culturist**, v.60, n. 1, p.67–70. July, 1998. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8640%281998%29060%3C0067%3A00HPCO%3E2.0.CO%3B2?journalCode=uzpf20> > Acesso em: 14 de abr. 2016. DOI: 10.1577/1548-8640(1998)060<0067:OOHPCO>2.0.CO;2.
- BARNES, M.E.; SOUPIR, C.A. Evaluation of formalin and hydrogen peroxide treatment regimes on rainbow trout eyed eggs. **North American Journal of Aquaculture**, v.69, n.1, p. 5–10. Jan, 2006. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/A05-080.1>>. Acesso em: 29 de mar. 2016. DOI: 10.1577/A05-080.1.
- BARROS, F.M.C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*). **Química Nova**, v.32, n.4, p.861-867. Mar, 2009. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000400007&script=sci\\_abstract&tlng=ES](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000400007&script=sci_abstract&tlng=ES)>. Acesso em: 31 de maio. 2016. DOI: 10.1590/S0100-40422009000400007.
- BEAKES, G.W. et al. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. **Protoplasma**, v.249, n.1, p. 3–19. Jan, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21424613>>. Acesso em: 04 de abr. 2016. DOI: 10.1007/s00709-011-0269-2.
- BENÉITEZ, F. et al. Differences in susceptibility to *Saprolegnia* infections among embryonic stages of two anuran species. **Oecologia**, v.165, n.3, p. 819-826. Mar, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21197546>>. Acesso em: 29 mar. 2016. DOI: 10.1007/s00442-010-1889-5.

BLY, J.E. et al. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immunity to *Saprolegnia* sp. **Journal Applied Aquaculture**. v.3, n. 1-2, p. 35-50. Feb,1994. Disponível em: < [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J028v03n01\\_04](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J028v03n01_04)>. Acesso em: 28 de abr. 2016. DOI: 10.1300/J028v03n01\_04.

BRUNO, D.W. WEST, V.P.; BEAKES, G.W. *Saprolegnia* and other oomycetes. Fish Diseases and Disorders. Edited by: Woo PTK and Bruno DW. **Wallingford, UK, CAB International**, v.3, p 599-659. Sept, 1999. Disponível em: < <https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20113056442>>. Acesso em: 24 de maio. 2016. DOI: 10.1079/9781845935542.0669.

BRUNO, D.W.; WOO, P.T.K. et al. Viral, bacterial and fungal infections (2nd edn) CABI International, Wallingford, Oxfordshire, **Fish Diseases and Disorders**, v.3, p. 669-720. Feb, 2011. Disponível em: < <https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20113056589>>. Acesso em: 22 de dez. 2016. DOI: 10.1079/9781845935542.0000.

BURKA, J.F. et al. Drug in salmonid aquaculture- a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.20, n.3, p. 333-349. Oct, 1997. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2885.1997.00094.x>>. Acesso em: 31 de maio. 2016. DOI: 10.1046/j.1365-2885.1997.00094.x.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. **Experimental Mycology**, v.8, n.4, p.370-37. Dec, 1984. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/222195448\\_Repeated\\_zoospore\\_emergence\\_from\\_isolated\\_spore\\_cysts\\_ofAphanomyces\\_astaci](https://www.researchgate.net/publication/222195448_Repeated_zoospore_emergence_from_isolated_spore_cysts_ofAphanomyces_astaci)>. Acesso em: 11 de jun. 2016. DOI: 10.1016/0147-5975(84)90061-6.

CHUKANHOM, K.; BORISUTHPETH, P.; HATAI, J. Antifungal activities of aroma components from *Alpinia galanga* against water molds. **Biocontrol Science**, v.10, n.3, p. 105-109. Agu, 2005. Disponível em: < [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio1996/10/3/10\\_3\\_105/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio1996/10/3/10_3_105/_article)>. Acesso em: 11 de jul. 2016. DOI: 10.4265/bio.10.105.

CITARUSU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture Intenational**, v.18, n.1, p. 403-414. Mar, 2009. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-009-9253-7>>. Acesso em: 29 de mar. 2016. DOI: 10.1007/s10499-009-9253-7.

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO.** The State of World's Fisheries and Aquaculture. FAO Information Division. Rome. Italy, 2008. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.htm>>. Acesso em: 14 de ago. 2016.

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO.** The State of World's Fisheries and Aquaculture. FAO Information Division. Rome. Italy, 2010.

Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm>>. Acesso em: 14 de ago. 2016.

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO.** The State of World's Fisheries and Aquaculture. FAO Information Division. Rome. Italy, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>. Acesso em: 14 de ago. 2016.

FORNERIS, G. et al. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. **Aquaculture**, v.21, p. 157–166. May, 2003. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848602005185>> Acesso em: 27 de maio. 2017. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00518-5

FUANGSAWAT, W.; ABKING, N.; LAWHAVINIT, O.A. Sensitivity comparison of pathogenic aquatic fungal hyphae to sodium chloride, hydrogen peroxide, acetic acid and povidone iodine. **Kasetsart Journal of Natural Science**, v.45, n.1, p.84-89. Sept, 2011. Disponível em: < [http://kasetsartjournal.ku.ac.th/kuj\\_files/2011/A1103021414078125.pdf](http://kasetsartjournal.ku.ac.th/kuj_files/2011/A1103021414078125.pdf)>. Acesso em: 27 de jul. 2016. DOI:

GAIKOWSKI, M.P. et al. Toxicity of hydrogen peroxide treatments to rainbow trout eggs. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.10, n.3, p. 241–251. Feb, 1998. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8667%281998%29010%3C0241%3ATOHPPT%3E2.0.CO%3B2>>. Acesso em: 27 de jul. 2016. DOI: 10.1577/1548-8667%281998%29010%3C0241%3ATOHPPT%3E2.0.CO%3B2. GRIFFIN, D.H. In Lower Fungi in the Laboratory; Fuller, M.S., Ed.; **University of Georgia: Athens, GA, USA**, p. 67–68. 1978.

HATAI, K.; HOSHIAI, G. Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* coker. **Journal Wildlife Diseases**, v.28, n.4, p. 532-536. Oct, 1992. Disponível em: < <http://www.jwildlifedis.org/doi/abs/10.7589/0090-3558-28.4.532?code=wdas-site>>. Acesso em: 29 de mar. 2016. DOI: 10.7589/0090-3558-28.4.532.

HENDRIX, J.W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**, v.144, p.1028-1029. May, 1967.

HUSSEIN, M.M.; HATAI, K.; NOMURA, T. Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan. **Journal Wildlife Diseases**, v.37, n.1, p. 204-207. Jan, 2001. Disponível em: < <http://www.jwildlifedis.org/doi/abs/10.7589/0090-3558-37.1.204>>. Acesso em: 08 de jul. 2016. DOI: 10.7589/0090-3558-37.1.204.

JIANG, R.H.J., et al. Distinctive expansion of potential virulence genes in the genome of the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica*. **PLoS Genetics**, v.9, n. 6, p. e1003272. June, 2013. Disponível: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003272>>. Acesso em: 18 de dec. 2017. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003272.

KHOSRAVI, A.R. et al. *Zataria multiflora* cream for the treatment of acute vaginal candidiasis. **International Journal Gynecology Obstetrics**, v.101, p. 201–202. May, 2008. Disponível em: < <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.ijgo.2007.11.010>>. Acesso em: 17 de fev. 2016. DOI: 10.1016/j.ijgo.2007.11.010.

MAGARAGGIA, M. et al. Treatment of microbiologically polluted aquaculture waters by a novel photochemical technique of potentially low environmental impact. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 8, n. 9, p. 923-931. July, 2006. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2006/em/b606975d#!divAbstract>>. Acesso em: 29 de mar. 2016. DOI: 10.1039/B606975D.

MARKING, L.L.; RACH, J.J.; SCHREIER, T.M. Evaluation of antifungal agents for fish culture. **Progressive Fish-Culturist**, v.56, p. 225–231. Jan, 1994. Disponível em: < [https://www.umesc.usgs.gov/documents/publications/1994/marking\\_a\\_1994.html](https://www.umesc.usgs.gov/documents/publications/1994/marking_a_1994.html)>. Acesso em: 20 de abr. 2016. DOI: 10.1577/1548-8640(1994)056<0225:AFSEOA>2.3.CO;2.

**Ministério da Pesca e Aquicultura- MPA.** Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Dez, 2014. Acesso em: 23 de abr. 2016.

MOREIRA, P.L.; BARATA, M. Egg mortality and early embryo hatching caused by fungal infection of Iberian rock lizard (*Lacerta monticola*) clutches. **Journal Herpetological**, v.15, p. 265-272. Apr, 2005. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/233623889\\_Egg\\_mortality\\_and\\_early\\_embryo\\_hatching\\_caused\\_by\\_fungal\\_infection\\_of\\_Iberian\\_rock\\_lizard\\_Lacerta\\_monticola\\_clutches](https://www.researchgate.net/publication/233623889_Egg_mortality_and_early_embryo_hatching_caused_by_fungal_infection_of_Iberian_rock_lizard_Lacerta_monticola_clutches)>. Acesso em: 18 de abr. 2016.

MORI, T. et al. Antifungal activities of plant extracts against some aquatic fungi. **Biocontrol Science**, v.7, p. 187–191. Feb, 2002.

NEISH, G.A. Observations on saprolegniasis of adult sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). **Journal Fish Biology**, v.10, p. 513-522. May, 1977. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04084.x>>. Acesso em: 19 de mar. 2016. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1977.tb04084.x.

PHILLIPS, A.J. et al. The New insights into animal pathogenic oomycetes. **Trends in Microbiology**, v.16, n.1, p.13–19. Jan, 2008. Disponível em: < [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(07\)00245-4](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(07)00245-4)>. Acesso em: 07 de jul. 2016. DOI: 10.1016/j.tim.2007.10.013.

RACH, J.J. et al. Efficacy of hydrogen peroxide versus formalin treatments to control mortality associated with saprolegniasis on lake trout eggs. **North American Journal of Aquaculture**, v.67, p.148–154. Dec, 2005. Disponível em: < <https://pubs.er.usgs.gov/publication/70029029>>. Acesso em: 06 de maio. 2016. DOI: 10.1577/A04-062.1.

RAI, M.K.; KAUSHAL, S.L.; ACHARYA, D. *In vitro* effect of five *Asteraceous* essential oils against *Saprolegnia ferax*, a pathogenic fungus isolated from fish. **Antiseptic**, v.99, n.4, p. 136–137. May, 2002.

REZINCIUC, S.; SIERRA, J.V.S.; URIBEONDO, J.D. Molecular identification of a bronopol tolerant strain of *Saprolegnia australis* causing egg and fry mortality in farmed brown trout, *Salmo trutta*. **Fungal Biology**, v.117, p. 591–600. July, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614613001761?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 de abr. 2016. DOI: 10.1016/j.funbio.2013.11.01.

SCHREIER, T.M.; RACH, J.J.; GEORGE, E.H. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. **Aquaculture**, v.140, n.4, p.323–333. Apr, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004484869501182X>>. Acesso em: 06 de abr. 2016. DOI: 10.1016/0044-8486(95)01182-X.

SRIVASTAVA, S.; SINHA, R.; ROY, D. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v.66, n.3, p. 319–329. Feb, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X03002169?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 de fev. 2016. DOI: 10.1016/j.aquatox.2003.09.008.

STAMMATI, A. et al. Effects of malachite green and its major metabolite, leucomalachite green, in two human cell lines. **Toxicology In Vitro**, v.19, n.7, p. 853–858. Oct, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233305001335?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 de fev.2016. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.021.

STUELAND, S.; HATAI, K.; SKAAR Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, v.28, n.8, p.445-453. Aug, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.2005.00635.x>>. Acesso em: 19 de nov. 2016. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2005.00635.x.

URIBEONDO, J.D.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Repeated zoospore emergence in *Saprolegnia parasitica*. **Mycological Research**, v.98, n.7, p. 810–815. Jule, 1994. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756209810605>>. Acesso em: 29 de mar. 2016. DOI: S0953756209810605.

VICENTE, I.S.T.; FONSECA-ALVE, C.E. Impact of Introduced Nile tilapia (*Oerochromis niloticus*) on Non-native Aquatic Ecosystems. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.16, n.3 p. 121-126. Nov, 2013. Disponível em: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2013.121.126>>. Acesso em: 07 de jan. 2016. DOI: 10.3923/pjbs.2013.121.126.

WATERSTRAT, P.R.; MARKING, L.L. Clinical evaluation of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride for the treatment of *Saprolegnia parasitica* on fall Chinook salmon eggs.

**Progressive Fish-Culturist**, v.57, n.4, p. 287–291. Jan, 1995. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1577/1548-8640%281995%29057%3C0287%3ACCEOFH%3E2.3.CO%3B2>> Acesso em: 18 de jul. 2016. DOI: 10.1577/1548-8640(1995)057<0287:CCEOFH>2.3.CO;2.

WHISLER, H.C. Identification of *Saprolegnia* spp. Pathogenic in Chinook Salmon. 1996, Washington, D.C, US, **Department of Energy**, p.43. Apr, 1996. Disponível em: <[http://docs.streamnetlibrary.org/BPA\\_Fish\\_and\\_Wildlife/02836-2.pdf](http://docs.streamnetlibrary.org/BPA_Fish_and_Wildlife/02836-2.pdf)> Acesso em: 03 de ago. 2016.

ZOYSA, M. et al. *Saprolegnia parasitica* Isolated from Rainbow Trout in Korea: Characterization, Anti-*Saprolegnia* Activity and Host Pathogen Interaction in Zebrafish Disease Model. **Mycology**, v.45, n.4, p. 297-311. Dec, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5780361/>>. Acesso em: 07 de jan. 2018. DOI: 10.5941/MYCO.2017.45.4.297.