



Mobile access

Artigo

Submetido 09 fev 2023

Aceito 20 fev 2023

Publicado 15 mar 2023

Autor Correspondente

R.V.B. Silva

ruana.bomfim@gmail.com

ISSN

2357-8068

URL

actapesca.com

DOI da Revista

[10.46732/actafish](https://doi.org/10.46732/actafish)

Indexadores/Diretórios

Sumários

<http://www.sumarios.org>

Miguilim

<https://miguilim.ibict.br/>

Diadorim

Diadorim.ibict.br

Latindex

www.latindex.org

OPEN ACCESS

EFEITO DO ÓLEO DE *Moringa oleifera* SOBRE O PATÓGENO PISCÍCOLA *Saprolegnia parasítica*

Effect of oil from the *Moringa oleifera* on the fish pathogen *Saprolegnia parasítica*

Ruana Vitória Bomfim Silva¹ , Higo Andrade Abe² , Paulo Roberto Gagliardi³
Lucicleide Souza Bomfim⁴ & Carolina Nunes Costa Bomfim⁵ ^{1,4,5}Departamento de Engenharia de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal de Sergipe - UFS²Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Nilton Lins - UniNilton³Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe - UFS

RESUMO

Moringa oleifera é uma planta com muito potencial para este fim, devido suas propriedades antimicrobianas. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a ação do óleo de sementes de *M. oleifera* sobre o fungo *Saprolegnia parasítica* que provoca a doença fúngica mais importante em peixes dulcícolas. Para tanto, as sementes foram coletadas das vagens em estado maduro e submetidas ao processo de extração a frio via prensa mecânica. Uma cepa de *S. parasítica* foi utilizada como cultura de teste pelo método bioanalítico "in vitro" em meio BDA (Batata, Dextrose e Agar). O óleo foi emulsificado pelo método de baixa energia, com surfactante e água, e vertido nas placas com meio nas concentrações dos tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento casualizado com 5 tratamentos (0, 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mL/L), todos em 5 repetições, mantidos a uma temperatura de 24°C. As placas foram observadas a cada 24 horas durante 96 horas para a medição do crescimento micelial. Até as 48 horas, foi observada redução no crescimento em 0,25mL/L, intensificando em níveis de 0,5; 0,75 e 1,0mL/L. Em 72 horas os tratamentos controle e o tratamento de 0,25mL/L não se diferenciaram entre si, mas foram diferentes dos outros tratamentos. Porém, após 96 horas todos atingiram extensão total. Portanto, o óleo de sementes de *M. oleifera* apresenta atividade fungistática sobre o fungo *S. parasítica*, em concentrações superiores a 0,25mL/L.

Palavras-chave: Saprolegniose, o patógeno piscícola, aquicultura, fitoterápico.

ABSTRACT

Moringa oleifera is a plant with great potential for this purpose, due to its antimicrobial properties. In this context, the objective was to evaluate the action of *M. oleifera* seed oil on the fungus *Saprolegnia parasítica*, which causes the most important fungal disease in freshwater fish. For this purpose, the seeds were collected from the pods in a ripe state and submitted to a cold extraction process via mechanical press. A strain of the *S. parasítica* was used as test culture by the bioanalytical method "in vitro" on BDA (Potato, Dextrose and Agar) medium. The oil was emulsified by the low energy method, with surfactant and water, and poured onto the plates with medium at the concentrations of the treatments. The experiment was conducted in a randomized design with 5 treatments (0, 0.25, 0.50, 0.75, and 1.0 mL/L), all with 5 repetitions, maintained at a temperature of 24°C. The plates were observed every 24 hours for 96 hours for mycelial growth measurement. By 48 hours, a reduction in growth was observed at 0.25mL/L, intensifying at levels of 0.5; 0.75, and 1.0mL/L. In 72 hours, the control treatments and the 0.25mL/L treatment did not differ, but were different from the other treatments. However, after 96 hours all reached full extension. Therefore, *M. oleifera* seed oil shows fungistatic activity on the fungus *S. parasítica* at concentrations higher than 0.25mL/L.

Keywords: Saprolegniosis, fish pathogen, aquaculture, phytotherapeutic.

INTRODUÇÃO

A aquicultura tem se destacado como uma das principais atividades produtoras de alimento do mundo. Com crescimento relevante de 5,7%, chegou a alcançar uma produção histórica de 122,6 milhões de toneladas em 2020 (FAO, 2022).

No entanto, o aumento da produção está associado a preocupação quanto a sanidade dos peixes, visto que já foram constatadas diversas doenças de grande impacto negativo em pisciculturas (Fujimoto *et al.*, 2019). Dentre estas, a “saprolegniose” tem sido notória e considerada a patologia fúngica mais importante, principalmente em peixes de água doce (Van west, 2006; Pavanelli *et al.*, 2008, Van De Berg *et al.*, 2013).

A *Saprolegnia* spp. é um Oomiceto aquático que afeta de forma relevante a sanidade dos peixes, bem como seus ovos e larvas, tanto em cultivo quanto em ambiente natural (VanWest, 2006; Thoen *et al.*, 2011; 2016). E acomete drasticamente o cultivo de organismos aquáticos, e causando danos econômicos significativos. Foram relatados danos drásticos em pisciculturas de salmônídeos e redução da sobrevivência em ovos de esturjão pela infecção deste agente patogênico (Corrêa *et al.*, 2013; Moghaddam *et al.* 2012).

Os peixes apresentam-se mais vulneráveis a saprolegniose no inverno, quando seu sistema imunológico se encontra comprometido devido as baixas temperaturas (Bly & Clem, 1992). Este Oomiceto é diretamente ligado ao stress do ecossistema e pode ser um patógeno secundário de outras doenças infecciosas de peixes, portanto é considerado um parasita oportunista (Neish *et al.*, 1980; Zaki *et al.*, 2008).

A infecção ocorre pelo crescimento do micélio na superfície corporal e brânquias dos peixes. Em geral possui coloração branca e semelhança ao algodão e causa lesões principalmente por enzimas que as hifas secretam, digerindo as células do indivíduo e causando necroses (Kubitza, 2014).

O controle de saprolegniose é geralmente realizado com uso de produtos químicos nos cultivos de peixes, porém, alguns destes são considerados tóxicos, limitando as alternativas de tratamento. Sendo assim, se fazem necessários estudos para identificar métodos eficazes e viáveis ecologicamente e economicamente. Desta forma, a utilização da fitoterapia tem se destacado como método alternativo eficiente no tratamento destes patógenos (Macchioni *et al.*, 1999; Ben Khemis *et al.*, 2016), como por exemplo a *Moringa oleifera*.

Esta espécie vegetal apresenta crescimento rápido, distribuição ampla por regiões subtropicais e tropicais e valor significativo devido aos seus diversos usos medicinais, como por exemplo a atividade antimicrobiana contra patógenos (Korni *et al.*, 2019; Ramachandran *et al.* 2014).

Foi observado em diversos estudos, que componentes como isotiocianato de 4 (a-L-Rhamnosiloxi) benzil, lectina coagulante purificada, taninos e ácidos graxos presentes nas sementes da planta tem efeito antifúngico em várias espécies patogênicas (Eilert *et al.* 1981; Oliveira *et al.* 2017; Simões *et al.* 2017; Chuang *et al.* 2007). Neste contexto, o presente estudo propõe o desenvolvimento de uma alternativa para tratamento de uma patologia que acomete organismos aquáticos, a Saprolegniose.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia e Pós Colheita do Departamento de Engenharia Agrônômica da UFS, município de São Cristóvão, estado de Sergipe. Para tanto, foram coletadas sementes de *M. Oleifera* localizado a partir das coordenadas 10°58'26.2"S 37°04'21.5"W. As sementes maduras foram retiradas das vagens, higienizadas e separadas para o processo de extração. Para a obtenção do óleo das sementes de *M. Oleifera* foi utilizada uma prensa mecânica de pressão de 40 a 65 bar para extração exaustiva do óleo.

Uma cepa do fungo *Saprolegnia parasitica* isolada de tambaqui *Colossoma macropomum* em BDA (Batata - Dextrose - Agar) foi doada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, para posterior repicagem e utilização como cultura de teste.

O óleo de moringa foi emulsificado pelo método de baixa energia, sendo composto por 15% de óleo, 15% de surfactante (Tween-80) e 70% de água (v:v:v), que foram agitados em vórtex por 6 minutos e vertidos nas placas contendo meio nas concentrações dos tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (0,25, 0,50, 0,75 e 1.0 mL/L) mais o controle composto apenas por meio de cultura, 5 repetições cada um, mantidos a temperatura de 24°C. As placas foram observadas a cada 24 horas, durante 96 horas para a medição do crescimento micelial do fungo.

Cada concentração foi adicionada em 10mL de meio de cultura (BDA) a 40°C que foram distribuídas em placas *Petri*. Posteriormente, um disco de 11 mm de meio de cultura com o fungo (*Saprolegnia parasitica*) foi inoculado no centro de cada placa e então foi observado o crescimento micelial a cada 24h durante 96h por meio de medida dos diâmetros e raios perpendiculares do halo de crescimento com uso de um paquímetro (adaptado de Corrêa *et al.*, 2013). Com os dados foi calculado o IVC (Índice de Velocidade

de Crescimento Micelial) expresso em mm/dia, utilizando-se para tanto a fórmula: $IVCM = (D - Da) / N$ (Araújo *et al.*, 2008), onde: D: Diâmetro médio atual; Da: Diâmetro médio anterior; N: número de dias após a repicagem; e a concentração mínima inibitória (CMI).

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Foram realizadas as análises do teor e identificação dos constituintes do óleo que foram obtidos em equipamento CG-EM/CG-DIC (GC-2010 Plus; GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas usando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (polissiloxano 5 %-difenil-95 %-dimetil polissiloxano) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.), 0,25- μ m de espessura de filme, em um fluxo constante de hélio (99,999 %) com taxa de 1,2 miligramas por mililitro.

Foi utilizado um volume de injeção de 1 μ L (10 miligramas por mililitro), com uma razão de *split* de 1:30. A programação de temperatura do forno utilizada foi a partir de 60° C (isoterma durante 1 min), com um aumento de 5° C / min, à 300° C, finalizando com uma isoterma de 10 min a 300°C.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e ao teste de Bartlett para verificação da normalidade e homogeneidade, respectivamente. Os valores de mortalidade serão transformados em arco seno raiz de X e log (x+1). Posteriormente, serão submetidos à análise de variância (Anova) e sendo F significativo às médias serão comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante 24 e 48 horas de avaliação foi observado que a utilização do óleo de moringa reduziu o crescimento micelial a partir de 0,25mL/L, sendo mais intensificado em níveis de 0,5; 0,75 e 1,0mL/L (24h= Controle 40,69 \pm 1,15a; 0,25mL/L 35,96 \pm 2,28b; 0,50mL/L 32,82 \pm 2,13c; 0,75mL/L 34,09 \pm 0,95bc; 100mL/L 32,57 \pm 1,85c. 48h = Controle 73,49 \pm 2,80a; 0,25mL/L 66,49 \pm 2,20b; 0,50mL/L 61,68 \pm 2,48c; 0,75mL/L 62,88 \pm 2,92c; 100mL/L 61,67 \pm 2,49c) (Figuras 1 e 2).

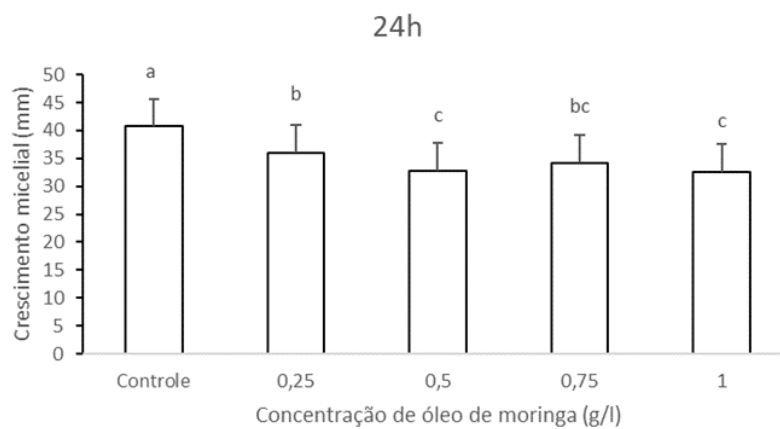


Figura 1. Dados das medidas do halo de crescimento micelial do fungo *Saprolegnia parasitica* em 24 horas.

Em 72 horas de crescimento o tratamento controle e o tratamento contendo 0,25mL/L não se diferenciaram entre si (Controle 81,28 \pm 1,78a; 0,25mL/L 82 \pm 1,51a), mas foram diferentes dos tratamentos 0,5; 0,75 e 1,0mL/L (76,99 \pm 2,38b; 77,66 \pm 2,56b; 76,83 \pm 2,81b respectivamente) (Figura 3).

Segundo Chuang *et al.*, (2007) após 24 horas, células fúngicas tratadas com extrato bruto de sementes de *M. oleifera* foram rompidas e os seus componentes foram danificados, no entanto, estes componentes não vazaram. Tanto o óleo quanto extratos de sementes de *M. oleifera* apresentaram efeitos antifúngicos nas espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. Xoccosum* e *M. kennels*, o que pode fundamentar os resultados inibitórios do óleo sobre o fungo *Saprolegnia spp.* No presente estudo, após 96 horas todos os fungos atingiram a total extensão da placa, o que configura um efeito fungistático.

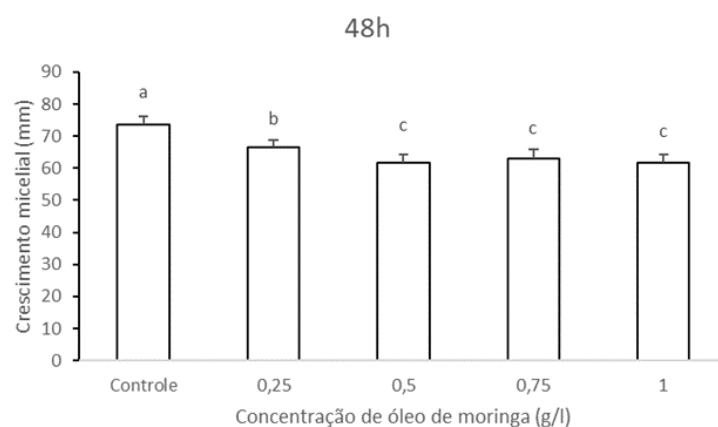


Figura 2. Dados das medidas do halo de crescimento micelial do fungo *Saprolegnia parasitica* em 48 horas.

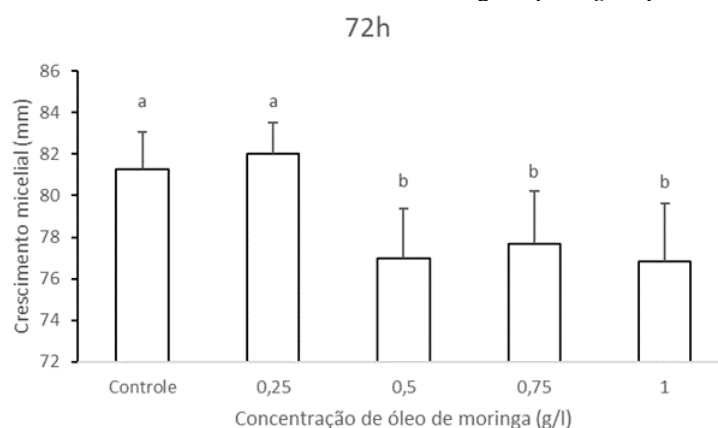


Figura 3. Dados das medidas do halo de crescimento micelial do fungo *Saprolegnia parasitica* em 72 horas.

A partir de análises cromatográficas de Corrente Iônica Total - TIC, foram identificados os seguintes ésteres metílicos: palmítico (16:0), palmítoleico (16:1), oleico (18:1), estearato (18:0), eicosenoico (20:1), araquídico (20:0), behênico (22:0), lignocérico (24:0) (Tabela 1). Destes, os ácidos oleico, Behenico e palmítico apresentaram maiores concentrações (20.38%, 5.25% e 4.30% GC-MS, respectivamente).

Estudos indicam que o ácido hexadecanóico também conhecido como ácido palmítico, encontrado em diversas espécies vegetais tem o potencial de suprimir o crescimento de espécies de fungos do gênero *Cândida*, bem como das espécies *Alternaria solani* e *A. erithrocephalus*. (Agoramoorthy *et al.*, 2007; Abubacker e Deepalakshmi, 2013). Chandrasekaran *et al.*, (2011) também descreveram a eficiência antibacteriana e antifúngica dos ésteres metílicos oleico (cis-9-Octadecanoico) e palmítico (hexadecanóico) no fungo *Candida albicans* e nas bactérias *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus*, *Klebsiella pneumoniae*.

O óleo de sementes de *Moringa oleifera* apresenta atividade fungistática “*in vitro*” sobre o fungo *S. parasitica*, em concentrações superiores a 0,25ml/L, todavia novos trabalhos devem ser realizados a fim de elucidar seus efeitos sobre os peixes.

Tabela 1. Cromatograma da Corrente Iônica Total (TIC) dos ésteres metílicos presentes no óleo.

TR (min)	Tempo de retenção	Composto	%GC-MS
33.650		Éster metílico do ácido palmítoleico (C16:1)	0.99
33.942		Ester metílico do Ac. Hexadecanóico (C16:0) (Palmitico C16:0)	4.30
36.825		Ester metílico do ácido cis-9-Octadecanoico (C18:1) (Oleico C18:1)	20.38
36.908		Co-eluição	
37.150		Ester metílico do Ac. Octadecanoico (C18:0) (Esteárico C18:0)	3.82
39.800		Ester metílico do Ac. 9-Eicosanóico (C20:1) (Eicosenoico C20:1)	2.46
40.092		Ester metílico do Ac Eicosanóico (C20:0) (Araquídico C20:0)	2.89
42.892		Ester metílico do Ac Docosanóico (22:0) (Behenico C22:0)	5.25
46.075		Ester metílico do Ac. Tetracosanoico (Lignocérico C24:0)	0.95

REFERÊNCIAS

- Agoramoorthy, G. Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V. & Hsu, M.J. (2007). Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 739-742. doi 10.1590/S1517-83822007000400028.
- Abubacker, M.N. & Deepalakshmi, T. (2013). In vitro Antifungal Potentials of Bioactive Compound Methyl Ester of Hexadecanoic Acid Isolated from *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaves. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10(2), 879-884. doi 10.13005/bbra/1211.
- Ben Khemis, I.; Besbes Aridh, N.; Hamza, N.; M'Hetli, M. & Sadok, S. (2016). Antifungal efficacy of the cactaceae *Opuntia stricta* (Haworth) prickly pear ethanolic extract in controlling pikeperch *Sander lucioperca* (Linnaeus) egg saprolegniasis. *J. Fish Dis.*, 39, 377–383. doi 10.1111/jfd.12356.
- Bly J.E & Clem L.W. (1992). Temperature and teleost immune functions. *Fish & Shellfish Immunology*, 2, 159-171. doi 10.1016/S1050-4648(05)80056-7.
- Chandrasekaran, M. Senthilkumar, A. & Venkatesalu, V. (2011). Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 775-780. doi 10.1016/S1050-4648(05)80056-7.
- Chuang, P.H., Lee, C.W., Chou, J.Y., Murugan, M., Shieh, B.J. & Chen, H.M. (2007). Atividade antifúngica de extratos brutos e óleo essencial de *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology*, 98 (1), 232-236. doi 10.1016/j.biortech.2005.11.003
- Fujimoto, R.Y.; Hide, D.M.V.; Paixão, P.E.G.; Abe, H.A.; Dias, J.A.R.; Sousa, N.C. ... & Maciel, P.O. (2019). Fauna parasitária e relação parasito-hospedeiro de tambaquis criados na região do Baixo São Francisco, nordeste do Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(2), 563-570. doi 10.1590/1678-4162-10306
- Korni, F.M.; El-Ela, F.I.A. & Moawad, U.K. (2019). Role of *Moringa oleifera* leaves and aqueous extract in prevention of Motile Aeromonas Septicemia in common carp, *Cyprinus carpio* fingerlings with a reference to histopathological alterations. *Aquaculture International*, doi 10.1007/s10499-019-00452-9
- Macchioni, F.; Perrucci, S.; Flamini, G.; Cioni, P.L. & Morelli, I. (1999). Antimycotic activity against *Saprolegnia ferax* of extracts of *Artemisia verlotorum* and *Santolina etrusca*. *Phytother Res*, 13, 242-244; 1999. doi 10.1002/(SICI)1099-1573(199905)13:3<242:AID-PTR422>3.0.CO;2-3.
- Moghaddam, A.A.; Hajimoradloo, A.; Ghiasi, M. & Ghorbani, R. (2012). In vitro inhibition of growth in *Saprolegnia* sp. isolated from the eggs of Persian Sturgeon *Acipenser persicus* (Pisces: Acipenseriformes) by *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC: 1430). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 11(2): 245-252, Disponível em <https://aquadocs.org/handle/1834/10474>
- Nardoni, S.; Najar, B.; Fronte, B.; Pistelli, L. & Mancianti, F. (2019). In Vitro Activity of Essential Oils against *Saprolegnia parasitica*. *Molecules*, 24(7), 1270. doi 10.3390/molecules24071270.
- Neish, G. A., & Hughes, G. C. (1980). *Fungal disease of fishes*. TFH Publ. Inc., Neptune.
- Nunes, L.P.S.; Cardoso-Filho, F.C.; Costa, A.P.R. & Muratori, M.C.S. (2015). Monitoramento de fungos micotoxígenos em peixes cultivados, na água e substrato de viveiros em fazendas. *Acta Veterinaria Brasilica*, 9(3), 199-204, doi 10.21708/avb.2015.9.3.4765
- Oliveira, B.F. (2017). Desenvolvimento, purificação e caracterização de IgC anti-lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL). [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Pernambuco.
- Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M. (2008). *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Maringá: Eduem.
- Ramachandran C.; Nivatha S.; Lavanya K. & Usha A. (2014). *Moringa oleifera*: a plant with multiple medicinal uses and food preservative. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 3:69-72, doi 10.21708/avb.2015.9.3.4765

- Sarowar, M.N.; van den Berg, A.H.; McLaggan, D.; Young, M.R. & van West, P. (2013). *Saprolegnia* strains isolated from river insects and amphipods are broad spectrum pathogens. *Fungal Biol.*, 117, 752-763. doi 10.1016/j.funbio.2013.09.002
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2017). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed.
- Tohen, E.; Evensen, Ø.; Skaar, I. (2016). Factors influencing *Saprolegnia* spp. spore numbers in Norwegian salmon hatcheries. *J. Fish Dis.*, 39, 657-665. doi 10.1111/jfd.12392
- Tohen, E.; Evensen, O. & Skaar, I. (2011). Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *J. Fish Dis.* 34, 601-618. doi 10.1111/j.1365-2761.2011.01273.x
- VanWest, P. (2006). *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: New challenges for an old problem. *Mycologist* ,20, 99-104. doi 10.1016/j.mycol.2006.06.004
- Zaki M.S; Fawzi O.M & El-Jackey J. (2008). Pathological and biochemical studies in tilapia nilotica infected with *Saprolegnia parasitica* and treated with potassium permanganate. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 3:677-80. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237610551>