UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

NANOTERAPIA E FITOTERAPIA NO CONTROLE DO FUNGO *Saprolegnia parasitica*

JULIANA OLIVEIRA MENESES

Aracaju

Março - 2017

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

NANOTERAPIA E FITOTERAPIA NO CONTROLE DO FUNGO *Saprolegnia parasitica*

Dissertação de Mestrado submetido à banca examinadora para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração Ambiente, Desenvolvimento e Saúde.

JULIANA OLIVEIRA MENESES

Orientadores:

Rodrigo Yudi Fujimoto, Dr.

Juliana Cordeiro Cardoso, Dra.

Aracaju

Março - 2017

Meneses, Juliana Oliveira

M543n Nanoterapia e fitoterapia no controle do fungo saprolegnia parasitica. / Juliana Oliveira Meneses ; Orientação [de] Profª. Drª. Juliana Cordeiro Cardoso, Prof. Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto – Aracaju: UNIT, 2017.

97 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes.

Inclui bibliografia.

1. AgNP-PVA. 2. Terminalia catappa. 3. Fungicida. 4. Fungistático. 5. Nanopartícula de prata. I. Cardoso, Juliana Cordeiro. (orient.) II. Fujimoto, Rodrigo Yudi. (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 615.322.03:582.28

NANOTERAPIA E FITOTERAPIA NO CONTROLE DO FUNGO *Saprolegnia parasitica*

Juliana Oliveira Meneses

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO AMBIENTE, DESENVOLVIMENTO E SAÚDE.

Aprovada por:

_____

Rodrigo Yudi Fujimoto, Dr.
Orientador

_____

Juliana Cordeiro Cardoso, Dra.

Orientadora

_____

Luiz Pereira da Costa, Dr.

Universidade Tiradentes

_____

Maria Nogueira Marques, Dra.

Universidade Tiradentes

_____

Rubens Riscala Madi, Dr.

Universidade Tiradentes (suplente)

Aracaju

Março - 2017

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e meu anjo da guarda, por ter me permitido chegar até aqui, sem eles eu nada seria.

À minha família e amigos, por estarem ao meu lado em todos os momentos difíceis e me ensinar a superá-los.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho”.

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças principalmente em momentos que fraquejei, sem ele nada disso estaria acontecendo.

Ao meu anjo da guarda, que me livrou de algumas mas ainda assim me colocou para desviar de muitas pedras e fez com que eu me tornasse a Juliana que sou hoje.

À minha família, que é a base de tudo e faz com que os momentos difíceis sejam apaziguados sempre. Meu pai Eu te amo, você é e sempre será meu xodó.Eu consegui!!!!Minha mãe, uma mulher super sensata e que quando eu já não aguentava mais sempre estava ali oferecendo um ombro amigo. E minhas irmãs Geo, Mah e Luh, apesar de chatas rsrs, quando chegava angustiada tentavam me fortalecer.

À toda a minha família, tios e tias, primos e primas e avôs e avós, que não estão mais presentes mas que fizeram parte da formação do meu caráter.

Aos meus amigos. Laís por sempre estar ao meu lado seja em momento de tristeza ou alegria, você sempre esteve por perto. E gente importante é isso ne? Sempre me dando ajuda também nas coisas da dissertação. Te amo!!! Layanne, Leila, Jessyca, apesar da minha ausência amo vocês!!!E não vale fazer aquela pergunta de sempre agora: Vamos sair? Ou vai dizer que tem artigo, projeto para entregar amanhã? kkkk

À minha amiga/irmã/companheira de trabalho Fê. Obrigada por sempre estar ao meu lado, seja nas horas boas e ruins. Até porque mesmo quando estávamos ferradas ainda assim conseguíamos rir da situação, ou chorar ne? Ah foi muito choro nessa jornada. Que pressão!!!!!!Te amo!

À minha amiga distante, Lua. Obrigada pelas conversas e pelos conselhos. Te amo.

Às minhas amigas de infância, Ana Paula e May. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Amo vocês.

Ao casal top, Carina e Lucas. Obrigada pelas conversas e saídas.

À Marina, amigona que a UFS me presenteou. Obrigada maga por todos conselhos e palavras de força que você sempre me deu. Te amo!!!

Às minhas eternas professoras e amigas, Ana Cristina e Juliana Schober. Amo vocês e obrigada por sempre acreditarem em mim e por terem feito parte da minha formação.

Ao Joel e Higo, que apesar de eu ter conhecido a pouco tempo já moram em meu coração e fizeram os meus dias na Embrapa mais engraçados. “Vamos tomar um tacacá pow kkkk”.

Aos “Novinhos” da Embrapa, Iaiá, Rafa, Rayanne, Estevam, obrigada!!!!Iaiá, obrigada por me aguentar e por me fazer rir diversas vezes!!!

Aos mais antigos também, Natal, Val, Peterson e Ruana. Muito obrigada pela ajuda nos trabalhos.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros pela infraestrutura fornecida para realização de todo o trabalho e a todos funcionários que colaboraram de alguma forma.

Ao Chico, técnico da Embrapa, pelos ensinamentos e por ter me aguentado em momentos de agonia. Valeu, Chicovisk!!!

Ao professor Rodrigo pelos ensinamentos durante esses 4 anos de jornada (Iniciação científica e Mestrado). Obrigada.

À Unit, UFS, ITP, ITPS pela estrutura e todos que me ajudaram: Bruno, Gui, Bia, professora Marla, Victor, Leonardo. Obrigada, foi muito bom conhecer vocês.

À professora Marla, que muito solícita, me ajudou de todas as formas na identificação da amendoeira. Obrigada professora!!

Ao professor Luiz, o cara das nanopartículas de prata – AgNPs, OU!!!-Juliana basta AgNP rsr (Sabe o que acho? Acho é pouco!!!Dizia ele quando eu ia conversar dos meus problemas!!!kkk), que me foi apresentado em um ótimo momento e que me ensinou muito nesses meses. Obrigada pelas conversas e ajudas. Serei eternamente grata.

Ao Victor, que me ajudou muito na espectroscopia de UV-Vis. Obrigada pela sua disponibilização e pela paciência.

À mulher e professora mais sensata que já conheci nos últimos tempos, Juliana Cardoso!!!Obrigada por todo apoio e por confiar em mim em todo esse tempo, você me ensinou muito!!!!!!!

Ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente e todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos que fiz na Pós, Flah, Dani, Ana Karina, Gregorina, Bruno, André e todos os outros que contribuíram de alguma forma no meu caminho até aqui.

À Michelle que me orientou nestes últimos meses e me ensinou a ser forte e desvias dos obstáculos. Você foi fundamental!

E finalmente à Capes que concedeu a bolsa para que fosse possível manter o meu estudo.

Mais uma vez obrigada!!!!!

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo obter, caracterizar e avaliar o efeito do extrato aquoso de *Terminalia catappa* e de nanopartículas de prata (AgNP) no controle do fungo *Saprolegnia parasitica in vitro*. O extrato de *T.catappa* foi produzido por dois métodos (extração a quente e em temperatura ambiente e caracterizados por HPLC, já as AgNP foram sintetizadas por diferentes métodos e caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES). Após a formulação e caracterização dos produtos, realizou-se experimentos *in vitro* para o controle do fungo *S. parasitica.* Foram realizados experimentos *in vitro* em meio sólido e meio líquido. No primeiro experimento em meio sólido avaliou-se 4 concentrações de extrato, 2 tipos de meio de cultura (com ou sem antibiótico) e 2 temperaturas para extração (quente ou ambiente). De posse dos resultados um experimento em meio líquido foi realizado com 4 concentrações de extrato a quente, 4 tempos de exposição e 2 tipos de meio de cultura. Já as AgNP produzidas pelos diferentes métodos foram testadas *in vitro* em meio sólido avaliando 4 concentrações, 2 tipos de meio de cultura e 3 repetições. De acordo com os dados deste experimento, foi realizado um outro teste avaliando em meio sólido a eficácia do PVA e AgNP-PVA no controle micelial. Nesta etapa utilizou-se 4 formulações, dois tipos de meio de cultura e 3 repetições. Em todos os testes avaliou-se o crescimento micelial e para verificar a ação fungicida ou fungistática, os micélios expostos aos produtos foram realocados para meio de cultura isentos dos produtos e avaliados durante 96 h. Ainda as AgNP foram avaliadas em meio líquido, com o fungo sendo exposto a mesma proporção do teste em meio sólido, sendo utilizados 4 tempos de exposição, 4 formulações, dois tipos de meio e três repetições. O teste de Tukey e teste t pareado foram as análises estatísticas utilizadas. Como resultado, o ácido gálico e elágico foram identificados nos extratos, mas o extrato a quente apresentou maiores teores. Em teste *in vitro* em meio sólido com extrato à 10 $g.L^{-1}$, foi mais eficaz e esta concentração a quente com antibiótico foi fungicida, já em meio líquido, 5 $g.L^{-1}$ foi eficaz e com ação fungicida. Com relação a produção de AgNP a banda plasmon foi em torno de 396 a 420 nm e as partículas apresentavam-se em escala nanométrica de 4,9 a 6,8 nm. Dentre os métodos de produção de AgNP avaliados, o tratamento de 10^{-3} mM de AgNP-PVA foi mais eficaz no controle micelial. A AgNP-PVA 300 mg em meio sólido e líquido mostrou-se mais eficaz durante as 96 h, independente do meio de cultura. O extrato aquoso a quente de *T. catappa* e a AgNP-PVA são eficazes no controle de *Saprolegnia parasitica in vitro.*

Palavras-chave: AgNP-PVA; *Terminalia catappa*; Fungicida; Fungistático; Nanopartícula de prata.

ABSTRACT

The present study aims to produce, characterize and evaluate *in vitro* the extract aqueous of *Terminalia catappa* and silver nanoparticles (AgNP) on fungus *Saprolegnia parasitica*. The extract of *T. catappa* were produced by two methods (hot and room temperature extraction) and characterized by HPLC and the AgNP were synthesized by different methods and characterized by spectroscopy of UV-Vis, transmission electron microscopy (TEM), plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). After the formulation and characterization of products, *in vitro* bioassays were performed to *S. parasitica* control. *In vitro* tests in solid and liquid medium were performed. The firts experiment in solid medium was conducted with 4 extract concentrations, 2 culture medium (with and without antibiotic) and 2 extractions (hot and RT). Further the next assay were performed in liquid medium constituted by 4 concentration of *T. catappa* hot extraction, 4 exposure times and 2 types of culture medium. The AgNP produceds by different methods were tested *in vitro* on solid media with 4 concentrations, 2 culture medium and 3 replicates. According to this experiment data, another *in vitro* solid medium test with PVA and AgNP-PVA was performed in the micelial control. Four formulations, two medium culture and 3 replicates was used in this assay. In all tests the micelial growth was evaluated to confirm fungicidal and fugistatic effects. For that the micelials exposure on extract were realocated for culture medium without products and evaluated for 96 h. The AgNP also in liquid medium with the fungus exposed to the same treatments of the previous assay on solid medium. For this, 4 exposure times, 4 formulations, two medium and three replicates were used. Tukey test and paired t test were the estatistic analysis used. In the results, the gallic and ellagic acid were identified in the extracts, but the hot extract presented higher concentration. In the *in vitro* test solid medium with extract at 10 $g.L^{-1}$ was the most effective and this concentration extracted by hot temperature and antibiotic adiction was fungicidal. In liquid medium, 5 $g.L^{-1}$ was effective and presented fungicidal action. In relation to AgNP production, the plasmon band was around 396 - 420 nm and the particles presented nanometric scale of 4.9 to 6.8 nm. In the AgNP production methods evaluated, 10^{-3} mM treatment of AgNP-PVA was more effective on micelial control. The AgNP-PVA 300 mg in solid and liquid medium showed to be more effective throughout 96 h, regardless of the culture medium. The hot aqueous extract of *T. catappa* and AgNP-PVA are effective for the *Saprolegnia parasitica* control.

Keywords: AgNP-PVA; *Terminalia catappa*; Fungicidal; Fungistatic; Silver Nanoparticle.

SUMÁRIO

RESUMO.....ix

ABSTRACT.....x

LISTA DE TABELAS xiii

LISTA DE FIGURAS.....xv

LISTA DE ABREVIATURAS.....xvi

1. INTRODUÇÃO.....17

2. OBJETIVOS.....18

2.1 Objetivo geral.....18

2.2 Objetivos específicos.....18

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....19

3.1 Saprolegniose.....19

3.2 Nanotecnologia.....21

3.3 Nanopartículas de prata.....21

3.4 Síntese e caracterização das nanopartículas de prata.....22

3.5 Atividade antifúngica das nanopartículas de prata.....24

3.6 *Terminalia catappa* e sua atividade antifúngica.....26

3.7 Compostos ativos do extrato aquoso de *T. catappa*.....28

4. MATERIAL E MÉTODOS.....30

4.1 Identificação e depósito do material botânico.....31

4.1.1 Produção do extrato aquoso de *Terminalia catappa*.....31

4.1.2 Caracterização dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência.....32

4.2 Produção das nanopartículas de prata (AgNP) 33

4.2.1 Síntese de AgNP-PVA (Álcool polivinílico).....34

4.2.2 Síntese de AgNP-BORO (Boro hidreto de sódio).....34

4.2.3 Síntese de AgNP-CIT (Citrato de sódio).....34

4.3 Caracterização das AgNP.....35

4.3.1 Espectroscopia de UV-Visível.....35

4.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....35

4.3.3 Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES).....35

4.4 Ensaio *in vitro* 36

4.4.1 Isolamento do fungo 36

4.4.2 Identificação da espécie do fungo.....36

4.4.3 Atividade antifúngica *in vitro* dos compostos em meio sólido.....36

4.4.4 Atividade antifúngica *in vitro* dos compostos em meio líquido.....37

4.4.5 Comparação da atividade antifúngica do PVA e AgNP-PVA 38

4.5 Análises estatísticas.....40

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....53

ARTIGO 1 53

ARTIGO 2.....68

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....88

7. ANEXOS.....89

LISTA DE TABELAS

Tabelas (Dissertação)

Tabela 1. Métodos de extração da folha de *Terminalia catappa* descritos na literatura.

Tabela 2. Gradiente de eluição realizado na análise cromatográfica (HPLC).

Tabelas (Artigo 1)

Tabela 1. Análise granulométrica de folhas de *Terminalia cat*appa trituradas.

Tabela 2. Interação entre concentração e forma de extração aquosa de folhas de *T. catappa* (em TA e a quente) em teste *in vitro* com *Saprolegnia parasitica.*

Tabela 3. Interação entre concentração do extrato aquoso de *T. catappa* e meio (sem antibiótico e com antibiótico) em teste *in vitro* com *Saprolegnia parasitica*.

Tabela 4. Interação entre concentração, meio e extrato aquoso de *T. catappa* ao longo do tempo (96 h) em teste *in vitro* com *Saprolegnia parasitica*.

Tabela 5. Efeito fungistático e fungicida dos diferentes extratos utilizados em teste *in vitro* em meio sólido sob *Saprolegnia parasitica*.

Tabela 6. Interação entre concentração do extrato aquoso de *T. catappa* e período de 96 h de subsequente do disco ao extrato em teste *in vitro* em meio líquido com *Saprolegnia parasitica*.

Tabelas (Artigo 2)

Tabela 1. Interação entre concentração e tempo em teste *in vitro* de AgNP-PVA 30 mg sob *Saprolegnia parasitica.*

Tabela 2. Interação entre meio e tempo em teste *in vitro* de AgNP-PVA 30 mg sob *Saprolegnia parasitica.*

Tabela 3. Interação entre meio e tempo em teste *in vitro* da AgNP-BORO sob *Saprolegnia parasitica*.

Tabela 4. Interação entre meio e tempo em teste *in vitro* da AgNP-CIT sob *Saprolegnia parasitica*.

Tabela 5. Interação entre formulação e meio em teste *in vitro* em meio sólido sob *Saprolegnia parasitica*.

Tabela 6. Interação entre a formulação utilizada e o tempo em teste *in vitro* com álcool polivinílico e nanopartículas de prata sob *Saprolegnia parasitica* em meio sólido.

Tabela 7. Efeito fungicida e fungistático das formulações utilizadas em teste *in vitro* em meio sólido sob a *Saprolegnia parasitica*.

Tabela 8. Interação entre formulação e meio em teste *in vitro* em meio líquido sob *Saprolegnia parasitica*.

LISTA DE FIGURAS

Figuras (Dissertação)

Figura 1. Foto digital de exemplar de *Terminalia catappa* e suas folhas.

Figura 2. Estrutura química do ácido gálico.

Figura 3. Estrutura química do ácido elágico.

Figura 4. Estrutura química da punicalagina e da punicalina.

Figura 5. Exsicata da espécie *Terminalia catappa L.*

Figura 6. Fotos digitais do experimento *in vitro* meio líquido.

Figuras (Artigo 1)

Figura 1: Cromatogramas do extrato aquoso em TA e a quente de *Terminalia catappa* (254 nm).

Figuras (Artigo 2)

Figura 1. A. Espectros de UV-Vis de AgNP-BORO ao longo do tempo; B. Coloração de AgNP-BORO ao longo do tempo; C. Imagem de microscopia eletrônica de AgNP-BORO; B: Histograma de distribuição de tamanho de AgNP-BORO. Contagem feita por amostragem em várias imagens da amostra.

Figura 2. A. Espectros de UV-Vis de AgNP-CIT ao longo do tempo; B.Coloração de AgNP-CIT ao longo do tempo; C. Imagem de microscopia eletrônica de AgNP- CIT; D. Histograma de distribuição de tamanho de AgNP-CIT. Contagem feita por amostragem em várias imagens da amostra.

Figura 3. A. Espectros de UV-Vis de AgNP-PVA 30 mg ao longo do tempo; B. Coloração de AgNP-PVA 30 mg ao longo do tempo; C. Imagem de microscopia eletrônica de AgNP-PVA 30 mg; D. Histograma de distribuição de tamanho de AgNP-PVA 30 mg. Contagem feita por amostragem da imagem.

Figura 4. A. Espectros de UV-Vis de AgNP-PVA 300 mg ao longo do tempo; B. Coloração de AgNP-PVA 300 mg ao longo do tempo; C. Imagem de microscopia eletrônica de AgNP-PVA 300 mg; D. Histograma de distribuição de tamanho de AgNP-PVA 300 mg. Contagem feita por amostragem da imagem.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNP – Nanopartícula de prata

AgNP-BORO – Nanopartícula de prata sintetizada com borohidreto de sódio

AgNP-CIT - Nanopartícula de prata sintetizada com citrato de sódio

AgNP-PVA – Nanopartícula de prata sintetizada com álcool polivinílico

BDA – Batata dextrose ágar

CIT – Citrato de sódio

DAD – Detector de arranjo de diodo

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

DMSO – Dimetilsulfóxido

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

ICP-OES – Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado

ITP – Instituto de Tecnologia e Pesquisa

ITPS – Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe

MIC – Concentração inibitória mínima

PTFE – Politetrafluoretileno

PVA – Álcool ponivilínico

PVP – Polivinilpirrolidona

RPS – Ressonância de plasmon de superfície

RT –Tempo de retenção

TA –Temperatura ambiente

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão

UFS – Universidade Federal de Sergipe

Unit – Universidade Tiradentes

UV-Vis – Ultravioleta-visível

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por peixes tem contribuído para o impulso no desenvolvimento da piscicultura. Devido a esse aumento de produção, o limiar de equilíbrio entre o patógeno, hospedeiro e ambiente pode ser quebrado proporcionando surtos de doenças com altas taxas de mortalidade dos peixes cultivados. Dentre as doenças de grande impacto na piscicultura, destacamos a saprolegniose, causada pelo gênero *Saprolegnia* sp., o mais importante fungo que infecta peixes de água doce capaz de se instalar e desenvolver em qualquer lesão na superfície do hospedeiro, além de ocasionar perdas massivas levando muitos piscicultores a prejuízos econômicos (WILLOUGHBY, 1985; WILLOUGHBY; ROBERTS, 1992; VAN WEST, 2006; PAVANELLI *et al*., 2008, VAN DE BERG *et al*., 2013).

Estima-se que 10% dos salmões cultivados são dizimados por infecções por *Saprolegnia* e as perdas são estimadas em dezenas de milhões de dólares anualmente. Além do dano causado a aquicultura, o declínio de populações naturais de salmonídeos também tem sido atribuído a estas infecções (VAN WEST, 2006; PHILLIPS *et al*., 2008). No Brasil, a saprolegniose causa altas mortalidades nos peixes nativos, principalmente na fase de reprodução e larvicultura, assim como após manejos errôneos (MARTINS *et al*., 2002; KUBTIZA, 2005; CORRÊA *et al*., 2013).

Apesar dessa problemática, atualmente não existem produtos químicos legalizados para o controle de doenças fúngicas para a aquicultura nacional. Assim, a nanotecnologia apresenta-se como uma ferramenta para proporcionar desenvolvimento de produtos com maior eficácia, utilizando uma concentração mais baixa, pois sua área de superfície específica é aumentada e o seu tamanho diminuto favorece a passagem pelas membranas celulares dos organismos (WILLEMS; WILDENBERG, 2005; MITTAL *et al*., 2013).

Na aquicultura, a nanotecnologia tem sido utilizada para desenvolvimento de diversos produtos como nanovacinas, nanomateriais para identificação de doenças, nanomateriais com liberação inteligente de compostos (antibióticos, imunestimulantes) (RATHER *et al*., 2011) e nanopartículas com propriedades antimicrobianas e antifúngicas (VELMURUGAN *et al*., 2014; PÉREZ-DIAS *et al*., 2015). Dentre essas nanopartículas se destacam as sintetizadas com prata pelo efeito fungicida desse elemento químico (BANERJEE *et al*., 2014; GRIFFITH *et al*., 2015; LEMIRE *et al*., 2015).

As nanopartículas de prata (AgNP) podem ser sintetizadas biologicamente, fisicamente e quimicamente. O método de redução química é o mais utilizado pois é simples e geralmente ocorre em fase líquida pela redução de um sal do metal, como é o exemplo da síntese de nanopartículas de prata a partir do nitrato de prata ($AgNO_3$). Na síntese química, os redutores

como boro hidreto de sódio, citrato de sódio, N,N-dimetilacetamida, polietilenoglicol, têm sido os mais utilizados (CREIGHTON *et al*., 1979; ZHAO; CROOKS, 1999; CHEN *et al*., 2007; AZEREDO, 2009; DA COSTA *et al*., 2011; PENCHEVA *et al*., 2012; RITHESH RAJ *et al*., 2015; SIMSIR *et al*., 2015). Além do processo de redução, a estabilização das nanopartículas é importante pois garante que estas permaneçam com suas propriedades por maior período de tempo permitindo uma aplicação eficiente, e como exemplo, o álcool polivinílico que é um dos estabilizantes mais utilizado para evitar os agregados de prata no processo de síntese (KONG; JANG, 2006; ELAISSARI, 2008; PENCHEVA *et al*., 2012).

Atualmente, no intuito de melhorar a eficácia das nanopartículas, estas têm sido combinadas com diferentes elementos como por exemplo os polímeros: PVA (Álcool polinivílico) (MBHELE *et al*., 2003), quitosana (KAUR *et al*., 2013), PVP (polivinilpirrolidona) (QIAN *et al*., 2001).

Além da nanoterapia, a fitoterapia pode atuar no controle de doenças da aquicultura. Nesse sentido, a *Terminalia catappa* conhecida vulgarmente como Chapéu de sol ou amendoeira, espécie vegetal pertencente à família das Combretaceae, possui flavonóides e terpenóides, além dos taninos que possuem atividade antimicrobiana e antifúngica (CHITMANAT *et al*., 2005; CHANSUE; ASSAWAWONGKASEM, 2008; CLAUDIANO *et al*., 2009). Assim, alternativas como fitoterápicos e nanoterápicos com atividade antimicrobiana e antifúngica são importantes para atuar no controle de fungos de importância na aquicultura.

A presente dissertação será apresentada em forma de capítulos, sendo que no Capítulo 1 será apresentado a Revisão de Literatura, Capítulo 2 – Material e Métodos, Capítulo 3 – Resultados e discussão em forma de artigo, Artigo 1 – Atividade Antifúngica *in vitro* de extrato aquoso de *Terminalia catappa* sob *Saprolegnia parasitica*, Artigo 2 – Síntese de nanopartículas de prata e sua atividade antifúngica sob *Saprolegnia parasitica in vitro* e Capítulo 4 – Considerações finais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o efeito do extrato aquoso de *Terminalia catappa* e de nanopartículas de prata (AgNP) no controle *in vitro* do fungo *Saprolegnia parasitica*.

2.2 Objetivos específicos

Produzir e caracterizar extrato aquoso de *T. catappa* e nanopartículas de prata (AgNP);

Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica do extrato aquoso de *Terminalia catappa* e de AgNP;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Saprolegniose

Saprolegniose é uma micose causada por um oomiceto do gênero *Saprolegnia* sp., frequente em peixes de água doce, distribuída globalmente e infecta inúmeras espécies de peixes independentemente do seu estágio de vida. Esta doença manifesta-se em qualquer temperatura, no entanto é mais comum ocorrer em temperaturas mais baixas (18 a 26 °C) (NEISH; HUGHES, 1980; PAVANELLI *et al*., 2008; BASSLEER, 2011).

O agente patogênico causador desta doença é caracterizado por colônias brancas que crescem na superfície corporal dos peixes, semelhante a um algodão (BASSLEER, 2011). Este fungo apresenta hifas ramificadas, não septadas, com dimensões variadas e esporângios com grande quantidade de zoósporos biflagelados. Na literatura, alguns autores citam que a infecção causada por este fungo geralmente ocorre quando o peixe apresenta escoriações em seu tecido epitelial e por isto este oomiceto é agente secundário, entretanto, outros autores afirmam que o mesmo pode ser um agente primário (MEYER, 1991; BRUNO; WOOD, 1999; BASSLEER, 2011).

A *Saprolegnia* sp. é um fungo aquático comumente encontrado em ambientes dulcícolas e vem acometendo diversas espécies de peixes como *Oncorhynchus kisutch* (Salmão coho), *Oncorhynchus mykiss* (Truta arco-íris), *Rutilus frisii kutum* (barata do mar preto) (HATAI; HOSHIAI, 1992; CORRÊA *et al*., 2013; JOHARI *et al*., 2015; KALATEHJARI *et al*., 2015). Este agente etiológico é comum em peixes de águas doces e frias, especialmente salmonídeos (NEISH; HUGHES, 1980).

No Brasil, a saprolegniose causa altas mortalidades nos peixes nativos principalmente na fase de reprodução e larvicultura, assim como após manejos errôneos, porém não existem dados econômicos dos prejuízos causados por esse fungo (MARTINS *et al*., 2002; KUBTIZA, 2005; CORRÊA *et al*., 2013). Segundo Moghaddam *et al*. (2012), a saprolegniose é um dos fatores responsáveis pela redução da taxa de sobrevivência de ovos de esturjão.

Em estudo realizado por Martins *et al*. (2002), analisando infecções parasíticas em peixes de água doce cultivados (Pacu - *Piaractus mesopotamicus*, piauçu - *Leporinus macrocephalus*; tambacu - híbrido, tilápia - *Oreochromis niloticus* e matrinxã - *Brycon cephalus*) no estado de São Paulo, foi detectado que em muitos dos peixes analisados que

apresentavam letargia e diminuição de alimentação, ocorria a presença de infecção fúngica por *Saprolegnia* sp.

Já Corrêa *et al*. (2013), isolaram *Saprolegnia* spp. de amostras de ovos de O*dontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis* (importantes espécies comerciais de peixe-rei em regiões subtropicais da América do Sul) coletadas de um sistema de produção experimental de peixes no sul do Rio Grande do Sul.

Então pode-se destacar que esse oomiceto pode infectar tanto os peixes (pele, brânquias) como os seus ovos. Em casos mais graves, este patógeno pode atingir a musculatura e em hospedeiros de tamanho diminuto, a musculatura e órgãos internos vitais podem ser atingidos (WILLOUGHBY, 1994; STUELAND *et al*., 2005; PAVANELLI *et al*., 2008).

Em altas infecções ocorrem falhas osmorregulatórias ocasionadas por destruição do tegumento além de lesões causadas nas brânquias que podem provocar a morte dos animais. Alguns autores afirmam que esta doença ocasiona perdas massivas levando muitos piscicultores a sérios prejuízos econômicos (VAN WEST, 2006; VAN DE BERG *et al*., 2013).

Estima-se que 10% dos salmões cultivados são dizimados por infecções por *Saprolegnia* e as perdas são estimadas em dezenas de milhões de dólares anualmente. Além do dano causado a aquicultura, o declínio de populações naturais de salmonídeos também tem sido atribuído a estas infecções (VAN WEST, 2006; PHILLIPS *et al*., 2008).

Este prejuízo está relacionado ao fato de que a transmissão deste fungo ocorre rapidamente, através de esporos de forma horizontal, através da água, de peixe para peixe, além de utensílios de manejo (BRUNO;WOOD, 1999).

Os peixes infectados geralmente são tratados com formalina, sulfato de cobre, permaganato de potássio, cloreto de sódio, verde malaquita, azul de metileno, e FMC (formalina+ verde malaquita + azul de metileno), peróxido de hidrogênio, ácido acético e iodo (PAVANELLI *et al*., 2008; BASSLEER, 2011; FUANGSAWAT *et al*., 2011; HUANG *et al*., 2015).

Corrêa *et al*. (2013) avaliaram o efeito de seis concentrações (10, 50, 100, 1000, 5000, 10000 ppm) das substâncias químicas cloreto de sódio, formaldeído, permanganato de potássio, iodeto de polivinilpirrolidona e sal marinho sem e com iodo em teste *in vitro* sob 12 isolados de *Saprolegnia* spp. isolados de ovos de *Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis*. Neste estudo foi detectado que formaldeído e o permanganato de potássio, em concentrações a partir de 10 e acima de 100 ppm, respectivamente, inibiram o crescimento micelial de isolados *Saprolegnia* spp. Já o iodeto de polivinilpirrolidona e o sal marino sem e

com iodo não mostraram atividade antifúngica em nenhuma das concentrações testadas (0-10.000 ppm).

No entanto, as quantidades preconizadas desses químicos para tratamento dessa doença são elevadas e causam impactos ao ambiente caso alcancem os corpos de água. Nesse sentido, a nanotecnologia passa a ser uma alternativa para a redução das concentrações utilizadas no controle de doenças e redução do impacto ambiental (WILLEMS; WILDENBERG, 2005; MITTAL *et al*., 2013).

3.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é o segmento tecnológico que manipula e constrói materiais e substâncias em nanoescala (1 a 100 nm) de forma a criar produtos com novas propriedades físicas e funcionais (SHAHI; PATRA, 2003; HUANG *et al*., 2007; RAI; INGLE, 2012; HUANG *et al*., 2015).

As nanopartículas, devido ao seu tamanho apresentam grande área de superfície que atribui a elas diferentes propriedades eletrônicas, óticas, catalíticas entre outras características reativas possibilitando seu uso em numerosas aplicações tanto na área industrial quanto médica (AZEREDO, 2009; FENT *et al*., 2010). Na agricultura, estas nanopartículas podem ser utilizadas como nanofertilizantes, nanocidas, nanopartículas para conservação de solo entre outras aplicações (FURLANETO, 2011; HUANG *et al*., 2015).

Na aquicultura, a nanotecnologia tem um grande potencial de aplicação para melhoria na produção de peixes no que consiste em novas ferramentas como nanosensores de qualidade de água, nanopartículas carreadoras de nutrientes para crescimento dos animais (RATHER *et al*., 2011). Além dessas utilizações, no campo da sanidade de organismos aquáticos a nanotecnologia auxilia com diversas ferramentas como nanovacinas, nanomateriais para identificação de doenças, nanomateriais com liberação inteligente de compostos (antibióticos, imunestimulantes) (CAN *et al*., 2011; RATHER *et al*., 2011) e nanopartículas com atividade antimicrobiana (ANKAMWAR, 2010; PENCHEVA *et al*., 2012).

3.3 Nanopartículas de prata (AgNP)

Nanopartículas de metais nobres como prata, ouro, platina e paládio têm sido estudadas devido ao pequeno tamanho e à grande área de superfície em relação ao seu volume. Nessa escala, estas partículas apresentam características diferentes de partículas maiores (AKHTAR, 2013).

A prata é utilizada em diversos segmentos da indústria como, por exemplo, no processamento de alimentos e bebidas, composição de produtos médicos, tratamento de

água devido principalmente ao seu potencial antimicrobiano, entre outros (RAGONHA *et al*., 2005; QUITANS-JÚNIOR *et al*., 2011; GRIFFITH *et al*., 2015; LEMIRE *et al*., 2015). Atualmente existem aproximadamente 1000 produtos que tem como princípio a nanopartícula de prata, constituindo assim uma produção de 500 toneladas por ano (KHAN *et al*., 2011).

Sua ação antimicrobiana é explicada pela sua aderência à membrana celular, degradando os lipopolissacarídeos formando cavidades na membrana celular que aumentam sua a permeabilidade (AZEREDO, 2009). Dentro das células causa danos ao DNA e liberação de íons de prata pela lenta oxidação da nanopartícula.

As AgNP apresentam grande versatilidade de aplicações e facilidade de preparação, de forma que sua síntese pode ser química, física ou biológica. O método mais comum para sua síntese é a redução química por agentes redutores inorgânicos e orgânicos. Neste processo, diferentes redutores têm sido utilizados como citrato de sódio, boro hidreto de sódio, ascorbato, dimetilformamida, N, N-dimetilacetamida, álcool, polietilenoglicol, entre outros. Tais agentes reduzem Ag^+ e conduzem a formação de prata metálica (Ag^0), seguida de formação de aglomerados oligoméricos. Posteriormente, estes aglomerados conduzem a formação de partículas de prata coloidais metálicas (EVANOFF; CHUMANOV, 2004; WILEY *et al*., 2005; CHEN *et al*., 2007; MERGA *et al*., 2007; DA COSTA *et al*., 2011; PENCHEVA *et al*., 2012; RATHESH RAJ *et al*., 2015; SIMSIR *et al*., 2015)

Durante esta síntese também se faz necessária a utilização de agentes estabilizantes para impedir a dispersão e aglomeração das nanopartículas. Estes agentes além de interagir com a superfície para estabilizar o crescimento das partículas, protege contra sedimentação e perda de propriedades superficiais. Dentre os agentes estabilizantes utilizados, os compostos poliméricos como polivinilpirrolidona, polietilenoglicol, metil polimetacrilato e álcool polivinílico são descritos na literatura como agentes eficazes na estabilização de nanopartículas (OLIVEIRA *et al*., 2005; KONG; JANG, 2006).

O álcool (PVA) é um polímero atóxico, porém, sintético e tem sido utilizado para revestir superfícies de partículas e impedir sua aglomeração, obtendo-se nanopartículas monodispersas. A estabilização de AgNP para a produção de nanocompósitos (nanofibras, nanofilmes) tem sido relatada na literatura (MBHELE *et al*., 2003; HONG *et al*., 2006, FILIPPO *et al*., 2009).

3.4 Síntese e caracterização das nanopartículas de prata

A síntese de nanopartículas de metálicas é realizada por redução de um íon metálico. A redução de Ag^+ em solução aquosa produz um colóide com partículas de alguns nanômetros (1 a 100 nm). Primeiramente, a redução leva à formação de átomos de prata (Ag^0) e

posteriormente sua agregação em grupos oligoméricos que forma as nanopartículas de Ag (AZEREDO, 2009; RAI; INGLE, 2012).

A redução química ocorre na presença de redutores e estabilizantes, que possuem como função torná-las termodinamicamente estáveis evitando a aglomeração e crescimento. O estabilizante não só controla a distribuição do tamanho médio de partícula como também tem função moderadora na forma geométrica e este fator implica diretamente sobre as propriedades ópticas destes sistemas nanoparticulados (MORONES *et al*., 2005; LEVIN *et al*., 2009). As nanopartículas esféricas são termodinamicamente mais estáveis, no entanto diversas formas podem ser obtidas, dependendo da natureza do material e do processo de preparação (ELAISSARI, 2008).

As partículas coloidais produzidas por esse método são menores do que o comprimento de onda de luz visível, sendo que a solução tem como característica cor amarelada com banda plasmônica intensa entre 380 - 400 nm, além de bandas menos intensas no comprimento de onda no espectro de absorção. Como estas nanopartículas são nanoestruturadas, elas passam a ter propriedades ópticas como a absorção de luz pela prata metálica em um comprimento de onda que o metal, em sua forma iônica, não tinha (SHARMA *et al*., 2009; SILVA, 2014).

Esse método de produção por redução química utiliza solventes tóxicos que podem ser adsorvidos na superfície dessas nanopartículas. Assim, pode ocorrer a geração de subprodutos perigosos além do grande consumo de energia. Dessa maneira, faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos menos tóxicos e agressivos ao meio ambiente e a saúde humana, com alto rendimento e baixo custo (AHMAD *et al*., 2003; SONG; KIM, 2009; THAKKAR, 2010; IRAVANI, 2011).

Após a produção das AgNP deve ser realizada sua caracterização. Para isto, diversas técnicas são utilizadas, como por exemplo a espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis) (RAVEENDRAN *et al*., 2003; SOLOMON *et al*., 2007; SHORE *et al*., 2011) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) que serão abordadas no presente estudo (KITTLER *et al*., 2010; SHORE *et al*., 2011).

A absorção na região do UV-Vis utiliza fótons na faixa do ultravioleta próximo ($200 < \lambda < 400$ nm), do visível (400 nm $< \lambda < 800$ nm), e do infravermelho próximo ($800 < \lambda < 3300$ nm). Esta técnica mostra a ressonância da superfície plasmônica. Algumas nanopartículas metálicas exibem forte banda de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), que é atribuída à banda de ressonância de plasmon de superfície (ANDRADE, 2008; NATH *et al*., 2010).

A oscilação de elétrons de condução, conhecida como ressonância de plasmon de superfície (RPS) corresponde à interação entre nanopartículas metálicas e o campo eletromagnético da luz. A oscilação do campo elétrico da onda eletromagnética ocasiona polarização de cargas de um lado da nanopartícula criando uma força de compensação no sentido oposto da mesma. Assim, o efeito plasmon é caracterizado pelo aparecimento de uma ou mais bandas de absorção no espectro UV-Vis das nanopartículas dispersas, sendo que a ressonância de superfície depende de fatores como morfologia da nanopartícula, tamanho e meio dielétrico (WILLETS; VAN DUYNE, 2006; NOGUEZ, 2007).

Nesta análise, é possível obter um gráfico de absorção de luz em função do comprimento de onda (nm), de forma a verificar a formação de AgNP, através da identificação da banda plasmônica característica (em torno de 400 nm) (ZHANG *et al*., 2004). A largura da banda no gráfico de absorção fornece informações sobre a intensidade e tamanho das AgNP, sendo que o alargamento na banda de plasmom ocorre possivelmente pela aglomeração e pela presença de tamanhos variados das nanopartículas. Assim, quanto mais estreita a banda plasmon, maior a homogeneidade no tamanho das nanoparticulas (SHIPWAY *et al*., 2000; HE *et al*., 2002).

Aliada a UV-Vis, a microscopia eletrônica de transmissão fornece informações sobre a forma e tamanho das nanopartículas, sendo que nanopartículas esferoidais são preferíveis pois são termodinamicamente mais estáveis (ELAISSARI, 2008).

3.5 Atividade antifúngica das Nanopartículas de prata (AgNP)

Nanopartículas de prata mostraram atividade antifúngica *in vitro* contra cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon beigelii* e *Candida albicans* em valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 2 $\mu g.mL^{-1}$, valor semelhante ao da Anfotericina B que é um agente antifúngico amplamente utilizado para tratar infecções sistêmicas (KIM *et al*., 2009)

Nasrollahi *et al*. (2011) também testaram *in vitro* a atividade antifúngica de nanopartículas de prata sob *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* e compararam as AgNP com anfotericina B e Fluconazol e constataram que o efeito da anfotericina foi maior que o fluconazol e a AgNP apresentou maior efeito do que esses dois agentes fúngicos sobre as cepas.

Em estudo com nanopartículas de prata e também fungos do gênero *Candida*, Monteiro *et al*. (2012) avaliaram o efeito destas nanopartículas sobre biofilmes de *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Foram testadas AgNP sintetizadas com nitrato de prata de diferentes tamanhos 5, 10 e 60 nm e estabilizadas com amônia (NH_3) e polivinilpirrolidona (PVP).

Observou-se que as duas espécies de *Candida* sp. foram sensíveis a todos os tamanhos de AgNP com valores de concentração inibitória mínima 0,4 - 0,8 µg.mL^{-1} contra *C. albicans* utilizando AgNP de 5 nm sintetizada com nitrato de prata, 0,8 a 3,3 µg.mL^{-1} com AgNP de 60 nm sintetizada com nitrato de prata e estabilizadas com amônia e polivinilpirrolidona contra *C. glabrata*, sendo que esta última espécie apresentou-se menos susceptível a AgNP.

Estudos tem avaliado a atividade fungicida de AgNP em fungos oculares patogênicos filamentosos. Xu *et al*. (2013) mostraram que estas nanopartículas exibiram atividade antifúngica significativamente superior que o antifúngico natamicina. Ao comparar os valores de MIC_{90} das AgNP com a natamicina contra *Alternaria alternata*, *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., observou-se que a eficiência foi de 4, 8 e 32 vezes maior, respectivamente, do que a natamicina.

As AgNP têm sido testadas também em fungos patogênicos para vegetais. Nejad *et al*. (2016), avaliaram o seu efeito em fungo *Rhizoctonia solani*, fungo que causa problemas no cultivo de arroz. As taxas de inibição para 5, 10, 25 e 50 ppm foram 8, 35, 67 e 85%, mostrando que estas inibiram o crescimento do fungo.

Já Kim *et al*. (2012), avaliaram o efeito antifúngico de nanopartículas de prata contra diversos fungos patogênicos para plantas. Foram utilizadas nanopartículas comerciais de três tipos com variação de 7 a 25 nm. No ensaio *in vitro*, foram utilizadas quatro concentrações diferentes AgNP (10, 25, 50 e 100 ppm). Discos de ágar de tamanho uniforme 8 mm de diâmetro contendo o fungo foram inoculados no centro de placa de petri e incubadas a 28 °C ± 2 °C durante 14 dias, sendo que maior inibição obtida foi na concentração de 100 ppm.

AgNP também tem sido testada em *Saprolegnia* sp. em ovos de truta (*Oncorhynchus mykis*). Foram utilizadas nanopartículas comerciais de forma esférica e concentração de 4.000 mg.L^{-1} com tamanho médio de 16,6 nm. O efeito antifúngico das AgNP foi avaliado pela determinação da concentração mínima inibitória. Discos de ágar de 5 mm de diâmetro contendo o fungo foram colocados no centro de placas de petri placas contendo o meio de cultura com as concentrações das nanopartículas. O crescimento da *Saprolegnia* foi avaliado no período de 24, 48 e 72 h. Nesse teste foram avaliadas as concentrações de 2, 4, 8,15, 31, 62,125, 250, 50, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 mg.L^{-1}. Em 2 e 4 mg.L^{-1} não houve diferença de crescimento comparado ao controle, de 8 a 1000 mg.L^{-1} o crescimento reduziu gradualmente e com 2000 mg.L^{-1} não houve crescimento. O desenvolvimento do micélio foi limitado de 1000 a 2000 mg.L^{-1} (JOHARI *et al*., 2015).

3.6 *Terminalia catappa* e sua atividade antifúngica

Apesar da eficácia demonstrada em fungos, a preocupação quanto ao efluente gerado pelo uso de nanopartículas é recorrente (NAYAK *et al*., 2016). Assim, o extrato de *Terminalia catappa* também se apresenta como uma alternativa para o controle de fungos.

A espécie *Terminalia catappa L*. pertence a família Combretaceae e é conhecida popurlamente como chapéu-sol, amendoeira, amendoeira-brava, castanheira, castanhola, sete-copas (Figura 1). É originária da índia e alcança de 25 a 45 metros de altura (GILMAN; WATSON, 1994). A espécie possui rápido crescimento e é utilizada para fins ornamentais, arborização urbana e rural, além de suas partes (raízes, folhas e frutos) poderem ser utilizadas na fitoterapia de diversas doenças (FRANCIS, 1989; THOMSOM; EVANS, 2006; MENESES *et al*., 2003; COCK, 2015; SILVA *et al*., 2015).

Figura 1. Foto digital de: A. Exemplar de *Terminalia catappa* localizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros; B. Folhas do exemplar de *Terminalia catappa*.

Essa utilização decorre principalmente por essa espécie possuir flavonóides, terpenóides e taninos, que possuem atividade antimicrobiana e antifúngica (GILMAN; WATSON, 1994; RIBEIRO *et al*., 1999; CHITMANAT *et al*., 2005; THOMSON; EVANS, 2006; CHANSUE; ASSAWAWONGKASEM, 2008; CLAUDIANO *et al*., 2009).

O extrato de diferentes partes (fruta, folha, casca) desta espécie tem demonstrado atividades antimicrobiana e antifúngica (CHANSUE; ASSAWAWONGKASEM, 2008; CHANDA *et al*., 2011; RUBINI *et al*., 2013; RAJESH *et al*., 2015; SILVA *et al*., 2015), antiparasitária (CLAUDIANO *et al*., 2009), antioxidante (ANNEGOWDA *et al*., 2010; RAJESH *et al*., 2015; VENKATALAKSHMI *et al*., 2015), hepatoprotetiva (GAO *et al*., 2004;CHEN; LI, 2006; TANG *et al*., 2006), anti-inflamatória (FAN *et al*., 2004; VENKATALAKSHMI *et al*., 2015; ABIODUN *et al*., 2016), anti-mutagênica (MININEL *et al*., 2014) e anti-diabética (NAGAPPA *et al.*, 2003).

Devido à sua atividade antimicrobiana, o processo de preparo de extrato das folhas de *Terminalia catappa* tem sido estudado por diversos autores (Tabela 1).

Tabela 1. Métodos de extração da folha de *Terminalia catappa* descritos na literatura.

Tempo de extração	Temperatura	Solvente	Planta/ Solvente	Granulometria	Folha	Temperatura/tempo de secagem das folhas	Método	Autor
48 h	70 °C	Etanol (99,5%)	100 g: 1000 mL	40 mesh	Fresca	-	Soxhlet	ANNEGOWDA *et al.*, 2010
6 h	-	Etanol (75%)	5 g: 200 mL	-	-	105 - 110 °C/ 30 min	Soxhlet	ADETUNJI; SALAWU, 2010
3, 5, 10 e 15 min	118 °C	Água deionizada	5 g: 100 mL	8 cm (abertura)	Folhas verdes, amarelas e vermelhas caídas	40 °C/ 12 h	-	CHYAU *et al.*, 2006
-	-	Etanol (50%)	-	-	Seca	-	Água aquecida 90 °C /1 h Spray dry	KINOSHITA *et al.*, 2007
-	-	Água	20 g: 1 L	-	Seca	Temperatura ambiente (umidade) e 50 °C até 20% de umidade	-	CLAUDIANO *et al.*, 2012
2 - 3 dias	60 °C	Água destilada	200 g: 500 mL	3 mm	Fresca	Sombra/ 3 semanas	-	N'GUESSAN *et al.*, 2011
-	-	-	-	-	-	50 °C/ 6 dias	Maceração	DA SILVA *et al.*, 2010
-	-	Água do mar	0,2 g: 1 L de água do mar	-	-	Temperatura ambiente	-	IKHWANUDDIN *et al.*, 2014
1 h	90 °C	Água deionizada	5 g: 100 mL de água deionizada	-	-	-	-	EL-RAFIE; HAMED, 2014
-	65 °C	Etanol e etanol acidificado	10 g: 100 mL	180 µm	Verdes e maduras (até 24 h de caída)	55 °C /12 h	-	FOGAÇA *et al.*, 2013
-	-	Etanol 95%	-	-	-	Temperatura ambiente/ 2 semanas	-	MUHAMMAD; MUDI, 2011
-	-	-	524,6 g 7:3 EtOH: H_2O	-	Seca	-	Percolação	MININEL *et al.*, 2014
15 min	-	Água destilada	10 g: 500 mL	-	-	-	-	ANKAMWAR, 2010
16 h	Temperatura ambiente	Etanol ou metanol	100 g: 500 mL	-	Frescas	50 °C	-	NADIRAH *et al.*, 2013
48 h	-	Metanol	50 g: 200 mL	-	Seca	-	-	BABAYI *et al.*, 2004

A utilização de extrato de *T. catappa* tem sido avaliada contra diferentes espécies de fungo. Gandhi *et al.* (2015) avaliaram a eficácia de extratos (aquoso, acetato de etila e hexano) da casca e da madeira de *T. catappa* contra os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Ganoderma* sp., *Microsporum gypseum*, *Mucor* sp., *Pencillium* sp., *Rhizopus* sp., *Scopulariops* sp., *Sporothrix scheckii* e *Trichoderma* sp. Concentrações de 50 µg, 100 µg e 150 µg de uma solução de 1 $\mu g.1\mu l^{-1}$ dos três extratos foram avaliados a partir dos diâmetros da zona de inibição. Esses autores verificaram que o extrato aquoso da madeira de *T. catappa* foi efetivo em todas as concentrações contra *Aspergillus fumigatus, Microsporum gypseum, Mucor* sp*., Penicillium* sp*., Rhizopus* sp*., Scopulariops* sp. e *Sporothrix scheckii.* A atividade inibitória máxima para *A. fumigatus* e *Mucor* sp. foi de 19 mm e para *Penicillium* foi de 17 milímetros. Porém, o extrato aquoso não apresentou efeito contra *C. albicans* e *Ganodema* sp. nas concentrações avaliadas.

Já Chanda *et al.* (2011) testaram a eficácia de extratos (metanólico, acetona e dimetilformamida) da folha da *T. catappa* em 16 cepas de fungos. Para isto, os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e a atividade antifúngica foi avaliada a uma concentração de 250 µg/disco através do método de difusão em disco no ágar. Para este teste *in vitro* também foram utilizados controles negativos (DMSO puro) e positivos (Nistatina e fluconazol). O crescimento foi determinado através do diâmetro da zona de inibição. Os três extratos foram eficazes contra 25% dos fungos testados.

Chitmanat *et al.* (2005) avaliaram a eficácia do extrato aquoso desta planta em ovos de tilápia infectados com fungo não especificado. A atividade do extrato (200 ppm) foi comparada com a atividade do alho e formol (200 ppm). A porcentagem de infecção fúngica foi determinada por meio da contagem do número de ovos mortos. O extrato aquoso de *T. catappa* apresentou maior efeito antifúngico em relação ao alho e formol. O percentual de ovos infectados tratados no controle foi 9,89 ± 2,98%, formol 4,10 ± 3,02%, alho 5,80 ± 1,00% e extrato de folhas de *T. catappa* foi 1,54 ± 0,53%.

3.7 Compostos ativos do extrato aquoso de *T.catappa*

As folhas de *Terminalia catappa* são ricas em taninos hidrolisáveis como: terflavinas A e B, tergalagina, tercatina, punicalina, punicalagina, ácido gálico, acido chebulágico, geranina, granatina B e corilagina (TANAKA *et al.,* 1986; AHMED *et al*., 2005). Sendo que a propriedade antifúngica dos extratos de *T. catappa* está relacionada a 4 principais compostos ativos: O ácido gálico, ácido elágico, a punicalina e punicalagina.

Estes compostos já foram identificados em casca, folha e fruto de *T. catappa* (LIN; HSU 1999; CHEN *et al*., 2000; LIN *et al*., 2000; Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases).

O flavonóide ácido gálico é um polifenol (Figura 2) encontrado em vários produtos naturais. Diversos estudos mostram que este ácido apresenta ação antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica, antitumoral e antifúngica (GICHNER *et al*., 1987; KROES *et al*., 1992; KIM *et al*., 2002; MA *et al*., 2003; LOCATELLI *et al*., 2013; NGUYEN *et al*., 2014; ALVES *et al.,* 2014).

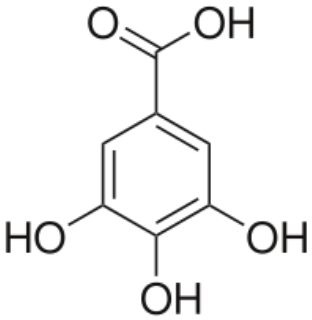

Figura 2. Estrutura química do ácido gálico; Nome IUPAC: 3,4,5-trihidroxibenzóico.

O ácido elágico também é um polifenol e pode ser encontrado em várias plantas, inclusive na *Terminalia catappa* e já tem seu potencial antioxidante comprovado tanto *in vitro* como *in vivo* (LIN *et al*., 2000; NAGAPPA *et al.,* 2003; SOH *et al.,* 2009; JUNYAPRASERT *et al*., 2012) (Figura 3).

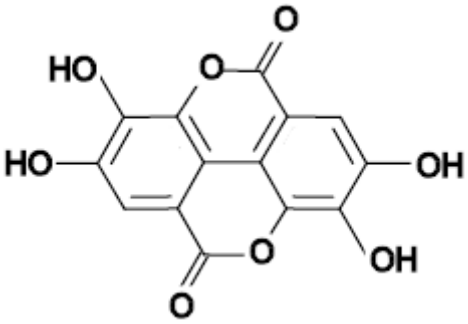

Figura 3. Estrutura química do ácido elágico; Nome IUPAC: 2,3,7,8-tetra-hidroxicromeno [5,4,3-cde] cromeno-5,10-diona.

A punicalagina e punicalina são taninos hidrolisáveis. Os taninos são polifenóis distribuídos em plantas, bebidas e alimentos. Estes estão presentes em plantas superiores e ocorrem em aproximadamente 30% das famílias destas plantas. São componentes solúveis em água e em solventes orgânicos polares e responsáveis pela adstringência de frutos e

plantas (HARTISH; KOLOODZIEJ, 1996; SANTOS *et al*., 1997; MAKKAR; BECKER, 1998; AERTS *et al*., 1999).

A punicalagina (Figura 4A) é responsável pela ação antimicrobiana (MACHADO *et al*., 2002). Os taninos têm efeito inibitório sobre bactérias e fungos e para isto existem três hipóteses: a inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a complexação dos substratos às enzimas; a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo; e por último a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo, a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos microrganismos (MELLO; SANTOS, 2002). Já a punicalina (Figura 4B) possui atividade antioxidante e hepatoprotetiva (LIN *et al*., 2001).

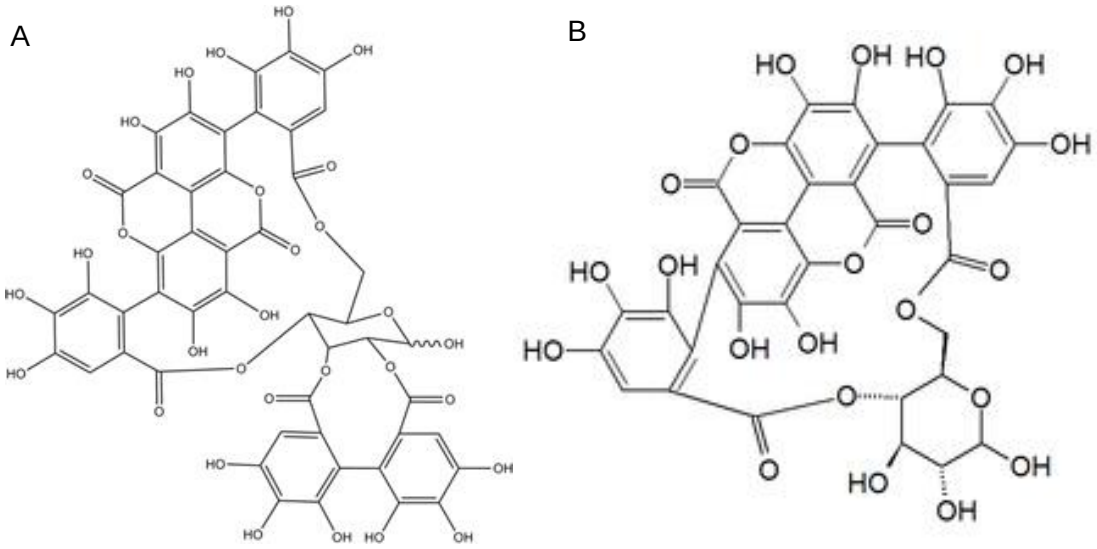

Figura 4. Estrutura química da Punicalagina; Nome IUPAC: 1, 2, 3, 11,12,13 – Hexahydroxy - 5,10 - dioxo - 8 - [3, 4, 5, 11, 17, 18, 19, 22, 23, 34, 35 – undecahydroxy - 8, 14, 26, 31 – tetraoxo - 9,13, 25, 32 – tetraoxaheptacyclo [25.8.0.0^{2,7}.0^{15,20}.0^{21,30}.0^{24,29}.0^{28,33}] pentatriaconta - 1(35), 2, 4, 6, 15, 17, 19, 21, 23, 27, 29, 33 – dodecaen -10-yl] - 5, 7, 8, 10 – tetrahydrodibenzo [f,h][1,4] dioxecine - 7 - carbaldehyde (A) e da Punicalina; Nome IUPAC: (10S, 11R, 12R, 15R) - 3, 4, 5, 11, 12, 13, 21, 22, 23, 26, 27, 38, 39 -Tridecahydroxy - 9, 14, 17, 29, 36 – pentaoxaoctacyclo [29.8.0.02, 7.010, 15.019, 24.025, 34.028, 33.032,37] nonatriaconta-1(39), 2, 4, 6, 19, 21, 23, 25, 27, 31, 33, 37 - dodecaene - 8, 18, 30 ,35 - tetrone (B).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Embrapa Tabuleiros Costeiros, no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), na Universidade Tiradentes (UNIT), no Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe (ITPS) e na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

4.1 Identificação e depósito do material botânico

O material botânico utilizado neste trabalho foi coletado na Unidade Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros (10°57’06.15’’S; 37°03’15.4’’W). A identificação da espécie *Terminalia catappa* L. foi realizada pela curadora do Herbário Tiradentes AJU, da Universidade Tiradentes (UNIT/Aracaju/SE), Profa. Dra. Marla Ibrahim Uehbe de Oliveira. O material encontra-se depositado neste herbário sob o número de registro AJU 831 (Figura 5).

Figura 5. Exsicata da espécie *Terminalia catappa L.* utilizada no presente estudo.

4.1.1 Produção do extrato aquoso de *Terminalia catappa*

As folhas amareladas caídas e secas de *T. catappa* foram coletadas na Unidade Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Para a produção do extrato aquoso, as folhas foram lavadas com água corrente e água destilada, após esse processo as folhas foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 50 °C até peso constante da amostra (adaptado de CHYAU *et al*., 2006; NADIRAH *et al*., 2013).

As folhas secas foram trituradas em moinho de facas Marconi® e o material vegetal obtido foi separado por granulometria. Este procedimento foi realizado através de peneiras de aço-inox 8 mesh (2,36 mm.µm^{-1}), 9 mesh (2,00 mm.µm^{-1}), 16 mesh (1,00 mm.µm^{-1}), 32 mesh (0,5 mm.µm^{-1}), 60 mesh (0,25 mm.µm^{-1}), 100 mesh (0,15 mm.µm^{-1}), 200 mesh (0,075 mm.µm^{-1}). Após a obtenção de grânulos diferentes, estes foram pesados para cálculo do rendimento.

Para a preparação do extrato aquoso foi utilizado o material peneirado entre 9 e 16 mesh (2,00 mm.µm^{-1} e 1,00 mm.µm^{-1}, respectivamente). Dois extratos foram preparados seguindo metodologia adaptada de CHYAU *et al.* (2006) e EL-RAFIE; HAMED (2014) onde foram utilizadas duas temperaturas para realização da extração dos compostos.

Para tanto utilizou-se 25 g do pó da *T. catappa* e 500 mL de água destilada, colocados em béquer de vidro em banho maria à 80 °C/1 h (extração a quente). Em seguida, essa solução foi filtrada em papel de filtro n°1, sendo o filtrado armazenado e o pó ainda retido no filtro foi utilizado para realização do processo de reextração com mais 500 mL de água destilada, na tentativa de remover mais compostos da folha (extração realizada em duas frações, metodologia adaptada de KIM *et al*., 2011). Posteriormente, filtrou-se novamente a suspensão obtida, descartando o que foi retido no filtro e armazenando o filtrado. Ao final do processo os dois filtrados da primeira extração e reextração foram misturados e compuseram o extrato a ser utilizado nos ensaios. Na extração em TA, o mesmo procedimento foi realizado, no entanto, o processo foi realizado em temperatura ambiente 27 °C.

Os extratos a quente e em TA foram congelados a -80 °C e então liofilizados em equipamento Labconco Freezone 4.5. durante uma semana na temperatura de -50 °C. O material liofilizado foi pesado e a partir dos 25 g utilizado no processo foi possível obter o rendimento. O material liofilizado (extrato a quente e em TA) foi caracterizado através de cromatografia líquida de alta eficiência.

4.1.2 Caracterização dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência

Os extratos de *Terminalia catappa* a quente e em TA foram diluídos com uma solução de metanol/água milli-q (50:50 v/v) até a concentração de 1 mg.mL^{-1}. A solução foi submetida a banho de ultrassom por 30 min e filtrada em membrana PTFE (politetrafluoretileno) de 0,45 µm antes das análises por HPLC.

As análises foram realizadas usando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência que consistiu em um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor automático SIL-20A, forno da coluna CTO-20A, detector de arranjo de diodo SPD-M20Avp

(DAD) acoplados a uma interface CBM-20A (Shimadzu Co., Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada através de uma coluna analítica (Phenomenex Luna®) 4,6 x 150 mm (5 µm tamanho de partícula).

O volume de injecção foi de 20 µL e a taxa de fluxo da fase móvel foi de 1,0 $mL.min^{-1}$. A fase móvel consistiu em gradiente de: A: 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura (sistema Milli-Q) e B: metanol (grau HPLC). O gradiente de eluição foi realizado de acordo com as seguintes etapas até o retorno das condições iniciais e finalização da análise (Tabela 2).

Tabela 2. Gradiente de eluição realizado na análise cromatográfica (HPLC).

Tempo (min)	A (%)	B (%)
5	95	5
5 - 10	75 - 95	5 - 25
10 - 15	50 - 75	25 - 50
15 - 20	45 - 50	50 - 55
20 - 25	40 - 45	55 - 60
25 - 30	0 - 40	60 - 100
100 - 5	0 - 95	100 - 5

O detector adequado em 254 nm para a análise de picos. Os compostos foram identificados através de injecções de normalização comparando os tempos de retenção e espectros de ultravioleta. Padrões de ácido gálico ($C_7H_6O_5$; Sigma-Aldrich) e ácido elágico ($C_{14}H_6O_8$; Sigma-Aldrich) foram diluídos com metanol até 100 $\mu g.mL^{-1}$. Para a análise quantitativa foram preparadas curvas de calibração de cada padrão identificado em cinco concentrações: 1, 15, 25, 50 e 75 $\mu g.mL^{-1}$. Os dados foram adquiridos através do software LC Solution.

4.2 Produção das nanopartículas de prata (AgNP)

As AgNP do presente trabalho foram sintetizadas por redução química por três diferentes métodos: utilizando PVA (Álcool polivinílico), estabilizante bastante utilizado (KONG; JANG, 2006; PENCHEVA *et al*., 2012; CHOU *et al*., 2014); boro hidreto e citrato de sódio, sendo que estes dois redutores são utilizados de acordo com a literatura (HEARD *et al*., 1983; ZHAO; CROOKS; 1999; JANA *et al*., 2001; SIMSIR *et al*., 2015).

4.2.1 Síntese de AgNP-PVA (Álcool polivinílico) - $(C_4H_6O_2)_n$

Para a produção de nanopartículas de prata, 5000 mg de álcool polivinílico (PVA) foi dissolvido em 95 mL de água deionizada sob agitação a 80 ºC. Paralelamente, 30 mg de nitrato de prata ($AgNO_3$) foi dissolvido em 5 mL de água e adicionado gota-a-gota, sob agitação, a solução de 95 mL de PVA (5%) alcançando a concentração final de nitrato de prata de 300 $mg.L^{-1}$. Posteriormente, as soluções preparadas foram aquecidas a 100 °C/1 h ao abrigo de luz conduzindo à formação de AgNP estabilizadas com PVA (PENCHEVA *et al*., 2012).

Este mesmo método de síntese também foi realizado utilizando uma concentração maior de $AgNO_3$ (300 mg). Ao final da síntese, para o experimento *in vitro* em meio sólido, foram feitos cálculos e diluição para que a solução mãe de AgNP - PVA 30 mg possuísse a concentração de 10^{-3} mM.

4.2.2 Síntese de AgNP-BORO (Boro hidreto de sódio) – $NaBH_4$

Primeiramente, 1,69 mg $AgNO_3$ foram dissolvidos em 10 mL de água destilada em temperatura ambiente em agitador magnético durante 15 min. Posteriormente 2,26 mg de $NaBH_4$ foram dissolvidos em 30 mL de água destilada em agitador magnético durante 15 minutos à temperatura ambiente. Depois a solução de $NaBH_4$ foi colocada em banho de gelo até atingir temperatura de 4 °C. Finalmente, 10 mL de solução de $AgNO_3$ foram gotejados sobre a solução de $NaBH_4$ durante 30 min em banho de gelo a 4 °C, sendo perceptível a mudança de cor. No final, a solução foi agitada em banho de gelo durante mais 5 min (adaptado de SIMSIR *et al*., 2015).

4.2.3 Síntese de AgNP-CIT (Citrato de sódio) - $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$

Inicialmente, no processo de preparação das nanopartículas, 2,12 mg de $AgNO_3$ foram dissolvidos em 50 mL de água destilada e 3,67 mg de $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ foram dissolvidos em 50 mL de água destilada. Após as soluções prontas, os 50 mL da primeira solução foram adicionados ao 50 mL da segunda solução por 30 s, sob agitação magnética e abrigo da luz a 23 °C ± 2 °C. Paralelamente a isto, uma solução de boro hidreto de sódio foi preparada, 0,113 mg de $NaBH_4$ foram dissolvidos em 3 mL de água destilada. Imediatamente após a mistura das soluções de nitrato de prata e citrato de sódio, adicionou-se a alíquota de 3 mL da solução de $NaBH_4$. Em seguida, a agitação foi mantida por mais 1 min (adaptado de JANA *et al*., 2001).

4.3 Caracterização das AgNP

4.3.1 Espectroscopia de UV-Visível

A redução de Ag^+ em Ag^0 foi observada por medição da absorbância em Espectro de UV-Vis através do equipamento FEMTO 800xi com cubetas de quartzo HELLMA no. 110-QS.

A redução química de cada amostra de AgNP foi monitorada por mensuração da absorbância de uma alíquota de 3 mL (sem diluição prévia) em faixa de comprimento de onda de 300 a 800 nm com 1 ou 2 nm de resolução, nos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 24 h e 1 semana (adaptado de GHOZALI *et al*., 2015). Os dados de absorbância e comprimento de onda foram plotados no software Origin 6.0 Professional, para elaboração de gráficos.

4.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas através de microscópio eletrônico de transmissão TEM-MSC JEOL 2100, operando com aceleração de 200 kV, para isto, as amostras de AgNP foram gotejadas diretamente na grade de cobre. As nanopartículas foram mensuradas e contabilizadas no software Image Tool 3.0. e os gráficos de histograma foram elaborados no software Origin 6.0 Professional.

4.3.3 Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES)

Para esta análise foi utilizado a solução padrão de $AgNO_3$ da Merck® ($AgNO_3$ em HNO_3 0,5 mol.L^{-1}) e o equipamento Varian 720-OES. Para a realização da análise, algumas condições do equipamento foram estabelecidas para os seguintes estágios: Plasma (L.min^{-1}) (purga:22,5;espera: 22,5; ignição 1,5; corrida 15,0), Auxiliar (L.min^{-1}) (purga:2,25; espera 2,25; ignição 1,50; corrida 1,50), Controlador de fluxo de massa (L.min^{-1}) (purga:0,90; espera 0,00; ignição 0,00; corrida 0,90), Potência (kW) (purga:0,0; espera 0,00; ignição 2,00; corrida 1,20), Bomba (rpm) (purga:0,0; espera 0,00; ignição 50,00 ; corrida 7,00) e Tempo (s) (purga:15; espera 10; ignição 5 ; corrida 3). Condições também foram estabelecidas para todas as curvas: Potência (kW) 1,20; Fluxo de plasma (L.min^{-1}) 15, fluxo auxiliar (L.min^{-1}) 1,50; fluxo do nebulizador (L.min^{-1}) 0,75; replica do tempo de leitura (s) 1; tempo de estabilização (s) 15. Outras configurações foram realizadas para a introdução da amostra: tempo de captação da amostra (s) 30; taxa da bomba (rpm) 15 e tempo de limpeza (s) 10.

Antes de iniciar a leitura, foram realizados cálculos de diluição para cada amostra de acordo com a curva de calibração da prata (1 a 10 mg.L^{-1}). As amostras foram diluídas em ácido nítrico (3%) conforme padrão do $AgNO_3$. As concentrações das amostras foram obtidas em mg.L^{-1}.

Como nesta análise foi mensurada a concentração final da prata reduzida (que indica a formação das nanopartículas) foi estabelecida pela diferença entre a concentração de ion prata inicial e a concentração de ion prata final, que apresenta como resultado a concentração de AgNP.

4.4 Ensaio *in vitro*

4.4.1 Isolamento do fungo

Para a realização do ensaio *in vitro,* o fungo *Saprolegnia parasitica* foi isolado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado no Laboratório de Aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Para o isolamento, dos peixes naturalmente infectados, fragmentos do fungo foram removidos através de pinça e alça de platina e transferidos para placas de Petri de vidro contendo 20 mL de BDA (Ágar batata dextrose) e cultivados em 25 °C em câmara de germinação Tecnal TE-40. A *Saprolegnia parasitica* foi então preservada em água estéril (*Castellani*) no banco de cepas desta espécie (TC/S 001). A identificação genética do fungo foi realizada segundo metodologia de Hulvey *et al.* (2007).

4.4.2 Identificação da espécie do fungo

Para identificação da espécie do fungo, foi utilizado protocolo de extração adaptado de Romano e Brasileiro (1999). A cepa do fungo isolada de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi identificada como *Saprolegnia parasitica*, pela técnica de PCR de acordo Hulvey *et al*. (2007) utilizando os primers C1 (5'-ACCCGCTGATT-TAAGCAT-3') e D2 (5'-TCCGTGTTTCAAGACGG). O perfil de termociclagem incluiu uma etapa de desnaturação a 94 ° C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 s, anelamento do iniciador a 50 °C durante 30 s e extensão do iniciador a 72 °C durante 1,5 min, uma etapa final de extensão durante 7 min a 72 °C e um banho a 4 °C. O fungo foi identificado com 90% de similaridade com a espécies *Saprolegnia parasitica* (E-value 0,0).

4.4.3 Atividade antifúngica *in vitro* dos compostos em meio sólido

Para os testes *in vitro* em meio sólido, um disco de 9 mm de meio de cultura com o fungo foi inoculado no centro de cada placa de Petri, e então, observado o crescimento micelial a cada 24 h durante 96 h por meio de medida dos diâmetros perpendiculares do halo de crescimento com um paquímetro digital de inox 150 mm LEE tools® (adaptado de CORRÊA *et al*., 2013) de acordo com as concentrações dos compostos em cada delineamento experimental utilizado.

Devido a peculiaridade da produção de cada composto, fatores avaliados na síntese como temperatura e presença de antibióticos no meio de cultura foram adicionados, quando pertinentes, como fatores no delineamento experimental. Assim, foram realizados 4 experimentos em meio sólido.

O primeiro avaliou o extrato de *T. catappa,* utilizando um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 2 x 2 constituído de 4 concentrações de extrato (0, 2,5, 5 e 10 $g.L^{-1}$), 2 meios de cultura (com e sem antibiótico: Cloranfenicol 500 $mg.L^{-1}$) e 2 tipos de preparo de extrato (em TA e a quente) em triplicata.

Para nanoparticula foram realizados 3 experimentos onde avaliou-se a eficácia de AgNP por diferentes métodos. Para tanto, cada experimento foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 constituído de 4 alíquotas de AgNP, 2 tipos de meio de cultura (sem e com antibiótico) e 3 repetições, sendo que para cada síntese utilizou-se as seguintes alíquotas de nanopartículas: AgNP-PVA (0, T_1= 1 mL de solução de AgNP-PVA 10^{-5} mM + 9 mL de BDA, T_2=1 mL de solução de AgNP-PVA 10^{-4} mM + 9 mL de BDA e T_3=1 mL de solução de AgNP-PVA 10^{-3} mM + 9 mL BDA), AgNP-BORO (0,T_1= 0,25 mL AgNP-BORO + 0,75 mL água destilada + 9 mL de BDA, T_2=0,5 mL de AgNP-BORO + 0,5 mL de água destilada + 9 mL de BDA, T_3= 1 mL de AgNP-BORO + 9 mL de BDA) e AgNP-CIT (0,T_1= 0,25 mL AgNP- CIT + 0,75 mL água destilada + 9 mL de BDA, T_2=0,5 mL de AgNP-CIT + 0,5 mL de água destilada + 9 mL de BDA, T_3= 1 mL de AgNP- CIT + 9 mL de BDA).

Após 96 h de cada experimento, o disco inicialmente inserido foi removido e realocado em novas placas contendo somente o meio de cultura BDA sem a presença das concentrações de extrato para confirmar a ação fungicida (micélios ausentes) ou fungistática dos extratos (micélios presentes) em até 96 h de exposição subsequente.

4.4.4 Atividade antifúngica *in vitro* dos compostos em meio líquido

Para avaliar se a superfície de contato em meio aquoso aumentaria a eficácia do tratamento foram realizados os ensaios *in vitro* também em meio líquido. Da mesma forma que o ensaio anterior, as concentrações dos produtos sintetizados foram incorporadas ao caldo de meio de cultura BDA em Erlenmeyers de 125 mL com volume útil de 50 mL (com e sem antibiótico) e a estes recipientes foram adicionados 4 discos de 9 mm do meio de cultura com o fungo e então mantidos em Shaker de bancada Cientec CT-712RN em rotação de 125 rpm a 25 °C (Figura 6). O delineamento experimental do ensaio com extrato foi semelhante ao ensaio em meio sólido utilizando concentrações diferentes (0, 2,5, 5 e 10 $g.L^{-1}$) porém foi utilizada somente a extração a quente devido aos resultados do ensaio anterior.

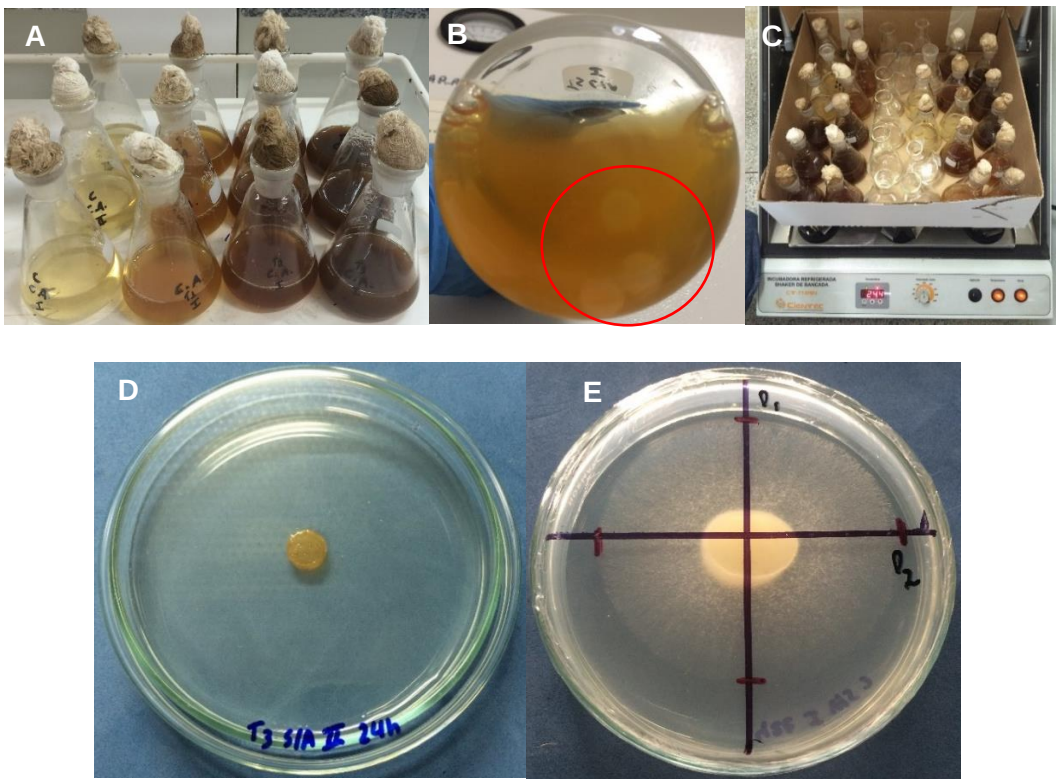

Figura 6. A. Erlenmeyers utilizados em experimento *in vitro* meio líquido, contendo os tratamentos testados; B. Discos (circulo vermelho) com *Saprolegnia parasitica* expostos ao tratamento; C. Erlenmeyers contendo os discos com fungo e o tratamento a ser testado em agitação; D. Disco removido do meio líquido e realocado para meio sólido (BDA); E. Medidas realizadas após o disco ser realocado para meio sólido (BDA), D_1: Diâmetro 1, D_2: Diâmetro 2.

Após 24, 48, 72 e 96 h de exposição ao produto, um disco de cada repetição foi retirado e colocado em placa de Petri contendo 10 mL de ágar BDA sem antibiótico e sem as concentrações de produto por 96 h, para verificar o efeito fungicida ou fungistático. Diariamente, por um período de 96 h, o crescimento micelial de *Saprolegnia parasitica* foi avaliado por meio de medida dos diâmetros perpendiculares do halo de crescimento com um paquímetro digital de inox 150 mm LEE tools® (adaptado de CORRÊA *et al*., 2013). Após 24, 48, 72 e 96 h um disco era retirado de cada repetição.

4.4.5 Comparação da atividade antifúngica do PVA e AgNP-PVA

Devido aos resultados do teste *in vitro* em meio sólido com diferentes nanopartículas sintetizadas e dados da literatura relatando que maiores eficácias são encontradas na concentração de 2000 $mg.L^{-1}$, outro teste *in vitro* foi realizado com concentrações maiores que o teste anterior.

Assim, foi realizado outro teste *in vitro* com as nanopartículas, partindo de soluções com 30 mg e 300 mg de $AgNO_3$ e comparando com o efeito isolado do PVA (álcool polivínílico).

Para os ensaios em meio sólido foram utilizados delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 2 constituído de 4 formulações diferentes: Controle, PVA, AgNP- PVA partindo de 30 mg de nitrato de prata e AgNP-PVA partindo de 300 mg de nitrato de prata. A solução de álcool polivinílico foi preparada de forma que 5000 mg de PVA foram dissolvidos em 95 mL de água destilada a 80 °C em agitador magnético (PENCHEVA *et al*., 2012).

As formulações utilizadas no delineamento foram as seguintes: 1 mL água + 9 mL BDA, 1 mL de solução de PVA + 9 mL de BDA,1 mL de AgNP- PVA partindo de 30 mg de nitrato de prata + 9 mL de BDA e 1 mL de AgNP-PVA partindo de 300 mg de nitrato de prata + 9 mL de BDA, com dois tipos de meio (sem e com antibiótico) e três repetições. O teste teve duração de 96 h e foi realizado em temperatura de 25 °C. Diariamente, o crescimento micelial de *Saprolegnia parasitica* foi avaliado através da mesma metodologia utilizada nos outros testes *in vitro*.

Após 96 h de experimento, o disco inicialmente exposto foi removido e realocado em novas placas contendo somente o meio de cultura nutritivo (BDA) sem a presença das concentrações de AgNP e PVA para confirmar a ação fungicida (micélios ausentes) ou fungistática dos composto (micélios presentes) em até 96 h.

Para avaliar se a superfície de contato em meio aquoso aumentaria a eficácia do tratamento foram realizados os ensaios *in vitro* também em meio líquido como já descrito anteriormente. As concentrações do ensaio em meio líquido obedeceram as mesmas proporções do ensaio em meio sólido. As formulações foram as seguintes: 5 mL de água destilada + 45 mL de Caldo de batata, 5 mL de PVA + 45 mL de Caldo de Batata, 5 mL de AgNP-PVA partindo de 30 mg de nitrato de prata + 45 mL de caldo de batata e 5 mL de AgNP-PVA partindo de 300 mg de nitrato de prata + 45 mL de caldo de batata. Para isto, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 x 2, com 4 tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 h), 4 formulações, dois tipos de meio (com e sem antibiótico) e três repetições.

Após 24, 48, 72 e 96 h de exposição às formulações, um disco de cada repetição foi retirado e colocado em placa de Petri contendo 10 mL de ágar BDA sem antibiótico para verificar o efeito fungicida ou fungistático. Diariamente, por um período de 96 h, o crescimento micelial de *Saprolegnia parasitica* foi avaliado por meio de medida dos diâmetros perpendiculares do halo de crescimento através de paquímetro digital de inox 150 mm LEE tools® (adaptado de CORRÊA *et al*., 2013).

4.5 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi interiamente casualizado em esquema fatorial com parcelas subdivididas ao tempo. Os dados dos experimentos *in vitro* foram submetidos à análise de normalidade de Shapiro Wilk e em caso de normalidade estes foram submetidos a ANOVA e sendo F significativo as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p=0,05)

O teste t pareado foi utilizado para a avaliação de efeito fungicida e fungistático dos ensaios *in vitro*, sendo que nesse caso, para dois valores ou um acima de zero e com valor de $p<0,05$ foi considerado que houve diferença significativa, então o tratamento foi classificado como fungistático, quando os dois valores foram acima de zero e o valor de $p>0,05$ foi considerado que não houve diferença estatística e então classificado como fungistático e por fim quando ambos os valores foram zerados e com valor de $p>0,05$ foi considerado que não houve diferença siginificativa, então o tratamento foi classificado como fungicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIODUN, O. O.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; GOMEZ-CARAVACA, A. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; UTRILLA, M. P. *et al.* Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L.(Combretaceae): *In vitro* and in vivo evidences. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; *192*, 309-319.

ADETUNJI, V. O.; SALAWU, O. T. Efficacy of ethanolic leaf extracts of *Carica papaya* and *Terminalia catappa* as molluscicides against the snail intermediate hosts of schistosomiasis. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4(22): 2348-2352.

AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 1999; 75(1): 1-12.

AHMAD, A.; MUKHERJEE, P.; SENAPATI, S.; MANDAL, D.; KHAN, M.I.; KUMAR, R.; SASTRY,M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003; 28: 313 - 318.

AHMED, S.M.; VRUSHABENDRA SWAMY, B.M.; GOPKUMAR, P.; DHANAPAL, R.; CHANDRASHEKARA, V.M. Anti-diabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. Leaf Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 2005; 4(1): 36-39.

AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y.S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2013; 1(6):591-602.

ALVES, C. T.; FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against Candida species. *Future microbiology* 2014; 9(2): 139-146.

ANDRADE, J.E. de. *Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob a influência do Ph* [Dissertação]. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe; 2008.

ANKAMWAR, B. Biosynthesis of gold nanoparticles (green-gold) using leaf extract of *Terminalia catappa*. *Journal of Chemistry* 2010; 7(4):1334-1339.

ANNEGOWDA, H.V.; WEEN, C.N.; MORDI, M.N.; RAMANATHAN, S.; MANSOR, S.M. Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Property of Hydrolysed Extracts of *Terminalia catappa* L. Leaf. *Asian Journal of Plant Sciences* 2010; 9(8):479-85.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. DE C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto B, Gomes L de C. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2nd ed. Santa Maria: UFSM; 2010. p. 175-204.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. *Os frutos do Tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Brasília; 1998.

ASHARANI, P. V.; WU, Y. L.; GONG, Z.; VALIYAVEETTIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 2008; 19(25): 1-8, 2008.

AZEREDO, H. M. C. de. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International* 2009; 42(9):1240-1253.

BABAYI, H.; KOLO, I.; OKOGUN, J. I.; IJAH, U. J. J. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms.*Biokemistri* 2004; 16(2):106-111.

BANERJEE, P.; SATAPATHY, M.; MUKHOPAHAYAY, A.; DAS, P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. *Bioresources and Bioprocessing* 2014; 1(1): 1-10.

BASSLEER, G. Guia prático de doenças de peixes. Belgium: Bassleer biofish; 2011.

BOSCARDIN, N.R. *Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. A produção aquícola brasileira.* Brasília; 2008.

BRUNO, D.W.; WOOD, B.P. *Saprolegnia and other Oomycetes.* In: Woo PTK, Bruno DW. Fish *Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Vol. 3. United Kingdom: CABI Publishing;1999. p. 599–659.

CAN, E.; KIZAK, V.; KAYIM, M.; CAN, S.S.; KUTLU, B.; ATES, M. *et al.* Nanotechnological Applications in Aquaculture-Seafood Industries and Adverse Effects of Nanoparticles on Environment. *Journal of Materials Science and Engineering* 2011; 5: 605-609.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K.; NAIR, R. Antimicrobial activity of *Terminalia catappa* L. leaf extracts against some clinically important pathogenic microbial strains. *Chinese Medicine* 2011; 2(4): 171-177.

CHANSUE, N.; ASSAWAWONGKASEM, N. The *in vitro* antibacterial activity and ornamental fish toxicity of the water extract of Indian almond leaves (*Terminalia catappa* Linn.). *KKU Veterinary Journal* 2008; 18(1): 36-45.

CHEN, P. S.; LI, J. H. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cells. *Toxicology letters* 2006; 163(1): 44-53.

CHEN, P.S.; LI, J.H.; LIU, T.Y.; LIN, T.C. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Cancer letters* 2000; 152: 111-122.

CHEN, Z.; GAO, L. A facile and novel way for the synthesis of nearly monodisperse silver nanoparticles*. Material Research Bulletin* 2007; 42:1657-1661.

CHITMANAT, C.; TONGDONMUAN, K.; KHANOM, P.;PACHONTIS, P.; NUNSONG, W. Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. *Acta Horticulturae* 2005; 678: 179-182.

CHOI, J.E.; KIM, S.; AHN, J.H.; YOUN, P.; KANG, J.S.; PARK, K. *et al.* Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. Aquatic Toxicology 2010; 100(2):151-159.

CHOU, H. L.; WU, C. M.; LIN, F. D.; RICK, J. Interactions between silver nanoparticles and polyvinyl alcohol nanofibers. *AIP Advances* 2014; 4(8): 1-9.

CHYAU, C. C.; KO, P. T.; MAU, J. L. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. *LWT-Food Science and Technology* 2006; 39(10): 1099-1108.

CLAUDIANO, G. D. S.; NETO, J. D.; SAKABE, R.; CRUZ, C. D.; SALVADOR, R.; PILARSKI, F. Eficácia do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 2009; 10 (3):625-636.

CLAUDIANO, G. D. S.; PILARSKI, F.; DA CRUZ, C.; SALVADOR, R.; BELO, M. A. D. A.; DE MORAES, F. R. Concentração letal LC50 do extrato aquoso de folhas de *Terminalia catappa* em guaru, phalloceros caudimaculatus. *Archives of Veterinary Science* 2012; 17(3): 15-19.

COCK, I. E. The medicinal properties and phytochemistry of plants of the genus Terminalia (Combretaceae). *Inflammopharmacology* 2015; 23(5): 203-229.

CORRÊA, B. F.; STOHL, F. E.; ROBALDO, R. B.; PEREIRA, D. I. B. Efeito *in vitro* de químicos no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. *Ciência Rural* 2013; 43(6):1021-1024.

CREIGHTON,J.A.; BLATCHFORD, C.G.; ALBRECHT, M.G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *Journal of the chemical society, Faraday Transactions* 1979; 75:790-798.

DA COSTA, L. P.; FORMIGA, A. L. B.; MAZALI, I. O.; SIGOLI, F. A. Spontaneous formation of highly dispersed spheroidal metallic silver nanoparticles in surfactant-free N, N-dimethylacetamide. *Synthetic Metals* 2011; 161(15): 1517-1521.

DA SILVA, L. P; DE ANGELIS, C. D.; TOMA, W. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Terminalia catappa* L.(combretaceae). *Revista Ceciliana Dez* 2010; 2(2):20-22.

Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. [Online Database] v. 1.7.1[Acessado em 15 mai 2016] Disponível em: https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search.

ELAISSARI, A. *Colloidal nanoparticles in biotechnology*. New Jersey: Wiley; 2008.

EL-RAFIE, H.M.; HAMED, M.A.A Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four*Terminalia* species. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 2014; 5(3):1-12

EVANOFF, D. D.; CHUMANOV, G. Size-controlled synthesis of nanoparticles. 1."Silver-only" aqueous suspensions via hydrogen reduction. *The Journal of Physical Chemistry B* 2004; 108(37): 13948-13956.

FABREGA, J.; LUOMA, S.N.; TYLER, C.R.; GALLOWAY, T.S.; LEAD, J.R. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International* 2011; 37(2):517- 531.

FAN, Y. M.; XU, L. Z.; GAO, J.; WANG, Y.; TANG, X. H.; ZHAO, X. N. *et al*. Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. *Fitoterapia* 2004; 75(3): 253-260.

FENT, K.; WEISBROD, C. J.; WIRTH-HELLER, A.; PIELES, U. Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish *Danio rerio* early life stages. *Aquatic Toxicology* 2010; 100(2): 218-228.

FILIPPO, E.; SERRA, A.; MANNO, D. Poly (vinyl alcohol) capped silver nanoparticles as localized surface plasmon resonance-based hydrogen peroxide sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2009; 138(2): 625-630.

FOGAÇA, D. N. L.; PINTO JÚNIOR, W. R.; RÊGO JÚNIOR, N. O.; NUNES, G. S. Atividade antioxidante e teor de fenólicos de folhas da Terminalia catappa Linn em diferentes estágios de maturação. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 2013; 34(2): 257-261.

FRANCIS, J. K. *Terminalia catappa L: indian almond*. Almendra;1989.

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* 2011; 45:84-89.

FURLANETO, F. de P.B. NANOTECNOLOGIA NO SETOR AGROPECUÁRIO. *Pesquisa & Tecnologia* 2011; 8(69): 1-4.

GANDHI, P. P.; VENKATALAKSHMI, P.; BRINDHA, P. Efficacy of *Terminalia catappa* L. wood and bark against some fungal species. *International Journal of Current Microbiolology and Applied Sciences* 2015; 4(9): 74-80.

GAO, J.; TANG, X.; DOU, H.; FAN, Y.; ZHAO, X.; XU, Q. Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and its two triterpenoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2004; 56(11): 1449-1455.

GHOZALI, S.Z.; VUANGHAO, L.; AHMAD, NH. Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles using *Catharanthus roseus* Leaf Extract and its Proliferative Effects on Cancer Cell Lines. *Nanomedicine & Nanotechnology* 2015; 6(4): 1-6.

GICHNER, T.; POSPÍŠIL, F.; VELEMÍNSKÝ, J.; VOLKEOVA, V.; VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the ames Salmonella Assay. *Folia Microbiologica* 1987; 32(1): 55-62.

GILMAN, E.F.; WATSON,D.G. *Terminalia catappa tropical-almond*. Gainsville: Institute of Food and Agricultural Sciences; 1994.

GRIFFITH, A.; NEETHIRAJAN, S.; WARRINER, K. Development and Evaluation of Silver Zeolite Antifouling Coatings on Stainless Steel for Food Contact Surfaces. *Journal of Food Safety* 2015; 35(3):345-354.

HARTISCH, C.; KOLODZIEJ, H. Galloylhamameloses and proanthocyanidins from Hamamelis virginiana. *Phytochemistry* 1996; 42(1), 191-198.

HATAI, K.; HOSHIAI, G. Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker. *Journal of Wildlife Diseases* 1992; 28: 532–536.

HE, R.; QIAN, X.; YIN, J.; ZHU, Z. Preparation of polychrome silver nanoparticles in different solvents. *Journal of Materials Chemistry* 2002; 12(12): 3783-3786.

HEARD, S.M; GRIESER, F.; BARRACLOUGH, C.G.; SANDRES, J.V. The characterization pf Ag sols by eléctron microscopy, optical absorption, and electrophoresis. *Journal of Colloid and Interface Science* 1983; 93(2): 545-555.

HONG, K. H.; PARK, J. L.; SUL, I. H.; YOUK, J. H.; KANG, T. J. Preparation of antimicrobial poly (vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 2006; 44(17): 2468-2474.

HUANG, J.; LI, Q.; SUN, D.; LU, Y.; SU, Y.;YANG, X. *et al.* Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 2007; 18 (10):1-11.

HUANG, S.; WANG, L.; LIU, L.; HOU, Y.; LI, L. Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 2015; 35(2): 369-400.

HULVEY, J. P.; PADGETT, D. E.; BAILEY, J. C. Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. *Mycologia* 2007; 99(3):421-429.

IKHWANUDDIN, M.; MOH, J. H.; HIDAYAH, M.; NOOR-HIDAYATI, A. B.; AINA-LYANA, N. M.; JUNETA, A. S. N. Effect of Indian almond, *Terminalia catappa* leaves water extract on the survival rate and growth performance of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* post larvae. *AACL Bioflux* 2014; 7(2): 85-93.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants.*Green Chemistry* 2011; 13(10): 2638-2650.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratioElectronic supplementary information (ESI) available: UV–VIS spectra of silver nanorods. *Chemical Communications* 2001; 7: 617-618.

JOHARI, S. A.; KALBASSI, M. R.; SOLTANI, M.; YU, I. J. Study of fungicidal properties of colloidal silver nanoparticles (AgNPs) on trout egg pathogen, *Saprolegnia* sp. *International Journal of Aquatic Biology* 2015; 3(3): 191-198.

JUNYAPRASERT, V. B.; SINGHSA, P.; SUKSIRIWORAPONG, J.; CHANTASART, D. Physicochemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid. *International journal of pharmaceutics* 2012; 423(2): 303-311.

KALATEHJARI, P.; YOUSEFIAN, M.; KHALILZADEH, M. A. Assessment of antifungal effects of copper nanoparticles on the growth of the fungus *Saprolegnia* sp. on white fish (*Rutilus frisii kutum*) eggs. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 2015; 41(4): 303-306.

KAUR, P.; CHOUDHARY, A.; THAKUR, R. Synthesis of chitosan-silver nanocomposites and their antibacterial activity. *International Journal of Scientific and Engineering Research* 2013; 4: 869-872.

KHAN, S.S.; SRIVATSAN, P.; VAISHNAVI, N.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Interaction of silver nanoparticles (SNPs) with bacterial extracellular proteins (ECPs) and its adsorption isotherms and kinetics. *Journal of Hazardous Materials* 2011; 192(1):299-306.

KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50(13): 3713-3717.

KIM, I. S.; YANG, M. R.; LEE, O. H.; KANG, S. N. Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *International journal of molecular sciences* 2011; 12(6): 4120-4131.

KIM, K.; SUNG, W.; SUH, B.; MOON, S.; CHOI, J.; KIM, J.; LEE, D. Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticles on *Candida albicans*. *Biometals* 2009; 22(2):235–242.

KIM, S. W.; JUNG, J. H.; LAMSAL, K.; KIM, Y. S.; MIN, J. S.; LEE, Y. S. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 2012; 40(1): 53-58**.**

KINOSHITA, S.; INOUE, Y.; NAKAMA, S.; ICHIBA, T.; ANIYA, Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from okinawa island and its tannin corilagin. *Phytomedicine* 2007;14(11): 755-762.

KITTLER, S.; GREULICH, C.; DIENDORF, J.; KOLLER, M.; EPPLE, M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials* 2010; 22(16): 4548-4554.

KONG, H.; JANG, J. One-step fabrication of silver nanoparticle embedded polymer nanofibers by radical-mediated dispersion polymerization. *Chemical communications* 2006; (28): 3010-3012.

KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A.J.J; QUALES VAN UFFORD, H.C.; VAN DIJK, H. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Medica* 1992; 58(6): 499-504.

KSIAZYK, M.; ASZTEMBORSKA, M.; STEBOROWSKI, R., BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G. Toxic effect of silver and platinum nanoparticles toward the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2015; 94(5):554-558.

KUBTIZA, FERNANDO. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. *Panorama da Aquicultura* 2005; 2005:15-23.

LEMIRE, J.A.; KALAN, L.; BRADU, A.; TURNER, R.J. Silver oxynitrate: An Unexplored Silver Compound with Antimicrobial and Antibiofilm Activity. *Antimicrobial agents and chemoteraphy* 2015; 59(9):1-30.

LEVIN, C. S.; HOFMANN, C.; ALI, T. A.; KELLY, A. T.; MOROSAN, E.; NORDLANDER, P.; WHITMIRE, H.; HALAS, N. J. Magnetic−plasmonic core−shell nanoparticles. *ACS nano* 2009; 3(6): 1379-1388.

LIN, C. C.; HSU, Y. F.; LIN, T. C.; HSU, H. Y. Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Phytotherapy Research* 2001; 15(3): 206-212.

LIN, T.C.; HSU, F.L. Tanin and related compounds from *Terminalia catappa* and *Terminalia parviflora. Journal of Chinese Chemical Society* 1999; 46: 623-618.

LIN, Y. L.; KUO, Y. H.; SHIAO, M. S.; CHEN, C. C.; OU, J. C. Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2000; 47(1): 253-256.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 60: 233-239.

MA, J.; LUO, X.D.; PROTIVA, P.; YANG, H.; MA, C.; BASILE, M.J. *et al*. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). *Journal of Natural Products* 2003; 66(7): 983-986.

MACHADO, T. D. B.; LEAL, I. C.; AMARAL, A. C. F.; SANTOS, K.; SILVA, M. G. D.; KUSTER, R. M. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits.*Journal of the Brazilian Chemical Society* 2002; 13(5): 606-610.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Do tannins in leaves of trees and shrubs from African and Himalayan regions differ in level and activity? *Agroforestry systems* 1998; 40(1): 59-68.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R. de; BOZZO CONCEIÇÃO PAIVA, A. de M.F.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum* 2002; 24(4):981-985.

MATZKE, M.; JURKSCHAT, K.; BACKHAUS, T. Toxicity of differently sized and coated silver nanoparticles to the bacterium *Pseudomonas putida*: risks for the aquatic environment? *Ecotoxicology* 2014; 23(5): 818-829.

MBHELE, Z. H.; SALEMANE, M. G.; VAN SITTERT, C. G. C. E.; NEDELJKOVIC, J. M.; DJOKOVIC, V., LUYT, A.S. Fabrication and characterization of silver-polyvinyl alcohol nanocomposites. *Chemistry of Materials* 2003; 15(26): 5019-5024.

MELLO, CP; SANTOS, SC. Taninos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões CMO. 4 ed. Porto Alegre: Editora Universitária; 2002. p. 517-544.

MENESES, C.H.S.G; SOUSA, E.B.M.; MEDEIROS, F.P.M.; MENEZES, I.R.; ALBUQUERQUE, H.N.; SANTOS, L. Análise da arborização dos bairros do Mirante e Vila Cabral na cidade de Campina Grande – PB. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 2003; 3(2):120-126.

MERGA, G.; WILSON, R.; YNN, G.; MILOSAVLJEVIC, B. H.; MEISEL, D. Redox catalysis on “naked” silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* 2007; 111(33): 12220-12226.

MEYER, F.P. Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science* 1991; 69: 4201- 4208.

MININEL, F. J.; LEONARDO JUNIOR, C. S.; ESPANHA, L. G.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; LEITE, C. Q. F. *et al.* Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn.(Combretaceae) and their mutagenic activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014;1:1-11.

MITTAL, A.K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances* 2013; 31(2): 346-356.

MOGHADDAM, A. A.; HAJIMORADLOO, A.; GHIASI, M.; GHORBANI, R. *In vitro* inhibition of growth in *Saprolegnia* sp. isolated from the eggs of Persian Sturgeon Acipenser persicus (Pisces: Acipenseriformes) by Pseudomonas aeroginosa (PTCC: 1430). *Caspian Journal of Environmental Sciences* 2012; 11(2): 245-252.

MONTEIRO, D. R.; SILVA, S.; NEGRI, M.; GORUP, L. F.; CAMARGO, E. R. de; OLIVEIRA, R. *et al.* Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Letters in Applied Microbiology* 2012; 54(5): 383-391.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005;16(10): 2346 – 2353.

MUHAMMAD, A.; MUDI, Y. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of *Terminalia catappa*, Leaf Extracts. *Biokemistri* 2011; 23(1):35-39.

N'GUESSAN, K.; FOFIE, N.G.B.Y.; ZIRIHI, G.N. Eeffect of aqueous extract of *Terminalia catappa* leaves on the glycaemia of rabbits. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011; 1(8):59-64.

NADIRAH, M.; WEE, T. L.; NAJIAH, M. Differential responses of Vibrio sp. to young and mature leaves extracts of *Terminalia catappa* L. *International Food Research Journal* 2013; 20(2):961-969.

NAGAPPA, A. N.;THAKURDESAI, P.A.; RAO, N. V. SINGH, J. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. *Journal of ethnopharmacology* 2003; 88(1): 45-50.

NASROLLAHI, A.; POURSHAMSIAN, K.; MANSOURKIAEE, P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *International Journal of Nanotechnology* 2011; 1(3): 233–239.

NATH, S.; JANA, S.; PRADHAN, M.; PAL, T. Ligand-stabilized metal nanoparticles in organic solvent. *Journal of Colloid and Interface Science* 2010; 341(2): 333–352.

NAVARRO, E.; PICCAPIETRA, F.; WAGNER, B.; MARCONI, F.; KAEGI, R; ODZAK, N.; SIGG, L.; BEHRA, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 2008; 42(23): 8959-8964.

NAYAK, D.; ASHE, S.; RAUTA, P. R.; KUMARI, M.; NAYAK, B. Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. *Materials Science and Engineering: C* 2016; 58: 44-52.

NEISH, C. A.; HUGHES, C. C. Fungal disease of fishes. In: Snieszko F, Axelrod HR. *Diseases of fishes*. New Jersey; 1980. p. 1-159.

NEJAD, M.S.; BONJAR, G.H.S.; KHATAMI, M.; AMINIS, A.; AGHJGHJ, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal properties of silver nanoparticles against *Rhizoctonia solani*, a commom agente of rice sheath blight disease. *The Institution of Engineering and Technology* 2016; 1:1-5.

NETO, E. A.B.; RIBEIRO,C.; ZUCOLOTTO, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. **Comunicado técnico 99 da Embrapa.** 2008.

NGUYEN, D.M.C.; SEO, D. J.; LEE, H. B.; KIM, I. S.; KIM, K. Y.; PARK, R. D. *et al*. Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microbial pathogenesis* 2013; 56(2013): 8-15.

NOGUEZ, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *The Journal of Physical Chemistry C* 2007; 111: 3806-3819.

OLIVEIRA, A.M. de; SILVA, M. de. N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. de; VAL, A.L. Caracterização da atividade de piscicultura nas mesorregiões do estado do Amazonas, Amazônia Brasileira. *Revista Colombiana de Ciência Animal* 2012; 4(1): 154-162.

OLIVEIRA, M. M.; UGARTE, D.; ZANCHET, D.; ZARBIN, A. J. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005; 292(2): 429-435.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Maringá: Eduem; 2008.

PENCHEVA, D.; BRYASKOVA, R.; KANTARDJIEV, T. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* 2012; 32(7): 2048-2051.

PÉREZ-DÍAZ, M.A.; BOEGLI, L.; JAMES, G.; VELASQUILLO, C.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, R.E. *et al.* Silver nanoparticles with microbial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Materials Science and Engineering C* 2015; 55(2015):360-366.

PHILLIPS, A.J.; ANDERSON, V.L.; ROBERTSON, E.J.; SECOMBES, C.J.; VAN WEST, P.New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* 2008;16(1): 13-19.

QIAN, X. F.; YIN, J.; FENG, S.; LIU, S. H.; ZHU, Z. K. Preparation and characterization of polyvinylpyrrolidone films containing silver sulfide nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 2001; 11(10): 2504-2506.

QUITANS-JÚNIOR, L.J.; SANTOS, M.R.V. dos; ARAÚJO, A.A. de S. Prospecção tecnológica do uso da prata contra microorganismos nocivos em sistemas de água. *Revista Gestão, Inovação e Tecnologias* 2011; 1(1): 12-21.

RAGONHA, A.C.O.; FERREIRA, E.; ANDRADE, D. de; ROSSI, L.A. Avaliação microbiológica de coberturas com sulfadiazina de prata a 1%, utilizadas em queimaduras. *Revista Latino Americana de Enfermagem* 2005;13(4): 514-521.

RAI, M.; INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. Applied Microbiology and Biotechnology 2012;94(2):287-93.

RAJESH, B. R.; POTTY, V. P.; KUMARI, P.; MIRANDA, M. T. P.; SREELEKSHMY, S. G. Antioxidant and antimicrobial activity of leaves of *Terminalia catappa* and Anacardium occidentale: A comparative study. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2015; 4(1): 79-82.

RATHER, M. A.; SHARMA, R.; AKLAKUR, M.; AHMAD, S.; KUMAR, N.; KHAN, M. *et al*. Nanotechnology: a novel tool for aquaculture and fisheries development. *Fisheries and Aquaculture* 2011; 2011:1-5

RAVEENDRAN, P.; FU, J.; WALLEN, S. L. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 2003; 125(46):13940-13941.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M. *et al. Flora da reserva ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firma na Amazônia Central*. Manaus: INPA; 1999.

RITHESH RAJ, D.; PRASANTH, S.; VINEESHKUMAR, T.V.; SUDARSANAKUMAR. Ammonia sensing properties of tapered plastic opticl fibe coated with silver nanoparticles/PVA/PVA hybrid. *Optical Communications* 2015; 340 (1): 86-92.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. Biotecnologia, *Ciência e Desenvolvimento* 1999; 2 (9): 40-43.

RUBINI, B.; SHANTHI, G.; SOUNDHARI, C.; RAJARAJAN, S. Antifungal activity of *Terminalia chebula* and *Terminalia catappa* on two dermatophytes*. Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2013, 4(2): 15–19.

SANTOS, S. A. dos ; ABREU, L.; CHAGAS, S. EFEITO DO ARMAZENAMENTO NOS TEORES DE FENÓLICOS EM CAULES DE ABACAXIZEIRO. *Revista Brasileira de Agrociência* 1997*;* 3(3):107-109.

SARKAR, B.; NETAM, S.P.; MAHANTY, A.; SAHA, A.; BOSU, R.;K.K. KRISHNANI. Toxicity Evaluation of Chemically and Plant Derived Silver Nanoparticles on Zebra fish (*Danio rerio*), *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 2014; 84(4): 885-892.

SHAHI, S.K.; PATRA, M. Microbially synthesized bioactive nanoparticles and their formulation active against human pathogenic fungi. *Reviews on Advanced Materials Science* 2003; 5: 501-509.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science* 2009; 145(1): 83-96.

SHIPWAY, A. N.; LAHAV, M.; GABAI, R.; WILLNER, I. Investigations into the electrostatically induced aggregation of Au nanoparticles. *Langmuir* 2000;16(23): 8789-8795.

SHORE, M. S.; WANG, J.; JOHNSTON-PECK, A. C.; OLDENBURG, A. L.; TRACY, J. B. Synthesis of Au (core)/Ag (shell) nanoparticles and their conversion to AuAg alloy nanoparticles. *Small* 2011; 7(2): 230-234.

SILVA, L. D. D. Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de Hancornia speciosa Gomes-Apocynaceae (mangabeira) [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2014.

SILVA, L. P.; DE ANGELIS, C. D.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; MININEL, F. J.; DOS SANTOS, L. C. *et al. Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-Helicobacter pylori and antiulcer action in experimental rodent models. *Journal of ethnopharmacology* 2015; 159: 285-295.

SIMSIR, H.; ELTUGRAL, N.; KARAGÖZ, S. Ligand-Depended Adsorption Characteristics of Silver Nanoparticles on Activated Carbon. *World Academy of Science, Engineering and*

Technology, International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering 2015; 9(3): 481- 484.

SOH, P. N.; WITKOWSKI, B.; OLAGNIER, D.; NICOLAU, M. L.; GARCIA-ALVAREZ, M. C.; BERRY *et al*. *In vitro* and in vivo properties of ellagic acid in malaria treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; 53(3): 1100-1106.

SOLOMON, S.D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A. V.; RUTKOWSKY, S.A.; BORITZ, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of chemical education* 2007; 84(2): 322-325.

SONG, Y.J.; KIM, S.B. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2009; 32:79- 84.

STUELAND, S.; HATAI, K.; SKAAR, I. Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. Strains pathogenic to atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 2005; 28(8): 445-453.

TANAKA, T.; NONAKA, G.I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XLII. Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavins A and B, tergallagin and tercatain from the leaves of *Terminalia catappa* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1986; 34(3): 1039-1049.

TANG, X.; GAO, J.; WANG, Y.; FAN, Y. M.; XU, L. Z.; ZHAO, X. N. *et al.* Effective protection of *Terminalia catappa* L. leaves from damage induced by carbon tetrachloride in liver mitochondria. *The Journal of nutritional biochemistry* 2006; 17(3): 177-182.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2010; *6*(2): 257-262.

THOMSON, L.A.J.; EVANS, B. *Terminalia catappa* (tropical almond). In: ELEVITCH CR. *Species profiles for pacific Island agroforestry***:** permanent agriculture resources (PAR), 2006. p. 1-20.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *O Biologico* 2002; 64(2):135-142.

VAN DEN BERG, A. H.; MCLAGGAN, D.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; VAN WEST, P. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews* 2013; 27(2): 33-42.

VAN WEST, P. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 2006; 20(3): 99-104.

VELMURUGAN, P.; IYDROOSE, M.; MOHIDEN, M.H.A.K.; MOHAN, T.S.; CHO, M.; OH, B.T. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* EWP-46 cell-free extract and evaluation of its antibacterial activity. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2014; 37(8):1527-1534.

VENKATALAKSHMI, P.; BRINDHA, P.; VELLINGIRI, V. *In vitro* Antioxidant and Anti-inflammatory Studies on Bark, Wood and Fruits of *Terminalia catappa* L. *International Journal of Phytomedicine* 2015; 7(3): 246-253.

VINEELA, D.; REDDY, S.J. Effect of Silver Nanoparticles on Haematological and Protein Metabolic Indices of Carp Fish, *Catla catla*, treated with Lihocin and *A. veronii. International journal of Pharmacy & Life Sciences* 2015; 6(4):4393-4404.

WILEY, B.; SUN, Y.; MAYERS, B.; XI, Y. Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver. *Chemistry - A European Journal* 2005; 11: 454-463.

WILLEMS; WILDENBERG, V.D. *Roadmap report on nanoparticles*. Barcelona: Espana sl; 2005.

WILLETS, K.A.; VAN DUYNE, R.P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review of Physical Chemistry* 2006; 58:267-297.

WILLOUGHBY, L. G. Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. *Journal of Fish Diseases* 1985; 8(5): 473-476.

WILLOUGHBY, L. G.; ROBERTS, R. J. Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. *Journal of Fish Diseases* 1992; 15(1), 1-13.

WILLOUGHBY, L.G. *Fungi and Fish Diseases*. Stirling: Pisces Press; 1994.

XU, Y.; GAO, C.; LI, X.; HE, Y.; ZHOU, L.; PANG, G. *et al. In vitro* antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2013; 29(2): 270-274.

ZHANG, L.; ZHENG, Y.; CHOW, M. S.; ZUO, Z. Investigation of intestinal absorption and disposition of green tea catechins by Caco-2 monolayer model. *International journal of pharmaceutics* 2004; 287(1): 1-12.

ZHAO, M.; CROOKS, R. M. Homogeneous hydrogenation catalysis with monodisperse, dendrimer-encapsulated Pd and Pt nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition* 1999; 38(3): 364-365.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antifúngica *in vitro* de extrato aquoso de *Terminalia catappa* sob *Saprolegnia parasitica*

Antifungal activity *in vitro* of aqueous extract *Terminalia catappa* on *Saprolegnia parasitica*

MENESES, J.O.[1]; CUNHA, F. dos S.[1]; ABE, H.A.[2]; LIMA, B. dos Santos[3]; NETO, A.G. de C.[3]; ARAÚJO, A.A. de Souza[4]; DA COSTA, L. P.[5]; Santos, F. J. dos[6]; CARDOSO, J.C.[7]; DINIZ, L. E. C.[8]; FUJIMOTO, R.Y.[8]

[1]Pós graduanda da Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia, Aracaju - SE, 49032-490, juliana_mns27@hotmail.com/fe.cunha_@hotmail.com

[2]Pós graduando da Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 1 - Guamá, Belém - PA, 66075-110, higabe@gmail.com

[3]Pós graduando do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n - Jd. Rosa Elze, São Cristóvão - SE, 49100-000, brunolimafarm@gmail.com/guilherme2105@hotmail.com

[4]Pesquisador do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n - Jd. Rosa Elze, São Cristóvão - SE, 49100-000, adriasa2001@yahoo.com.br

[5]Pesquisador do Instituto do Instituto de Tecnologia e Pesquisa e Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe, Av. Murilo Dantas, nº 300 - Prédio do ITP (Universidade Tiradentes) - Farolândia, Aracaju - SE, 49032-490/ITPS, R. Campo do Brito, 371 - Treze de Julho, Aracaju - SE, 49020-380, lupeco7@hotmail.com

[6]Técnico da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia, Aracaju - SE, 49032-490, francisco.j.santos@embrapa.br

[7]Pesquisadora da Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia, Aracaju - SE, 49032-490, juaracaju@yahoo.com.br

[8]Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, nº 3.250, Bairro Jardins, CEP: 49025-040, Aracaju, SE, leandro.diniz@embrapa.br/ryfujim@hotmail.com

Resumo

O objetivo foi avaliar o efeito do extrato aquoso de *Terminalia catappa* no controle *in vitro* de *Saprolegnia parasitica*. O extrato de *T. catappa* foi preparado com duas temperaturas de extração (a quente e ambiente) e estes foram caracterizados por HPLC. No teste em meio sólido foram utilizadas 4 concentrações de extrato (0, 2,5, 5 e 10 $g.L^{-1}$), 2 tipos de meio de cultura (com e sem antibiótico) e 2 temperaturas de extração em triplicata. Em meio líquido foram utilizadas as mesmas concentrações de extrato a quente, 4 tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 h) e 2 tipos de meio de cultura em triplicata. O crescimento micelial foi aferido durante 96 h. O teste de Tukey e teste T pareado foram utilizados para comparação das médias. Ácido gálico e elágico foram identificados nos extratos, mas o extrato a quente apresentou as maiores concentrações. Em meio sólido, apenas 10 $g.L^{-1}$ com antibiótico a quente foi fungicida, já em meio líquido, 5 $g.L^{-1}$ e 10 $g.L^{-1}$ mostraram efeito fungicida. O extrato aquoso a quente de *T. catappa* é eficaz no controle *in vitro* de *Saprolegnia parasitica*.

Palavras-chave: Amendoeira; Eficácia; Fitoterapia; Fungo.

Abstract

The objective was to evaluate the effect of the aqueous extract of *Terminalia catappa* on the *in vitro* control of *Saprolegnia parasitica*. The extract was prepared through two methods (hot and in Room Temperature) and characterized by HPLC. In the solid-medium test, 4 concentrations of extract (0, 2.5, 5 and 10 $g.L^{-1}$), 2 culture medium (with and without antibiotic) and 2 extracts (hot and RT) in triplicate were used. In liquid medium the same concentrations of hot extract, 4 exposure times (24, 48, 72 and 96 h) and 2 culture medium in triplicate were used. Mycelial growth was measured for 96 h. Tukey's test and paired T test were used to compare the means. Galic acid and ellagic acid were identified in both extracts, but the hot extract presented higher concentrations. In solid medium, only 10 $g.L^{-1}$ hot extract with antibiotic was fungicidal and 5 $g.L^{-1}$ and 10 $g.L^{-1}$ showed a fungicidal effect in the liquid medium. The hot aqueous extract of *T. catappa* is effective in the control of *Saprolegnia parasitica*.

Keywords: Amendoeira; Efficacy; Fungus; Phytotherapy.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por peixes para alimentação humana tem contribuído para o impulso no desenvolvimento da piscicultura. Devido a esse aumento de produção, o limiar de equilíbrio entre o patógeno, hospedeiro e ambiente pode ser facilmente quebrado proporcionando surtos de doenças com altas taxas de mortalidade dos peixes cultivados. Dentre as doenças de grande impacto na piscicultura, destacamos a saprolegniose, causada pelo gênero *Saprolegnia* sp., o mais importante fungo que infecta peixes de água doce capaz de instalar-se e desenvolver-se em qualquer lesão na superfície do hospedeiro, além de ocasionar mortalidade e consequentemente a prejuízos econômicos (Van West, 2006; Van de berg *et al*., 2013).

No entanto, atualmente, não existem produtos químicos legalizados para o controle de doenças fúngicas para a aquicultura nacional. Nesse cenário, a fitoterapia pode ser uma

alternativa para o tratamento de doenças na piscicultura, já que possui um menor custo em relação aos fármacos, diminui a contaminação ambiental e é menos provável de causar resistência (Fujimoto *et al*., 2012).

Diante desta problemática e do potencial da fitoterapia, podemos citar a espécie *Terminalia catappa L.* como alternativa no controle de doenças na piscicultura. Esta espécie vegetal pertence à família Combretaceae, é originária da Índia e é conhecida por castanheira, castanhola, castanholeira, chapéu-de-sol e sete-copas e possui, além de flavonóides e terpenóides, os taninos, que apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica (Thomson; Evans, 2006; Chansue e Assawawongkasem, 2008; Claudiano *et al*., 2009).

Diversos estudos têm sido realizados com o extrato de diferentes partes (fruta, folha, casca) da *T. catappa* e tem demonstrado atividades biológicas como: antimicrobiana e antifúngica (Silva *et al*., 2015), antiparasitária (Claudiano *et al*., 2009), antioxidante (Venkatalakshmi *et al*., 2015), hepatoprotetiva (Tang *et al*., 2006), anti-inflamatória (Abiodun *et al*., 2016), anti-mutagênica (Mininel *et al*., 2014) e antidiabética (Nagappa *et al*., 2003).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato aquoso de *Terminalia catappa* no controle *in vitro* de *Saprolegnia parasitica*

MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas na Embrapa Tabuleiros Costeiros, na Universidade Tiradentes (UNIT), no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Identificação e depósito do material botânico

O material botânico utilizado neste trabalho foi coletado na Unidade Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros (10°57’06.15’’S; 37°03’15.4’’W). A identificação da espécie *Terminalia catappa L.* foi realizada pela curadora do Herbário Tiradentes AJU, da Universidade Tiradentes (UNIT/Aracaju/SE), Profa. Dra. Marla Ibrahim Uehbe de Oliveira. O material encontra-se depositado neste herbário sob o número de registro AJU 831.

Produção do extrato aquoso de *Terminalia catappa*

Para a produção de extrato aquoso, folhas amareladas caídas e secas de *T. catappa* foram coletadas, lavadas com água corrente e água destilada e secas em estufa de circulação de ar

forçado a 50 °C até peso constante da amostra (adaptado de Chyau *et al*., 2006; Nadirah *et al*., 2013).

Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas Marconi® e o material vegetal obtido foi separado por granulometria. Este procedimento foi realizado através de peneiras de aço-inox 8 mesh, 9, 16, 32, 60, 100 e 200 mesh. Após a obtenção dos diferentes grânulos, estes foram pesados para cálculo do rendimento em porcentagem.

Para a preparação do extrato aquoso foi utilizado o material peneirado entre 9 e 16 mesh. Dois extratos foram preparados seguindo metodologia adaptada de Chyau *et al*. (2006) e El-rafie e Hamed (2014) onde foram utilizadas duas temperaturas 80 °C/1 h (denominada de extração a quente) e temperatura ambiente 27 °C/1 h (TA) para realização da extração dos compostos. Para tanto, utilizou-se 25 g do pó das folhas de *T. catappa* e 500 mL de água destilada, colocados em béquer de vidro em banho maria à 80 °C/1 h. Em seguida, essa solução foi filtrada em papel de filtro n°1, sendo o filtrado armazenado e o pó ainda retido no filtro foi utilizado para realização do processo de reextração com mais 500 mL de água destilada, na tentativa de remover mais compostos da folha (extração realizada em duas frações, metodologia adaptada de Kim *et al*., 2011). Posteriormente, filtrou-se novamente a solução, descartando o que foi retido no filtro e armazenando o filtrado. Ao final do processo, os dois filtrados, da primeira extração e da reextração, foram misturados e compuseram o extrato a ser utilizado nos ensaios. Para a extração em TA foi utilizada a mesma metodologia porém em temperatura diferente.

Os extratos a quente e em TA foram congelados a -80 °C e então liofilizados em equipamento Labconco Freezone 4.5. a temperatura de -50 °C afim de manter as características químicas dos extratos. O material liofilizado foi pesado e a partir dos 25 g iniciais utilizados no processo foi possível obter o rendimento do extrato liofilizado.

Caracterização dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência

Os extratos em pó de *Terminalia catappa* em TA e a quente ressuspendidos em uma solução de metanol/água milli-q (50:50 v/v) até a concentração de 1 $mg.mL^{-1}$. Essas soluções foram submetidas a banho de ultrassom por 30 min e filtradas em membrana PTFE (politetrafluoretileno) de 0,45 µm antes das análises por HPLC.

As análises foram realizadas usando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, que consistiu em um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor

automático SIL-20A, forno da coluna CTO-20A, detector de arranjo de diodo SPD-M20Avp (DAD) acoplados a uma interface CBM-20A (Shimadzu Co.,Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada através de uma coluna analítica (Phenomenex Luna®) 4,6 x 150 mm (5 µm tamanho de partícula).

O volume de injecção foi de 20 µL e a taxa de fluxo da fase móvel foi de 1,0 $mL.min^{-1}$. A fase móvel consistiu em gradiente de: A: 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura (sistema Milli-Q) e B: metanol (grau HPLC). O gradiente de eluição começou com 5% de B durante 5 min, de 5 - 25% de B durante 5 - 10 min, em 25 - 50% de B durante 10 - 15 min, 50 - 55% de B durante 15 - 20 min, 55-60% de B durante 20 - 25 min, 60 - 100% B durante 25 - 30 min, 100 - 5% de B durante 30 - 35 min, retornando as condições iniciais e finalização da análise. O detector foi fixado em 254 nm para a análise de picos. Os compostos foram identificados através de injecções de normalização comparando os tempos de retenção e espectros de ultravioleta. Os padrões de ácido gálico ($C_7H_6O_5$; Sigma-Aldrich) e ácido elágico ($C_{14}H_6O_8$; Sigma-Aldrich) foram diluídos com metanol até 100 $\mu g.mL^{-1}$. Para a análise quantitativa foram preparadas curvas de calibração de cada padrão identificado em cinco concentrações: 1, 15, 25, 50 e 75 $\mu g.mL^{-1}$. Os dados foram analisados através do software LC Solution.

Ensaio *in vitro*

Isolamento de *Saprolegnia parasitica*

Para a realização do ensaio *in vitro*, o fungo *Saprolegnia parasitica* foi isolado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado no Laboratório de Aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Para o isolamento, fragmentos do fungo dos peixes naturalmente infectados foram removidos através de pinça e alça de platina e transferidos para placas de Petri de vidro contendo 20 mL de BDA (Ágar batata dextrose) e cultivados em 25 °C em câmara de germinação Tecnal TE-40. A *Saprolegnia parasitica* foi então preservada em água estéril (*Castellani*) no banco de cepas (TC/S 001).

Para identificação da espécie do fungo foi utilizado protocolo de extração adaptado de Romano e Brasileiro (1999). A cepa do fungo isolada de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi identificada como *Saprolegnia parasitica*, pela técnica de PCR de acordo Hulvey *et al*. (2007) utilizando os primers C1 (5'-ACCCGCTGATT-TAAGCAT-3'), D2 (5'-TCCGTGTTTCAAGACGG). O perfil de termociclagem incluiu uma etapa de desnaturação a

94 ° C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 ° C durante 30 s, anelamento do iniciador a 50 °C durante 30 s e extensão do iniciador a 72 °C durante 1,5 min, uma etapa final de extensão durante 7 min a 72 °C e um banho a 4 °C. O fungo foi identificado com 90% de similaridade com a espécie *Saprolegnia parasitica* (E-value 0,0).

Atividade antifúngica do extrato de *T. catappa in vitro* em meio sólido

Para o teste *in vitro* em meio sólido do extrato de *T. catappa*, um disco de 9 mm do meio de cultura com o fungo foi inoculado no centro de uma placa de Petri de vidro (80 x 10 mm) contendo BDA misturado às diferentes concentrações dos extratos. Nesse experimento utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 x 2 constituído de 4 concentrações de extrato (0, 2,5, 5 e 10 $g.L^{-1}$), 2 tipos de meio de cultura (com e sem antibiótico, Cloranfenicol - 500 $mg.L^{-1}$) e 2 tipos de preparo de extrato (a quente e em TA) em triplicata.

Diariamente, por um período de 96 h, o crescimento micelial de *Saprolegnia parasitica* foi avaliado por meio de medida dos diâmetros perpendiculares do halo de crescimento com um paquímetro digital de inox 150 mm LEE tools® (adaptado de Corrêa *et al*., 2013).

Após 96 h de experimento, o disco inicialmente inserido foi removido e realocado em novas placas contendo somente o meio de cultura BDA sem a presença das concentrações de extrato para confirmar a ação fungicida (micélios ausentes) ou fungistática dos extratos (micélios presentes) em até 96 h.

Atividade antifúngica do extrato a quente de *T. catappa in vitro* em meio líquido

O extrato que apresentou maior eficácia no experimento *in vitro* em meio sólido (extrato a quente) foi testado também em meio líquido a fim avaliar uma maior eficácia devido a maior contato do extrato com o fungo em meio líquido. Para o teste *in vitro* do extrato a quente de *T. catappa* em meio líquido, 4 discos de 9 mm do meio de cultura com o fungo foram inseridos em Erlenmeyers de 125 mL com volume útil de 50 mL (caldo de BDA, com e sem antibiótico, e as concentrações do extrato a serem testadas) que foram mantidos em Shaker de bancada Cientec CT-712RN em rotação de 125 rpm a 25 °C.

Nesse experimento utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 x 2 constituído de 4 concentrações de extrato a quente (0, 2,5, 5 e 10 $g.L^{-1}$), 4 tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 h) e 2 tipos de meio de cultura com e sem antibiótico (Cloranfenicol 500 $mg.L^{-1}$) em triplicata. Cada disco representou um tempo de exposição ao extrato 24, 48, 72 e 96 h. Após o tempo de exposição de cada disco, estes foram removidos dos

Erlenmeyers e colocados em placas de Petri contendo 10 mL de BDA sem antibiótico e sem as concentrações de extrato por 96 h subsequentes, para verificar o efeito fungicida ou fungistático do extrato.

Diariamente, por um período de 96 h, o crescimento micelial de *Saprolegnia parasitica* foi avaliado por meio de medida dos diâmetros perpendiculares do halo de crescimento (adaptado de Corrêa *et al*., 2013).

Análises estatísticas

Os dados dos experimentos *in vitro* foram submetidos a análise de normalidade de Shapiro Wilk e em caso de normalidade estes foram submetidos a ANOVA e sendo F significativo as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p=0,05), utilizando o software SISVAR versão 5.6 e o software Bioestat 5.3. Para a avaliação de efeito fungicida e funsgistático foi utilizado o teste t pareado, (p=0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção do extrato aquoso de *Terminalia catappa*

A massa total das folhas trituradas de *T. catappa* foi 430,18 g, sendo que na análise granulométrica foi possível visualizar partículas de diferentes tamanhos (< 8, 8, 9, 16, 32, 60, 100 e 200 mesh). Os maiores rendimentos (%) foram obtidos nas peneiras de 9 (49,86%) e 16 (32,37%) mesh e, portanto, estes foram utilizados para a extração a quente e em TA (Tab. 1). Houve uma perda de 1,32 g no final do procedimento. Esses fatores como tamanho de partícula, temperatura e tempo de extração tem efeito sobre o rendimento do extrato (Sari e Velioglu, 2011).

Tabela 1. Análise granulométrica de folhas de *Terminalia catappa* trituradas.

Tyler/Mesh	Massa (g)	Rendimento (%)
< 8	0,102	0,02
8	0,29	0,07
9	213,84	49,86
16	138,83	32,37
32	44,08	10,29
60	18,958	4,42
100	7,650	1,78
200	5,11	1,19
TOTAL	428,86	100

Após o processo de extração, o rendimento médio da extração a quente (80 °C/1 h) foi de 28,86% enquanto que a extração aquosa em TA (27 °C/1 h) apresentou rendimento de 16,76%.

El-Rafie e Hamed (2014), observaram menores rendimentos de 10% de extrato a quente (90 °C/1h) de *T. catappa,* 11% de *T. bellerica,* 11,8% *de T. bentazoe* e 12% de *T. mellueri* (12%), no entanto foi utilizado apenas 5 g de cada espécie e não foi citado a granulometria utilizada no processo de extração.

Em outras espécies vegetais, o rendimento de extração a quente (80 a 100 ° C/3 h - fração I; 80 a 100 °C durante 0,5 h - fração II) de *Rosmarinus officinalis* foi 19,75%, *Carum carvi* (12,00%), *Syzygium aromaticum* (19,58%), *Curcuma longa* (12,50%), *Maiorana hortensi* (18,07%), *Myristica fragrans* (7,64%), *Foeniculum vulgare* (11,38%), *Coriandrum sativum* (13,73%), *Satureja* (17,67%) e *Cuminum cyminum* (10,27%), no entanto foi utilizado 4 g de cada espécie e a granulometria utilizada também não foi citada (Kim *et al*., 2011). Assim, a utilização das frações granulométricas com 2 e 1 mm, melhoram o rendimento de extração do processo.

Análise de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos extratos aquosos de *T. catappa* em TA e a quente

Os cromatogramas dos extratos aquosos em TA e a quente de *T. catappa* estão apresentados na Figura 1. Ambos cromatogramas mostraram picos distintos, apresentando o pico do ácido gálico no tempo de retenção (RT) de 6 min e do ácido gálico em 13 min, porém com intensidades diferentes entre os processos de extração a quente em TA (Fig. 1: A e B). O extrato a quente apresentou picos de ambos os compostos com maior intensidade. O teor de ácido gálico e ácido elágico nos extratos aquosos de *Terminalia catappa* a quente foi 3,82 ± 0,23 $\mu g.mg^{-1}$ e 1,30 ± 0,38 $\mu g.mg^{-1}$ e em TA foi 2,60 ± 0,10 $\mu g.mg^{-1}$ e 1,12 ± 0,04 $\mu g.mg^{-1}$, respectivamente.

O ácido gálico e o acido elágico foram identificados em estudos de caracterização química das folhas e extrato das folhas de *Terminalia catappa,* (Chiau *et al*., 2006; Marrero Delange e RICO, 2016). Na literatura, esses fenóis de plantas são responsáveis por propriedades biológicas, incluindo as propriedades antimicrobianas (Penna *et al*., 2001; Van Der Watt e Pretorius, 2001). No entanto, o método de extração e o tipo de solvente utilizado influenciam diretamente a quantidade de compostos ativos presentes nos extratos de plantas e na sua atividade biológica (Hayouni *et al*., 2007).

Vale ressaltar a presença de picos nos tempos próximos a 17,5 e 22,5 min nos dois extratos produzidos que podem corresponder aos princípios ativos punicalina e punicalagina,

que são encontrados como componentes principais, junto do ácido gálico e elágico, em extratos de *T. catappa* (Silva *et al*., 2015).

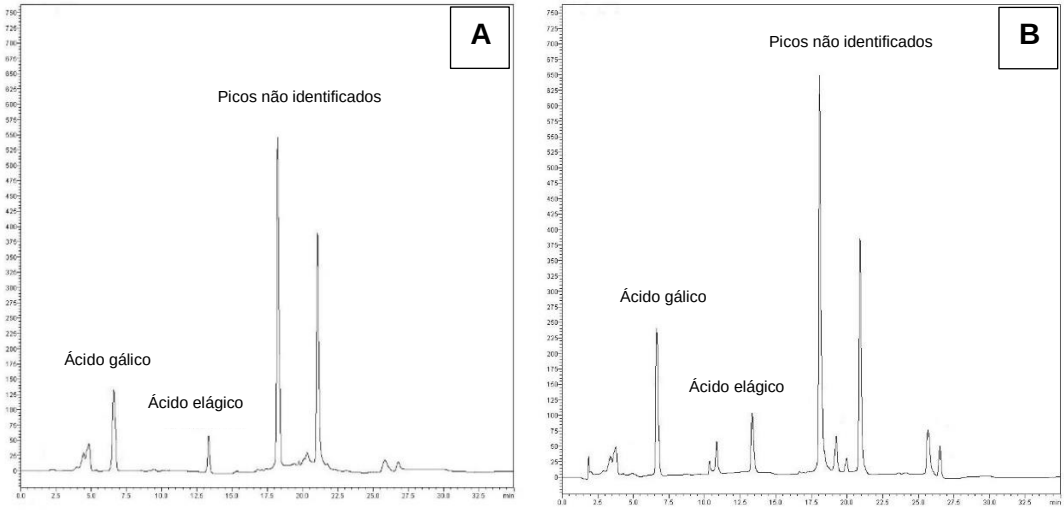

Figura 1: A: Cromatograma do extrato aquoso em TA de *Terminalia catappa* (254 nm); B: Cromatograma do extrato aquoso a quente de *Terminalia catappa* (254 nm).

Teste *in vitro* em meio sólido (BDA- ágar batata dextrose)

No teste *in vitro* em meio sólido dos extratos aquosos a quente e em TA de *T. catappa* a interação entre concentração do extrato e forma de extração (quente e em TA) foi significativa ($p<0,05$). Observou-se que elevação das concentrações do extrato a quente proporcionou maior inibição do crescimento micelial do fungo (Tab. 2), de forma que todos os tratamentos diferiram dos controles, sendo que a maior concentração (10 $g.L^{-1}$) foi o tratamento mais eficaz tanto no extrato em TA (4,44 ± 3,09 mm) como a quente (0,00 ± 0,00 mm).

Apesar da extração em TA ser um método mais utilizado, na extração a quente podem ocorrer mudanças químicas causadas pela temperatura resultando em biomoléculas mais ativas do que as encontradas em extratos com temperaturas mais baixas (Jeyaseelan e Jashothan, 2012). Em estudo da extração a quente realizada com solução aquosa de alho, 100% de inibição do crescimento micelial foi obervado para a espécie de fungo *Rhizoctonia solani (*Kane *et al*., 2002) corroborando com dados do presente estudo.

Tabela 2. Interação entre concentração e forma de extração aquosa de folhas de *T. catappa* (em TA e a quente) em teste in vitro com *Saprolegnia parasitica*.

Conc./Ext.	TA	Quente
0 g.L^{-1}	60,98 ± 17,77 Ad	60,82 ± 17,68 Ad
2,5 g.L^{-1}	27,46 ± 19,70 Bc	10,41 ± 5,67 Ac
5 g.L^{-1}	6,97 ± 3,78 Ab	7,37 ± 3,58 Ab
10 g.L^{-1}	4,44 ± 3,09 Ba	0,00 ± 0,00 Aa

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

A interação entre concentração de extrato e meio de cultura (com e sem antibiótico) foi significativa ($p<0,05$) (Tab. 3). A concentração de 10 g.L^{-1} foi mais eficaz dentre todos os tratamentos, independentemente do uso do antibiótico. Nas duas maiores concentrações não houve diferença entre o uso ou não do antibiótico mostrando que possivelmente o extrato anulou o efeito do antibiótico a partir de 5 g.L^{-1}. No entanto nos tratamentos controle e 2,5 g.L^{-1} foi possível perceber sinergismo entre o extrato aquoso de *T. catappa* e o antibiótico (Tab. 4). Com o aumento da concentração do extrato, independente do meio utilizado, qualquer dessas concentrações (2,5, 5 e 10 g.L^{-1}) mostrou propriedades antifúngicas sob o *Saprolegnia parasitica.*

O sinergismo entre extrato e antibiótico vem sendo relatado na literatura. Chanda *et al.* (2013) relataram a atividade antifúngica sinérgica de extrato metanólico de folhas de *Terminalia catappa* (10%) com nistatina e anfotericina-B contra cinco espécies de fungo. Além de efeitos sinérgicos entre extratos e antibióticos, o sinergismo entre óleos essenciais de plantas e antibióticos também têm sido relatados, como exemplo, o estudo realizado por Rosato *et al.* (2008), que avaliaram o efeito sinérgico do óleo essencial de caule e folhas de *Melaleuca alternifolia, Origanum vulgaree e Pelargonium* com anfotericina B sob 6 espécies de fungo (*Candida albicans, Candida glabrata, Candida guillermi, Candida krusei, Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* e verificaram que todos os tratamentos que utilizaram o extrato/antibiótico apresentaram um maior grau de inibição do que apenas o extrato isoladamente.

Tabela 3. Interação entre concentração do extrato aquoso de *T. catappa* e meio (sem antibiótico e com antibiótico) em teste *in vitro* com *Saprolegnia parasitica*.

Conc./Meio	S/A Diâmetro (mm)	C/A Diâmetro (mm)
0 g.L^{-1}	65,73 ± 13,25 Bd	56,07 ± 20,10 Ad
2,5 g.L^{-1}	24,21 ± 20,39 Bc	13,65 ± 9,89 Ac
5 g.L^{-1}	7,18 ± 3,98 Ab	7,16 ± 3,37 Ab
10 g.L^{-1}	1,58 ± 2,44 Aa	2,86 ± 3,61 Aa

***** Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$); S/A: sem antibiótico; C/A: com antibiótico (Cloranfenicol)

Analisando os tratamentos ao longo do tempo (Tab. 4), tods os tratamentos apresentaram efeitos sob o crescimento do micélio fúngico em relação ao controle em todos os tempos avaliados. Vale ressaltar que o uso de antibiótico afetou o crescimento do fungo nos controles até 48 h. A maior concentração do extrato foi mais eficiente no controle de *Saprolegnia* em todos os tratamentos e em todos os tempos observados. No entanto, os tratamentos de 10 g.L^{-1} com extrato a quente (sem e com antibiótico) não apresentaram crescimento micelial durante todo o tempo de observação.

Tabela 4. Interação entre concentração, meio e extrato aquoso de *T. catappa* ao longo do tempo (96 h) em teste *in vitro* com *Saprolegnia parasitica.*

Conc.x Meio x Ext./ Tempo		Média ± DP (mm) Diâmetro 24h	Média ± DP (mm) Diâmetro 48h	Média ± DP (mm) Diâmetro 72h	Média ± DP(mm) Diâmetro 96h
	0 g.L^{-1}	43,37 ± 0,21 Af	73,29 ± 0,07 Bh	73,29 ± 0,07 Bf	73,29 ± 0,07 Bg
	2,5 g.L^{-1}	11,42 ± 0,90 Ad	28,01 ± 2,03 Bf	46,08 ± 2,77 Ce	65,11 ± 3,10 Df
S/A F	5 g.L^{-1}	1,98 ± 0,75 Aabc	4,29 ± 0,13 Abc	7,97 ± 0,51 Bb	12,91 ± 0,96 Cc
	10 g.L^{-1}	0,89 ± 0,96 Aab	1,77 ± 1,18 Aab	3,14 ± 1,76 Aa	6,86 ± 1,46 Bb
	0 g.L^{-1}	43,16 ± 0,09 Af	73,16 ± 0,03 Bh	73,16 ± 0,03 Bf	73,16 ± 0,03 Bg
	2,5 g.L^{-1}	3,61 ± 0,78 Abc	8,03 ± 0,19 Bd	13,18 ± 0,48 Cc	18,26 ± 1,74 Dd
S/A Q	5 g.L^{-1}	2,75 ± 0,27 Aabc	6,16 ± 1,05 Bcd	9,46 ± 0,94 Cb	11,98 ± 1,33 Dc
	10 g.L^{-1}	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa
	0 g.L^{-1}	25,62 ± 1,09 Ae	51,84 ± 1,98 Bg	74,02 ± 1,35 Cf	73,18 ± 0,44 Cg
	2,5 g.L^{-1}	4,26 ± 0,66 Ac	11,36 ± 1,99 Be	20,90 ± 4,93 Cd	32,53 ± 9,06 De
C/A F	5 g.L^{-1}	2,73 ± 0,48 Aabc	6,33 ± 0,16 Bcd	8,15 ± 0,12 Bb	11,43 ± 0,69 Cc
	10 g.L^{-1}	2,12 ± 0,35 Aabc	4,28 ± 0,21 ABbc	6,45 ± 0,28 Bb	10,05 ± 0,36 Cbc
	0 g.L^{-1}	26,01 ± 0,57 Ae	50,9 ± 0,58 Bg	73,46 ± 0,03 Cf	73,46 ± 0,03 Cg
	2,5 g.L^{-1}	2,68 ± 0,37 Aabc	7,37 ± 0,40 Bcd	13,02 ± 0,95 Cc	17,11 ± 1,53 Dd
C/A Q	5 g.L^{-1}	2,27 ± 0,18 Aabc	6,03 ± 0,34 Bcd	8,95 ± 0,81 Bc	11,40 ± 0,68 Dc
	10 g.L^{-1}	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$); S/A: sem antibiótico; C/A: com antibiótico (Cloranfenicol); F: extrato em TA; Q: extrato a quente.

Em relação ao efeito fungicida e fungistático dos extratos utilizados no controle de *Saprolegnia parasitica* em meio sólido, apenas a concentração de 10 g.L^{-1} com antibiótico a quente foi fungicida, todos os outros tratamentos apresentaram efeito fungistático (Tab. 5), ressaltando assim o efeito sinérgico entre o extrato e o antibiótico. Os estudos que avaliam atividade antifúngica de extratos e realizam experimento complementar de realocar o fungo para meio nutritivo para verificar possível recuperação do mesmo são escassos.

Tabela 5. Efeito fungistático e fungicida dos diferentes extratos utilizados em teste *in vitro* em meio sólido sob *Saprolegnia parasitica*.

Tratamento		Diâmetro Média ± DP (mm) 96h de exposição ao Extrato	Diâmetro Média ± DP (mm) 96h em meio nutritivo
S/A	**2,5 g.L^{-1} F**	65,06 ± 3,08 a	73,36 ± 0,30 b
	2,5 g.L^{-1} Q	18,2 ± 1,73 a	73,83 ± 0,11 b
	5 g.L^{-1} F	12,86 ± 0,95 a	73,53 ± 0,05 b
	5 g.L^{-1} Q	11,93 ± 1,36 a	73,45 ± 0,21 b
	10 g.L^{-1} F	6,83 ± 1,43 a	73,5 ± 0,1 b
	10 g.L^{-1} Q	0,00 ± 0,00 a	24,83 ± 41,89 b
C/A	**2,5 g.L^{-1} F**	32,5 ± 9,07 a	73,66 ± 0,05 a
	2,5 g.L^{-1} Q	16,5 ± 0,35 a	73,3 ± 0,15 b
	5 g.L^{-1} F	11,39 ± 0,66 a	72,5 ± 1,64 b
	5 g.L^{-1} Q	11,3 ± 0,65 a	73,4 ± 0,17 b
	10 g.L^{-1} F	10,00 ± 0,36 a	73,4 ± 0,2 b
	10 g.L^{-1} Q	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a

*Letras diferentes na mesma linha, apresentam diferenças estatísticas ($p<0,05$) no teste t de amostra dependentes.

Teste *in vitro* em meio líquido (Caldo de batata dextrose)

No teste *in vitro* do extrato aquoso a quente em meio líquido a interação entre concentração e meio e exposição e meio não foi significativa ($p>0,05$). Houve interação significativa entre concentração e tempo de exposição ($p<0,05$) (Tab. 6). O fungo exposto à concentração de 5 g.L^{-1} após realocado para meio nutritivo continuou sem apresentar crescimento micelial ao longo das 96 h de exposição, diferindo do teste em meio sólido, demostrando o melhor contato do extrato com o fungo. Esta maior eficiência em meio líquido é importante, uma vez que estes extratos serão testados *in vivo* no controle de saprolegniose em tambaqui (*Colossoma macropomum*) em meio aquático.

Além disso, os discos com fungo expostos às diferentes concentrações de extrato quando transferidos para meio de cultura nutritivo por 96 h, mostrou que, nas concentrações de 5 g.L^{-1} e 10 g.L^{-1} os discos permaneceram sem crescimento micelial, mostrando efeito fungicida e na menor concentração o fungo voltou a crescer, mostrando efeito fungistático (Tab. 6).

Tabela 6. Interação entre concentração do extrato aquoso de *T. catappa* e período de 96 h de subsequente do disco ao extrato em teste *in vitro* em meio líquido com *Saprolegnia parasitica.*

Conc./Exp.	24h	48h	72h	96h
0 $g.L^{-1}$	67,96 ± 10,02 Ac	66,83 ± 11,77 Ac	65,87 ± 13,59 Ac	65,36 ± 15,07 Ab
2,5 $g.L^{-1}$	45,54 ± 30,67 Cb	21,94 ± 29,15 Bb	18,76 ± 28,74 ABb	6,65 ± 19,91Aa
5 $g.L^{-1}$	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa
10 $g.L^{-1}$	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa

*Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

CONCLUSÃO

O extrato aquoso a quente de *T. catappa* foi eficaz no controle de *Saprolegnia parasitica in vitro* nas concentrações de 5 e 10 $g.L^{-1}$ podendo ser uma alternativa no controle de doenças fúngicas em peixes desde que se cumpram a premissas dos testes *in vivo* e de toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIODUN, O. O.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; GOMEZ-CARAVACA, A. M. *et al*. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L.(Combretaceae): *In vitro* and *in vivo* evidences. *J. Ethnopharmacol*., v.192, p. 309-319, 2016.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K.; DHOLAKIA, K.; BARAVALIA, Y. Antimicrobial, antioxidant, and synergistic properties of two nutraceutical plants: *Terminalia catappa* L. and *Colocasia esculenta* L. *Turk. J. Biol.*, v. 37, n.1, p. 81-91, 2013.

CHANSUE, N.; ASSAWAWONGKASEM, N. The *in vitro* antibacterial activity and ornamental fish toxicity of the water extract of Indian almond leaves (*Terminalia catappa* Linn.). *KKU Vet. J.*, v.18, n.1, p.36-45, 2008.

CHYAU, C. C.; KO, P. T.; MAU, J. L. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. *LWT-Food Sci. Technol.*, v. 39, n.10, p. 1099-1108, 2006.

CLAUDIANO, G. D. S.; NETO, J. D.; SAKABE, R.; CRUZ, C. D. *et al.* Eficácia do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.10, n.3, p. 625-636, 2009.

CORRÊA, B. F.; STOHL, F. E.; ROBALDO, R. B.; PEREIRA, D. I. B. *In vitro* effect of chemical on hyphal growth of *Saprolegnia* spp. *Ciênc. Rural*, v.43, n.6, p.1021-1024, 2013.

EL-RAFIE, H.M.; HAMED, M.A.A Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four*Terminalia* species. *Advances in Natural Sciences: Nanosci. Nanotechnol.*, v.5, n.3, p.1-12, 2014.

FUJIMOTO, R. Y.; COSTA, H. C. D.; RAMOS, F. M. Alternative control of helminthes, parasites of Astyanax cf. zonatus, using phytotherapy with seeds of *Cucurbita maxima* and *Carica papaya*. *Pesq. Vet. Bras.*, v.32, n.1, p.5-10, 2012.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDI, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.*, v.105, n.3, p.1126-1134, 2007.

HULVEY, J. P.; PADGETT, D. E.; BAILEY, J. C. Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. *Mycologia*, v.99, n. 3, p.421-429, 2007.

JEYASEELAN, E. C.; JASHOTHAN, P. J. *In vitro* control of *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571) and Escherichia coli (ATCC 25922) by *Ricinus communis* L. *Asian Pac. J. of Trop. Biomed.*, v.2, n.9, p.717-721, 2012.

KANE, P. V; KSHISARGAR, C. R; JADHAV, A. C; PAWAR, N. B. *In vitro* evaluation of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* from chickpea. J. *Maharashtra Agric. Univ.*, v.27, p.101-102, 2002.

KIM, I. S.; YANG, M. R.; LEE, O. H.; KANG, S. N. Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *Int. J. Mol. Sci.*, v.12, n.6, p. 4120-4131, 2011.

MARRERO DELANGE, D.; MORALES RICO, C. L. Identificación de ácidos polifenólicos en el extracto metanólico de las hojas de *Terminalia catappa* Linn. *Rev. Cubana Plant. Med.*, v.21, n.2, p.223-233, 2016.

MININEL, F. J.; LEONARDO JUNIOR, C. S.; ESPANHA, L. G.; RESENDE, F. A. *et al*. Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn.(Combretaceae) and their mutagenic activity. J. *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, v.2014, p.1-11, 2014.

NADIRAH, M.; WEE, T. L.; NAJIAH, M. Differential responses of Vibrio sp. to young and mature leaves extracts of *Terminalia catappa* L. *Int. Food Res. J.*, v.20, n.2, p.961-966, 2013.

NAGAPPA, A. N.; THAKURDESAI, P. A.; RAO, N. V.; SINGH, J. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. *J. Ethnopharmacol.*, v.88, n.1, p.45-50, 2003.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C. *et al*. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases: isolation of active compounds from Sebastiania brasiliensis. *J. Ethnopharmacol.*, v.77, n.1, p.37- 40, 2001.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. *Biotecnolog., Ciênc. Desenvolv.*, v.2, n.9, p.40-43,1999.

ROSATO, A.; VITALI, C.; GALLO, D.; BALENZANO, L. *et al.* The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, v.15, n.8, p.635-638, 2008.

SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea. *J. Food Comp. Anal.*, v.24, n.8, p.1130-1135, 2011.

SILVA, L. P.; DE ANGELIS, C. D.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H. *et al*. *Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-Helicobacter pylori and antiulcer action in experimental rodent models. *J. Ethnopharmacol.*, v.159, p.285-295, 2015.

TANG, X.; GAO, J.; WANG, Y.; FAN, Y. M. *et al*. Effective protection of Terminalia catappa L. leaves from damage induced by carbon tetrachloride in liver mitochondria. *J. Nutr. Biochem.*, v.17, n.3, p.177-182, 2006.

THOMSON, L.A.J.; EVANS, B. *Terminalia catappa* (tropical almond). In: ELEVITCH, C.R. Species profiles for pacific Island agroforestry**:** permanent agriculture resources (PAR). Hawai:Western sare, 2006. p. 1-20.

VAN DEN BERG, A. H.; MCLAGGAN, D.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; VAN WEST, P. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biol. Rev.*, v.27, n.2, p.33-42, 2013.

VAN DER WATT, E.; PRETORIUS, J. C. Purification and identification of active antibacterial compounds in *Carpobrotus edulis* L. *J. Ethnopharmacol.*, v.76, n.1, p.87- 91, 2001.

VAN WEST, P. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*, v.20, n.3, p.99-104, 2006.

VENKATALAKSHMI, P.; BRINDHA, P.; VELLINGIRI, V. *In vitro* Antioxidant and Anti-inflammatory Studies on Bark, Wood and Fruits of *Terminalia catappa* L. *Int. J. Phytomed.*, v.7, n.3, p.246-253, 2015.

Síntese de nanopartículas de prata e sua atividade antifúngica sob *Saprolegnia parasitica in vitro*

Silver nanoparticles synthesis and antifungal activity on *Saprolegnia parasitica in vitro*

MENESES, J.O[1]; CUNHA, F. dos S.[1]; NASCIMENTO, V.R.S.[2]; CUNHA, A.F.S.da[2]; DIAS, J.A.R.[3]; SOUSA, N.da C.[3]; COUTO, M.V.S. do[3]; DA COSTA, L.P[4]; CARDOSO, J.C.[5]; FUJIMOTO, R.Y.[6]

[1] Pós graduanda da Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia, Aracaju - SE, 49032-490, juliana_mns27@hotmail.com/fe.cunha_@hotmail.com

[2]Graduando da Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia, Aracaju - SE, 49032-490, victoruan2008@hotmail.com/flaviasantoscunha@yahoo.com

[3]Pós graduando da Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 1 - Guamá, Belém - PA, 66075-110, natal159@yahoo.com.br/vallcouto18@hotmail.com

[4]Pesquisador do Instituto do Instituto de Tecnologia e Pesquisa e Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe, Av. Murilo Dantas, nº 300 - Prédio do ITP (Universidade Tiradentes) - Farolândia, Aracaju - SE, 49032-490/ITPS, R. Campo do Brito, 371 - Treze de Julho, Aracaju - SE, 49020-380, lupeco7@hotmail.com

[5]Pesquisadora da Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia, Aracaju - SE, 49032-490, juaracaju@yahoo.com.br

[6]Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, nº 3.250, Bairro Jardins, CEP: 49025-040, Aracaju, SE, leandro.diniz@embrapa.br/ryfujim@hotmail.com

Resumo

O objetivo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* em *Saprolegnia parasitica* de nanopartículas de prata sintetizadas por diferentes métodos. As AgNP foram sintetizadas por diferentes métodos e então caracterizadas por microscopia, espectroscopia e espectrometria. Foram realizados teste *in vitro* em meio sólido e em meio líquido e após 96 h de experimento foi realizado teste para confirmar a ação fungicida ou fungistática. Diariamente o crescimento micelial foi avaliado. Teste de tukey e teste t pareado foram utilizados. A banda plasmon das AgNP foi de 396-420 nm. O tamanho das partículas foram AgNP-BORO 6,80 ± 4,0 nm, AgNP-CIT 5,99 ± 3,39 nm, AgNP-PVA 30 mg 4,92 ± 1,68 nm e AgNP-PVA 300 mg 5,54 ± 2,27 nm. No teste com AgNP-PVA, o tratamento 10^{-3} mM foi mais eficaz no controle do fungo. A concentração de AgNP obtida pelo método PVA foi de 87,3 $mg.L^{-1}$, BORO foi 146,55 $mg.L^{-1}$, e CIT foi 18,31 $mg.L^{-1}$. Em meio líquido, AgNP-PVA 300 mg foi mais eficaz e mostrou-se fungicida ao longo das 96 h, independente do meio. A AgNP-PVA foi a mais eficaz no controle de *Saprolegnia parasitica*, sendo que a AgNP com 300 mg $AgNO_3$ é mais indicado.

Palavras-chave: AgNP; Controle; Fungo; Nanotecnologia.

Abstract

The objective was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by different methods on *Saprolegnia parasitica*. The AgNP were synthesized by different methods and caracterized by microscopy, spectroscopy and spectrometry. *In vitro* tests in solid and liquid medium were performed and after 96 h other test was performed to confirm fungistatic or fungistatic action. Daily mycelial growth was evaluated. Tukey test and paired t test were used. The plasmon band of AgNP was 396-420 nm. Particle size were AgNP-BORO 6.80 ± 4.0 nm, AgNP-CIT 5.99 ± 3.39 nm, AgNP-PVA 30 mg 4.92 ± 1.68 nm and AgNP-PVA 300 mg 5.54 ± 2.27 nm. In the AgNP-PVA test, 10^{-3} mM treatment was more effective in the fungus control. The concentration obtained by PVA method was 87.3 $mg.L^{-1}$, BORO was 146.55 $mg.L^{-1}$ and CIT was 18.31 $mg.L^{-1}$. In liquid medium, AgNP-PVA 300 mg was the most effective and showed fungicidal over the 96 h, regardless of the medium used. AgNP-PVA was the most effective in the control of *Saprolegnia parasitica*, and the AgNP with 300 mg $AgNO_3$ process is the most suitable.

Keywords: AgNP; Control; Fungus; Nanothecnology.

INTRODUÇÃO

A espécie *Saprolegnia parasitica*, é considerada dentre oomicetos um dos agentes patogênicos mais destrutivos em peixes. Esta espécie é endêmica de habitats de água doce em todo o mundo e responsável pelo declínio de populações de salmonídeos e outros peixes de água doce. Estima-se que 10% dos salmões cultivados são dizimados por infecções por *Saprolegnia* e as perdas são estimadas em dezenas de milhões de dólares anualmente. Além do dano causado a aquicultura, o declínio de populações naturais de salmonídeos também tem sido atribuído a estas infecções (Van West, 2006).

Surtos de infecções fúngicas (saprolegniose) causam mortalidades em diferentes estágios de vida dos peixes de ovos a adultos, sendo que em ovos tem apresentado grande relevância devido as altas mortalidades provocadas no período de incubação, sendo então um obstáculo na indústria aquícola mundial (Soltani *et al*., 2011).

No entanto, atualmente, não existem produtos químicos legalizados para o controle de doenças fúngicas para a aquicultura nacional. Nesse cenário, a nanotecnologia apresenta-se como uma ferramenta para proporcionar desenvolvimento de produtos com maior eficácia utilizando, em teoria, uma menor concentração, pois possui tamanho diminuto com elevada área de superfície específica que favorece a passagem pelas membranas celulares (Mittal *et al*., 2013).

Na aquicultura, a nanotecnologia tem sido utilizada para desenvolvimento de diversos produtos como nanovacinas, nanomateriais para identificação de doenças, nanomateriais com liberação inteligente de compostos (antibióticos, imunestimulantes) (Rather *et al*., 2011) e nanopartículas com propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Pérez-Dias *et al*., 2015). Sendo que as nanopartículas de prata destacam-se pelo efeito fungicida desse elemento químico (Lemire *et al.*, 2015).

As nanopartículas de prata apresentam grande versatilidade de aplicações e facilidade de preparação, de forma que sua síntese pode ser química, física ou biológica. O método mais comum para sintetizar nanopartículas de prata é a redução química por agentes redutores inorgânicos e orgânicos. Neste processo, diferentes redutores e estabilizantes têm sido utilizados. Dentre os redutores estão o citrato de sódio, boro hidreto de sódio, ascorbato, dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, álcool, polietilenoglicol, entre outros. Tais agentes reduzem Ag^{+} e conduzem a formação de prata metálica (Ag^{0}), seguida de formação de aglomerados oligoméricos. Posteriormente, estes aglomerados conduzem a formação de partículas de prata coloidais metálicas (Da Costa *et al.*, 2011*;* Pencheva *et al.*, 2012; Simsir *et al.*, 2015). E dentre os agentes estabilizantes utilizados, os compostos poliméricos como álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol e polimetacrilato de metil são descritos na literatura como agentes eficazes na estabilização de nanopartículas (Pencheva *et al*., 2012). Estes agentes além de interagir com a superfície das partículas para estabilizar o crescimento destas, protege as partículas contra sedimentação, aglomeração e perda de propriedades superficiais.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de nanopartículas de prata sintetizadas por diferentes métodos em *Saprolegnia parasitica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese de Nanopartícula de prata (AgNP) com boro hidreto de sódio- AgNP-BORO

Primeiramente, 1,69 mg $AgNO_3$ foram dissolvidos em 10 mL de água destilada em temperatura ambiente em agitador magnético durante 15 min. Posteriormente 2,26 mg de boro hidreto de sódio ($NaBH_4$) foram dissolvidos em 30 mL de água destilada em agitador magnético durante 15 min em temperatura ambiente. Depois a solução de $NaBH_4$ foi colocada em banho de gelo até atingir temperatura de 4 °C. Finalmente, 10 mL de solução de $AgNO_3$ foram gotejados sobre a solução de $NaBH_4$ durante 30 min em banho de gelo a 4 °C, sendo perceptível a mudança de cor. No final, a solução foi agitada em banho de gelo durante mais 5 min (adaptado de Simsir *et al*., 2015).

Síntese de AgNP com Citrato de sódio e boro hidreto de sódio-AgNP-CIT

Inicialmente, no processo de preparação das nanopartículas, 2,12 mg de $AgNO_3$ foram dissolvidos em 50 mL de água destilada e 3,67 mg de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) foram dissolvidos em outros 50 mL de água destilada. Após as soluções prontas, os 50 mL da primeira solução foram adicionados aos 50 mL da segunda solução por 30 s, sob agitação magnética e abrigo de luz a 23 °C ± 2 °C. Paralelamente a isto, uma solução de boro hidreto de sódio foi preparada, 0,113 mg de $NaBH_4$ foram dissolvidos em 3 mL de água destilada. Imediatamente após a mistura das soluções de nitrato de prata e citrato de sódio, adicionou-se a alíquota de 3 mL da solução de $NaBH_4$. Em seguida, a agitação foi mantida por mais 1 min (adaptado de Jana *et al*., 2001).

Síntese de AgNP com álcool polivinílico (PVA)- AgNP-PVA

Para a produção de nanopartículas de prata, 5000 mg de álcool polivinílico (PVA) foi dissolvido em 95 mL de água deionizada sob agitação a 80 ºC. Paralelamente, 30 mg de nitrato de prata ($AgNO_3$) foi dissolvido em 5 mL de água e adicionado gota-a-gota, sob agitação, a solução de 95 mL de PVA (5%) alcançando a concentração final de nitrato de prata de 300 $mg.L^{-1}$. Posteriormente, as soluções preparadas foram aquecidas a 100 °C/1h em ambiente escuro conduzindo a formação de nanopartículas de prata estabilizadas com PVA (Pencheva *et*

al., 2012). Este mesmo método de síntese também foi realizado utilizando uma concentração maior de $AgNO_3$ (300 mg).

Caracterização das AgNP

Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A redução de Ag^+ em Ag^0 foi observada por medição da absorbância em Espectro de UV-Vis com o equipamento FEMTO 800xi com cubetas de quartzo HELLMA no. 110-QS. A redução química de cada amostra de AgNP foi monitorada por mensuração da absorbância de uma alíquota de 3 mL (sem diluição prévia) em faixa de comprimento de onda de 300 a 800 nm com 2 nm de resolução, nos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 24 h e 1 semana. Os dados de absorbância e comprimento de onda foram plotados no software Origin 6.0 Professional, para elaboração de gráficos.

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão TEM-MSC JEOL 2100, operando com aceleração de 200 kV, para isto, as amostras de AgNP foram gotejadas diretamente na grade de cobre. As nanopartículas foram contabilizadas e mensuradas no software Image Tool 3.0. e os gráficos de histograma foram elaborados no software Origin 6.0 Professional.

Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES)

Para esta análise foi utilizada a solução padrão de $AgNO_3$ da Merck® ($AgNO_3$ em HNO_3 0,5 $mol.L^{-1}$) e o equipamento Varian 720-OES. Antes de iniciar a leitura, foram feitos cálculos de diluição para cada amostra de acordo com a curva de calibração da prata (1 a 10 $mg.L^{-1}$) de forma que as amostras foram diluídas em ácido nítrico (3%) conforme padrão do $AgNO_3$ (Da Costa *et al.*, 2013). As concentrações das amostras foram obtidas em $mg.L^{-1}$

Atividade Antifúngica de AgNP-PVA, AgNP-BORO, AgNP- CIT *in vitro* em meio sólido

Para os testes *in vitro* em meio sólido, diferentes concentrações de AgNP foram adicionadas em ágar Batata dextrose água (BDA) e plaqueadas em placa de Petri de vidro (80 x 10 mm). Posteriormente, um disco de 9 mm de meio de cultura com o fungo foi inoculado no centro de cada placa e então observado o crescimento micelial a cada 24 h durante 96 h por meio de medida dos diâmetros perpendiculares do halo de crescimento com um paquímetro

digital (adaptado de Corrêa *et al*., 2013). O experimento foi realizado a 25 °C e utilizou-se o antibiótico cloranfenicol (500 $mg.L^{-1}$) para impedir o crescimento bacteriano. O fungo foi isolado de tambaquis (*Colossoma macropomum*) e identificado pela metodologia descrita por Hulvey *et al*. (2007).

Para cada experimento foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 constituído de 4 concentrações de AgNP, 2 tipos de meio de cultura (sem e com antibiótico) e 3 repetições, sendo que para cada síntese utilizou-se as seguintes alíquotas de nanopartículas: AgNP-PVA (0, T_1= 1 mL de solução de AgNP-PVA 10^{-5} mM + 9 mL de BDA, T_2=1 mL de solução de AgNP-PVA 10^{-4} mM + 9 mL de BDA e T_3=1 mL de solução de AgNP-PVA 10^{-3} mM + 9 mL BDA), AgNP-BORO (0,T_1= 0,25 mL AgNP-BORO + 0,75 mL água destilada + 9 mL de BDA, T_2=0,5 mL de AgNP-BORO + 0,5 mL de água destilada + 9 mL de BDA, T_3= 1 mL de AgNP-BORO + 9 mL de BDA) e AgNP- CIT (0,T_1= 0,25 mL AgNP-CIT + 0,75 mL água destilada + 9 mL de BDA, T_2=0,5 mL de AgNP- CIT + 0,5 mL de água destilada + 9 mL de BDA, T_3= 1 mL de AgNP- CIT + 9 mL de BDA).

Comparação da ação antifúngica do PVA e AgNP-PVA

Devido aos resultados do teste *in vitro* em meio sólido com diferentes nanopartículas sintetizadas, outro teste *in vitro* foi realizado com concentrações maiores que o teste anterior. Assim, foi realizado um teste *in vitro* com as nanopartículas, partindo de soluções com 30 mg e 300 mg de $AgNO_3$ e comparando com o efeito isolado do PVA (álcool polivínílico).

Para os ensaios em meio sólido foram utilizados delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 constituído de 4 formulações diferentes (Controle, PVA, AgNP- PVA partindo de 30 mg de nitrato de prata e AgNP-PVA partindo de 300 mg de nitrato de prata) e dois tipos de meio com 3 repetições. A solução de álcool polivinílico foi preparada de forma que 5000 mg de PVA foram dissolvidos em 95 mL de água destilada a 80 °C em agitador magnético (Pencheva *et al*., 2012).

As formulações utilizadas no delineamento foram as seguintes: 1 mL água + 9 mL BDA, 1 mL de solução de PVA + 9 mL de BDA,1 mL de AgNP- PVA partindo de 30 mg de nitrato de prata + 9 mL de BDA e 1 mL de AgNP-PVA partindo de 300 mg de nitrato de prata + 9 mL de BDA, com dois tipos de meio (sem e com antibiótico) e três repetições. O teste teve duração de 96 h e foi realizado em temperatura de 25 °C. Diariamente, o crescimento micelial de

Saprolegnia parasitica foi avaliado de acordo com a mesma metodologia utilizada nos outros testes *in vitro*.

Após 96 h de experimento, o disco inicialmente exposto foi removido e realocado em novas placas contendo somente o meio de cultura nutritivo (BDA) sem a presença das concentrações de AgNP e PVA para confirmar a ação fungicida (micélios ausentes) ou fungistática dos composto (micélios presentes) em até 96 h.

Para avaliar se a superfície de contato em meio aquoso aumentaria a eficácia do tratamento foram realizados os ensaios *in vitro* também em meio líquido. As alíquotas dos formulados sintetizados foram incorporados ao caldo de batata em Erlenmeyers de 125 mL com volume útil de 50 mL (com e sem antibiótico) e a estes recipientes foram adicionados 4 discos de 9 mm do meio de cultura com o fungo e então mantidos em Shaker de bancada Cientec CT-712RN em rotação de 125 rpm a 25 °C. O delineamento experimental do ensaio em meio líquido obedeceu a mesma proporção do ensaio em meio sólido. As formulações foram as seguintes: 5 mL de água destilada + 45 mL de Caldo de batata, 5 mL de PVA + 45 mL de Caldo de Batata, 5 mL de AgNP-PVA partindo de 30 mg de nitrato de prata + 45 mL de caldo de batata e 5 mL de AgNP-PVA partindo de 300 mg de nitrato de prata + 45 mL de caldo de batata.

Para isto, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 x 2, com 4 tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 h), 4 formulações, dois tipos de meio (com e sem antibiótico) e três repetições. Após 24, 48, 72 e 96 h de exposição às formulações, um disco de cada repetição foi retirado e colocado em placa de Petri contendo 10 mL de ágar BDA sem antibiótico para verificar o efeito fungicida ou fungistático. Diariamente, por um período de 96 h, o crescimento micelial de *Saprolegnia parasitica* foi avaliado por meio de medida dos diâmetros perpendiculares do halo de crescimento com um paquímetro digital de inox 150 mm LEE tools® (adaptado de Corrêa *et al*., 2013).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados dos experimentos *in vitro* foram submetidos a análise de normalidade de Shapiro Wilk e em caso de normalidade estes foram submetidos a ANOVA e sendo F significativo as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p=0,05). Para a avaliação de efeito fungicida e fungistático foi utilizado o teste t pareado (antes e depois) (p=0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das AgNP-BORO, AGNP-CIT, AgNP-PVA

A sínteses de AgNP-BORO, AgNP-CIT e AgNP-PVA foram confirmadas através da análise de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. Nesta análise, é possível detectar a banda plasmon ou ressonância de plasmon de superfície, que é a propriedade óptica que nanopartículas metálicas possuem devido a interação com a radiação eletromagnética (Pal *et al.*, 2007).

A banda plasmon da AgNP-BORO variou pouco ao longo do tempo (0 h a uma semana), entre 396 e 398 nm, no entanto, estabilizou em 398 nm. Tais dados corroboram com os obtidos por Simsir *et al*. (2015) que detectaram o pico de absorbância máxima em 396 nm e também uma banda estreita utilizando o mesmo método.

As bandas plasmon das amostras de AgNP-BORO apresentaram padrões semelhantes ao longo do tempo sem haver deslocamento no máximo de absorção, o que sugere que não houve aumento de tamanho de partículas. No entanto, do período de 0 h a 24 h as bandas plasmon aumentaram a intensidade evidenciando o aumento de populações de nanopartículas esferoidais formadas. Já no período de uma semana a banda apresentou alargamento que pode estar relacionado à interação entre partículas próximas ou até mesmo aglomeração e redução da intensidade devido à deposição nas paredes do vidro do recipiente (Da Costa *et al*., 2011). Já as imagens da microscopia eletrônica de transmissão mostraram que as AgNP-BORO apresentaram nanopartículas de forma esferoidal e variaram de 2-20 nm, com maior intensidade de 3 - 6 nm, apresentando tamanho médio de 6,80 ± 4,0 nm (Fig. 1).

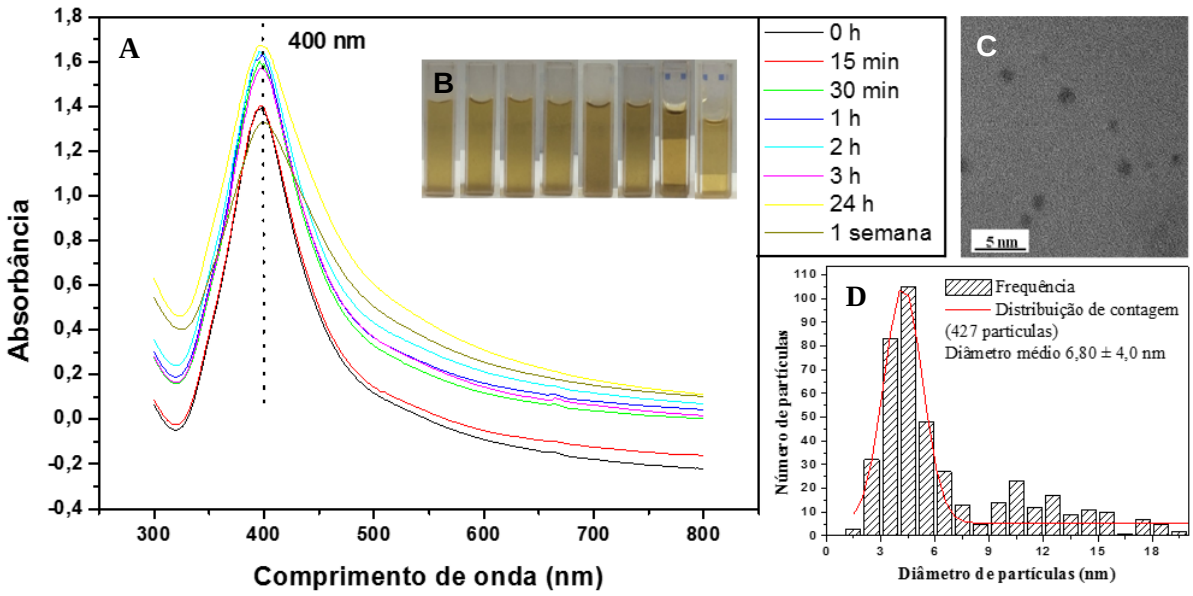

Figura 1. A. Espectros de UV-Vis de AgNP-BORO ao longo do tempo; B. Coloração de AgNP-BORO ao longo do tempo; C. Imagem de microscopia eletrônica de AgNP-BORO; B: Histograma de distribuição de tamanho de AgNP-BORO. Contagem feita por amostragem em várias imagens da amostra.

A banda plasmon da AgNP- CIT do tempo 0 até 3 h foi 390 nm, no entanto com 24 h a banda plasmon foi 396 nm, e no período de uma semana foi 400 nm corroborando com outros estudos que avaliaram a síntese de nanopartículas de prata com citrato de sódio e apresentaram banda plasmon em torno de 400 nm (Pillai e Kamat, 2004). Do período de 0 h a 3 h, as bandas apresentaram maior intensidade mostrando um aumento de populações de nanopartículas, sendo que no período de 24 h a uma semana houve uma redução desta intensidade explicada pela redução da quantidade de suspensão devido à deposição nas paredes do vidro do recipiente e um leve alargamento das bandas indicando uma provável aglomeração ou aumento de tamanho de partículas (Da Costa *et al*., 2011). Estas nanopartículas apresentaram forma esferoidal e variaram 1-18 nm, com maior intensidade de 3-6 nm, apresentando tamanho médio de 5,99 ± 3,39 nm (Fig. 2).

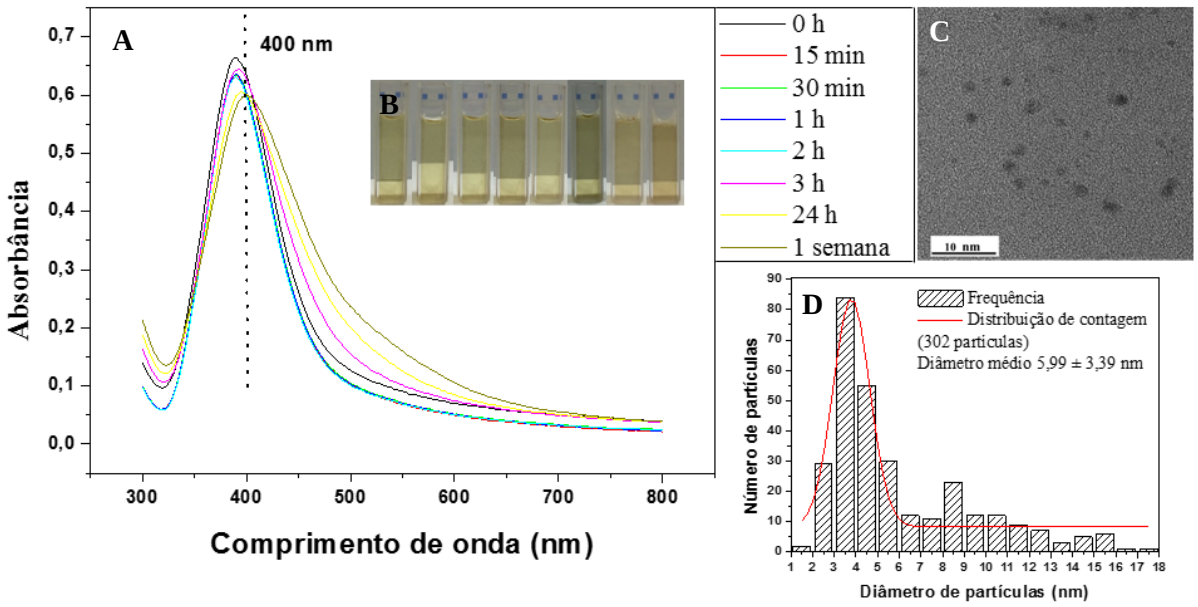

Figura 2. A. Espectros de UV-Vis de AgNP-CIT ao longo do tempo; B. Coloração de AgNP-CIT longo do tempo; C. Imagem de microscopia eletrônica de AgNP- CIT; D. Histograma de distribuição de tamanho de AgNP-CIT. Contagem feita por amostragem em várias imagens da amostra.

Já as AgNP-PVA de 30 mg, a banda plasmon variou de 413 nm a 419 nm do tempo 0 h a 1 semana, sendo que do período de 24 h ao período de 7 dias se manteve estável e com partículas esferoidais, corroborando com autores deste mesmo método (Pencheva *et al*., 2012) que detectaram o pico de absorbância máxima em 420 nm para AgNP-PVA de 30 mg, no entanto com a banda plasmon mais larga. Ao longo do tempo, não houve deslocamento no máximo da absorção e nem variações de intensidade, mostrando uma estabilidade das partículas formadas (Haiss *et al*., 2007; Bastús *et al*., 2014). Estas nanopartículas apresentaram forma esferoidal e variaram de 2 a 13 nm, sendo que a maior intensidade destas apresentou 3-8 nm e o tamanho médio foi de 4,92 ± 1,68 nm (Fig. 3).

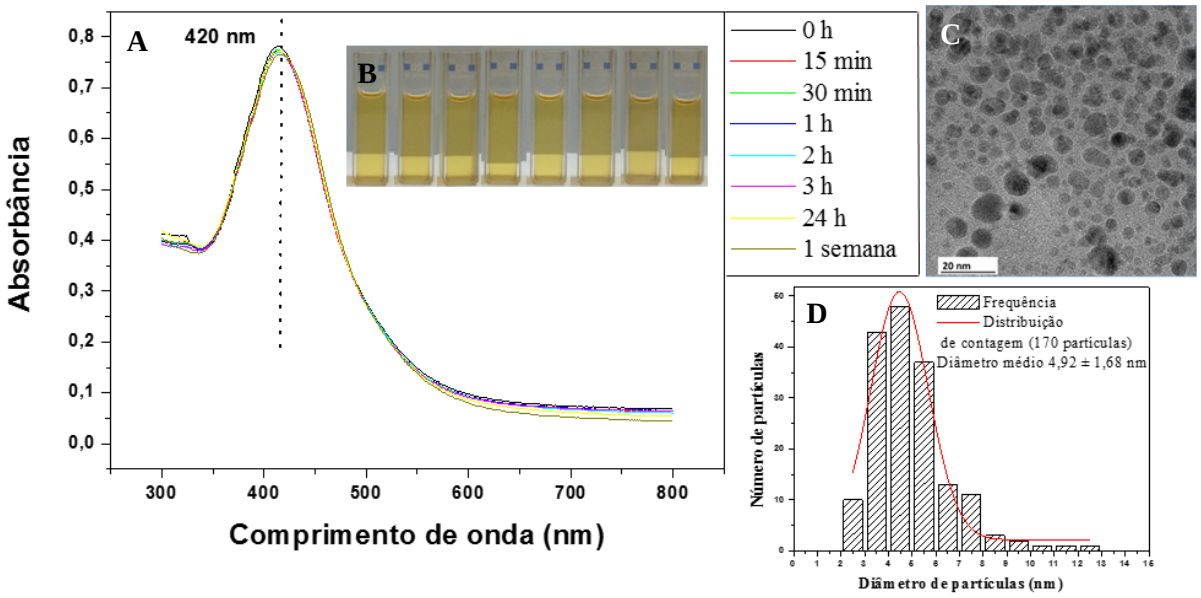

Figura 3. A. Espectros de UV-Vis de AgNP-PVA 30 mg ao longo do tempo; B. Coloração de AgNP-PVA 30 mg ao longo do tempo; C. Imagem de microscopia eletrônica de AgNP-PVA 30 mg; D. Histograma de distribuição de tamanho de AgNP-PVA 30 mg. Contagem feita por amostragem da imagem.

As AgNP-PVA de 300 mg, a banda plasmon variou de 396 a 407 nm, sendo que a partir do tempo de 2 h ela se manteve estável até uma semana. Do período 0h a uma semana, as bandas plasmon não apresentaram deslocamentos do máximo da absorção, entretanto, no período de 24 h e uma semana, a intensidade das bandas aumentaram evidenciando aumento de populações de nanopartículas formadas e um estreitamento das bandas indicando redução do tamanho das nanopartículas (Bhainsa e D´Souza, 2006). Estas AgNP variaram de 1-15 nm, com forma esferoidal, intensidade entre 2-9 nm e tamanho médio de 5,54 ± 2,27 nm (Fig.4).

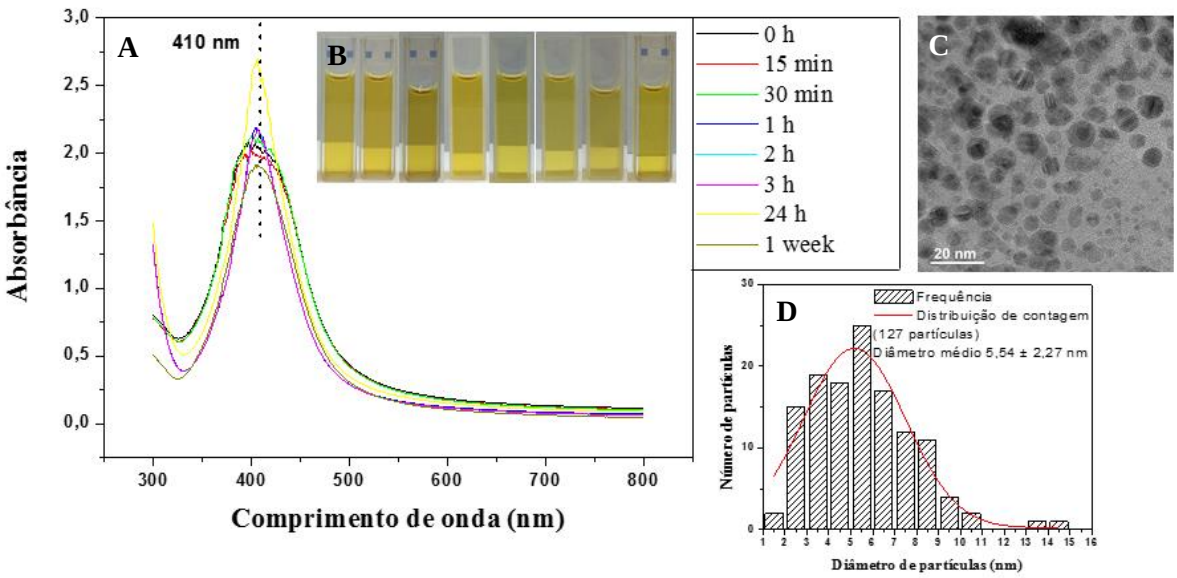

Figura 4. A. Espectros de UV-Vis de AgNP-PVA 300 mg ao longo do tempo; B. Coloração de AgNP-PVA 300 mg ao longo do tempo; C. Imagem de microscopia eletrônica de AgNP-PVA 300 mg; D. Histograma de distribuição de tamanho de AgNP-PVA 300 mg. Contagem feita por amostragem da imagem.

Os tamanhos das AgNP dos diferentes métodos permaneceram dentro da faixa obtida por Simsir *et al.*, 2015 e Pencheva *et al.*, 2012, que utilizaram o mesmo método do presente estudo. Todas as sínteses realizadas apresentaram a banda plasmon em torno de 396 - 420 nm, intervalo este, dentro do padrão encontrado na literatura para nanopartículas de prata (400 nm - 420 nm) (Pencheva *et al*., 2012). As bandas plasmon das nanopartículas de prata sintetizadas pelos diferentes métodos apresentaram-se estreitas, fato este que demonstrou a presença de nanopartículas com tamanho uniforme (He *et al*., 2002).

As análises de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis mostraram que as nanopartículas sintetizadas pelos diferentes métodos apresentam o máximo da banda de ressonância de plasmon entre 390 e 440 nm, indicando a presença de nanopartículas esferoidais, confirmadas pelas imagens de microscopia, sendo que pode ocorrer variações nesta faixa devido ao tamanho, interação entre partículas e constante dielétrica do meio (Pastoriza-Santos e Liz-Marzán, 2008). A coloração de todas as amostras de nanopartículas de prata, sintetizadas pelos diferentes métodos, apresentou cor amarela (Solomon *et al*., 2007), com variações de tons entre os métodos, porém sem variações bruscas relacionadas ao tempo em cada método.

Segundo Elaissari (2008), apesar das nanopartículas poderem ser obtidas de diversas formas, as esferoidais são termodinamicamente mais estáveis, sendo que o controle do tamanho

e a distribuição do tamanho é importante pois define a área superficial das partículas. Assim, a obtenção de nanopartículas mais estáveis garante que estas permaneçam com suas propriedades por maior período de tempo permitindo uma aplicação eficiente.

Assim, a caracterização das nanopartículas é importante pois suas propriedades dependem da forma, tamanho e estrutura (Pileni, 2001) e a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata, por exemplo, depende da forma e tamanho, pois diferentes morfologias promovem diferentes áreas de interação com os microorganismos (Pal *et al*., 2007; Martinez-Castanon *et al*., 2008).

Atividade Antifúngica de AgNP-PVA, AgNP-BORO, AgNP- CIT *in vitro* em meio sólido

A concentração de AgNP obtida pelo método AgNP-PVA foi de 87,3 $mg.L^{-1}$, a de AgNP-BORO foi 146,55 $mg.L^{-1}$, e de AgNP-CIT foi 18,31 $mg.L^{-1}$. No teste de atividade antifúngica da AgNP-PVA, não houve interação entre concentração e meio ($p>0,05$). No entanto houve interação entre concentração e tempo (Tab.1). O tratamento que utilizou 1 mL da solução de AgNP-PVA 10^{-3} mM (T_3) diferiu dos outros tratamentos e do controle ao longo do tempo ($p<0,05$), sendo mais eficaz no controle micelial de *Saprolegnia parasitica*. Os demais tratamentos que utilizaram 1 mL de solução de AgNP-PVA 10^{-5} mM (T_1) e 10^{-4} mM (T_2) apresentaram efeitos semelhantes entre si ao longo do tempo porém sem eficácia no controle do crescimento micelial.

Tabela 1. Interação entre concentração e tempo em teste *in vitro* de AgNP-PVA 30 mg sob *Saprolegnia parasitica.*

Concentração x Tempo	Média ± DP mm Diâmetro 24h	Média ± DP mm Diâmetro 48h	Média ± DP mm Diâmetro 72h	Média ± DP mm Diâmetro 96h
0	39,63 ± 10,50 Ab	64,97 ± 10,00 Bb	73,09 ± 0,03 Cb	73,10 ± 0,04 Cb
T_1	38,30 ± 10,05 Ab	64,04 ± 10,00 Bb	73,12 ± 0,05 Cb	73,12 ± 0,05 Cb
T_2	39,42± 3,38 Ab	65,56 ± 8,84 Bb	73,15 ± 0,12 Cb	73,15 ± 0,12 Cb
T_3	18,29 ± 3,38 Aa	31,03 ± 6,79 Ba	44,69 ± 8,76 Ca	54,74 ± 7,86 Da

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Diversos autores têm avaliado a atividade antifúngica das nanopartículas de prata a partir de diferentes métodos, e alcançando inibição de diversas espécies de fungo como: *Candida albicans, Candida krusei, Candida tropicalis,Candida glabrata, Aspergillus brasiliensis*, *Saprolegnia* sp., (Pencheva *et al.,* 2012; Johari *et al*., 2015).

A interação entre meio e tempo também foi significativa (p<0,05) (Tab.2). O meio com antibiótico diferiu do meio sem antibiótico ao longo do tempo, sendo que o meio com antibiótico apresentou maior inibição do fungo durante as 96 h, apesar de apresentarem crescimento gradativo ao longo das 96 h.

Tabela 2. Interação entre meio e tempo em teste *in vitro* de AgNP-PVA 30 mg sob *Saprolegnia parasitica*.

Meio x Tempo	**Média ± DP mm Diâmetro 24h**	**Média ± DP mm Diâmetro 48h**	**Média ± DP mm Diâmetro 72h**	**Média ± DP mm Diâmetro 96h**
Sem Antibiótico	41,64 ± 12,38 Ab	64,16 ± 16,28 Bb	68,02± 9,33 Cb	70,28 ± 5,32Cb
Com Antibiótico	26,18 ± 6,79 Aa	48,14 ± 14,21 Ba	64,01 ± 16,42 Ca	66,78 ± 11,46 Da

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Apesar de no presente estudo não ter havido interação entre concentração e o meio utilizado (sem e com antibiótico), existem estudos que mostraram interação entre concentração e meio autilizado. Fayaz *et al.* (2010), avaliaram o efeito sinérgico de nanopartículas de prata e quatro antibióticos diferentes (eritromicina, canamicina, cloranfenicol e ampilicina) no controle de quatro espécies de bactérias *Salmonella typhi, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus* através do método do disco de difusão. Este trabalho apesar de ter sintetizado as AgNP por um método diferente do presente estudo (a partir do fungo *Trichoderma viride*), observou-se o efeito sinérgico do mesmo antibiótico utilizado no presente estudo (Cloranfenicol) com AgNP.

Já Padalia *et al*. (2014), produziram nanopartículas de prata utilizando o extrato aquoso de *Tagetes erecta* como redutor ao invés de um químico e avaliaram o efeito sinérgico as AgNP com antibiótico no controle de 3 espécies de fungo (*Candida albicans, Candida glabrata e Cryptococcae neoformans*). Os testes *in vitro* com AgNP e os antibóticos nistatina e amfotericina aumentaram a eficácia em relação ao antibiótico, aumentando a zona de inibição.

Já as AgNP sintetizadas utilizando boro hidreto de sódio e citrato de sódio não apresentaram eficácia no controle do fungo, mostrando a necessidade de concentrações maiores para pois a atividade antifúngica de AgNP comercial para controle de *Saprolegnia* sp. foi de 2000 $mg.L^{-1}$ (Johari *et al*., 2015).

No entanto, houve interação entre meio utilizado (sem e com antibiótico) e tempo, mostrando que apesar do meio com antibiótico até 72 h ter apresentando melhor eficácia, ao final de 96 h, a eficácia dos dois meios foi semelhante em ambas as AgNP (Tab.3 e 4).

Tabela 3. Interação entre meio e tempo em teste *in vitro* da AgNP-BORO sob *Saprolegnia parasitica*.

Meio x Tempo	**Média ± DP mm Diâmetro 24h**	**Média ± DP mm Diâmetro 48h**	**Média ± DP mm Diâmetro 72h**	**Média ± DP mm Diâmetro 96h**
Sem Antibiótico	44,89 ± 0,77 Ab	73,49 ± 0,06 Bb	73,49 ± 0,06 Bb	73,53 ± 0,17 Ba
Com Antibiótico	21,55 ±7,08 Aa	43,98 ± 1,55 Ba	68,93 ±2,52 Ca	73,53 ± 0,04 Da

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 4. Interação entre meio e tempo em teste *in vitro* da AgNP-CIT sob *Saprolegnia parasitica*.

Meio x Tempo	**Média ± DP mm Diâmetro 24h**	**Média ± DP mm Diâmetro 48h**	**Média ± DP mm Diâmetro 72h**	**Média ± DP mm Diâmetro 96h**
Sem Antibiótico	50,32 ± 2,27 Ab	73,56 ± 0,10 Bb	73,56 ± 0,11 Bb	73,56 ± 0,11 Ba
Com Antibiótico	23,03 ±1,44 Aa	46,05 ± 2,86 Ba	69,27 ± 4,22 Ca	73,42 ± 0,06 Da

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Comparação da atividade antifúngica do PVA e AgNP-PVA meio sólido

No teste *in vitro* em meio sólido com PVA e AgNP-PVA de 30 mg e 300 mg, houve interação significativa entre a formulação utilizada e o meio (p<0,05) (Tab. 5). O efeito do álcool polivinílico sem antibiótico foi semelhante ao controle, no entanto com a presença de antibiótico já há influência negativa sobre o crescimento fúngico. Apesar da AgNP-PVA 30 mg não ter apresentado a melhor eficácia, esta diferiu do controle e do álcool polivinílico ao longo do tempo e seu efeito foi melhor com antibiótico. Já a AgNP-PVA 300 mg mostrou maior eficácia em relação a todas outras formulações, e não houve diferença entre os meios com e sem antibiótico (Tab.5).

Além disso no decorrer das 96 h, a eficácia dos tratamentos também foi significativamente diferente (p<0,05) (Tab.6), não apresentando efeito sobre o crescimento micelial e a AgNP-PVA 300 mg mostrou-se mais eficaz durante as 96 h, independente do meio de cultura utilizado. Já o PVA sem e com antibiótico foi igual ao controle ao longo do tempo, não apresentando efeito sobre o crescimento micelial e a AgNP-PVA 30 mg apresentou melhores resultados somente com antibiótico com valores intermediários no controle micelial.

As nanopartículas de prata com polivinil álcool têm sido eficazes no controle de diversos microoorganismos: *S. aureus* e *K. pneumoniae* (Hong *et al.*, 2006); *E. coli e S. Aureus* (Galya *et al*., 2008), *E. coli, S. Aureus, Pseudomonas auruginosa, Candida albicans; C. glabrata* e *C. tropicalis* (Pencheva *et al*., 2012); *C. albicans, E. coli, P. aeruginosa, S. aureus e B. megaterium* (Tan *et al*., 2016) o que corrobora com a atividade antifúngica contra *Saprolegnia parasitica*.

Tabela 5. Interação entre formulação e meio em teste *in vitro* em meio sólido sob *Saprolegnia parasitica*.

Formulação x Meio	**S/A**	**C/A**
Controle	67,33 ± 10,97 Bc	50,36 ± 21,63 Ad
PVA	67,11 ± 49,30 Bc	49,30 ± 21,41 Ac
AgNP 30	7,97 ± 5,31 Bb	6,15 ± 4,20 Ab
AgNP 300	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 6. Interação entre a formulação utilizada e o tempo em teste *in vitro* com álcool polivinílico e nanopartículas de prata sob *Saprolegnia parasitica* em meio sólido.

Formulação x Meio/Tempo	**Média ± DP mm Diâmetro 24h**	**Média ± DP mm Diâmetro 48h**	**Média ± DP mm Diâmetro 72h**	**Média ± DP mm Diâmetro 96h**
C S/A	49,14 ± 1,04 Ad	73,39 ± 0,04 Bd	73,39 ± 0,04 Bf	73,39 ± 0,04 Bd
PVA S/A	48,46 ± 1,90 Ad	73,33 ± 0,02 Bd	73,33 ± 0,02 Bf	73,33 ± 0,02 Bd
AgNP 30 S/A	1,87 ± 0,11 Ab	5,09 ± 0,16 Bb	9,51 ± 0,41 Cc	15,41 ± 0,56 Dc
AgNP 300 S/A	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa
C C/A	20,20 ± 0,18 Ac	42,73 ± 0,41 Bc	65,17 ± 1,04 Ce	73,34 ± 0,03 Dd
PVA C/A	19,84 ± 0,55 Ac	41,60 ± 1,07 Bc	62,41 ± 1,34 Cd	73,37 ± 0,04 Dd
AgNP 30 C/A	0,74 ± 0,41 Aab	4,45 ± 0,14 Bb	7,81 ± 0,07 Cb	11,60 ± 0,15 Db
AgNP 300 C/A	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

No teste para avaliar o efeito fungicida e fungistático do PVA e AgNP-PVA 30 e 300 mg, a única formulação que mostrou efeito fungicida foi a AgNP-PVA 300 sem e com antibiótico, todas as outras formulações foram fungistáticas (Tab.7).

Tabela 7. Efeito fungicida e fungistático das formulações utilizadas em teste *in vitro* em meio sólido sob a *Saprolegnia parasitica*.

Tratamento	Média Diâmetro ± DP 96h exposto as formulações	Média Diâmetro ± DP 96h em meio nutritivo
PVA S/A	73,33 ± 0,02 b	73,33 ± 0,02 b
AgNP 30 S/A	15,41 ± 0,56 a	73,27 ± 0,02 b
AgNP 300 S/A	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
PVA C/A	73,37 ± 0,00 b	73,37 ± 0,00 b
AgNP 30 C/A	11,60 ± 0,15 a	73,38 ± 0,01 b
AgNP 300 C/A	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a

*Letras diferentes na mesma linha, apresentam diferenças estatísticas ($p<0,05$) no teste t de amostra dependentes.

Comparação da atividade antifúngica do PVA e AgNP-PVA meio líquido

Houve interação significativa entre formulação e meio ($p<0,05$) (Tab.8) sobre o crescimento do fungo. O fungo exposto ao PVA sem e com antibiótico apresentou crescimento. O disco com fungo exposto a AgNP-PVA 30 mg sem antibiótico em meio líquido, ao ser colocado em meio nutritivo cresceu normalmente. No entanto, o disco com fungo exposto a esta mesma nanopartícula utilizando antibiótico, quando voltou para meio nutritivo não apresentou crescimento micelial, mostrando efeito fungicida. Já os discos com fungo expostos a AgNP-PVA 300 mg em meio líquido sem e com antibiótico, ao serem colocados em meio nutritivo não apresentaram crescimento micelial durante as 96 h, mostrando efeito fungicida.

Ao longo do tempo (96 h) a interação formulação e meio também apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) (Tab. 8). A AgNP-PVA 300 mg foi a única formulação que mostrou-se fungicida ao longo dos 4 dias de experimento, independente do meio utilizado. Já a AgNP-PVA 30 mg sem antibiótico apresentou efeito fungistático e com antibiótico efeito fungicida. O crescimento micelial do fungo exposto ao PVA assemelhou-se ao controle ao longo do tempo.

Tabela 8. Interação entre formulação e meio em teste *in vitro* em meio líquido sob *Saprolegnia parasitica*.

Formulação x Meio	S/A	C/A
Controle	68,90 ± 8,16 Bc	66,03 ± 13,09 Ac
PVA	67,44 ± 10,13 Bbc	62,52 ± 18,23 Ab
AgNP-PVA 30 mg	66,07 ± 12,73 Bb	0,00 ± 0,00 Ac
AgNP-PVA 300 mg	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Ac

* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si; Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

CONCLUSÃO

É possível sintetizar nanopartículas de prata uniformes e estáveis através de álcool polivinílico, citrato de sódio e borohidreto de sódio. Dentre estas nanopartículas, a AgNP-PVA foi a mais eficaz no controle de *Saprolegnia parasitica*, sendo que o processo a partir de 300 mg de nitrato de prata é o mais indicado para o controle deste fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTÚS, N. G.; MERKOÇI, F.; PIELLA, J.; PUNTES, V. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties. *Chem.Mater.*, v.26, n.9, p.2836-2846, 2014.

BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus fumigatus. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, v.47, n.2, p.160-164, 2006.

CORRÊA, B. F.; STOHL, F. E.; ROBALDO, R. B.; PEREIRA, D. I. B. Efeito *in vitro* de químicos no crescimento micelial de Saprolegnia spp. *Ciênc. Rural*, v.43, n.6, p.1021-1024, 2013.

DA COSTA, L. P.; FORMIGA, A. L. B.; MAZALI, I. O.; SIGOLI, F. A. Spontaneous formation of highly dispersed spheroidal metallic silver nanoparticles in surfactant-free N, N-dimethylacetamide. *Synthetic Met., v.*161, n.15, p.1517-1521, 2011.

DA COSTA, L.P. ; QUITES, F.J.; SIGOLI, F.A.; MAZALI, I.O.; PASTORE, H.O. Ag/lamelar hosts composites: a route to morphology-controllable synthesis of Ag nanoparticles. *J. Nanopart. Res.*, v.15, n.8, p. 1796-1810, 2013.

ELAISSARI, A. Colloidal nanoparticles in biotechnology. New Jersey: Wiley, 2008.

FAYAZ, A. M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; YADAV, R. *et al.* Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed: Nanotech., Biol.Med.*, v.6, n.1, p.103-109, 2010.

GALYA,T.; SEDLARIK,V.; KURITKA,I.; NOVOTNY, R. *et al.* Antibacterial Poly(vinyl) alcohol film containing silver nanoparticles: preparation and characterization, *J. Appl. Polym. Sci.*,v.110, n.2008, p.3178–3185, 2008.

HAISS, W.; THANH, N. T.; AVEYARD, J.; FERNIG, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Anal. Chem.*, v.79, n.11, p.4215-4221, 2007.

HE, R.; QIAN, X.; YIN, J.; ZHU, Z. Preparation of polychrome silver nanoparticles in different solvents. *J. Mater. Chem.*, v.12, n.12, p.3783-3786, 2002.

HONG, K. H.; PARK, J. L.; SUL, I. H.; YOUK, J. H. *et al.* Preparation of antimicrobial poly (vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *J. Polym. Sci. B. Polym. Phys.*, v.44, n.17, p. 2468-2474, 2006.

HULVEY, J. P.; PADGETT, D. E.; BAILEY, J. C. Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. *Mycologia*, v.99, n.3, p.421-429, 2007.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratioElectronic supplementary information (ESI) available: UV–VIS spectra of silver nanorods. *Chem. Commun.*, v.7, p.617-618, 2001.

JOHARI, S. A.; KALBASSI, M. R.; SOLTANI, M.; YU, I. J. Study of fungicidal properties of colloidal silver nanoparticles (AgNPs) on trout egg pathogen, *Saprolegnia* sp. *Int. J. Aquat. Biol.*, v.3, n.3, p.191-198, 2015.

LEMIRE, J.A.; KALAN, L.; BRADU, A.; TURNER, R.J. Silver oxynitrate: An Unexplored Silver Compound with Antimicrobial and Antibiofilm Activity. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, v.59, n.9, p.1-30, 2015.

MARTINEZ-CASTANON, G.A.; NINO-MARTINEZ, N.; MARTINEZ-GUTIERREZ, F.; MARTINEZ-MENDOZA, J.R. *et al.* Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanopart. Res.*, v.10, p.1343–1348, 2008.

MITTAL, A.K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol. Adv.*, v.31, n.2, p.346-356, 2013.

PADALIA, H.; MOTERIYA, P.; CHANDA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arab. J. Chem.*, v.8, n.5, p.732-741, 2015.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.73, n.6, p.1712-1720, 2007.

PASTORIZA-SANTOS, I.; LIZ-MARZÁN, L. M. Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges. *J. Mater. Chem.*, v.18, n.15, p.1724-1737, 2008.

PENCHEVA, D.; BRYASKOVA, R.; KANTARDJIEV, T. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C.*; v.32, n.7, p.2048-2051, 2012.

PÉREZ-DÍAZ, M.A.; BOEGLI, L.; JAMES, G.; VELASQUILLO, C. *et al.* Silver nanoparticles with microbial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Mater. Sci. Eng. C.*, v.55, n.2015, p.360-366, 2015.

PILENI, M.P. Magnetic Fluids: Fabrication, Magnetic Properties, and Organization of Nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.*, v.11, p.323–336, 2001.

PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *J. Phys. Chem. B.*; v.108, n.3, p. 945-951, 2004.

RATHER, M. A.; SHARMA, R.; AKLAKUR, M.; AHMAD, S. *et al*. Nanotechnology: a novel tool for aquaculture and fisheries development. *Fish. Aquac.*, v.2011, p.1-5, 2011.

SIMSIR, H.; ELTUGRAL, N.; KARAGÖZ, S. Ligand-Depended Adsorption Characteristics of Silver Nanoparticles on Activated Carbon. *Int. J. Chem., Molec., Nuc., Mater. Metallurg. Eng.*, v.9, n.3, p.481- 484, 2015.

SOLOMON, S. D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A. V.; RUTKOWSKY, S. A. *et al.* Synthesis and study of silver nanoparticles. *J.Chem. Educ.*, v.84, n.2, p.318-322, 2007.

SOLTANI, M.; ESFANDIARY, M.; SAJADI, M.M.; KHAZRAEENIA, S. *et al.* Effect of nanosilvef particles on hatchability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg and survival of the produced larvae. *Iran. J. Fish. Sci.*, v.10, n.1, p.167-176. 2011.

TAN, G.; SAĞLAM, S.; EMÜL, E.; ERDÖNMEZ, D.; SAĞLAM, N. Synthesis and characterization of silver nanoparticles integrated in polyvinyl alcohol nanofibers for bionanotechnological applications. *Turki. J. Biol.*, v.40, n.3, p.643-651, 2016.

VAN WEST, P. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*, v.20, n.3, p. 99-104, 2006.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos resultados obtidos no presente estudo mostrarem que o extrato aquoso de *T. catappa* a quente e as nanopartículas de prata (AgNP) sintetizadas com álcool polivinílico (PVA) são eficazes *in vitro*, estudos de toxicidade com estes produtos devem ser realizados priorizando a utilização de concentrações em que haja o controle antifúngico mas que se considere o bem-estar animal sem geração de danos fisiológicos e morfológicos aos peixes. Assim, o estudo de toxicidade trará informações importantes para que os produtos sejam testados *in vivo* e uma vez que existam concentrações que causem danos aos peixes, novas estratégias de aplicação como por exemplo banhos terapêuticos de maiores concentrações e tempo curto ou de menores concentrações e tempo de exposição maior sejam adotados para minimizar esses efeitos.

7. ANEXOS

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - Manuscript ID ABMVZ-2017-9792

A Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia <onbehalfof+abmvz.artigo+abmvz.org.br@manuscriptcentra

Responder

Hoje, 13:43

Você; juliana_mns27@hotmail.com; fe.cunha_@hotmail.com; higabe@gmail.com; brunolimafarm@gmail.com; mais 7

06-Feb-2017

Dear Mrs. Meneses:

Your manuscript entitled "Antifungal activity in vitro of aqueous extract Terminalia catappa on Saprolegnia parasitica" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Your manuscript ID is ABMVZ-2017-9792.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo.

Thank you for submitting your manuscript to the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Sincerely,
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia Editorial Office

NORMAS DA REVISTA ARQUIVOS BRASILEIROS DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISSN 1678-4162 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Política Editorial
- Reprodução de artigos publicados
- Orientações Gerais
- Comitê de Ética
- Tipos de artigos aceitos para publicação
- Preparação dos textos para publicação
- Formatação do texto
- Seções de um artigo
- Taxas de submissão e de publicação
- Recursos e diligências

Atualizado: 09/08/2016

Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** citado como **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao **ABMVZ**.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmitee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou

Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto:Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo

Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.

- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*.
* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos , bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.
Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al*., 1979) ou Ferguson *et al*. (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al*. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al*., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO

DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais*... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <http://www.org/critca16.htm>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar **http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos** (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.
  Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação:**. A taxa de publicação de R$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.
  OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee**. The publication fee is of US$100,00 (one hundred dollars) per page, and US$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by

the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.