



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2018

**Tânia Cristina  
Resende Magina**

**Produção de microalgas e de compostos  
antimicrobianos em biorreatores industriais**



## **Declaração**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Tânia Cristina  
Resende Magina**

**Produção de microalgas e de compostos  
antimicrobianos em biorreatores industriais**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Mário J. V. Pereira, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e coorientação da Doutora Maria Teresa Lamela Pérez, Diretor de qualidade da Necton, S.A..

Dedico esta dissertação à minha irmã.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves**

Investigador Principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Tânia Isabel Sousa Caetano**

Professor Auxiliar Convidado do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Mário Jorge Verde Pereira**

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Primeiramente quero agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Mário Verde Pereira, que me acompanhou nos últimos quatro anos e desde o primeiro minuto me encorajou a seguir os meus sonhos. Apesar dos momentos de desânimo o professor sempre passou uma mensagem positiva e principalmente nunca desistiu do meu trabalho. A ele, um grande obrigada pela orientação, amizade e dedicação.

Ao professor Doutor Artur Alves por toda a dedicação e sinceros conselhos ao longo do meu percurso.

A toda a equipa Necton, S.A. por me receberem e me apoiarem, que ao longo de um ano se tornaram na minha família. Devo salientar duas pessoas muito importantes nesta empresa, a Doutora Teresa Lamela, cuja orientação foi imprescindível para conseguir finalizar o projeto. Ao Hugo Pereira, apesar de não o ser, foi um grande orientador, que mesmo com todos os “dramas” e problemas que surgiram sempre acreditou ser possível e trabalhou em parceria para que o mesmo acontecesse.

Agradeço ao laboratório MarBiotech, inserido no CCMAR por toda a disponibilidade que tiveram em me receber, foram pessoas fantásticas que me ensinaram imenso. Com um especial agradecimento, ao Professor Doutor João Varela e Katkam Gangadhar.

Devo salientar também a Doutora Florbela Soares e Márcio Moreira obrigada por toda a paciência e todos os esclarecimentos. Assim como, a toda equipa do IPMA-Olhão.

Um especial obrigada aos meus pais e irmã que permitiram que tudo isto fosse possível, que me apoiaram e estiveram ao meu lado dia após dia. Foram muitos os amigos que me apoiaram ao longo desta etapa, não posso deixar de agradecer às pessoas que me viram superar cada dificuldade e me levantaram, desde as amigas que conquistei no secundário e que mesmo ao fim de mais de 10 anos continuam presentes e aos que se juntaram a mim recentemente e que me apoiaram, de igual forma.

Obrigada à Ana, Diana e Soraia por estarem presentes nos bons e maus momentos, por rirem comigo e por contruírem todas as histórias que um dia iremos contar aos nossos filhos. Foram das melhores coisas que levo da universidade.

Ao Pedro, a quem agradeço por ser um amigo que, para além de me apoiar sempre nas minhas decisões, é o primeiro a dizer que estou errada quando realmente estou, sem dúvida uma voz da razão.

Por fim, agradeço ao Ruben que apesar de não estar presente, foi uma força interior. Todas as palavras não foram esquecidas.

A todos, o meu grande obrigada.

## palavras-chave

Microalga, aquacultura, fotobiorreator, atividade antibacteriana, Vibrionaceae, *Skeletonema* sp.

## resumo

Os produtos naturais, saudáveis e seguros têm vindo a ser uma tendência crescente por parte dos consumidores, forçando a novas pesquisas de forma, a encontrar novos produtos com ingredientes funcionais, evitando, deste modo, o uso de antibióticos. Estes incluem as microalgas, que ganharam, nos últimos anos, um importante destaque pelos seus valiosos compostos com a sua aplicação em vários sectores, como a farmacêutica, cosmética, biocombustíveis e na alimentação humana e animal. A otimização dos processos de produção, à escala industrial, é fundamental para a evolução deste sector. O presente trabalho permitiu avaliar a performance de crescimento de *Nannochloropsis* sp. e *Skeletonema costatum* em condições ambientais naturais. Partindo de placas de Petri, foi realizado o aumento de escala até aos fotobiorreatores tubulares de 15000 L da Necton, S.A.. As maiores produtividades (areal e volumétrica) foram verificadas, em modo de crescimento semi-contínuo, com a microalga *Nannochloropsis* sp.. A biomassa proveniente das microalgas supracitadas e de outras espécies, facultadas pela empresa Necton, S.A., tais como, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*, são produtoras de compostos bioativos com capacidades terapêuticas (anti-tumoral, anti-inflamatório, entre outras). Neste estudo, foi investigada a atividade antibacteriana das microalgas e seus derivados usando quatro extratos orgânicos (acetato de etilo, acetona, etanol e hexano). O seu efeito inibitório foi testado através do método de difusão em poços, para patógenos causadores de perdas económicas em aquacultura (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*). A *P. damsela* subsp. *piscicida* revelou ser a bactéria mais sensível aos extratos testados. Os extratos de acetato de etilo e acetona de *S. costatum* destacaram-se pelo seu poder contra as bactérias testadas. Por sua vez, a purificação do extrato de acetato de etilo gerou sete frações, das quais duas (80% de acetato de etilo em hexano e acetato de etilo) se distinguiram pelo seu efeito antibacteriano. Quando, analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência a fucoxantina foi detetada como sendo o composto bioativo mais relevante.

**keywords**

Microalgae, aquaculture, photobioreactor, antibacterial activity, Vibrionaceae, *Skeletonema* sp.

**abstract**

Natural, healthy and safe products have been a growing trend among consumers, forcing the need for new research to find new products with functional ingredients, avoiding this way of using antibiotics. These include microalgae, which have gained in recent years, importance for their valuable compounds that have been applied to various sectors such as pharmaceuticals, cosmetics, biofuels and food and feed. The optimization of industrial production processes is fundamental for the evolution of this sector. The present work allowed the evaluation of the growth performance of *Nannochloropsis* sp. and *Skeletonema costatum* under natural environmental conditions. Starting from Petri dishes, the scale-up was performed up to the 15000 L tubular photobioreactors of Necton, S.A., in semi-continuous. There were higher yields (areal and volumetric) in *Nannochloropsis* sp.. Biomass from the above-mentioned microalgae and others, such as *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chuii*, produce bioactive compounds with therapeutic properties (anti-tumor, anti-inflammatory, among others). In this study, the antibacterial activity of the microalgae was investigated using four organic extracts (ethyl acetate, acetone, ethanol and hexane). Its inhibitory effect was tested by the well diffusion method for pathogens causing economic losses in aquaculture (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*). That said, *P. damsela* subsp. *piscicida* proved to be the most sensitive bacteria to the extracts tested. The ethyl acetate and acetone extracts of *S. costatum* were distinguished by their inhibitory power. In turn, purification of the ethyl acetate extract originated seven fractions, where two (80% ethyl acetate in hexane and ethyl acetate) distinguished themselves because of their antibacterial effect. The fucoxanthin was detected by high-performance liquid chromatography, as the most relevant bioactive compound.

# Índice

Introdução .....	3
1.1 Microbiologia na aquicultura .....	4
1.1.1 <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	5
1.1.2 <i>Vibrio anguillarum</i> .....	6
1.1.3 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .....	6
1.2 Atividade Antimicrobiana .....	7
1.3 Microalgas.....	9
1.3.1 Microalgas na aquicultura .....	10
1.3.2 Atividade antibacteriana de microalgas .....	11
1.3.3 Fotobiorreatores.....	12
1.3.4 Espécies estudadas.....	13
1.4 Necton, S.A. ....	15
1.5 Objetivos.....	16
Referências Bibliográficas.....	17
Capítulo II.....	27
Produção das microalgas <i>Skeletonema costatum</i> e <i>Nannochloropsis</i> sp. em fotobiorreatores industriais .....	29
Resumo .....	29
1. Introdução .....	31
2. Material e métodos .....	33
2.1 Cultura de Microalgas e aumento de escala .....	33
2.2 Condições de produção .....	36
2.3. Parâmetros analíticos: Físicos, Químicos e Produtividade.....	36
2.3.1 pH.....	36
2.3.2 Nitratos .....	37
2.3.3 Curvas de crescimento .....	37
2.3.4 Avaliação da biomassa – Taxas de crescimento.....	37

2.3.5 Produtividade .....	39
2.4 Análise de dados.....	40
3. Resultados .....	41
3.1 Cultura de <i>Skeletonema costatum</i> .....	41
3.2 Cultura de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	42
4. Discussão .....	45
5. Conclusão.....	47
6. Agradecimentos.....	47
7. Referências bibliográficas.....	48
Capítulo III.....	53
Atividade antimicrobiana de extratos de microalgas marinhas cultivadas em sistemas industriais .....	55
Resumo .....	55
1. Introdução .....	56
2. Material e métodos .....	59
2.1 Material Biológico.....	59
2.2 Isolamento e identificação de estirpes bacterianas.....	59
2.2.1 Isolamento.....	59
2.2.2 Extração, análise, amplificação de DNA e identificação das estirpes bacterianas .....	60
2.3 Teste de atividade antimicrobiana – Método de difusão em poço .....	62
2.4 Cultura de microalgas, extratos e ensaios de sensibilidade.....	62
2.4.1 Cultura de microalgas.....	62
2.5 Preparação de extratos .....	63
2.5.1 Fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna de sílica.....	65
2.5.2 Cromatografia em camada fina em placa .....	66
2.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	67
2.5.4 Cromatografia em camada fina preparativo .....	68
2.6 Análise de dados.....	68

3. Resultados .....	70
3.1 Identificação das estirpes bacterianas .....	70
3.2 Atividade antibacteriana de extratos de microalgas.....	71
3.2.1 Extratos de <i>Skeletonema costatum</i> .....	71
3.2.2 Extratos de <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	72
3.2.3 Extratos de <i>Isochrysis galbana</i> .....	73
3.2.4 Extratos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	74
3.2.5 Extratos de <i>Porphyridium cruentum</i> .....	75
3.2.6 Extratos de <i>Tetraselmis chuii</i> .....	76
3.3 Fracionamento do extrato de <i>S. costatum</i> .....	78
3.4 Purificação do extrato de 80% de acetato de etilo em hexano e 100% acetato de etilo .....	80
4. Discussão .....	84
5. Conclusão.....	88
6. Agradecimentos.....	88
7. Referências Bibliográficas.....	89
1. Conclusão Geral .....	98
1.1 Perspetivas futuras .....	100
Referências Bibliográficas.....	102

## Índice de figuras

### Capítulo II

Figura 1. Representação do procedimento de aumento de escala das culturas usado no presente trabalho. 1 (caixa de Petri) e 2 (balões) correspondem a cultura em laboratório e 3 (*Green Wall* – 100 a 800 L) e 4 (sistema tubular – 15000 L) em exterior..... 33

Figura 2. Cultivo de *S. costatum* em escala industrial. A- Crescimento em GW de 800 L. B- Crescimento em PBRs tubulares de 15000 L. C- Taxa de crescimento, com representação das renovações efetuadas. D- Temperatura (máxima e mínima) registada em Faro (Lat. 37,015335; Long. -7,972328), durante os dias de ensaio. .... 41

Figura 3. Cultivo de *Nannochloropsis* sp. em escala industrial. A- Crescimento em GW de 800 L. B- Crescimento em PBRs tubulares de 15000 L. C- Taxa de crescimento, com representação das renovações efetuadas. D- Temperatura (máxima e mínima) registada em Faro (Lat. 37,015335; Long. -7,972328), durante os dias de ensaio. .... 43

### Capítulo III

Figura 1. Filtração dos extratos através de filtros de papel de 20-25µm..... 63

Figura 2. Resumo da purificação do extrato de *S. costatum* (SKC) em acetato de etilo (AE). F 1.1 – Hexano; F 1.2 – 20% de acetato de etilo em hexano; F 1.3 – 40% de acetato de etilo em hexano; F 1.4 – 60% de acetato de etilo em hexano; F 1.5 – 80% de acetato de etilo em hexano; F 1.6 – acetato de etilo; F 1.7 – 20% metanol em acetato de etilo; F 2.1- primeira fração do TLC preparativo; F 2.2 segunda fração do TLC preparativo; F 2.3 terceira fração do TLC preparativo; F 2.4 quarta fração do TLC preparativo. .... 64

Figura 3. Representação esquemática da coluna de sílica. ....65

Figura 4. Coluna de sílica com frações diferenciadas.....	66
Figura 5. Representação do reservatório do solvente e da placa de TLC durante o desenvolvimento do ensaio.....	67
Figura 6. Eletroforese gel de agarose da amplificação dos produtos de PCR. A- Multiplex PCR <i>Vibrio</i> sp. (689 bp) e <i>V. alginolyticus</i> (199 bp); B- PCR <i>V. anguillarum</i> (207 bp); C- PCR <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> ; l- ladder; c- controlo negativo; 1- amostra de <i>V. alginolyticus</i> ; 2- amostra de <i>V. alginolyticus</i> ; 3- amostra de <i>V. anguillarum</i> ; 4- amostra de <i>V. anguillarum</i> ; 5- amostra de <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> ; 6- amostra de <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> .	70
Figura 7. Atividade antibacteriana dos extratos de <i>S. costatum</i> (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). * Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra <i>V. alginolyticus</i> ; B- Inibição contra <i>V. anguillarum</i> ; C- Inibição contra <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> .	71
Figura 8. Atividade antibacteriana dos extratos de <i>Nannochloropsis</i> sp. (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). * Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra <i>V. alginolyticus</i> ; B- Inibição contra <i>V. anguillarum</i> ; C- Inibição contra <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> .	72
Figura 9. Atividade antibacteriana dos extratos de <i>I. galbana</i> (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). * Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra <i>V. alginolyticus</i> ; B- Inibição contra <i>V. anguillarum</i> ; C- Inibição contra <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> .	74

Figura 10. Atividade antibacteriana dos extratos de *P. tricornutum* (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damsela* subsp. *piscicida*. ..... 75

Figura 11. Atividade antibacteriana dos extratos de *P. cruentum* (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damsela* subsp. *piscicida*. ..... 76

Figura 12. Atividade antibacteriana dos extratos de *T. chuii* (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damsela* subsp. *piscicida*. ..... 77

Figura 13. A: TLC com 80% hexano e 20% de acetato de etilo; B: TLC com 85% de hexano e 15% de acetato de etilo; C: TLC com 60% de hexano e 40% de acetato de etilo; D: TLC com 40% de hexano e 60% de acetato de etilo. Sendo que os números 1-7 correspondem às amostras provenientes da cromatografia de coluna de sílica. 1: Hexano; 2: 20% de acetato de etilo em hexano; 3: 40% de acetato de etilo em hexano; 4: 60% de acetato de etilo em hexano; 5: 80% de acetato de etilo em hexano; 6: acetato de etilo; 7: 20% de metanol em acetato de etilo. .... 78

Figura 14. Atividade antimicrobiana das diferentes frações do extrato de acetato de etilo de *S. costatum* para a bactéria *V. anguillarum* (A) e *P. damsela* subsp. *piscicida* (B). Concentração do extrato (mg/mL) vs diâmetro do halo (mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). ..... 80

Figura 15. Perfil da amostra de 80% de acetato de etilo em hexano e acetato de etilo por HPLC..... 81

Figura 16. TLC preparativo..... 82

Figura 17. Resultados do antibiograma da purificação de 80% de Acetato de etilo em Hexano e Aceto de etilo para as bactérias *V. alginolyticus* (A), *V. anguillarum* (B) e *P. damsela* subsp. *piscicida*. Concentração do extrato (mg/mL) vs diâmetro do halo (mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ )..... 83

## **Índice de tabelas**

### **Capítulo II**

Tabela 1. Produtividade da biomassa volumétrica e areal apresentada em PS da cultura de *S. costatum* cultivada em PBR tubular de 15000 L..... 42

Tabela 2. Produtividade da biomassa volumétrica e areal apresentada em PS da cultura de *Nannochloropsis* sp. cultivada em PBR tubular de 15000 L. .... 44

### **Capítulo III**

Tabela 1. Quantidade de amostra registrada em HPLC..... 81

## Lista de acrónimos

CE – Comissão Europeia

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO – Densidade ótica

EPA – Ácido eicosapentaenoico

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FDA – Food and Drug Administration

GW – *Green walls*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IPMA – Instituto Português do Mar e Atmosfera

MH – Müeller Hinton

PBR – Fotobiorreator

PCR – *Polymerase chain reaction*

PS – Peso seco

PTFE – Politetrafluoroetileno

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados

TCBS – Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose

TLC – *Thin layer chromatography*

TSB – *Tryptic Soy Broth*

UV – Ultra-violeta

# Capítulo I

## Introdução geral



## Introdução

“Uma era pós-antibiótico, longe de ser uma fantasia apocalíptica, é uma possibilidade muito real para o século XXI”. Os antibióticos são utilizados intensivamente em aquacultura (WHO, 2014). Nos últimos anos, o uso de antibióticos tem sido limitado através do Regulamento da Comissão Europeia (CE), sendo necessário encontrar alternativas para diminuir a ocorrência de bactérias patogénicas no setor da aquacultura (Pöttering and Kohout, 2009).

De forma a minimizar as resistências aos antibióticos, foram propostas diversas estratégias para diminuir os efeitos nocivos das bactérias em unidades aquícolas, tais como: a terapia fágica, a inibição do crescimento através de ácidos gordos de cadeia curta, os disruptores de *quorum-sensing*, os probióticos, as vacinas e a técnica da água verde. No entanto, à exceção das vacinas, estes métodos estão ainda em estudo (Defoirdt et al., 2011; Molina-Cárdenas et al., 2014). As infeções por microrganismos patogénicos levam a uma elevada mortalidade e morbilidade, o que provoca um elevado impacto económico no setor (Austin and Newaj-Fyzul, 2017). Dentro das várias infeções causadas por bactérias patogénicas destacam-se a vibriose, normalmente provocada pelas espécies *Vibrio anguillarum* (Frans et al., 2011) e *Vibrio alginolyticus* (Austin and Newaj-Fyzul, 2017; Chatterjee and Haldar, 2012; Mustapha et al., 2013) e ainda, a pasteurelose causada pela bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Romalde, 2002).

As microalgas são, hoje em dia, consideradas uma solução para vários problemas que a sociedade enfrenta, sendo utilizadas em várias indústrias como é o caso da farmacêutica e da alimentar, tanto humana como de animais (Khan et al., 2018; Plaza et al., 2009). Apesar de nas últimas décadas o cultivo industrial das microalgas ter aumentado substancialmente nos diversos sectores, devido a serem a base da cadeia trófica marinha, a aquacultura continua a ser o setor com maior aplicação comercial. As microalgas constituem a base da cadeia alimentar de peixes, moluscos e crustáceos sendo um elemento essencial na maioria das aquaculturas para o enriquecimento de alimento vivo (por exemplo, rotíferos), que por sua vez é essencial na nutrição das larvas de peixes (Ferreira et al., 2008). Vários

trabalhos mostraram que diferentes espécies de microalgas (ex. *Skeletonema costatum*, *Nannochloropsis* spp.) produzem compostos bioativos com propriedades antibacterianas contra, por exemplo, *Vibrio* spp. (Falaise et al., 2016; Naviner et al., 1999).

## 1.1 Microbiologia na aquicultura

Os microrganismos têm um papel fundamental em todos os ambientes do nosso planeta, a título de exemplo, na aquicultura, eles reciclam os nutrientes e degradam a matéria orgânica. Por vezes, quando patogênicos, podem infectar e até provocar a morte de peixes, larvas ou o alimento vivo (Bentzon-Tilia et al., 2016). A comunidade microbiana em ambientes aquáticos responde rapidamente a mudanças no ambiente, podendo ativar ou inativar vias metabólicas ou causar mudanças na composição e na funcionalidade da própria comunidade microbiana (Bentzon-Tilia et al., 2016).

As bactérias autotróficas têm um papel essencial no processo de nitrificação em tanques de aquicultura, contudo, a comunidade de bactérias heterotróficas é abundante, podendo ser encontradas entre estas algumas bactérias patogênicas (ex. *Vibrio* spp.) (Rurangwa and Verdegem, 2015). Neste contexto, as fases larvares dos peixes estão principalmente predispostas a infecções por microrganismos patogênicos. A eliminação destes microrganismos por antibióticos podem provocar riscos para a saúde humana devido à disseminação da resistência a antibióticos (Bentzon-Tilia et al., 2016; Cabello et al., 2013).

A virulência de um microrganismo depende da sua capacidade de se adaptar ao ambiente onde se encontra e de infectar o hospedeiro. Assim, ao longo de milhões de anos as bactérias desenvolveram características para conseguirem competir com outros organismos. Por esse motivo, a capacidade de colonizar e aderir às superfícies do hospedeiro tornou-se uma vantagem competitiva. A mobilidade flagelar permite que as bactérias melhorem a interação com a superfície. Os géneros *Aeromonas* e *Vibrio* produzem flagelos (um flagelo polar, para se moverem em líquidos, ou peritricos para se deslocarem em ambientes viscosos). Existem ainda outros fatores de virulência

nomeadamente, proteínas quimiotáticas (que permitem direcionar a mobilidade), sideróforos, polissacarídeos extracelulares (proteção e ligação), enzimas líticas (degradação dos tecidos do hospedeiro), pili (adesão), sistema de secreção (distribuição de fatores de virulência) e *quorum-sensing* (Defoirdt, 2014; McCarter, 2004).

As doenças que mais preocupam os aquacultores são a vibriose, “úlceras de inverno”, fotobacteriose, furunculose, entre outras. Estima-se que em aquacultura, por ano, são perdidos 7,8 biliões de euros devido a doenças (Novriadi, 2016). Como o nome indica, a vibriose é uma infeção causada por bactérias do género *Vibrio*, entre as quais, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*; que são normalmente associados a doenças em camarões (Chatterjee and Haldar, 2012). As patologias associadas a perdas significativas na fase larval ou juvenil incitam, também, ao aparecimento de outras doenças oportunistas nos peixes. A fotobacteriose, também conhecida como pasteurelose, é causada pela bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (anteriormente descrita como *Pasteurella piscicida*), que foi previamente reportada como causadora de elevadas perdas económicas na Europa e no EUA (Toranzo et al., 2005).

### **1.1.1 *Vibrio alginolyticus***

*Vibrio alginolyticus* é uma bactéria gram-negativa, que pode ser encontrada em ambientes estuarinos e marinho, estando reportadas como halofílicas, uma vez que são tolerantes a elevadas concentrações de sal (Reilly et al., 2011; Sabir et al., 2013). Esta estirpe patogénica provoca surtos de vibriose em animais, sendo também responsável por intoxicações alimentares nos seres humanos (Cao et al., 2018).

O mecanismo de patogenicidade não está completamente conhecido, mas pensa-se que a sua virulência poderá estar associada aos flagelos (polares e laterais), que permitem a adesão, a formação de biofilme, *swimming* e *swarming*; entre outros fatores de virulência (Hernández-Robles et al., 2016).

### **1.1.2 *Vibrio anguillarum***

A bactéria gram-negativa, *Vibrio anguillarum*, foi reportada pela primeira vez em 1718, na Europa Continental. Em 1984, MacDonell e Colwell incluíram o *V. anguillarum* no género *Listonella* sendo excluído do género *Vibrio*. Atualmente, é denominado como *Vibrio (Listonella) anguillarum* (Hickey and Lee, 2017), encontrando-se em ambientes aquáticos suportando concentrações de NaCl entre 0,5‰ a 7,0‰. É uma bactéria curta, em forma de haste e com um flagelo polar (Rad and Shahsavani, 2010).

É principalmente conhecida por ser responsável por provocar vibriose em peixes, bivalves e crustáceos, podendo mesmo levar à morte, após a infeção, ao fim de 2 a 5 dias nas fases larvares (Frans et al., 2013; Hickey and Lee, 2017).

### **1.1.3 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***

*P. damsela* subsp. *piscicida* é a bactéria patogénica que causa mais mortes em aquacultura. A fotobacteriose, conhecida anteriormente por pasteurelose (*Pasteurella piscicida*), provoca septicemias agudas, em peixes jovens. O fator de maior preocupação dos aquacultores perante esta bactéria, deve-se ao facto de os tratamentos serem ineficientes quando a doença é detetada após os animais deixarem-se de alimentar, e ainda as vacinas existentes para esta bactéria não serem completamente eficientes (Carraro et al., 2018; Romalde, 2002; Vendramin et al., 2016).

Esta bactéria gram-negativa tem uma elevada patogenicidade numa grande variedade de animais marinhos. Os principais mecanismos de virulência deste microrganismo são: i) a absorção de ferro; ii) a presença de polissacarídeos capsulares; iii) a produção de exotoxinas contra os macrófagos e neutrófilos do hospedeiro; iv) estruturas semelhantes a pilus na superfície; v) péptidos catiónicos antimicrobianos (Carraro et al., 2018; Romalde, 2002).

## 1.2 Atividade Antimicrobiana

Nas últimas décadas os antibióticos foram utilizados para prevenção (profilaxia), para o controlo (metafilaxia) e para o tratamento de doenças, tanto em humanos como em animais. Muitas vezes, inseridos nos alimentos para estimular o crescimento rápido e a qualidade dos produtos animais (Romero et al., 2012). Contudo, esta prática rotineira conduziu a uma resistência aos antibióticos mais utilizados (Cheng et al., 2014; Romero et al., 2012). Para que existisse um controlo mais rígido foram criados regulamentos pela União Europeia e a “*Food and Drug Administration*” (FDA) onde estão descritos limites de resíduos de substâncias farmacológicas ativas nos alimentos de origem animal (FDA, 2011; Pöttering and Kohout, 2009).

A mortalidade por infeções bacteriológicas é a principal perda económica em aquacultura, principalmente nas fases larvares (Romero et al., 2012). Atualmente, estão a ser estudadas e desenvolvidas, medidas para proteger os animais das bactérias patogénicas evitando o uso de antibióticos (Cheng et al., 2014). Estudos mostram várias alternativas que estão a ser testadas como alternativas aos antibióticos (Defoirdt et al., 2011; Natrah et al., 2011), tais como:

- Técnica da água verde: as microalgas são usadas para cultivar animais, tais como, camarões ou rotíferos. Foram anteriormente reportados, casos onde o *Vibrio* spp. desapareceu após utilização de microalgas (tais como, *Chlorella* e *Chaetoceros calcitrans*) (Defoirdt et al., 2007; Huervana et al., 2006);
- Bacteriófagos: são vírus que parasitam bactérias, eliminando-as, tornando-se um agente efetivo para eliminar bactérias patogénicas. Este método enfrenta, no entanto obstáculos ao nível de segurança e ainda, a inexistência de dados em testes de grande escala (Cheng et al., 2014; Wittebole et al., 2013);
- Inibição do crescimento através da adição de ácidos gordos de cadeia curta: embora os mecanismos antibacterianos não sejam totalmente entendidos, têm capacidade

bacteriostática e bactericida. Poderá existir alguma resistência por parte das bactérias, especialmente em ambientes ácidos (Ricke, 2003);

- Inibidores de *quorum-sensing*: a patogenicidade bacteriana deve-se, muitas vezes, à regulação e controlo do sistema de *quorum-sensing*. Sendo possível inibir as moléculas de sinalização e assim evitar a virulência (Romero et al., 2012);
- Probióticos: os microrganismos não patogénicos são administrados vivos e constituem uma vantagem para o hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Estes microrganismos benéficos ocupam o nicho ecológico, podendo mesmo, em alguns casos, destruir os microrganismos patogénicos através da produção de compostos antimicrobianos (Cheng et al., 2014);
- Vacinas: as vacinas que contêm organismos inativos ao entrarem em contacto com o hospedeiro, estimulam o seu sistema imunitário. Desta forma, o hospedeiro é capaz de realizar uma resposta rápida e eficaz aquando de um novo contacto (Cheng et al., 2014);
- Óleos essenciais: são frações voláteis que contêm substâncias responsáveis pelos aromas das plantas. São considerados como a primeira defesa contra agentes patogénicos e animais devido ao seu efeito antibacteriano, antiviral, antifúngico, entre outros (Romero et al., 2012).

Diversos trabalhos mostram que organismos marinhos, tais como, algumas espécies de microalgas, por exemplo, *Isochrysis galbana*, têm a capacidade de inibir o crescimento de agentes patogénicos humanos e de animais, através da produção de metabolitos secundários (González-Davis et al., 2012; Molina-Cárdenas et al., 2014). Algumas espécies são capazes de produzir oxigénio reativo que aumentam a toxicidade de ácidos gordos, tais como, o ácido eicosapentaenóico (EPA), contra agentes patogénicos nomeadamente, *Vibrio* spp. (Molina-Cárdenas et al., 2014).

### 1.3 Microalgas

As microalgas podem ser encontradas numa grande variedade de ecossistemas nomeadamente em ambientes terrestres e aquáticos, tanto em água salgada como em água doce (Mostafa, 2012). Estes organismos fotolitoautotróficos, microscópicos (-1-50- $\mu\text{m}$ ), usam energia e convertem dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), resultando na produção de oxigénio ( $\text{O}_2$ ). Estes microrganismos utilizam o azoto e o fósforo como principais fontes de nutrientes. As microalgas são consideradas responsáveis por cerca de 60% da captura de  $\text{CO}_2$  e produção de  $\text{O}_2$  (Wolkers et al., 2011).

Existe ainda um desconhecimento da totalidade das espécies de microalgas, apesar de estarem identificadas cerca de 30 000 espécies extantes, estima-se que existam mais de 50 000 (Mata et al. 2010). As análises moleculares estão a completar a classificação complexa deste grupo. Bem como, divididos em diferentes grupos taxonómicos de acordo com, a sua estrutura, classificação celular, pigmentos, substâncias de reserva, habitat, entre outros.

A comunidade científica e a indústria têm, ao longo dos últimos anos, aumentado o interesse na biomassa de microalgas, sendo o seu potencial, hoje em dia, bastante estudado (Talero et al., 2015; Widowati et al., 2017). Compostos, tais como, carotenóides e lípidos, têm grande relevância devido à sua atividade antioxidante, neuroprotectora, anti-diabética, anti-cancerígena ou antibacteriana (Falaise et al., 2016; Widowati et al., 2017). Devido a estas propriedades, algumas espécies de microalgas são sugeridas como benéficas para a saúde humana (Milledge, 2011). As microalgas são usadas na alimentação humana, podendo ser encontradas em forma de cápsulas, líquidos, entre outros. Têm uma grande diversidade de aplicações alimentares (como, massas, bebidas, guloseimas) visto terem propriedades químicas que permitem que estas sejam utilizadas como suplemento nutricional ou corantes naturais. Algumas microalgas, incluindo cianobactérias, são comercializadas para alimentação humana, tais como: *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella salina* (Spolaore et al., 2006).

Na alimentação animal as microalgas são principalmente utilizadas indiretamente como alimento para presas vivas, usadas na alimentação larvar, ou diretamente para a alimentação de moluscos e camarões.

### **1.3.1 Microalgas na aquicultura**

A população mundial tem aumentando significativamente nos últimos anos. Dados registados no dia 12 de novembro de 2018 (17h 45min), a população mundial atingiu 7.663.219.000 de indivíduos (“Worldometers,” 2018). As Nações Unidas estimam que a população mundial atinja 9,8 bilhões de indivíduos em 2050 (Lewandowski et al., 2017). Com este aumento significativo da população é necessário encontrar estratégias para produção de proteína com elevada qualidade. Desta forma, a aquicultura tem diversos fatores que permitem um crescimento desta atividade, tais como: a gestão sustentável da água, as melhores estratégias da alimentação e mais ecológicas, os organismos geneticamente mais aptos e ainda, uma menor emissão de gases de efeito estufa (Bentzon-Tilia et al., 2016; Hemaiswarya et al., 2011).

As microalgas são um elemento crucial para o setor da aquicultura. Estas permitem uma alimentação nutritiva e sustentável para a produção de peixes e crustáceos (Ferreira et al., 2008; Muller-Feuga, 2000), possuindo enormes vantagens, como por exemplo, o melhoramento da cor dos salmonídeos (Lorenz, R.T., Cysewski, 2000; Sirakov et al., 2015). Estes organismos unicelulares são fundamentais para a alimentação das larvas ou para o consumo de moluscos, camarões e rotíferos (Ferreira et al., 2008; Hemaiswarya et al., 2011; Muller-Feuga, 2000). Em estudos anteriores foi provado que uma alimentação com algas tem diversos efeitos positivos na fisiologia dos peixes, graças ao perfil vitamínico completo, minerais e ácidos gordos essenciais, melhorando a resposta imunitária e a fertilidade. Têm efeitos, ainda, na aparência externa dos animais (Certik and Shimizu, 1999; Spolaore et al., 2006). O alimento não vivo apresenta desvantagens quando comparado com o alimento vivo (microalgas), visto que, o primeiro pode baixar o crescimento e aumentar a mortalidade (Hemaiswarya et al., 2011). Os nutrientes provenientes das

microalgas são transferidos ao longo da cadeia trófica, quando ingeridos pelo zooplâncton (Durmaz and Erbil, 2017).

As microalgas têm que respeitar vários critérios para que possam ser utilizados na alimentação em aquacultura. Têm, também, de ser facilmente cultiváveis e não-tóxicas. Necessitam de ser facilmente digeridas, com um elevado valor nutricional (principalmente aminoácidos e ácidos gordos essenciais) e ter um tamanho e forma adequados para serem ingeridos (Spolaore et al., 2006).

As espécies mais usadas para este propósito são as espécies, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata* e *Skeletonema costatum* (Hemaiswarya et al., 2011; Spolaore et al., 2006). Com a procura da biomassa de microalgas, tem de ser produzida em diferentes sistemas de cultivo de larga-escala, dos quais se destacam os fotobiorreatores (PBRs).

### **1.3.2 Atividade antibacteriana de microalgas**

A atividade antibacteriana nas microalgas em culturas não axénicas poderá, também, dever-se a compostos, provenientes de bactérias simbiotes. Estas bactérias podem competir com as patogénicas e desta forma eliminá-las. Em culturas não axénicas podem, ainda, ser encontrados bacteriófagos que permitem eliminarem os agentes causadores de virulência (Cai et al., 2011).

As condições de produção das microalgas têm um papel fundamental no metabolismo das mesmas. A síntese de compostos antimicrobianos pode ser influenciada pela temperatura, pelo pH do meio, pelo período de cultivo, pela salinidade, pela intensidade luminosa assim como pelos constituintes do meio (De Moraes et al., 2015; Noaman, 2004).

Algumas condições promovem a produção de biocompostos, por exemplo, uma redução de alguns nutrientes no meio de cultura (tais como, azoto), estimula a produção de lípidos ou hidratos de carbono (De Moraes et al., 2015; Fogg, 1983). A intensidade luminosa,

quando muito elevada, pode diminuir a concentração de ácidos gordos, embora afete positivamente a atividade antioxidante da microalga (De Moraes et al., 2015; Guedes et al., 2010). A temperatura é um dos fatores mais importantes quando se fala do crescimento e produção de biocompostos, tais como, compostos antimicrobianos (De Moraes et al., 2015; Jourdan and On, 2001).

### **1.3.3 Fotobiorreatores**

Com o crescimento acentuado da aquacultura e por sua vez, o aumento do cultivo das microalgas tem existido a necessidade de cultivar a biomassa em sistemas fechados que permitam um elevado controlo da cultura. Os PBRs têm sido desenhados para uma otimização do cultivo das microalgas, estes podem estar dependentes da luz solar ou da luz artificial. Sendo que, os PBRs dependentes da luz natural são mais comumente utilizados, podendo ser, por exemplo, tubulares ou planos. Os PBRs fechados limitam a contaminação por bactérias ou contaminantes químicos, permitindo assim, uma maior produtividade e qualidade das microalgas produzidas (Durmaz and Erbil, 2017).

Os PBRs tubulares apresentam melhores características para a produção de microalgas quando comparados com outros sistemas (Durmaz and Erbil, 2017). Permitem uma grande área produtiva com uma elevada produtividade volumétrica e de fácil controlo. Estes oferecem diversas vantagens comparativamente aos sistemas abertos, visto que é possível um fácil controlo da temperatura e do CO<sub>2</sub> transferido. (Durmaz and Erbil, 2017).

Existem muitos tipos de sistemas fechados para o cultivo de microalgas, nomeadamente, em painéis planos, colunas verticais, tanques com agitação, sacos de plástico, PBRs tubulares, entre outros (Liao et al., 2014).

A Necton, S.A., em 2005, desenhou e construiu um novo tipo de PBR tubular industrial, onde diferentes microalgas são cultivadas e posteriormente recolhidas por centrifugação.

### 1.3.4 Espécies estudadas

As microalgas estudadas ao longo desta dissertação correspondem a microalgas produzidas em PBR, na Necton, S.A. (*Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Nannochloropsis* sp., *Porphyridium cruentum*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*).

*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1898

Em 1898, Bohlin, descreveu a microalga *Phaeodactylum tricornutum*, pela primeira vez, como sendo uma diatomácea (Guiry, 2018). Esta espécie é o único representante do género *Phaeodactylum*, família Phaeodactylaceae e subordem Phaeodactylinae. Diferenciando-se, também, pelo seu pleomorfismo, em virtude das condições ambientais (He et al., 2014; Purohit and Venugopalan, 2009). Esta microalga pode ser encontrada em águas salobras e marinhas (Prestegard et al., 2016)

Pelas suas características polimórficas tem sido alvo de vários estudos fisiológicos e genéticos. Ao nível industrial esta microalga serve de alimento em aquaculturas devido aos elevados valores de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) e EPA (Prestegard et al., 2016).

*Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 1873

Esta diatomácea caracteriza-se por apresentar frústulas cilíndricas providas de projeções de sílica que ligam as células entre si levando à formação de filamentos (Sarno et al., 2005).

Esta espécie pertence à classe Mediophyceae, à ordem Thalassiosirales, família da Skeletonemataceae. Estas espécies diferenciam-se com base nas suas características morfológicas, citológicas, e mais recentemente através de técnicas moleculares (Guiry, 2018; Sarno et al., 2005).

A espécie *S. costatum* é maioritariamente utilizada em aquacultura para a alimentação de poliquetas, lagostas, camarões, mexilhões, ostras, entre outras (Kumar and Prabu, 2014). Contudo, devido à sua composição química é também utilizada na indústria cosmética,

tendo sido, um extrato lipídico patenteado pela *Parfums Christian Dior*, devido ao seu poder adelgaçante, anti-celulítico e antienvhecimento da pele (Viron et al., 2002).

*Nannochloropsis spp.* D.J.Hibberd, 1981

Este género tem como halotipo *Nannochloropsis oculata*, primeiramente descrita em 1981 por D.J. Hibberd. Pertence à classe Eustigmatophyceae, à ordem Eustigmatales e à família Monodopsidaceae (Guiry, 2018). As suas espécies que habitam em ambientes marinhos, com uma morfologia simples e formada por células verdes, ou amarela-esverdeadas. O género *Nannochloropsis* é constituído atualmente por sete espécies (Guiry, 2018; Suda et al., 2002).

Devido à sua composição química, nomeadamente um elevado conteúdo em EPA, esta microalga tem efeitos positivos na saúde de animais, apresentando uma elevada aplicação comercial. É principalmente utilizada na alimentação de rotíferos, camarões e larvas de peixes, sendo também utilizada em cosmética (por exemplo, para endurecimento da pele) e para a extração de ácido gordos (Spolaore et al., 2006).

*Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nägeli, 1849

*P. cruentum* é uma alga vermelha (Rodophyta), sem parede celular, ainda assim, apresenta forma esférica, normalmente são células solitárias, podendo ser encontradas em colónias irregulares (Guiry, 2018; Reboloso Fuentes, 2000). Esta microalga tem uma larga distribuição mundial (Gaikwad et al., 2009). Atualmente são conhecidas nove diferentes espécies dentro do género *Porphyridium* (Guiry, 2018).

Esta microalga tem sido referenciada como fonte de produtos de elevado valor, tais como, PUFAs, EPA e pigmentos (Asgharpour et al., 2015).

*Isochrysis galbana* Parke, 1949

A microalga marinha pertencente à família Isochrysidaceae e ordem Isochrysidales. São compostas por células individuais com a capacidade movimento devido à presença de flagelos (Guiry, 2018).

As suas boas características nutricionais permitem que esta microalga seja utilizada em aquacultura, com especial aplicação, em alimentação de larvas, peixes e crustáceos no início do estado de crescimento (Godet et al., 2010; Sánchez et al., 2000).

*Tetraselmis chuii* Butcher, 1959

A microalga verde, *Tetraselmis chuii* faz parte da ordem Chlorodendrales e da família Chlorodendraceae (Guiry, 2018). Caracteriza-se pelos seus quatro flagelos e pela forma ovoide. Mais de 50 espécies estão descritas como pertence ao género *Tetraselmis* (Mohammadi et al., 2015).

Esta microalga tem sido utilizada na alimentação animal, nos últimos anos é frequentemente referenciada como potencial espécie para a produção de biodiesel devido ao seu elevado crescimento e valor lipídico (Kumaran et al., 2014; Rahman et al., 2017).

#### **1.4 Necton, S.A.**

A Necton - Companhia Portuguesa de Culturas Marinhas, S.A, iniciou a sua atividade há mais de 20 anos (1997), resultando de um *spin-off* da Universidade Católica Portuguesa, com o intuito de produzir microalgas numa escala industrial. A companhia está situada no Parque Natural da Ria Formosa, sendo o local adequado para a produção de microalgas devido ao clima propício e à proximidade da água salgada. Nos dias de hoje, a empresa divide-se em dois grandes setores, a produção de microalgas e a produção de sal (sal marinho e “flor de sal”).

Com uma coleção de aproximadamente 30 espécies de microalgas, fornecem biomassa de microalgas para variadíssimos fins, entre eles, aquacultura, cosmética ou projetos científicos. As microalgas são vendidas sob a marca PhytoBloom em forma de biomassa concentrada com diferentes formatos: i) PhytoBloom Ice<sup>®</sup>, corresponde a uma pasta congelada com uma elevada concentração de biomassa; ii) PhytoBloom Green Formula<sup>®</sup>, que diz respeito a um concentrado de biomassa líquido e; iii) PhytoBloom Prof<sup>®</sup>, correspondendo a uma biomassa liofilizada, que apresenta um tempo de prateleira superior aos anteriores. A unidade de negócio das microalgas comercializa, também, um meio de cultura para microalgas denominado NutriBloom<sup>®</sup>.

## 1.5 Objetivos

Com esta dissertação, foi pretendido avaliar a performance de crescimento de *S. costatum* e *Nannochloropsis* sp. em PBRs tubulares, utilizados numa unidade de produção industrial.

Teve ainda como principal objetivo identificar a capacidade antibacteriana das microalgas *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp., *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum* e *Tetraselmis chuii*. Para atingir este fim, foi verificado a atividade antimicrobiana dos extratos de microalgas com solventes orgânicos: acetato de etilo; acetona; etanol; hexano. A suscetibilidade, perante estes extratos, foi testada para as estirpes patogénicas com relevância em aquacultura (*Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*).

Finalmente, foi pretendido identificar o principal composto bioativo da microalga que revelou maior poder inibitório.

## Referências Bibliográfica

- Asgharpour, M., Rodgers, B., Hestekin, J.A., 2015. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium cruentum*: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products. *Energies* 8, 10487–10503. doi:10.3390/en80910487
- Austin, B., Newaj-Fyzul, A., 2017. *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*, First edit. ed. John Wiley & Sons Ltd, Chaguanas, Trinidad.
- Bentzon-Tilia, M., Sonnenschein, E.C., Gram, L., 2016. Monitoring and managing microbes in aquaculture – Towards a sustainable industry. *Microb. Biotechnol.* 9, 576–584. doi:10.1111/1751-7915.12392
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., Buschmann, A.H., 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 15, 1917–1942. doi:10.1111/1462-2920.12134
- Cai, W., Wang, H., Tian, Y., Chen, F., Zheng, T., 2011. Influence of a bacteriophage on the population dynamics of toxic dinoflagellates by lysis of algicidal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7837–7840. doi:10.1128/AEM.05783-11
- Cao, J., Zhang, J., Ma, L., Li, L., Zhang, W., Li, J., 2018. Identification of fish source *Vibrio alginolyticus* and evaluation of its bacterial ghosts vaccine immune effects. *Microbiologyopen*. 1–11. doi:10.1002/mbo3.576
- Carraro, R., Dalla Rovere, G., Ferraresso, S., Carraro, L., Franch, R., Toffan, A., Pascoli, F., Patarnello, T., Bargelloni, L., 2018. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish tissues. *J. Fish Dis.* 41, 247–254. doi:10.1111/jfd.12703
- Certik, M., Shimizu, S., 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 1–14. doi:10.1016/S1389-1723(99)80001-2
- Chatterjee, S., Haldar, S., 2012. *Vibrio Related Diseases in Aquaculture and Development*

- of Rapid and Accurate Identification Methods. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* S1, 1–7. doi:10.4172/2155-9910.S1-002
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., Yuan, Z., 2014. Antibiotic alternatives: The substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2014.00217
- De Moraes, M.G., Vaz, B.D.S., De Moraes, E.G., Costa, J.A.V., 2015. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *Biomed Res. Int.* 1–15. doi:10.1155/2015/835761
- Defoirdt, T., 2014. Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Rev. Aquac.* 6, 100–114. doi:10.1111/raq.12030
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.* 25, 472–479. doi:10.1016/j.tibtech.2007.08.001
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 251–258. doi:10.1016/j.mib.2011.03.004
- Durmaz, Y., Erbil, G.Ç., 2017. Performance of industrial-scale tubular photobioreactor in marine hatchery. *J. Appl. Phycol.* 29, 2755–2760. doi:10.1007/s10811-017-1202-7
- Falaise, C., François, C., Travers, M., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Mouget, J., 2016. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Mar. Drugs* 14, 1–27. doi:10.3390/md14090159
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, in: Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada, pp. 1–11. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03873
- FDA - Food and Drug Administration, 2011. Aquaculture Drugs, in: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. Department of Health and Human Services, Food and

- Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, pp. 183–208.
- Ferreira, M., Maseda, A., Fábregas, J., Otero, A., 2008. Enriching rotifers with “premium” microalgae. *Isochrysis* aff. *galbana* clone T-ISO. *Aquaculture* 279, 126–130. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.03.044
- Fogg, G.E., 1983. The Ecological significance of extracellular products of phytoplankton. *Bot. Mar.* 26, 3–14. doi:10.1515/botm.1983.26.1.3
- Frans, I., Dierckens, K., Crauwels, S., Van Assche, A., Leisner, J., Larsen, M.H., Michiels, C.W., Willems, K.A., Lievens, B., Bossier, P., Rediers, H., 2013. Does Virulence Assessment of *Vibrio anguillarum* Using Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Larvae Correspond with Genotypic and Phenotypic Characterization? *PLoS One* 8, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0070477
- Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B., Rediers, H., 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *J. Fish Dis.* 34, 643–661. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x
- Gaikwad, M.S., Meshram, B.G., Chaugule, B.B., 2009. On occurrence of the Genus *Porphyridium nageli*: new to India. *J. Algal Biomass Util.* 1, 102–106.
- Godet, S., Loiseau, C., Pencreac’h, G., Ergon, F., Hérault, J., 2010. Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding a novel putative esterase from the marine microalga *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae, haptophyta). *J. Phycol.* 46, 679–684. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00838.x
- González-Davis, O., Ponce-Rivas, E., Sánchez-Saavedra, M.D.P., Muñoz-Márquez, M.E., Gerwick, W.H., 2012. Bioprospection of Microalgae and Cyanobacteria as Biocontrol Agents Against *Vibrio campbellii* and Their Use in White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Culture. *J. World Aquac. Soc.* 43, 387–399. doi:10.1111/j.1749-7345.2012.00567.x
- Guedes, A.C., Meireles, L.A., Amaro, H.M., Malcata, F.X., 2010. Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity.

- JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc. 87, 791–801. doi:10.1007/s11746-010-1559-0
- Guiry, M.D., 2018. AlgaeBase [WWW Document]. World-wide Electron. Publ. Natl. Univ. Ireland, Galw. URL [http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus\\_id=44568](http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44568) (accessed 2.28.18).
- He, L., Han, X., Yu, Z., 2014. A Rare *Phaeodactylum tricornutum* Cruciform Morphotype: Culture Conditions, Transformation and Unique Fatty Acid Characteristics. PLoS One 9, e93922. doi:10.1371/journal.pone.0093922
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R.R., Ganesan, V., Anbazhagan, C., 2011. Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. World J. Microbiol. Biotechnol. 27, 1737–1746. doi:10.1007/s11274-010-0632-z
- Hernández-Robles, M.F., Álvarez-Contreras, A.K., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Curiel-Quesada, E., Vázquez-Salinas, C., Quiñones-Ramírez, E.I., 2016. Virulence factors and antimicrobial resistance in environmental strains of *Vibrio alginolyticus*. Int. Microbiol. 19, 191–198. doi:10.2436/20.1501.01.277
- Hickey, M.E., Lee, J.L., 2017. A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: Ecology, pathology and prevention. Rev. Aquac. 1893, 1–26. doi:10.1111/raq.12188
- Huervana, F.H., De La Cruz, J.J.Y., Caipang, C.M.A., 2006. Inhibition of luminous *Vibrio harveyi* by “green water” obtained from tank culture of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Acta Ichthyol. Piscat. 36, 17–23. doi:10.3750/AIP2006.36.1.03
- Jourdan, B.J., On, R., 2001. Grow your own *Spirulina*. Production 13, 1–16.
- Khan, M.I., Shin, J.H., Kim, J.D., 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. Microb Cell Fact. 17, 1–21. doi:10.1186/s12934-018-0879-x
- Kumar, C.S., Prabu, V.A., 2014. Original Research Article Culture of the phytoplankton *Skeletonema costatum*, Cleve, 1873. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 3, 129–136.
- Kumaran, P., Saifuddin, N., Janarthanan, S., 2014. Potential of microalgae *Tetraselmis Chuii* as feedstock for biodiesel application. Int. Rev. Mech. Eng. 8, 283–288.

- Lewandowski, C.M., Co-investigator, N., Lewandowski, C.M., 2017. World population prospects Volume II: Demographic Profiles. World Popul. Prospect. Vol. II Demogr. Profiles Revision. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Liao, Q., Li, L., Chen, R., Zhu, X., 2014. A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. *Bioresour. Technol.* 161, 186–191. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.119
- Lorenz, R.T., Cysewski, G.R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18, 160–167. doi:10.1016/S0167-7799(00)01433-5
- McCarter, L.L., 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 18–29. doi:10.1159/000077866
- Milledge, J.J., 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10, 31–41. doi:10.1007/s11157-010-9214-7
- Mohammadi, M., Kazeroni, N., Baboli, M.J., 2015. Fatty acid composition of the marine micro alga *Tetraselmis chuii* Butcher in response to culture conditions. *J. Algal Biomass Util.* 6, 49–55.
- Molina-Cárdenas, C., Sánchez-Saavedra, M., Lizárraga-Partida, M., 2014. Inhibition of pathogenic *Vibrio* by the microalgae *Isochrysis galbana*. *Appl. Phycol.* 26, 2347–2355. doi:10.1007/s10811-014-0270-1
- Mostafa, S.S.M., 2012. Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications. *Plant Sci.* 275–314. doi:10.5772/53649
- Muller-Feuga, A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* 12, 527–534. doi:10.1023/A:1008106304417
- Mustapha, S., Mustapha, E.M., Nozha, C., 2013. *Vibrio alginolyticus*: an emerging pathogen of foodborne diseases. *Ijst* 2, 302–309.
- Natrah, F.M.I., Mardel, M., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., Defoirdt, T., 2011. Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum

- sensing. *Aquaculture* 317, 53–57. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.038
- Naviner, M., Bergé, J.P., Durand, P., Le Bris, H., 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174, 15–24. doi:10.1016/S0044-8486(98)00513-4
- Noaman, M.N., 2004. Effect of potassium and nitrogen fertilizer on the growth and biomass of some halophytes grown under high levels of salinity. *J. Agron.* 3, 25–30. doi:10.3923/ja.2004.25.30
- Novriadi, R., 2016. Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika* 12, 1–12. doi:10.20884/1.oa.2016.12.1.24
- Parke, M., 1941. Studies on Marine Flagellates. *J. Mar. Biol. Assoc.* 28, 255–288.
- Plaza, M., Herrero, M., Alejandro Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7159–7170. doi:10.1021/jf901070g
- Pöttering, H.-G., Kohout, J., 2009. Regulation (Ec) No 470/2009 Of The European Parliament And Of The Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regul. Off. J. Eur. Union 152, 11–22.
- Prestegard, S.K., Erga, S.R., Steinrücken, P., Mjøs, S.A., Knutsen, G., Rohloff, J., 2016. Specific metabolites in a *Phaeodactylum tricornutum* strain isolated from Western Norwegian fjord water. *Mar. Drugs* 14, 1–17. doi:10.3390/md14010009
- Purohit, R., Venugopalan, P., 2009. Polymorphism : An Overview 882–893. doi:10.1007/s12045-009-0084-7
- Rad, M., Shamsavani, D., 2010. Isolation and characterization of *Vibrio (Listonella) anguillarum* from catfish. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 34, 413–415. doi:10.3906/vet-0812-5
- Rahman, N.A., Khatoon, H., Yusuf, N., Banerjee, S., Haris, N.A., Lananan, F., Tomoyo, K., 2017. *Tetraselmis chuii* biomass as a potential feed additive to improve survival and

- oxidative stress status of Pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Int. Aquat. Res.* 9, 235–247. doi:10.1007/s40071-017-0173-2
- Reboloso Fuentes, M., 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chem.* 70, 345–353. doi:10.1016/S0308-8146(00)00101-1
- Reilly, G.D., Reilly, C.A., Smith, E.G., Baker-Austin, C., 2011. *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. *Eurosurveillance* 16, 3.
- Ricke, S., 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult. Sci.* 82, 632–639. doi:10.1093/ps/82.4.632
- Romalde, J.L., 2002. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: An integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int. Microbiol.* 5, 3–9.
- Romero, J., Gloria, C., Navarrete, P., 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. *Heal. Environ. Aquac.* doi:10.5772/28157
- Rurangwa, E., Verdegem, M.C.J., 2015. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Rev. Aquac.* 7, 117–130. doi:10.1111/raq.12057
- Sabir, M., Ennaji Moulay, M., Cohen, N., 2013. *Vibrio alginolyticus* : An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases. *Int. J. Sci. Technol.* 2, 302–309.
- Sánchez, S., Martínez, M.E., Espinola, F., 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochem. Eng. J.* 6, 13–18. doi:10.1016/S1369-703X(00)00071-1
- Sarno, D., Kooistra, W.H.C.F., Medlin, L.K., Percopo, I., Zingone, A., 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *J. Phycol.* 41, 151–176. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.04067.x
- Sirakov, I., Velichkova, K., Stoyanova, S., Staykov, Y., Katya Velichkova, C., 2015. The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2, 81–84.

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. doi:10.1263/jbb.101.87
- Suda, S., Atsumi, M., Miyashita, H., 2002. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41, 273–279. doi:10.2216/i0031-8884-41-3-273.1
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., Motilva, V., 2015. Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Mar. Drugs* 13, 6152–6209. doi:10.3390/md13106152
- Toranzo, A., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.002
- Vendramin, N., Zrncic, S., Padrós, F., Oraic, D., Le Breton, A., Zarza, C., Olesen, N.J., 2016. Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes and future challenges. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 36, 38–45.
- Viron, C., Krzych, V., Renimel, I., Andre, P., 2002. Lipid extract of the *Skeletonema* algae. *US* 6,447,782 B1. doi:10.1038/incomms1464
- WHO, 2014. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. *Bull. World Health Organ.* 61, 383–94.
- Widowati, I., Zainuri, M., Kusumaningrum, H., Susilowati, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Bourgougnon, N., Mouget, J.-L., 2017. Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 55, 1–6. doi:10.1088/1755-1315/55/1/012067
- Wittebole, X., De Roock, S., Opal, S.M., 2013. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 5, 226–235. doi:10.4161/viru.25991
- Wolkers, H., Barbosa, M., Kleinegris, D., Bosma, R., Wijffels, R., 2011. Microalgae: the green gold of the future? Large-scale sustainable cultivation of microalgae for the production

of bulk commodities. Wageningen UR, Wageningen.

Worldometers [WWW Document], 2018. URL <http://www.worldometers.info/> (accessed 11.12.18).



## Capítulo II

Produção das microalgas *Skeletonema costatum* e *Nannochloropsis* sp. em fotobiorreatores industriais



## Produção das microalgas *Skeletonema costatum* e *Nannochloropsis* sp. em fotobiorreatores industriais

### Resumo

Com o crescimento exponencial de população humana, exaustão de recursos (de entre eles os pesqueiros) e a necessidade de novos produtos têm, nas últimas décadas, impulsionado a pesquisa e aplicação de microalgas *in toto* ou fracionadas. A sua utilização por diversas indústrias: biocombustíveis, farmacêutica, cosmética e na alimentação humana e animal. Vários grupos taxonómicos (ex. Bacillariophyceae Eustigmatophyceae, Porphyridiaceae, Chlorodendraceae) têm contribuído com espécies para exploração económica, aplicações que dependem do isolamento, cultivo em pequena escala, caracterização dos produtos e suas potenciais aplicações e, nos casos viáveis, o seu aumento de escala para produção industrial.

O presente trabalho teve como objetivo o redimensionamento para a escala industrial de uma diatomácea (Bacillariophyceae) marinha, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve 1873 e a de um Eustigmatophyceae pertencente ao género *Nannochloropsis*. Também foi objeto a caracterização de produtividades, volumétrica e areal ao longo de ciclo de quatro a seis semanas de cultivo intensivo.

A cultura em caixa de Petri e seu progressivo redimensionamento para cultivo final (cultura pura) em novo sistema de fotobiorreatores tubulares de 15000 L. Nas produções utilizou-se um meio sintético, com fornecimento de CO<sub>2</sub> e nas condições de fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura de inverno (06.12.2017 a 13.03.2018) em Belamandil - Olhão (Sul de Portugal).

Estes sistemas permitiram produtividades totais de: 1,708 g/m<sup>2</sup>/d – *S. costatum*; 4,899 g/m<sup>2</sup>/d – *Nannochloropsis* sp. (produtividade areal) e 0,039 g/L/d – *S. costatum*; 0,111 g/L/d – *Nannochloropsis* sp. (produtividade volumétrica) e uma extração regular de biomassa com interesse económico, mostrando a também a aplicabilidade daquele sistema no cultivo daquelas duas microalgas.

**Palavras-chave:** *Skeletonema*, *Nannochloropsis*, aumento de escala, Fotobiorreatores industriais, produtividade volumétrica, produtividade areal.

# 1. Introdução

Nos últimos 50 anos têm-se verificado um crescimento na utilização de microalgas, tendo sido desenvolvidas metodologias, que permitiram um aumento do número de espécies estudadas (Milledge, 2014). Os biocompostos produzidos por estes organismos são utilizados em áreas como a indústria alimentar, a indústria farmacêutica, a indústria de aquacultura e ainda a indústria cosmética. Dentro dos compostos de interesse produzidos pelas microalgas estão os lípidos, hidratos de carbono, proteínas, carotenoides e vitaminas (Cuellar-bermudez et al., 2015; Lutz and Dunford, 2018).

Para a produção de microalgas foi necessário criar sistemas que permitam o seu cultivo à escala industrial, estes denominados por fotobiorreatores (PBRs) (Briassoulis et al., 2010). São, atualmente, conhecidos vários tipos de PBRs, tais como, *raceways* (Romero-villegas et al., 2018), painéis planos (Romero-villegas et al., 2018), tubulares (Toledo-cervantes et al., 2018), entre outros. Os sistemas fechados, tais como, os PBRs tubulares permitem um controlo mais ajustado de parâmetros como, o pH e a temperatura. Nestes sistemas a probabilidade de contaminações é menor por não existir uma exposição direta da cultura ao ambiente (Pereira et al., 2018; Pulz, 2001). Para espécies mais sensíveis, como é o caso das diatomáceas, são normalmente utilizados PBRs tubulares fechados (Silva et al., 2013).

A microalga *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve é uma espécie de diatomácea (Bacillariophyceae) capaz de formar *blooms* reportados por todo o Mundo (Huo and Un, 2005). Estão referenciadas como presentes em todas as águas costeiras, exceto na Antártida (Yamada et al., 2014). Os seus metabolitos, como é o caso da fucoxantina, têm despertado interesse por parte da comunidade científica devido à sua atividade antioxidante (Chern et al., 2017). O perfil bioquímico permite que esta microalga seja utilizada em aquacultura, gerando produtos com uma melhor textura e sabor, como por exemplo, as ostras (Houcke et al., 2017). Existem outras microalgas que são frequentemente utilizadas em aquacultura pelo seu perfil bioquímico, como é o caso da microalga *Nannochloropsis* sp..

A *Nannochloropsis* sp. tem sido utilizada em aquacultura para alimentar rotíferos, artêmias, e peixes juvenis (Camacho-Rodríguez et al., 2013; Sarker et al., 2018; Toda and Ross, 2018). Esta microalga pode ser encontrada em águas marinhas, águas doces e salobras. O seu tamanho reduzido permite ser ingerido por organismos de menores dimensões (2-5 µm) (Andersen et al., 1998; Wei, 2018). A *Nannochloropsis* sp. tem despertado, ao longo dos últimos anos, um enorme interesse entre a comunidade científica. Esta produz pigmentos de interesse (clorofila, zeaxantina, astaxantina, entre outros), e ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), usados como anticancerígenos, anti-inflamatórios, entre outros (Moloudizargari et al., 2018; Prokop et al., 2015; Rocha et al., 2003).

As duas microalgas têm elevado valor económico, como tal, o objetivo deste estudo passou pela produção em escala industrial de *S. costatum*, nunca antes conseguido. Acompanhando, desta forma, o crescimento e a produtividade das microalgas, *S. costatum* e *Nannochloropsis* sp., em PBR tubular exterior desenhado pela empresa Necton, S.A..

## 2. Material e métodos

Todos os ensaios descritos no presente estudo foram realizados nas instalações da empresa Necton, S.A. ([www.necton.pt](http://www.necton.pt)), assim como todos os protocolos, que foram, também estes, fornecidos pela empresa.

Os ensaios decorreram entre os dias 6 de dezembro de 2017 e 13 de março de 2018.

### 2.1 Cultura de Microalgas e aumento de escala

As microalgas utilizadas neste estudo, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve 1873 (Bacillariophyceae) e *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae), pertencem à coleção da Necton, S.A.. Estas microalgas foram mantidas numa câmara refrigerada, com uma temperatura de 10°C, numa placa de Petri (meio 1,5% Agar, VWR) ou em erlenmeyers de 50 mL ou 100 mL, suplementado com meio nutritivo Nutribloom® (Necton, S.A) (figura 1 (1)).



Figura 1. Representação do procedimento de aumento de escala das culturas usado no presente trabalho. 1 (caixa de Petri) e 2 (balões) correspondem a cultura em laboratório e 3 (Green Wall – 100 a 800 L) e 4 (sistema tubular – 15000 L) em exterior.

Desta forma, quando foi pretendido produzir uma microalga, as mesmas eram transferidas para balões de volumes, sucessivamente, superiores (figura 1 (2)). Sempre que foi atingido um número mínimo de células na cultura, estas foram transferidas. A primeira

transferência ocorreu a partir de culturas existentes no laboratório, em placa ou em suspensão, armazenados na câmara de cultura. O aumento de escala ocorreu com uma diluição de aproximadamente 1:10 até chegarem a volumes suficientes elevados para os *Green Walls* (GW) (figura 1 (3)) e mais tarde para os PBRs de 15000 L (figura 1 (4)) (Andersen, 2005).

No laboratório a temperatura foi monitorizada (23°C), já o fotoperíodo e a intensidade e qualidade da radiação incidente foram de acordo com as condições ambientais presentes no exterior. Cada balão teve duas perfurações na rolha que permitiram a entrada e saída de ar. Na entrada de ar, um tubo permite um arejamento contínuo e uma boa homogeneização da cultura, injetando ar e CO<sub>2</sub> para a cultura. A água utilizada para a cultura de microalgas foi proveniente da Ria Formosa, tendo sido previamente ultrafiltrada. Possui uma salinidade de 33 PSU e antes da utilização foi esterilizada por autoclavagem a 121°C durante 40 minutos. Após ocorrer o aumento de escala foi-lhes acrescentado meio nutritivo (Nutribloom®) na quantidade de 2 mL/L. O Nutribloom® utilizado é um meio produzido pela Necton, S.A., a sua composição química é conhecida, com um mínimo de: 2,800% de Azoto; 0,310% de Fósforo; 0,112% de Ferro; 0,014% de Zinco; 0,006% de Manganésio; 0,005% de Magnésio; 0,001% de Molibdénio; 0,001% de Cobalto; 0,001% de Cobre; 0,0035% de Tiamina; 0,0005% de Biotina; 0,0003% de B12.

Quando as culturas de microalgas atingiram densidades óticas (DO) de  $\approx 4,0$  no caso da *Nannochloropsis* sp. (540 nm) e  $\approx 2,5$  na *S. costatum* (450 nm), estas foram transferidas para os GW, no exterior.

Os *Green walls* são PBRs, utilizados pela Necton, S.A., para o aumento de escala entre as culturas de laboratório e os PBRs de produção (15000 L) com um volume de 100 a 800 L. As estruturas são constituídas por um saco de plástico (polietileno de baixa densidade) suportados por uma armação de ferro, no interior um tubo na base do saco permite a recirculação da cultura através da injeção de ar e CO<sub>2</sub>. O saco foi preenchido com água salgada ultrafiltrada proveniente da Ria Formosa, com uma salinidade de 33 PSU e tratada com hipoclorito de sódio (NaClO) na proporção de 1 mL/L de água. O NaClO atuou num período mínimo de 30 minutos. Após a desinfecção o cloro foi eliminado com a adição de

tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (0,5 mL/L). A ausência do cloro foi verificada através do teste de cloro (tiras de medição de cloro). Procedeu-se à inoculação das microalgas, sendo que, 20% do volume de cada GW foi preenchido com o inóculo da microalga. As microalgas foram transferidas para GW com volumes superiores até atingirem os GW com 800 L. Diariamente, foi retirado uma amostra num tubo *falcon* (50 mL) para proceder a análises bioquímicas. Foi verificado o crescimento celular através da DO, e interpolado por intermédio de retas de calibração pré-definidas com base no peso seco (PS) e no número de células por mL. As células foram observadas ao microscópio, foi medido o pH da cultura e ainda, duas vezes por semana, foi determinada a concentração de nitratos. Os nutrientes na cultura foram repostos pela adição da quantidade adequada de Nutribloom®, sendo, no caso da *S. costatum*, acrescentado 2 mL/L de silicatos (23 g/L [ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ]).

Os PBRs foram inicialmente preenchidos com água salgada, o mesmo processo que ocorreu nos GW foi repetido no PBR. Os PBRs tubulares têm uma capacidade de 15000 L e foram inoculados com as microalgas de interesse. Tal como aconteceu com os GW, os PBRs foram monitorizados diariamente, tendo sido realizadas as mesmas análises. Quando necessário foi adicionado maior quantidade de  $\text{CO}_2$  (controlado através dos valores de pH) e ainda foi fornecido Nutribloom® duas vezes por semana quando se verificou carência de nutrientes. Tal como nos GW, no caso da *S. costatum* foi também suplementada com sílica (2 mL/L a 23 g/L [ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ]).

As culturas no exterior estiveram submetidas ao fotoperíodo correspondente da época do ano em que decorreu o estudo, assim como à temperatura ambiente. Os sistemas de produção (PBR tubulares e GW) apresentam um sistema de refrigeração que teve como função evitar que atingissem, no seu interior, temperaturas superiores a 30°C. O sistema de refrigeração era composto por aspersores de rega que fornecia água de forma a arrefecer todo o sistema, se necessário.

Sendo uma produção semi-contínua, quando estas atingiram concentrações celulares ideais, uma parte do volume foi recolhido e submetida a um processo de centrifugação para o aproveitamento da biomassa.

## 2.2 Condições de produção

A produção industrial de biomassa de microalgas foi realizada em PBRs tubulares com 15000 L de capacidade e uma área de ocupação de 340 m<sup>2</sup>. O sistema foi composto por tubos de polimetil metacrilato (PMMA) com um diâmetro de 63mm.

Parte da cultura [2000-6000L] foi recolhida para centrifugação enquanto que, a restante cultura foi renovada com um meio de crescimento novo. Ambos os reatores foram cultivados a uma salinidade de 33 PSU, a uma velocidade de circulação de 1,0 m/s e a um ponto de ajuste de pH para a injeção de CO<sub>2</sub>. O pH é ajustado para 8,5 no caso da *Nannochloropsis* sp. e 9,0 no caso da *S. costatum*. Um sistema interno regista o pH e temperatura dentro do PBR em tempo real.

Os ensaios decorreram entre as datas de 06.12.2017 e 13.03.2018, em Belamandil - Olhão (Sul de Portugal).

## 2.3. Parâmetros analíticos: Físicos, Químicos e Produtividade

A avaliação do crescimento da biomassa das microalgas foi avaliada por meio da medição da DO e PS. A necessidade de nutrientes e CO<sub>2</sub> na cultura foram analisadas através das medições de nitratos e pH, respetivamente.

### 2.3.1 pH

O pH é medido em tempo real através de uma sonda inserida nos PBRs. A sonda permite o ajuste do pH por meio de CO<sub>2</sub>, assim sendo o pH é ajustado a 8,5 no caso da microalga *Nannochloropsis* sp. e 9,0 para a *S. costatum*. O pH foi confirmado diariamente, em laboratório, através de uma sonda de pH portátil (pHep® HANNA).

### 2.3.2 Nitratos

A concentração de nitratos nas culturas foi medido duas vezes por semana, utilizando um protocolo desenvolvido pela Necton, S.A.. Sempre que necessário foi acrescentado à cultura nutrientes - NutriBloom® (Necton, S.A.) - ajustando dessa forma o volume adicionado às necessidades das mesmas.

A quantificação foi realizada pelo método de rastreio espectrofotométrico a ultravioleta (UV). Para a quantificação foram realizadas leituras para cada amostra a 220 nm e a 275 nm (Shimadzu). A medição através destes comprimentos de onda permitiram diferenciar a quantidade de nitratos presentes na amostra pois, os nitratos absorvem fortemente a radiação UV. A matéria orgânica e outros solutos também absorvem a radiação a 220 nm. A leitura a 275 nm permitiu corrigir os valores de nitratos, visto que, a este comprimento de onda apenas a matéria orgânica e os outros solutos são absorvidos (APHA, 2000).

### 2.3.3 Curvas de crescimento

A partir das amostras retiradas dos tubos de PBRs foi medida a absorbância (DO) num espectrofotómetro UV mini-240 (Shimadzu). Para a microalga *Nannochloropsis* sp. a densidade ótica (DO) foi medida através de um comprimento de onda de 540 nm, na *S. costatum* foi medida a 450 nm.

O valor esteve compreendido entre 0 e 1. Sempre que a concentração da cultura era elevada, a leitura da DO era superior a 1, desta forma, foi necessário realizar diluições com água salgada (1:10 ou 1:20).

### 2.3.4 Avaliação da biomassa – Taxas de crescimento

As taxas de crescimento específicas foram determinadas através do PS, medido durante a fase de crescimento exponencial em função do tempo.

O PS foi realizado de acordo com o procedimento da Necton, S.A.. Tendo sido, utilizado um sistema de filtração (DYMAX 30) e filtros com um tamanho de poro de 1,5 µm da VWR.

Todos os filtros antes da sua utilização foram previamente lavados com 20 mL de água destilada e 2 mL de formiato de amónia 0,5M (31,53 g/L). Posteriormente, os filtros foram colocados na estufa a 60°C, durante um mínimo de 24 horas. Após estarem totalmente secos, os filtros foram retirados da estufa e colocado no exsicador por um período mínimo de 15 minutos, até atingirem a temperatura ambiente. Seguidamente foram pesados e o seu peso inicial foi registado (Pi).

Os filtros foram colocados na rampa de filtração e a cultura colocada no copo para ser filtrada. Para culturas pouco concentradas foi utilizado um volume de 20 mL de cultura e para as mais concentradas foi utilizado apenas 10 mL (cultura previamente homogeneizada). Devido a serem culturas marinhas, foi necessário limpar o filtro com formiato de amónia, o volume de formiato de amónia correspondeu ao volume adicionado de cultura, de forma a dissolver os sais presentes na amostra. Para cada amostra foram realizadas três réplicas que, posteriormente, foram colocadas na estufa por um período mínimo de 48h.

Após serem retirados da estufa os filtros foram colocados no exsicador até atingirem a temperatura ambiente. Seguidamente, foram pesados, novamente, e anotado o peso do filtro (Pf).

Para obter o valor de PS foi utilizado a seguinte fórmula:

$$PS = \frac{Pf - Pi}{V}$$

PS expresso em mg/mL.

Em que,

Pf – peso final do filtro com a amostra (mg);

Pi – peso inicial do filtro (mg);

V – volume da amostra (mL).

Foram criadas retas de calibração para todas as espécies produzidas na Necton S.A.. A recta de calibração utilizada para a *S. costatum* é:  $y=0,3948x+0,1352$

e, no caso da *Nannochloropsis* sp.:  $y=0,1791x+0,0403$

Onde,

Y – peso seco

X – densidade ótica

### 2.3.5 Produtividade

A produtividade, é a capacidade de um sistema produzir biomassa, esta é expressa em termos de volume da cultura e da área da superfície. A produtividade volumétrica da biomassa ( $P_v$ , g/L/d) foi determinada de acordo com a seguinte fórmula (Durmaz and Erbil, 2017):

$$P_v = \frac{X_f - X_i}{\Delta t}$$

Onde,

$P_v$  – produtividade volumétrica

$X_f$  – concentração final da biomassa (g/L)

$X_i$  – concentração inicial da biomassa (g/L)

$\Delta t$  – intervalo de tempo (dias)

A produtividade areal de biomassa ( $P_a$ , g/L/d) e a produtividade volumétrica são relacionadas segundo (Durmaz and Erbil, 2017):

$$Pa = \frac{V(Xf - Xi)}{\Delta t}$$

Onde,

Pa – produtividade areal

V – volume da cultura por 1 m<sup>2</sup>

## 2.4 Análise de dados

Para os ensaios realizados, foram calculados médias e desvios padrões com base nos dados recolhidos. Foram, ainda, calculadas variáveis de respostas, tais como, produtividade da biomassa volumétrica e areal, usando o SPSS (versão 25).

### 3. Resultados

#### 3.1 Cultura de *Skeletonema costatum*

O ensaio relativo à espécie *S. costatum* decorreu entre os dias 6 de dezembro e 20 de fevereiro. Os dados do cultivo, taxa de crescimento, assim como, as condições ambientais (temperatura máxima e mínima) registadas na região, foram apresentados na figura 2.

A figura 2 (A) representa os GWs que deram origem ao PBR tubular (15000 L) de *S. costatum*. Atingiram um máximo de 5,63 (GW 1) e 5,05 (GW 2). O GW 2 foi originário de um outro GW pelo que a DO inicial é superior.

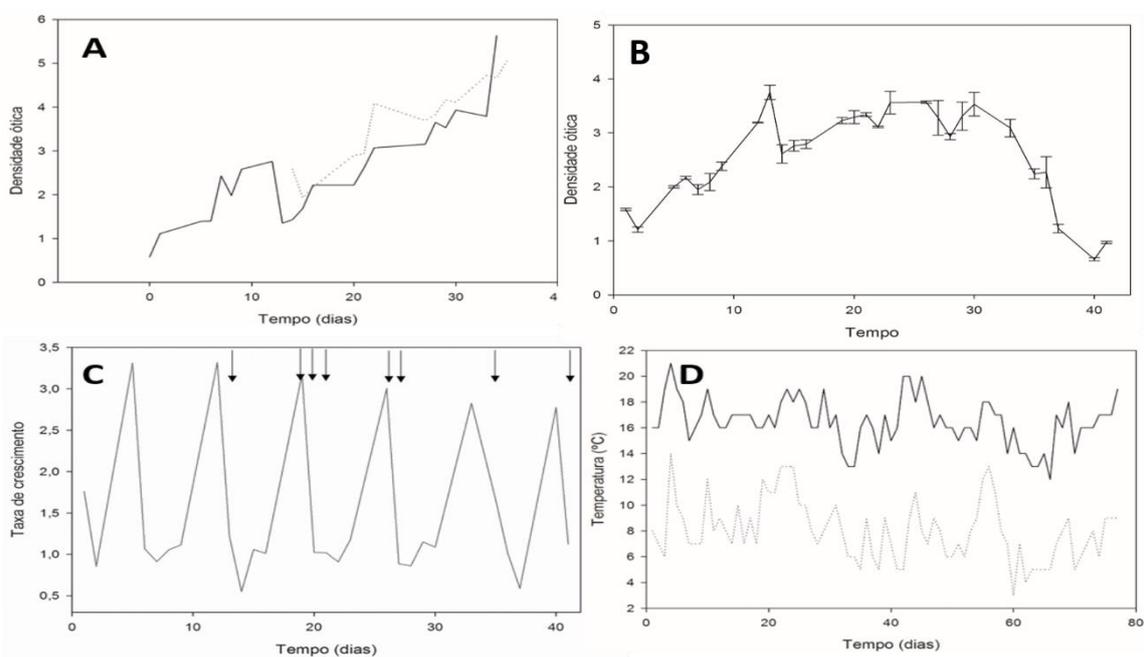


Figura 2. Cultivo de *S. costatum* em escala industrial. A- Crescimento em GW de 800 L. B- Crescimento em PBRs tubulares de 15000 L. C- Taxa de crescimento, com representação das renovações efetuadas em PBR. D- Temperatura (máxima e mínima) registada em Faro (Lat. 37,015335; Long. -7,972328), durante os dias de ensaio.

A figura 2 (B) mostra o padrão de crescimento da *S. costatum* em PBR tubular. A cultura obteve um pico no crescimento ao 13º dia com uma DO de 3,85. Verificou-se um crescimento da cultura de aproximadamente 30 dias, embora se tenha verificado nos restantes dias uma diminuição no crescimento. A produção desta microalga terminou ao 41º dia com uma DO de 0,97. A totalidade da biomassa foi retirada por centrifugação.

Na figura 2 (C) está representado a taxa de crescimento que a cultura atingiu ao longo da sua produção. A cultura foi inicialmente inoculada com um volume de 8000 L mas só ao 7º dia completou os 15000 L. Sendo uma cultura semi-continua as renovações ocorreram ao longo do cultivo desta microalga. Assim, as renovações registaram-se no 13º dia (3000 L), 19º, 20º, 21º, 26º e 27º dias (2000 L) e por fim no 36º dia (6000 L).

A temperatura máxima registada na região foi de 21°C contrastando com a temperatura mínima registada de 3°C (figura 2 D).

No GW o pH esteve compreendido entre 8,51 e 9,56, enquanto nos PBRs os valores ficaram compreendidos entre 8,16 e 8,70.

Para a cultura em reator foi calculado a respetiva produtividade volumétrica e areal (total e máxima). Os valores estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Produtividade da biomassa volumétrica e areal apresentada em PS da cultura de *S. costatum* cultivada em PBR tubular de 15000 L.

Produtividade volumétrica		Produtividade areal	
Total	Máxima	Total	Máxima
0,039 g/L/d	0,320 g/L/d	1,708 g/m <sup>2</sup> /d	14,108 g/m <sup>2</sup> /d

### 3.2 Cultura de *Nannochloropsis* sp.

A microalga *Nannochloropsis* sp. inicialmente cultivada em dois GWs e, posteriormente, transferida para o PBR (figura 3 [A]). Em 6 dias atingiu uma DO de 2,95 (GW 3) e 2,59 (GW4).

Na figura 3 (B) é possível observar o crescimento da cultura de *Nannochloropsis* sp., em PBR, ao longo de 49 dias. O último dia de produção corresponde à DO mais elevada (14,77). A totalidade da biomassa foi colhida através centrifugação.

A taxa de crescimento foi também calculada com base nos dados obtidos, estando representados na figura 3 (C). A cultura foi inicialmente inoculada com água a 33 PSU perfazendo um total de 15000 L. A primeira renovação ocorreu ao 16º dia (4000 L), outras renovações sucederam-se: 22º dia (4000 L), 24º dia (3000 L), 29º dia (6000 L), 34º dia (3400 L) e 42º dia (6000 L). Atingiu uma taxa de crescimento máximo de 3,59 ao dia 34.

As temperaturas atingidas durante o ensaio (16/01/2018 a 13/03/2018) estão representadas na figura 3 (D). A temperatura máxima registada durante o período de ensaio foi de 20°C, enquanto que a temperatura mínima foi de 3°C.

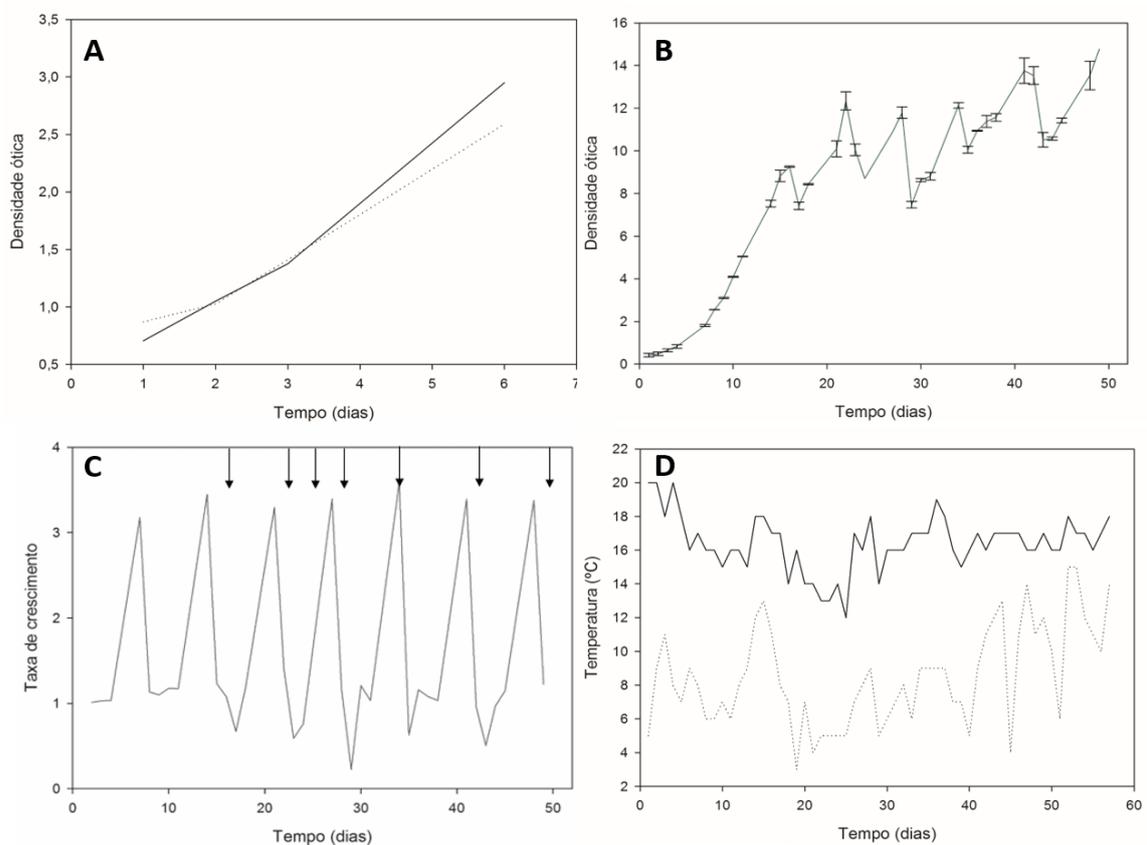


Figura 3. Cultivo de *Nannochloropsis* sp. em escala industrial. A- Crescimento em GW de 800 L. B- Crescimento em PBRs tubulares de 15000 L. C- Taxa de crescimento, com representação das

renovações efetuadas. D- Temperatura (máxima e mínima) registada em Faro (Lat. 37,015335; Long. -7,972328), durante os dias de ensaio.

O pH em GW esteve compreendido entre 8,41 e 8,80. No entanto, em PBR atingiu valores de 7,37 e 8,34.

Para a cultura em reator foi calculado a respetiva produtividade volumétrica e areal (total e máxima). Os valores estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Produtividade da biomassa volumétrica e areal apresentada em PS da cultura de *Nannochloropsis* sp. cultivada em PBR tubular de 15000 L.

<b>Produtividade volumétrica</b>		<b>Produtividade areal</b>	
Total	Máxima	Total	Máxima
0,111 g/L/d	0,595 g/L/d	4,899 g/m <sup>2</sup> /d	26,233 g/m <sup>2</sup> /d

## 4. Discussão

As células algais têm características promissoras que as diferem das outras fontes de biomassa. Assim sendo, são a base da cadeia alimentar marinha, por serem ricas em proteína e lípidos com um equilibrado perfil de aminoácidos (Beal et al., 2018). A intensiva exploração da aquacultura e dos restantes sectores onde as microalgas têm-se mostrado fundamentais, obriga a um desenvolvimento e otimização na produção industrial das mesmas.

A produção em PBRs tubulares fechados constituem uma vantagem relativamente aos *raceways* abertos, não apenas pela diminuição da probabilidade de contaminações externas, mas também, por ter um rendimento total mais elevado (Durmaz and Erbil, 2017).

O presente estudo demonstrou o sucesso do aumento de escala de *Nannochloropsis* sp. e *S. costatum*, partindo de uma caixa de Petri até atingir PBRs de 15000 L. Estas duas espécies estão, assim, aptas de ser produzidas de uma forma industrial e aplicadas a novos contextos.

A microalga *S. costatum* foi, pela primeira vez, produzida em escala industrial através de um PBR. A fase exponencial em GW ocorreu mais lentamente, demorando aproximadamente 30 dias até atingir concentrações celulares adequadas à transferência. Segundo Uddin e Zafar (2007) a temperatura ótima ao crescimento desta microalga é de 25-27°C, as temperaturas aquando do seu cultivo eram menores, o que justificando a lenta divisão celular.

Em PBR verificou-se um decaimento no crescimento da cultura a partir do dia 30, não tendo sido apuradas as causas desta diminuição da concentração celular. O pH nesta cultura foi superior ao relatado por outros estudos, os valores mantiveram-se sempre superiores a 8,1 (Michelis, 2002; Uddin and Zafar, 2007). A cultura parece reagir de forma positiva aos valores de pH utilizados. O facto desta microalga conseguir-se reproduzir em ambientes que seriam, à partida, desfavoráveis à mesma, permite diminuir a contaminação (poucos

contaminantes crescem em condições desfavoráveis) e predação, podendo ser cultivadas em diferentes condições ambientais (Griffiths and Harrison, 2009).

A cultura monoalgal de *Nannochloropsis* sp. tem sido estudada em diferentes sistemas de produção. O estudo em questão foi realizado nos meses de inverno, onde a taxa de crescimento e o desempenho fotossintético está afetado, devido ao facto da temperatura ótima para esta microalga ser de 24-26°C, como tem sido reportado em estudos anteriores (Sukenik et al., 2009; Tamburic et al., 2014). Ainda assim, verifica-se um crescimento rápido em GW, quando comparado com a outra microalga em estudo. Em PBR obteve um crescimento contínuo e saudável.

Ao comparar a produtividade areal máxima (26,233 g/m<sup>2</sup>/d) com as obtidas em outros estudos de produção de *Nannochloropsis* sp. (por exemplo, 3,45 g/m<sup>2</sup>/d e 23,90 g/m<sup>2</sup>/d), foi verificado uma produtividade superior neste estudo (Dogaris et al., 2015; Durmaz and Erbil, 2017).

A produtividade volumétrica (total e máxima) foi superior nesta microalga (*Nannochloropsis* sp.) em comparação com a diatomácea (*S. costatum*), também em estudo. O mesmo foi concluído no caso da produtividade areal (total e máxima).

As culturas de *S. costatum* e *Nannochloropsis* sp. obtiveram taxa de crescimento máximas semelhantes, 3,17 e 3,59, respetivamente. Sendo estas definidas pelas condições ambientais a que estão sujeitas (Durmaz and Erbil, 2017).

Assim, conclui-se, que este sistema de produção é eficaz para a produção da microalga da família Eustigmatophyceae e diatomácea Bacillariophyceae, estando adaptadas a condições ambientais no pico do inverno de Belamandil, Olhão.

## 5. Conclusão

Foi realizado com sucesso o aumento de escala de culturas monoalgais de *S. costatum* e *Nannochloropsis* sp. até atingirem a escala industrial em PBR tubulares. A produção por um período de 41 e 49 dias, respetivamente foi realizado num sistema de produção semi-contínuo. A microalga *Nannochloropsis* sp. não sofreu qualquer colapso ou contaminação por competição de outra microalga, em contraste com a *S. costatum*, que ao final de 30 dias a cultura sofreu uma diminuição no crescimento.

Apesar das condições climatéricas não serem as mais apropriadas ao cultivo destas microalgas, ambas as espécies apresentaram produtividades (areal e volumétricas) elevadas quando comparadas com as mesmas espécies em diferentes sistemas de cultivo. Ainda assim, a *Nannochloropsis* sp. apresenta valores superiores em comparação com a *S. costatum*, mostrando-se mais bem-adaptada ao sistema utilizado.

## 6. Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os membros da empresa Necton, S.A. por todo o apoio prestado e pela disponibilização de todo o material necessário para a realização deste trabalho.

## 7. Referências bibliográficas

- Andersen, R., 2005. ALGAL CULTURING TECHNIQUES, Elsevier Academic Press.
- Andersen, R.A., Brew, R.W., Potter, D., Sexton, J.P., 1998. Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 18s rDNA, with Emphasis on *Nannochloropsis* 149, 61–74. doi:10.1016/S1434-4610(98)70010-0
- APHA, 2000. 4500-NO<sub>3</sub>- Nitrogen (Nitrate). Stand. Methods Exam. Water Wastewater 120–129.
- Beal, C.M., Gerber, L.N., Thongrod, S., Phromkunthong, W., Kiron, V., Granados, J., Archibald, I., Greene, C.H., Huntley, M.E., 2018. Marine microalgae commercial production improves sustainability of global fisheries and aquaculture. Sci. Rep. 8, 1-8. doi:10.1038/s41598-018-33504-w
- Briassoulis, D., Panagakis, P., Chionidis, M., Tzenos, D., Lalos, A., Tsinos, C., Berberidis, K., Jacobsen, A., 2010. Bioresource Technology An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. Bioresour. Technol. 101, 6768–6777. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.103
- Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M.C., González-López, C. V., Fernández- Sevilla, J.M., Contreras-Gómez, A., Molina-Grima, E., 2013. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. Bioresour. Technol 144, 57-66 doi:10.1016/j.biortech.2013.06.083
- Chern, S., Yusoff, F., Ismail, M., Basri, M., Kun, S., Khong, N.M.H., Wei, K., Ebrahimi, M., 2017. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. J. Biotechnol. 241, 175–183. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.11.026
- Cuellar-bermudez, S.P., Aguilar-herandez, I., Cardenas-chavez, D.L., Ornelas-soto, N., Romero-ogawa, M.A., Leon, N., 2015. Minireview Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae : essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins 8, 190–209. doi:10.1111/1751-7915.12167

- Dogaris, I., Welch, M., Meiser, A., Walmsley, L., Philippidis, G., 2015. A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae. *Bioresour. Technol.* 198, 316–324. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.030
- Durmaz, Y., Erbil, G.Ç., 2017. Performance of industrial-scale tubular photobioreactor in marine hatchery. *J. Appl. Phycol.* 29, 2755–2760. doi:10.1007/s10811-017-1202-7
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21, 493–507. doi:10.1007/s10811-008-9392-7
- Houcke, J. Van, Medina, I., Maehre, H.K., Cornet, J., Cardinal, M., Linssen, J., Luten, J., 2017. The effect of algae diets (*Skeletonema costatum* and *Rhodomonas baltica*) on the biochemical composition and sensory characteristics of Pacific cupped oysters (*Crassostrea gigas*) during land-based refinement. *Food Res. Int.* 100, 151–160. doi:10.1016/j.foodres.2017.06.041
- Huo, W.Y., Un, J.I.A.N., 2005. Outbreak of *Skeletonema costatum* Bloom and Its Relations to Environmental Factors in Jiaozhou Bay , China, in: environment, ecosystem and development. WSEAS, Venice, pp. 205–210. doi: 10.2741/4656
- Lutzu, G.A., Dunford, N.T., 2018. Interactions of microalgae and other microorganisms for enhanced production of high-value compounds. *Bioscience* 23, 1487–1504.
- Michelis, D., 2002. A photobioreactor with pH control: demonstration by growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *J. Plankt. Reserarch* 24, 557–563. doi:10.1093/plankt/24.6.557
- Milledge, J., 2014. Microalgae – commercial potential for fuel , food and feed. *Food Sci. Technol.* 26, 26–28.
- Moloudizargari, M., Mortaz, E., Asghari, M.H., Adcock, I.M., Redegeld, F.A., Garssen, J., 2018. Effects of the polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA, on hematological malignancies: a systematic review. *Oncotarget* 9, 11858–11875. doi:10.18632/oncotarget.24405

- Pereira, H., Páramo, J., Silva, J., Marques, A., Barros, A., Maurício, D., Santos, T., Schulze, P., Barros, R., Gouveia, L., Barreira, L., Varela, J., 2018. Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta) for CO<sub>2</sub> mitigation : from an agar plate to 100 m<sup>3</sup> industrial photobioreactors. Scientific Reports 8, 1–11. doi:10.1038/s41598-018-23340-3
- Prokop, A., Bajpai, R., Zappi, M., 2015. Algal Biorefineries: Products and Refinery Design. Springer, Switzerland. doi:10.1007/978-3-319-20200-6
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors : production systems for phototrophic microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 287–293. doi:10.1007/s002530100702
- Rocha, J.M.S., Garcia, J.E.C., Henriques, M.H.F., 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. Biomol. Eng. 20, 237–242. doi:10.1016/S1389-0344(03)00061-3
- Romero-villegas, G.I., Fiamengo, M., Ación-fernández, F.G., Molina-grima, E., 2018. Utilization of centrate for the outdoor production of marine microalgae at the pilot-scale in raceway photobioreactors. J. Environ. Manage. 228, 506–516. doi:10.1016/j.jenvman.2018.08.020
- Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Bae, A.Y., Donaldson, E., Sitek, J., Fitzgerald, D.S., Edelson, O.F., 2018. Towards sustainable aquafeeds : Evaluating substitution of fishmeal with lipid-extracted microalgal co-product (*Nannochloropsis oculata*) in diets of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). PLoS One 13, 1–25. doi:10.1371/journal.pone.0201315
- Silva, A.M., Torzillo, G., Rica, U.D.C., Pedro, S., Jose, S., 2013. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds 4, 2–9. doi:10.1016/j.biombioe.2013.03.016
- Sukenik, A., Beardall, J., Kromkamp, J.C., Kopecký, J., Masojídek, J., Van Bergeijk, S., Gabai, S., Shaham, E., Yamshon, A., 2009. Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions.

Aquat. Microb. Ecol. 56, 297–308. doi:10.3354/ame01309

Tamburic, B., Guruprasad, S., Radford, D.T., Szabó, M., Lilley, R.M.C., Larkum, A.W.D., Franklin, J.B., Kramer, D.M., Blackburn, S.I., Raven, J.A., Schliep, M., Ralph, P.J., 2014. The effect of diel temperature and light cycles on the growth of *Nannochloropsis oculata* in a photobioreactor matrix. PLoS One 9, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0086047

Toda, T., Ross, O.H., 2018. The Effects of Microalgae as Live Food for *Brachionus plicatilis* (Rotifer) in Intensive Culture System 29, 127–138. doi:10.21315/tlsr2018.29.1.9

Toledo-cervantes, A., Morales, T., González, Á., Muñoz, R., Lebrero, R., 2018. Long-term photosynthetic CO<sub>2</sub> removal from biogas and flue-gas: Exploring the potential of closed photobioreactors for high-value biomass production. Sci. Total Environ. 640, 1272–1278. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.05.270

Uddin, S.A., Zafar, M., 2007. Mass culture of marine diatom *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve collected from the bay of bengal. Pakistan J. Mar. Sci. 16, 33–38.

Wei, L., 2018. Optimized methods of chromatin immunoprecipitation for profiling histone modifications in industrial microalgae *Nannochloropsis* spp. J. Phycol. Soc. Am. 54, 358–367. doi:10.1111/jpy.12623

Yamada, M., Otsubo, M., Kodama, M., Yamamoto, K., Nishikawa, T., Ichimi, K., Tada, K., Harrison, P., 2014. Species composition of *Skeletonema* (Bacillariophyceae) in planktonic and resting-stage cells in Osaka and Tokyo Bays. Plankt. Benthos Res. 9, 168–175. doi:10.2331/suisan.16-00040



## **Capítulo III**

### **Atividade antibacteriana de extratos de microalgas marinhas cultivadas em sistemas industriais**



## Atividade antibacteriana de extratos de microalgas marinhas cultivadas em sistemas industriais

### Resumo

As aquaculturas, de todo o mundo, sofrem perdas económicas devido a agentes patogénicos, principalmente da família Vibrionaceae. As microalgas têm um papel fundamental nesta indústria, por serem a base da cadeia alimentar.

De modo a testar o potencial antibacteriano, seis microalgas produzidas em fotobiorreatores industriais (*Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Nannochloropsis* sp., *Porphyridium cruentum*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*) foram testadas quanto à sua capacidade de inibir o crescimento de três estirpes bacterianas patogénicas de peixes e bivalves (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*). A atividade antibacteriana de extratos, destas microalgas, foi determinada pelo método de difusão em poço.

Todos os extratos (acetato de etilo, acetona, etanol e hexano) testados, a diferentes concentrações, foram comparados com o Dimetilsulfóxido (DMSO) e testados o grau de significância para  $p < 0,05$ . Os dados revelaram que a *P. damsela* subsp. *piscicida* foi a bactéria mais sensível. Por sua vez, a microalga mais eficiente foi a *S. costatum* destacando-se o extrato de acetato de etilo e acetona. A caracterização bioquímica dos extratos revelou que o composto bioativo com potencial antibacteriano é a fucoxantina.

**Palavras-chave:** Aquacultura, microalgas marinhas, extratos de microalgas, Vibrionaceae, *Skeletonema*, atividade antibacteriana.

# 1. Introdução

O crescimento da população mundial colocou a segurança alimentar como uma das prioridades mais prementes. A aquacultura possibilita a produção de elevadas quantidades de proteína num reduzido período de tempo. Assim, permite que exista um maior desenvolvimento económico e uma maior estabilidade social em todo o mundo (FAO, 2018; Ina-Salwany et al., 2018; Novais et al., 2018)

Os microrganismos têm um papel preponderante na aquacultura. O equilíbrio entre os microrganismos comensais e parasitas é fundamental para a saúde dos organismos (Gómez and Balcázar, 2008; Minniti et al., 2017). Quando os animais produzidos em aquacultura são submetidos a stress ou a antibióticos esse equilíbrio é destruído e estes organismos podem ser alvo de infeções (Boutin et al., 2013; Carlson et al., 2015; Minniti et al., 2017), encontrando-se as bactérias da família Vibrionaceae como umas das que afetam gravemente as aquaculturas de peixes e bivalves (Cao et al., 2018; Dubert et al., 2017; Leite et al., 2017). Esta família agrupa 12 géneros, entre os quais: *Aliivibrio* (2007); *Enterovibrio* (2002); *Listonella* (1986); *Grimontia* (2003); *Photobacterium* (1889); *Salinivibrio* (1996); *Vibrio* (1854) (Ina-Salwany et al., 2018; Rosenberg et al., 2013). As espécies de *Vibrio* são encontrados em ambientes aquáticos, estuarinos e marinhos, incluído em sedimentos, sendo estes um dos grandes responsáveis por infeções em aquaculturas (Rosenberg et al., 2013). Estas infeções estão associadas a espécies de Vibrionaceae tais como, *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum* e ainda, *P. damsela* subsp. *damsela* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (conhecida como *Pasteurella piscicida*) (Ina-Salwany et al., 2018).

As vibrioses foram referidas como sendo uma das principais causas de morte em aquacultura (Ina-Salwany et al., 2018; Leite et al., 2017). Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO) os problemas com estas espécies tende a aumentar devido às alterações climáticas. Com temperaturas mais elevadas (>15°C) e uma salinidade menor (<25 PSU), estas bactérias têm as condições ótimas para o seu crescimento (FAO, 2016). As vibrioses não são a única infeção que preocupa os aquacultores, as septicémias causadas

pela *P. damselae* subsp. *piscicida* provoca mortalidade massiva numa ampla gama de hospedeiros (Essam et al., 2016) tal como, em casos de resistência a alguns antibióticos (Essam et al., 2016; Ina-Salwany et al., 2018).

Por consequência, a consciencialização para os fatores adversos dos antibióticos têm tido um especial destaque nos últimos anos. Desta forma, outras alternativas têm sido desenvolvidas para a minimização dos efeitos de agentes patogénicos em aquacultura. Vários mecanismos são utilizados para este efeito, os bacteriófagos, através da terapia fágica, têm sido estudados como potenciais soluções para a eliminação de bactérias patogénicas, como é o caso das Vibrionaceae (Kalatzis et al., 2018). Os probióticos têm mostrado grandes benefícios quando aplicados a aquaculturas, seja através da competição pelo espaço, competição por químicos ou energia, imunomodulação ou ainda através da produção de compostos antimicrobianos (Zorriehzahra et al., 2016). Os compostos antimicrobianos não são apenas encontrados em bactérias, as microalgas também têm sido estudadas para este fim. Relativamente às microalgas, estas são utilizadas em aquacultura através da técnica da água verde, sendo fundamentais como ração, por serem o alimento da base da cadeia alimentar de várias espécies, principalmente nas fases mais jovens ou larvares (Falaise et al., 2016; Fan et al., 2014; Giordano et al., 2018).

As microalgas têm a capacidade de sintetizar compostos orgânicos, que são acumulados ou excretados como metabolitos primários e secundários. Nos últimos anos foram amplamente estudadas pela capacidade de produzir composto bioativos (Jyotirmayee et al., 2014). Estudos mostram que as microalgas tem funções anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatórias, anticoagulante e antimicrobianas (Falaise et al., 2016; Fan et al., 2014; Giordano et al., 2018). Destas têm um especial interesse, por já serem aplicadas à aquacultura, as espécies que aqui mais se destacaram foram a *Skeletonema* sp., *Tetraselmis* sp., *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. (El-sayed et al., 2014; Kokou et al., 2012a; Molina-Cárdenas et al., 2014).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal, verificar a atividade de seis espécies de microalgas produzidas pela empresa Necton, S.A., sobre três estirpes de Vibrionaceae prejudiciais para a aquacultura. Foi, ainda, objetivo verificar que frações da

biomassa de microalgas produzidas fornecem a atividade antimicrobiana e qual o composto bioativo com esta função.

## 2. Material e métodos

O presente trabalho decorreu nas instalações da empresa Necton, S.A. e nos laboratórios do grupo MarBiotech, pertencente ao Centro de Ciências do Mar CCMAR, da Universidade do Algarve.

### 2.1 Material Biológico

Para a realização deste estudo foram utilizadas seis microalgas incluídas nos grupos Heterokontophyta, das quais duas diatomáceas (Bacillariophyceae) *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1898, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve 1873 e uma Eustigmatophyceae, *Nannochloropsis* sp.; Rhodophyta, *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nägeli 1849; Haptophyta, *Isochrysis galbana* Parke 1949 e Chlorophyta, *Tetraselmis chuii* Butcher, 1959 provenientes da coleção da Necton, S.A..

As estirpes de bactérias (*V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e *P. damsela* subsp. *piscicida*) foram isoladas a partir de amostras de peixes infetados obtidas no Instituto Português do Mar e da Atmosfera de Olhão (IPMA-Olhão).

### 2.2 Isolamento e identificação de estirpes bacterianas

#### 2.2.1 Isolamento

O isolamento e identificação das estirpes de *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*. e *P. damsela* subsp. *piscicida* realizou-se através métodos convencionais em meio Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS; ISO - VWR). Técnicas moleculares foram, posteriormente, utilizadas para identificar/confirmar a identidade dos isolados.

Para esse efeito, foi utilizado o meio seletivo agarizado, TCBS agar (ISO – VWR), por meio da técnica de sementeira à superfície com incubação a  $23,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24-48\text{h} \pm 3\text{h}$ .

## 2.2.2 Extração, análise, amplificação de DNA e identificação das estirpes bacterianas

O DNA bacteriano total foi extraído por recurso ao Kit Quick-gDNA Miniprep (Zymo Research®). Neste protocolo foi usado um *Buffer* que lisa as células, uma coluna de recolha do DNA, *Buffers* para lavagem e por fim um *Buffer* de eluição do DNA. A amostra foi armazenada a -20°C.

Sequências de DNA foram amplificadas por recurso à reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase chain reaction*).

Para *Vibrio* sp. foram utilizados os *primers*: *forward* F46 (5'-GTC ARA TTG AAA ARC ART TYG GTA AAG G-3') e *reverse* R734 (5'-ACY TTR ATR CGN GTT TCR TTR CC-3'), os quais permitem selecionar um produto de PCR com 689 bp de tamanho, que codifica o gene específico para a proteína Recombinase A (Kim et al., 2015).

Para a amplificação de sequências de DNA de *V. alginolyticus* fez-se recurso aos *primers* para *V. alginolyticus* também descritos por Kim e coautores (2015). Estes, tiveram como alvo uma sequência de 199 bp, sendo os *primers* escolhidos: *forward* VA-1198230-F (5'-ACG GCA TTG GAA ATT GCG ACT G-3') e *reverse* (5'-TAC CCG TCT CAC GAG CCC AAG-3') (Kim et al., 2015).

A mistura de reação, para um volume final de 25 µL, foi constituída por: 2 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs; 0,8 mM), 0,5 unidades de Taq Polimerase do DNA, 5 µL de GoTaq Buffer, 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), *primers* para *Vibrio* sp. 2,5 µL (1 µM) (*primers forward* e *reverse*) e para *V. alginolyticus* 0,25 µL (0,1 µM) e 2 µL DNA *template* (25 ng; NP80; IMPLEN®) e ajustado ao volume final com água MilliQ (Millipore MilliQ Synthesis A-10).

A amplificação de DNA deu-se num termociclador (2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems) com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 30s. A reação foi finalizada por um alongamento durante 10 min a 72°C e mantida a 4°C (Kim et al., 2015).

Para a amplificação do *V. anguillarum* foram usados *primers*: forward (5' -TTC CGT GCT ACT GGC GAG GTT-3') e reverse (5'- CGG CTG ATA CTG GTA GTG CTG-3'). Tiveram como alvo a sequência do gene empA de 207 bp. Para detecção do *V. anguillarum*, cada PCR foi constituído por 18 µL de *Master Mix* e 2 µL (20 ng [Nanofotómetro - NP80; IMPLEN®]) do DNA *template* de interesse a amplificar. A *Master Mix* foi constituída por: 0,20 mM de dNTPs, 1,25 unidades de Taq Polimerase, 5 µL de GoTaq Buffer (10x), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> e, ainda, os *primers forward* e *reverse* 2 µL (1 µM). A amplificação foi obtida por meio de um termociclador (2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems): 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C num período de 30 s e 1 min a 72 °C; por fim, é mantido a 72 °C durante 7 min. As amostras foram armazenadas a 4 °C (Chen et al., 2011).

Finalmente, o último conjunto de *primers* utilizados são específicos para *P. damselae* subsp. *piscicida* (fragmento de 410 bp responsável pelo gene polissacarídeo capsular). Os *primers* usados amplificam o gene polissacarídeo capsular: CPS-F (5'-AGG GGA TCC GAT TAT TAC TG-3') CPS-R (5'-TCC CAT TGA GAA GAT TTG AT-3'). A reação de PCR foi efetuada com 10 µL de DNA *template*, 5 µL de *Buffer* PCR (10x), 2 µL (25mM) de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL (0,2 mM) de cada dNTP, 1 µL (1 µM) de cada *primer*, 1,25 unidades de Taq DNA Polimerase e água destilada MilliQ até perfazer o volume da reação de 50 µL (Rajan et al., 2003). No termociclador (2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems) a desnaturação inicial ocorre a 94 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 s, o emparelhamento a 55 °C durante 30 s e o alongamento a 72 °C por 1 min. A reação foi terminada a 72 °C durante 7 min e armazenada a 4 °C (Rajan et al., 2003).

Os produtos de PCR obtidos foram carregados num gel de agarose, preparado com agarose (1%) e TAE (1x de Tris-acetato EDTA). O primeiro poço (marcador) foi carregado com 2 µL de água MilliQ e 1 µL de 100-1000 bp ladder (Thermo Fisher Scientific®). Nos seguintes poços foram carregadas as amostras: 5 µL de produto de PCR, 2 µL de Green GoTaq Buffer e 1 µL de Gel Red (1:1000). O gel correu durante 35 min, a 120 V. No final o resultado foi observado num transiluminador à luz ultra-violeta (UV) (BIO-RAD®).

## 2.3 Teste de atividade antimicrobiana – Método de difusão em poço

As estirpes foram cultivadas em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) e a sua sensibilidade aos diferentes extratos testada após um período incubação de 24h-48h.

A densidade bacteriana foi avaliada por leitura de densidade ótica (DO) a 540 nm (espectrofotômetro UVmini-240).

A carga microbiana utilizada nestes ensaios correspondeu a uma DO de  $0,600 \pm 0,100$ , tendo sido ajustada, sempre que necessário, ao valor através de diluição em TSB.

Fez-se recurso ao método por difusão em poço em meio Müller Hinton Agar (MH; VWR) (20 mL por placa de Petri) após inoculação, à superfície, de 100 µL de inóculo, para testar a sensibilidade de *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* aos diferentes extratos de microalgas (Balouiri et al., 2016; Salgado and Roncari, 2005).

As placas com o inóculo das espécies de bactérias foram perfuradas com um tubo de metal, diâmetro de 5,28 mm, e, a cada utilização, o mesmo foi esterilizado à chama.

Para cada amostra, foram realizadas três diluições, em DMSO: 0,1 mg/mL, 1,0 mg/mL e 10,0 mg/L. O DMSO (100 µL) foi utilizado como controlo negativo e a Canamicina (5 mg/mL) como controlo positivo (Hossain et al., 2012). Todos os testes foram efetuados com 3 réplicas cada, com aplicação, por poço, de 100 µL de extrato ou substância a testar.

As placas foram colocadas na estufa a  $23,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os resultados foram observados ao fim de 48h e registados.

## 2.4 Cultura de microalgas, extratos e ensaios de sensibilidade

### 2.4.1 Cultura de microalgas

Todas as espécies de microalgas utilizadas neste estudo (*I. galbana*, *Nannochloropsis* sp., *P. cruentum*, *P. tricornutum*, *S. costatum* e *T. chuii*) foram produzidas em fotobiorreatores (PBRs) industriais tubulares na Necton, S.A.. Para atingirem os PBRs tubulares de escala

industrial (15000 L) foi realizado aumento de escala a partir de placa de agar. O crescimento foi realizado em semi-contínuo, todo o processo é apresentado no capítulo II.

## 2.5 Preparação de extratos

Foram preparados extratos orgânicos de hexano, acetato de etilo, etanol e acetona a partir de biomassa liofilizada das estirpes *I. galbana*, *Nannochloropsis* sp., *P. cruentum*, *P. tricornutum*, *S. costatum* e *T. chuii*. Neste contexto, foi adicionado uma grama de biomassa e 40 mL do solvente correspondente (1:40, m/v) a erlenmeyer's cobertos com papel de alumínio. A extração foi realizada *overnight* à temperatura ambiente num agitador magnético.

Após a extração, os extratos foram filtrados numa primeira fase com papel de filtro (20-25 $\mu$ m; Figura 1) e posteriormente, com o auxílio de uma seringa através de um filtro PTFE (politetrafluoroetileno) com uma porosidade de 0,2 $\mu$ m.



Figura 1. Filtração dos extratos através de filtros de papel de 20-25 $\mu$ m.

Os extratos foram de seguida transferidos para um balão de fundo redondo e evaporados até à secura num evaporador rotativo (IKA RV 10 digital) a 40°C.

A massa de cada extrato foi dissolvida em DMSO (VWR) a uma concentração 50 mg/mL. Posteriormente foi testado a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a diferentes concentrações.

A extrato de *S. costatum* foi ainda fracionado, purificado e identificado de acordo com a sequência apresentada na figura 2 como explicada nos subtópicos 2.5.1 a 2.5.3.

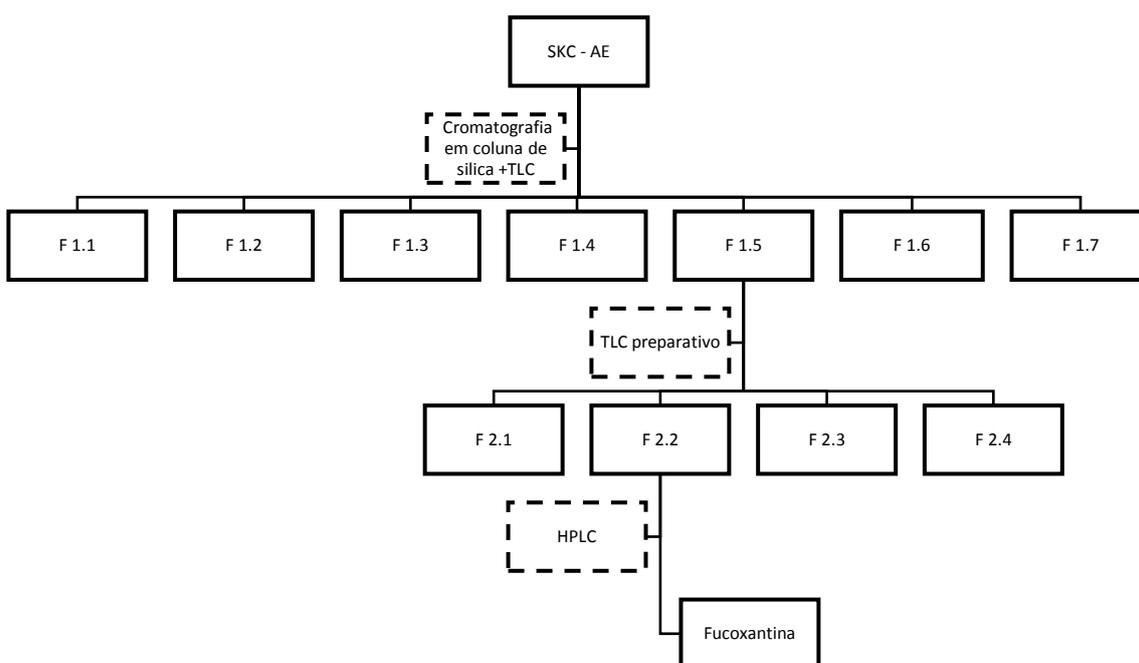


Figura 2. Resumo da purificação do extrato de *S. costatum* (SKC) em acetato de etilo (AE). F 1.1 – Hexano; F 1.2 – 20% de acetato de etilo em hexano; F 1.3 – 40% de acetato de etilo em hexano; F 1.4 – 60% de acetato de etilo em hexano; F 1.5 – 80% de acetato de etilo em hexano; F 1.6 – acetato de etilo; F 1.7 – 20% metanol em acetato de etilo; F 2.1- primeira fração do TLC preparativo; F 2.2 segunda fração do TLC preparativo; F 2.3 terceira fração do TLC preparativo; F 2.4 quarta fração do TLC preparativo.

### 2.5.1 Fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna de sílica

Para preparação de frações com potencial antimicrobiano foi realizado uma cromatografia em coluna de sílica gel.

A coluna foi preenchida de baixo para cima com: algodão hidrófilo, areia, sílica gel ativada (70°C *overnight*), com uma malha entre 70 a 130 µm, adicionado hexano (100 g sílica gel:500 mL hexano), extrato liofilizado e algodão hidrófilo (figura 3).



Figura 3. Representação esquemática da coluna de sílica

Cada extrato foi ressuspensão em 50 mL de clorofórmio e adicionado 7 g de sílica gel ativada. O solvente foi evaporado num evaporador rotativo (IKA RV 10 digital), em vácuo. Toda a biomassa, em pó, foi inserida na coluna de cromatografia para seu fracionamento (Figura 4). Posteriormente, procedeu-se ao fracionamento do extrato que começou com 300 mL de hexano (100%), que foi recolhido e, posteriormente, evaporado (condições descritas no parágrafo anterior).

O extrato foi subsequentemente eluído com 300 mL de: hexano/acetato de etilo (80:20, v/v); hexano/acetato de etilo (60:40, v/v); hexano/acetato de etilo (40:60, v/v); hexano/acetato de etilo (20:80, v/v); acetato de etilo; acetato de etilo/metanol (80:20, v/v). Todas as frações foram separadas evaporadas nas mesmas condições que as descritas anteriormente.



Figura 4. Coluna de sílica com frações diferenciadas.

### 2.5.2 Cromatografia em camada fina em placa

O fracionamento dos extratos, provenientes da cromatografia em coluna de sílica, foi seguido por cromatografia de camada fina em placa (TLC -*Thin-layer chromatography*)

As frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica foram novamente suspensas em diferentes solventes ou misturas de diferentes solventes. Em diclorometano foram dissolvidos os extratos correspondentes às frações obtidas por eluição com hexano, 20 % e 40% de acetato de etilo em hexano em clorofórmio o extrato de 60% de acetato de etilo em hexano e, numa mistura de clorofórmio/metanol (2:1 v/v) os extratos de 80% de

acetato de etilo em hexano e o extrato de acetato de etilo e 20% de metanol em acetato de etilo.

Os extratos aplicados em placas de sílica (Silica Gel 60G; Merck, Alemanha) que foram, de seguida, colocadas numa tina de vidro saturada com 10 mL de uma mistura de hexano, acetato de etilo e ácido acético em diferentes proporções (80:20:1; 85:15:1; 60:40:1; 40:60:1, v/v/v) (Figura 5). As placas foram reveladas por imersão em iodo.



Figura 5. Representação do reservatório do solvente e da placa de TLC durante o desenvolvimento do ensaio.

### 2.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os extratos mais bioativos, da amostra de 80% de acetato de etilo e 100% acetato de etilo, foram analisados por HPLC. O sistema utilizado foi Dionex 580 HPLC system (DIONEX Corporation, Estados Unidos) equipado com um detetor PDA 100 Photodiode-array, uma bomba P680, ASI 100 Automated Injector e uma coluna STH 585, usando a coluna LiChroCART® RP-18 (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4mm, LiChrospher®) e o software Chromeleon®.

A fase móvel é constituída por acetonitrilo:água 9:1 (v/v) como solvente A e acetato de etilo como solvente B. O programa aplicado foi: 0-16 min, 0-60% B; 16-30 min, 60% B; 30-32 min 100% B; 32-35 min 100% A. Este processo decorreu a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi 100  $\mu$ L e a temperatura foi mantida a 20°C. Os compostos

foram detetados a 450 nm e, no caso de ser um carotenóide, foi quantificado usando curvas de calibração para fucoxantina, violaxantina, luteína e  $\beta$ -carotenos (Couso et al., 2012).

#### 2.5.4 Cromatografia em camada fina preparativo

As frações de 80% de acetato de etilo e 100% acetato de etilo, foram homogeneizadas em conjunto, de seguida, os solventes foram evaporados através da injeção de azoto gasoso. O extrato foi dissolvido em 2 mL de acetona e este foi aplicado na base de uma placa de vidro para TLC (20 cm x 20 cm). Foi aplicado, como padrão, 150  $\mu$ L fucoxantina. A placa após secar foi colocada numa câmara de vidro previamente saturada com 100 mL de hexano e acetato de etilo (40:60, v/v).

As bandas obtidas, correspondentes a cada composto, foram destacadas da placa de vidro separadamente em tubos de ensaio e ressuspensas em 10 mL de acetato de etilo (Enzymatic). Os extratos juntamente com a sílica foram filtrados num filtro de 20-25  $\mu$ m de forma reter toda a sílica. Foi realizado, ainda, mais duas lavagens do extrato em sílica, cada uma com 10 mL de acetato de etilo. Foi retirado o solvente por meio de azoto gasoso.

As amostras foram ressuspensas em DMSO (10 mg/mL) para posterior análise da atividade antimicrobiana.

#### 2.6 Analise de dados

A atividade antibacteriana foi avaliada para os extratos de seis diferentes espécies de microalgas marinhas. Foram realizados extratos com acetato de etilo, acetona, etanol e hexano. Cada extrato foi testado nas concentrações de 0,1 mg/mL, 1 mg/mL e 10 mg/mL-e testada a suscetibilidade em *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* e *P. damselae* subsp. *piscicida*. Os valores relatados excluem o diâmetro do poço ( $\emptyset$  5,28 mm) onde foi inserido o extrato.

Todos os dados são representados como média das três réplicas e o respetivo desvio padrão.

Na análise de resultados, diâmetro do halo de inibição, foi aplicado o teste T para determinar se existe diferenças significativas entre as diferentes concentrações de solventes e o controlo negativo (DMSO), tendo sido considerada a inibição de crescimento bacteriano significativa para valores de  $p < 0,05$ . Os testes estatísticos aplicados foram realizados com o software estatístico SPSS (versão 25).

### 3. Resultados

#### 3.1 Identificação das estirpes bacterianas

A figura 6 mostra os *amplicons* correspondentes às estirpes em estudo (amplificação por PCR dos genes para *Vibrio* sp., *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e *P. damsela* subsp. *piscicida*). As amostras 1 a 6 correspondem às estirpes bacterianas esperadas, a amostra 6 não amplificou para os *primers* correspondentes a *P. damsela* subsp. *piscicida*, assim sendo, esta alíquota não foi utilizada para os ensaios subsequentes.

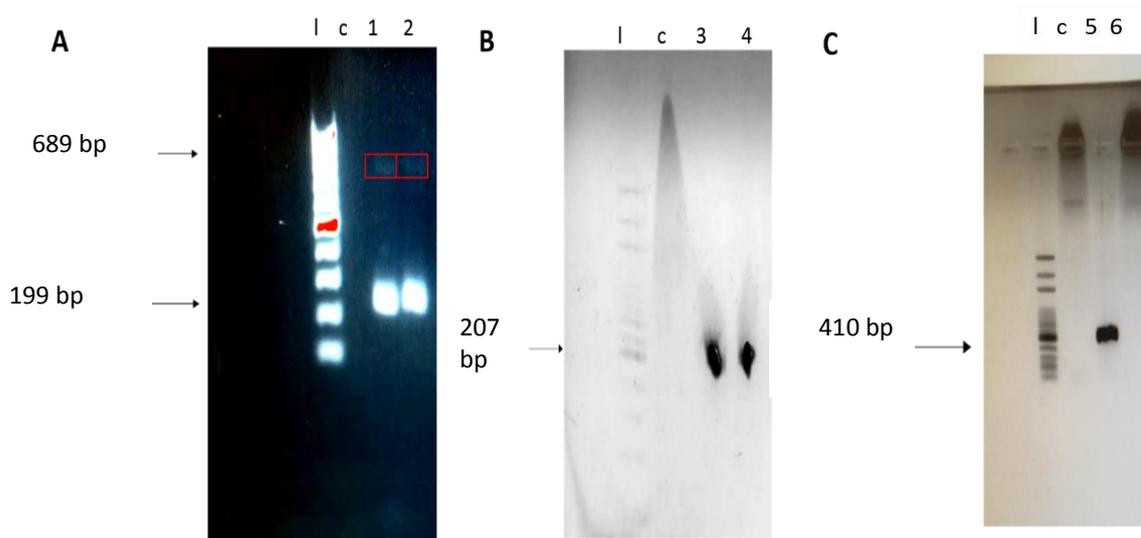


Figura 6. Eletroforese gel de agarose da amplificação dos produtos de PCR. A- Multiplex PCR *Vibrio* sp. (689 bp) e *V. alginolyticus* (199 bp); B- PCR *V. anguillarum* (207 bp); C- PCR *P. damsela* subsp. *piscicida*; l- ladder; c- controlo negativo; 1- amostra de *V. alginolyticus*; 2- amostra de *V. alginolyticus*; 3- amostra de *V. anguillarum*; 4- amostra de *V. anguillarum*; 5- amostra de *P. damsela* subsp. *piscicida*; 6- amostra de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

## 3.2 Atividade antibacteriana de extratos de microalgas

Estes resultados correspondem à atividade antibacteriana, testes de suscetibilidade sobre o *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* e *P. damselae* subsp. *piscicida*, dos extratos das seis espécies de microalgas marinhas.

### 3.2.1 Extratos de *Skeletonema costatum*

A uma concentração de extrato de 10 mg/mL, contra a bactéria *V. alginolyticus* (figura 7 A) verificaram-se halos de inibição maiores do que nas restantes concentrações, apresentando halos de inibição compreendidos entre  $3,54 \pm 0,16$  mm e  $4,49 \pm 1,20$  mm. Somente, o extrato de acetato de etilo na maior concentração registou diferenças significativas relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ).

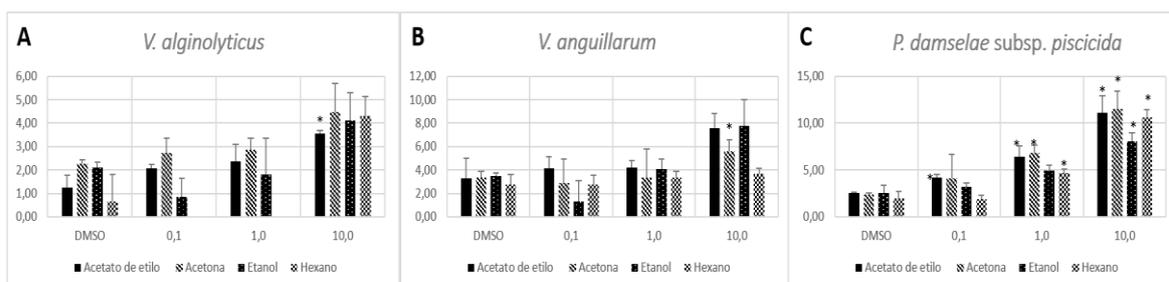


Figura 7. Atividade antibacteriana dos extratos de *S. costatum* (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damselae* subsp. *piscicida*.

Nos extratos de *S. costatum* o *V. anguillarum* (figura 7 B) obteve valores de suscetibilidade superiores no extrato de etanol e acetato de etilo (10 mg/mL) registando halos de inibição de  $7,74 \pm 2,30$  mm e  $7,59 \pm 1,23$  mm, respetivamente. O extrato de acetona (10 mg/mL)

apresenta valores de atividade inibitória com significado estatístico quando comparado com o DMSO ( $p < 0,05$ ).

A bactéria *P. damsela* subsp. *piscicida* é responsável pelos valores mais elevados de suscetibilidade (figura 7 C). O extrato com a acetona teve um halo de  $11,55 \pm 1,89$ mm, seguido do extrato de acetato de etilo com  $11,14 \pm 1,80$  mm, ambos na concentração de 10 mg/mL. A figura mostra ainda a diminuição do diâmetro do halo à medida que a concentração de extrato também diminui. Verificou-se ainda, que as amostras de acetato de etilo (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL), acetona (1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL), etanol (10,0 mg/mL) e Hexano (1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) são significativamente diferentes do DMSO ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Extratos de *Nannochloropsis* sp.

Os resultados da microalga *Nannochloropsis* sp. podem ser observados nas figuras 8. O *V. alginolyticus* apresenta maior sensibilidade ao extrato de acetona (10,0 mg/mL). O diâmetro de inibição deste extrato foi de  $2,83 \pm 0,52$  mm, sendo a única amostra que apresenta diferenças significativas em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ).

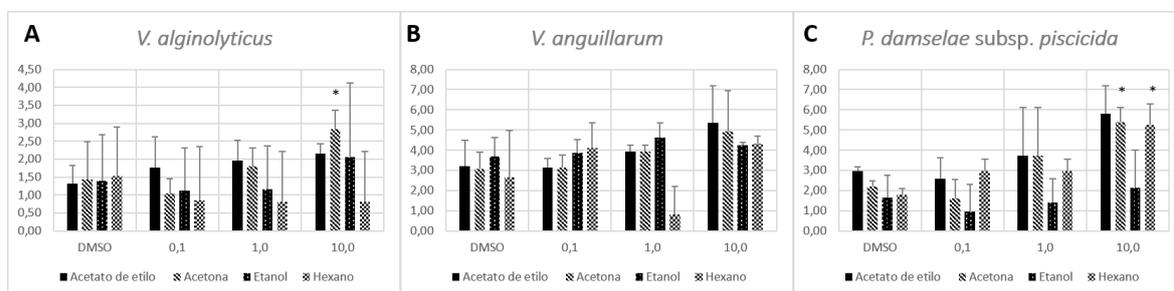


Figura 8. Atividade antibacteriana dos extratos de *Nannochloropsis* sp. (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damsela* subsp. *piscicida*.

No caso do *V. anguillarum* não é possível verificar diferenças significativas entre os halos de inibição das diferentes concentrações e o controlo negativo. Contudo, é possível observar, na figura 8 B, que as concentrações superiores os halos de inibição dos extratos de acetato de etilo e acetona são responsáveis pelos valores mais elevados de suscetibilidade contra esta estirpe bacteriana,  $5,37 \text{ mm} \pm 1,80 \text{ mm}$  e  $4,94 \text{ mm} \pm 2,01 \text{ mm}$ , respetivamente.

A bactéria *P. damsela* subsp. *piscicida* é a bactéria mais sensível a estes extratos (figura 8 C). Em todas as concentrações o extrato de etanol mostrou-se ser o que continha menor poder inibitório. Os restantes extratos, a uma concentração de 10 mg/mL têm valores superiores, os halos com diâmetro maior pertencem aos extratos de acetato de etilo ( $5,79 \text{ mm} \pm 1,79 \text{ mm}$ ), acetona ( $5,37 \text{ mm} \pm 0,74 \text{ mm}$ ) e hexano ( $5,26 \text{ mm} \pm 1,02 \text{ mm}$ ). Ainda assim, apenas o extrato de acetona e hexano (10,0 mg/mL) apresentou diferenças significativas.

### 3.2.3 Extratos de *Isochrysis galbana*

Os extratos da microalga *I. galbana* foram testados por antibiogramas contra as estirpes bacterianas em estudo. Para o *V. alginolyticus* o valor de inibição mais elevado corresponde ao extrato de acetato de etilo (figura 9 A). Ainda assim, as diferenças não são significativas relativamente ao controlo negativo. Apenas o extrato de etanol à concentração de 1,0 mg/mL, obteve diferença significativas quando comparado com o controlo negativo DMSO ( $p < 0,05$ ).

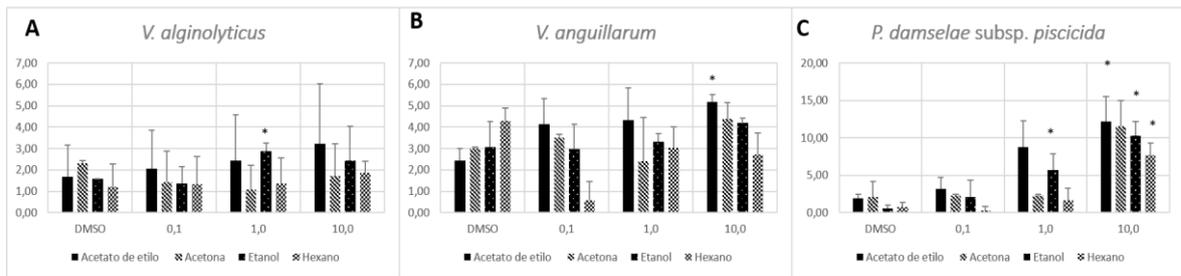


Figura 9. Atividade antibacteriana dos extratos de *I. galbana* (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damselae subsp. piscicida*.

Na bactéria *V. anguillarum* verificou-se uma maior suscetibilidade ao extrato de acetato de etilo, com um halo de  $5,19 \text{ mm} \pm 0,35 \text{ mm}$  ( $p < 0,05$ ) a uma concentração de 10,0 mg/mL (figura 9 B). Contudo, os restantes extratos têm valores de inibição muito próximos do controlo negativo.

Assim como, nas microalgas estudadas anteriormente, verifica-se que a *P. damselae subsp. piscicida* tem uma maior suscetibilidade aos extratos orgânicos estudados (figura 8 C). O extrato de acetato de etilo obteve maior poder inibitório ( $12,16 \text{ mm} \pm 3,36 \text{ mm}$ ,  $p < 0,05$ ), seguido do extrato de acetona ( $11,59 \text{ mm} \pm 3,40 \text{ mm}$ ), o extrato de etanol ( $10,31 \text{ mm} \pm 1,31 \text{ mm}$ ,  $p < 0,05$ ) e por fim, o extrato de hexano ( $7,6 \text{ mm} \pm 1,65 \text{ mm}$ ,  $p < 0,05$ ). A concentrações mais baixas o mesmo não é verificado, ainda assim, a uma concentração de 1 mg/mL, o extrato de acetato de etilo ( $8,76 \text{ mm} \pm 3,51$ ) e o extrato de etanol ( $5,69 \text{ mm} \pm 2,21$ ,  $p < 0,05$ ), continuam elevados por comparação com o controlo negativo.

### 3.2.4 Extratos de *Phaeodactylum tricornutum*

A inibição de *V. alginolyticus* pelos extratos orgânicos de *P. tricornutum* (figura 10 A) mostra que o extrato mais eficiente é o de acetato de etilo. Sendo verificado que é o único com valores considerados significativamente diferentes do controlo negativo ( $p < 0,05$ ), nas

concentrações de 1,0 mg/mL e 10,0 mg/mL. Para esta bactéria o extrato de hexano provocou ausência de halo de inibição em todas as concentrações, até mesmo no controlo negativo.

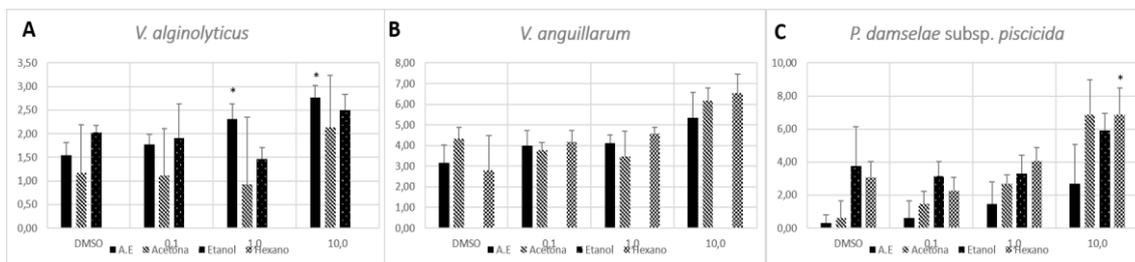


Figura 10. Atividade antibacteriana dos extratos de *P. tricornutum* (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damselae subsp. piscicida*.

O extrato de *P. tricornutum* não apresenta atividade inibitória significativa para o *V. anguillarum* ( $p > 0,05$ ) (figura 10 B). O extrato de etanol apresentou ausência de inibição para a bactéria.

*P. damselae subsp. piscicida* (figura 10 C) é inibida pelo extrato de hexano na concentração de 10,0 mg/mL, o halo de inibição foi de 6,88 mm  $\pm$  1,62 mm. O extrato de acetona desta microalga obteve o mesmo diâmetro que o anterior (6,88 mm  $\pm$  2,09 mm).

### 3.2.5 Extratos de *Porphyridium cruentum*

Por análise estatística a *P. cruentum* não obteve valores de halos de inibição significativamente diferentes do controlo negativo ( $p > 0,05$ ), no género *Vibrio* sp. (figuras 11 A e B).

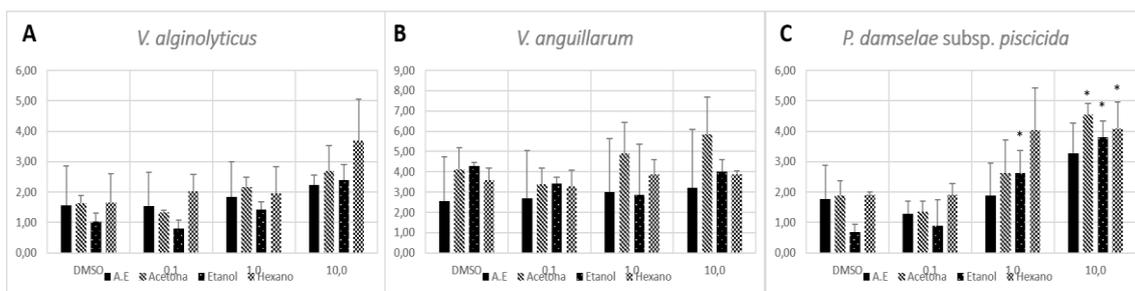


Figura 11. Atividade antibacteriana dos extratos de *P. cruentum* (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damselae subsp. piscicida*.

Ainda assim, na bactéria *V. alginolyticus* o extrato com diâmetros de inibição superiores corresponde ao extrato de hexano (10 mg/mL) (figura 11 A).

Na figura 11 B é possível verificar que o extrato que mais se destaca é o de acetona a 10 mg/mL.

A bactéria *P. damselae subsp. piscicida* é inibida por vários extratos desta microalga (figura 11 C). Os extratos com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são os de acetona e hexano na concentração de 10,0 mg/mL ( $4,54 \pm 0,38$  mm e  $4,08 \pm 0,87$  mm, respetivamente), tal como, o extrato de etanol a 1,0 mg/mL e 10,0 mg/mL ( $2,64 \pm 0,74$  mm e  $3,82 \pm 0,53$  mm, respetivamente).

### 3.2.6 Extratos de *Tetraselmis chuii*

Por último os extratos da microalga *T. chuii* (figura 12) foram submetidos a teste de inibição perante as bactérias em estudo. No caso do *V. alginolyticus* e *P. damselae subsp. piscicida* (figura 12 A e C) não foram verificadas diferenças significativas entre os extratos e o DMSO ( $p > 0,05$ ).

No caso do *V. anguillarum* foram registadas diferenças significativas para o extrato de acetato de etilo ( $p < 0,05$ ), em que registou valores de  $5,33 \pm 1,23$  mm (figura 11 B).

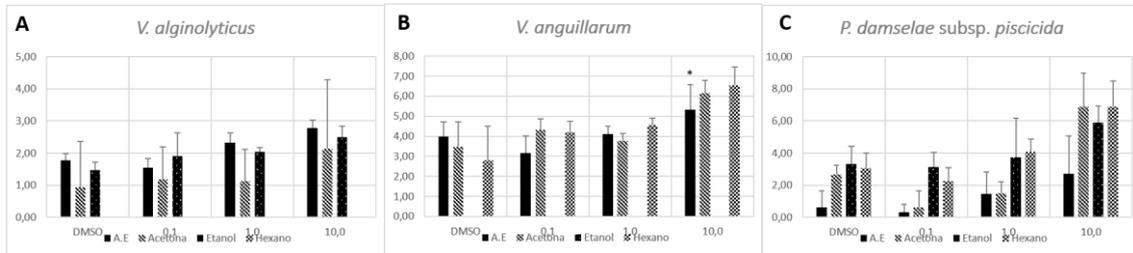


Figura 12. Atividade antibacteriana dos extratos de *T. chuii* (0,1 mg/mL; 1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) através do método de difusão em poços (zona de inibição em mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ). A- Inibição contra *V. alginolyticus*; B- Inibição contra *V. anguillarum*; C- Inibição contra *P. damselae subsp. piscicida*.

### 3.3 Fracionamento do extrato de *S. costatum*

Para verificar os compostos presentes em cada uma das frações, provenientes da coluna de sílica, foi realizado TLC, como é possível observar nas imagens representadas pela figura 13.

Na figura 13 D é possível observar duas bandas nas amostras de 80% de acetato de etilo em hexano e na amostra de acetato de etilo.

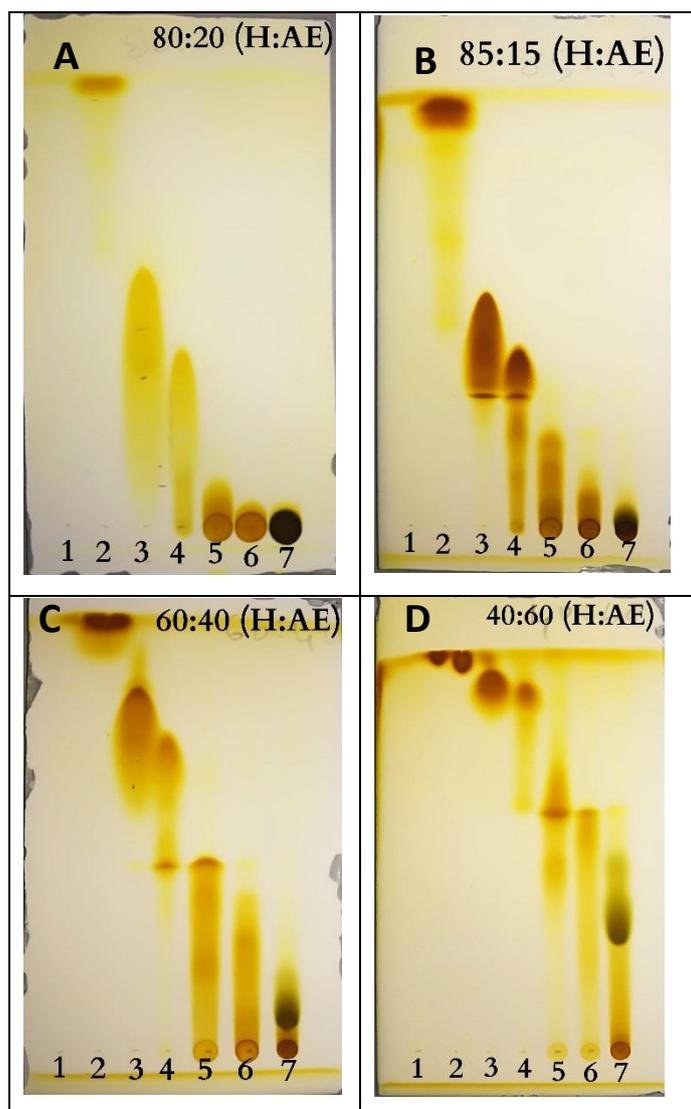


Figura 13. A: TLC com 80% hexano e 20% de acetato de etilo; B: TLC com 85% de hexano e 15% de acetato de etilo; C: TLC com 60% de hexano e 40% de acetato de etilo; D: TLC com 40% de hexano

e 60% de acetato de etilo. Sendo que os números 1-7 correspondem às amostras provenientes da cromatografia de coluna de sílica. 1: Hexano; 2: 20% de acetato de etilo em hexano; 3:40% de acetato de etilo em hexano; 4:60% de acetato de etilo em hexano; 5: 80% de acetato de etilo em hexano; 6: acetato de etilo; 7: 20% de metanol em acetato de etilo.

As frações provenientes da cromatografia de coluna de sílica foram submetidas a testes de suscetibilidade bacteriana das espécies de microrganismos em estudo. Assim, foi testado o *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e *P. damsela* subsp. *piscicida*. Contudo, verificou-se que na estirpe *V. alginolyticus* não existiu crescimento.

Na impossibilidade de se repetir este ensaio em tempo útil, o prosseguimento deste ensaio baseou-se unicamente nas restantes espécies em estudo (*V. anguillarum* e *P. damsela* subsp. *piscicida*).

Assim, os resultados dos antibiogramas para o *V. anguillarum* (figura 14 A) mostram que, existem duas frações que se destacam dos restantes, quando se observa os dados da concentração mais elevada. Os halos de inibição de maior dimensão correspondem à fração de acetato de etilo com um halo de 9,70 mm  $\pm$  2,02 mm, seguido da fração de 80% de acetato de etilo em hexano com um halo de 7,38 mm  $\pm$  1,38 mm (figura 14 B). As análises dos dados obtidos mostram a fração de 100% de acetato de etilo (0,1 mg/mL e 10,0 mg/mL), 80% de acetato de etilo em hexano (10 mg/mL), 60% de acetato de etilo em hexano (10 mg/mL), 40% de acetato de etilo em hexano (1,0 mg/mL) e 20% de acetato de etilo em hexano (1,0 mg/mL) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controlo negativo.

A *P. damsela* subsp. *piscicida* (figura 14 C) forneceu dados importantes no que diz respeito às frações que têm na sua composição composto antibacterianos de relevância. Desta forma, a fração com maiores halos de inibição foi o acetato de etilo com um diâmetro de halo de inibição de 8,04 mm  $\pm$  3,28 mm. Seguido imediatamente por uma fração de 60% de acetato de etilo em hexano com 7,22 mm  $\pm$  1,35 mm. A terceira, com maiores halos, foi o de 80% de acetato de etilo em hexano, 6,09 mm  $\pm$  0,77 mm. O diâmetro dos halos de inibição anteriormente mencionados correspondem à concentração de 10 mg/mL. No caso

da concentração de 1 mg/mL as variações são diferentes, mas mantém como mais eficiente a fração de acetato de etilo.

A análise de dados mostrou que as frações significativamente diferentes do DMSO ( $p < 0,05$ ). Foram: 40% de acetato de etilo em hexano (1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL), 60% acetato de etilo em hexano (1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL), 80% de acetato de etilo em hexano (1,0 mg/mL; 10,0 mg/mL) e acetato de etilo (1,0 mg/mL)

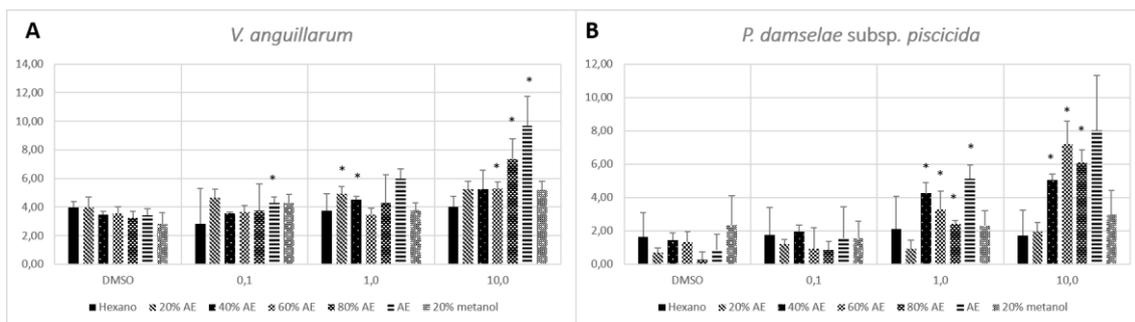


Figura 14. Atividade antimicrobiana das diferentes frações do extrato de acetato de etilo de *S. costatum* para a bactéria *V. anguillarum* (A) e *P. damsela subsp. piscicida* (B). Concentração do extrato (mg/mL) vs diâmetro do halo (mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Purificação da fração de 80% de acetato de etilo em hexano e 100% acetato de etilo

Uma vez que, as frações de 80% de acetato de etilo em hexano e 100% acetato de etilo obtiveram melhores resultados, procedeu-se à sua caracterização química, por HPLC. O

cromatograma obtido no HPLC encontra-se representado na figura 15, onde se identificou como compostos maioritários a fucoxantina (7,41 µg/mL e a luteína (1,630 µg/mL).

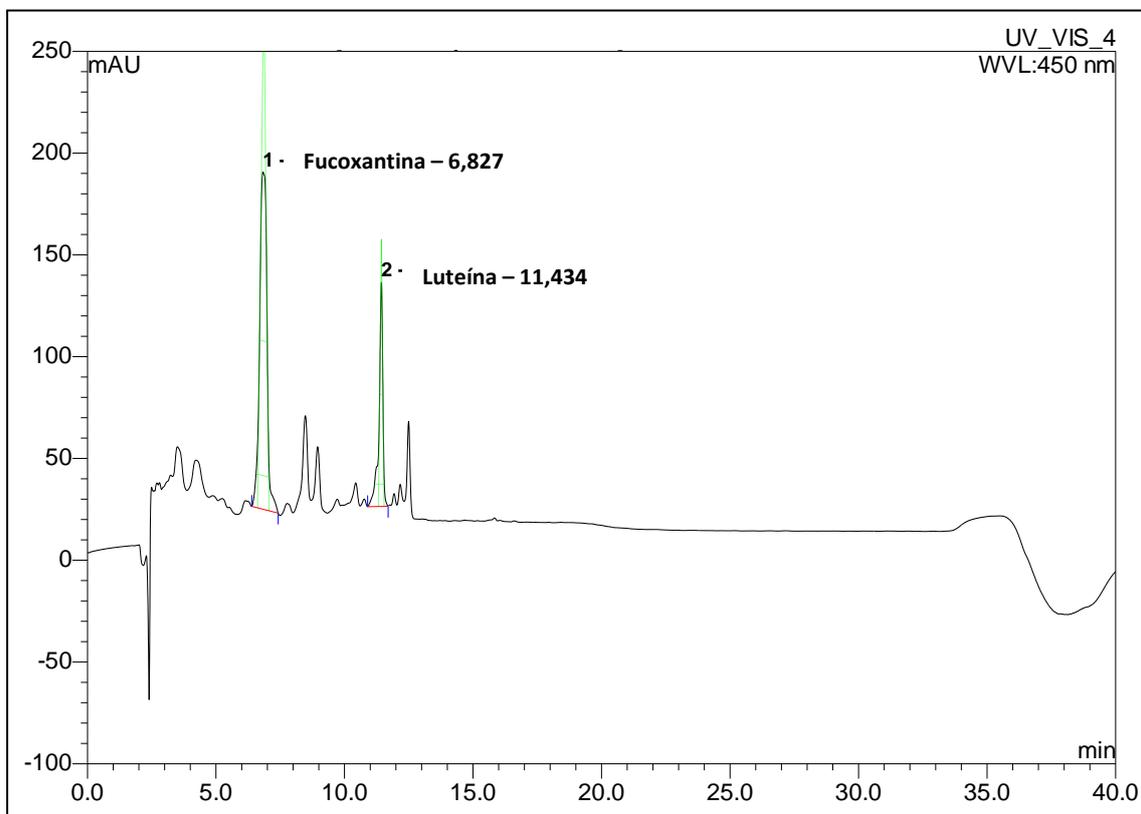


Figura 15. Perfil da amostra de 80% de acetato de etilo em hexano e 100% acetato de etilo por HPLC.

A quantidade destes compostos foi determinada por comparação com retas de calibração estabelecidas com os compostos puros (tabela 1).

Tabela 1 Quantidade de amostra registada em HPLC.

Nome do pico	Tempo real (min)	Altura (mAU)	Área mAU*min	Área (%)	Quantidade (µg/mL)
<b>Fucoxantina</b>	6,83	165,655	55,355	74,35	7,414
<b>Luteína</b>	11,43	110,121	19,099	25,65	1,630

Posteriormente, e de acordo com as informações reveladas pelo HPLC o TLC preparativo foi realizado com o controlo positivo, a fucoxantina. Foram obtidas quatro bandas definidas, nomeadas como F1, F2, F3 e F4 (figura 16).

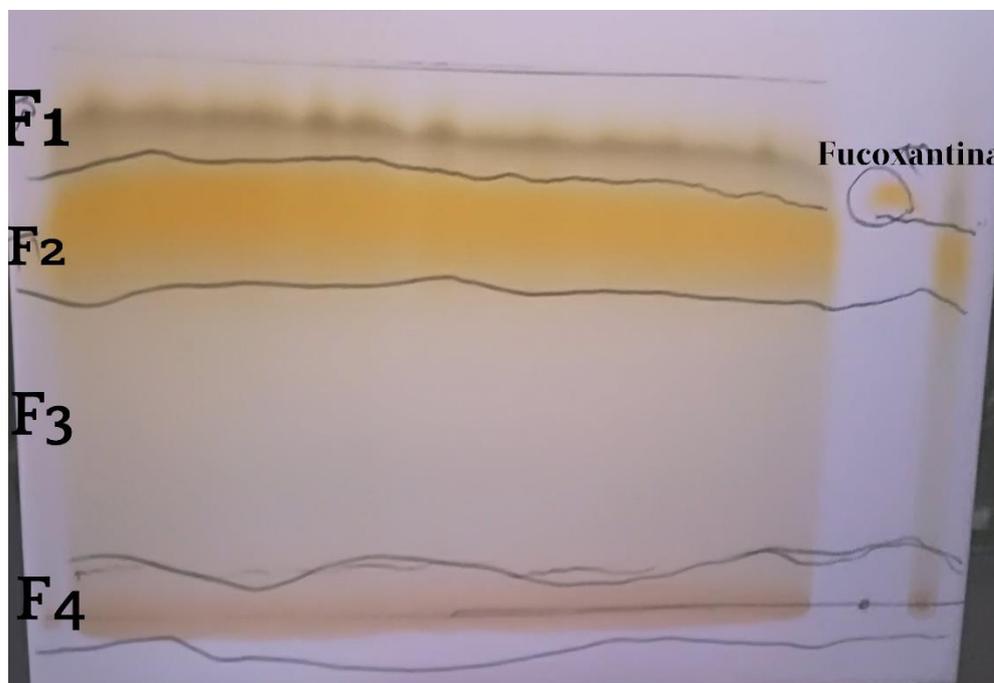


Figura 16. TLC preparativo de 80% de acetato de etilo em hexano e 100% de acetato de etilo

Tal como aconteceu com as outras amostras, também estas foram tratadas quanto à suscetibilidade bacteriana.

O *V. alginolyticus* teve como frações com maiores halos de inibição as amostras F2 e F4, com um diâmetro de  $5,65 \text{ mm} \pm 4,00 \text{ mm}$  e  $6,53 \text{ mm} \pm 0,00 \text{ mm}$ , respetivamente (concentração de 10 mg/mL) (figura 17). Contudo, apenas a amostra F1 na concentração mais elevada é considerada significativamente diferente por análises estatísticas.

O *V. anguillarum* teve como fração mais eficiente para a eliminação desta estirpe a F3 no caso da concentração mais elevada, com um diâmetro de  $7,59 \text{ mm} \pm 1,49 \text{ mm}$ . Nas restantes concentrações, apesar de não ser a mais elevada, continua a ser bastante elevada, sendo ultrapassada apenas por a F1.

Neste ensaio verifica-se que a F2 é significativamente diferente do controlo negativo em todas as concentrações testadas. Também a fração F3 na concentração de 10,0 mg/mL é considerada significativamente diferente.

Finalmente, a bactéria *P. damselae* subsp. *piscicida* a figura abaixo representa os resultados dos antibiogramas (figura 17 C). É possível observar duas frações que são destacadas das outras, F1 e F2, que correspondem aos diâmetros dos halos de inibição de 6,31mm ± 2,48 mm e 6,41mm ± 1,02 mm. Verifica-se que a fração F1 mantém-se elevada em todas as concentrações, existindo um decaimento gradual, de acordo com o aumento da diluição.

Apenas a fração F2, à concentração mais elevada, apresenta diferenças significativas em relação ao controlo negativo (DMSO),  $p < 0,05$ .

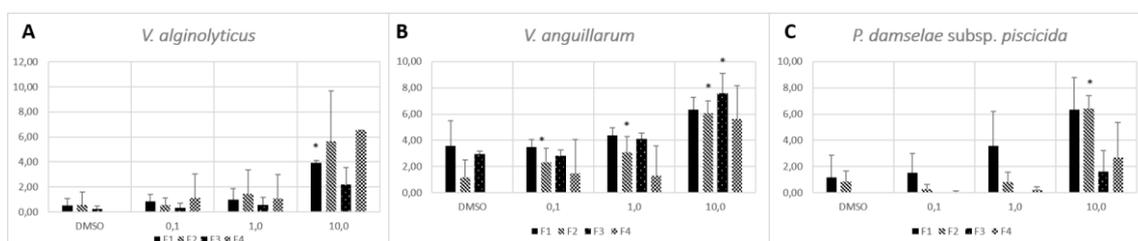


Figura 17. Resultados do antibiograma da purificação de 80% de Acetato de etilo em Hexano e Aceto de etilo para as bactérias *V. alginolyticus* (A), *V. anguillarum* (B) e *P. damselae* subsp. *piscicida* (C). Concentração do extrato (mg/mL) vs diâmetro do halo (mm). \* Valor significativamente diferente do controlo negativo ( $p < 0,05$ ).

## 4. Discussão

Os resultados obtidos mostram que não é apenas uma microalga que apresenta atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas em estudo. Os extratos orgânicos da diatomácea *S. costatum* mostraram ter o poder de inibir *V. anguillarum*, como verificado por Lauritano e coautores (2018), *V. alginolyticus*, também reportado por Molina-Cárdenas e Sánchez-Saavedra (2017) e, principalmente, contra a bactéria *P. damsela* subsp. *piscicida*. Tanto quanto é do meu conhecimento, não existem dados bibliográficos sobre a atividade antimicrobiana da *S. costatum* para *Photobacterium* sp., no entanto, em todos os extratos foi verificado esta capacidade, mesmo no caso de concentrações mais baixas, determinados extratos, apresentam inibição.

O efeito antibacteriano dos extratos de *Nannochloropsis* sp testado, não se verificou para a bactéria *V. anguillarum*, nas condições testadas, esta informação é corroborada por Kokou e co-autores em 2012. Os mesmos autores afirmam que o *V. alginolyticus* apresenta também resistência a esta microalga, o que não se verificou para o extrato de acetona (Kokou et al., 2012b). A bactéria *P. damsela* subsp. *piscicida* apresenta sensibilidade a extratos de *Nannochloropsis* sp. (acetona, 10,0 mg/mL e hexano, 10,0 mg/mL), no entanto, mais uma vez, não foram encontrados dados bibliográficos de sensibilidade a esta microalga.

A *I. galbana* mostrou-se capaz de inibir as três bactérias em estudo, em pelo menos um extrato. O *V. alginolyticus* foi sensível apenas ao extrato de etanol (1 mg/mL), também verificado por Molina-Cárdenas e seus coautores (2014). O extrato de acetato de etilo (10 mg/mL) foi capaz de inibir *V. anguillarum*. À semelhança das microalgas anteriores a bactéria *P. damsela* subsp. *piscicida* é a que apresenta maior sensibilidade aos extratos de *I. galbana*.

O extrato de acetato de etilo da microalga *P. tricornutum* evidencia atividade antibacteriana contra o *V. alginolyticus* nas concentrações de 1,0 e 10,0 mg/mL. Apesar de anterior ter sido comprovada a atividade antimicrobiana desta microalga contra o *V.*

*anguillarum* (Desbois et al., 2009), os extratos testado não obtiveram inibição. Já a *P. damselae* subsp. *piscicida* é apenas inibida por o extrato de hexano na concentração mais elevada.

A *P. cruentum* tem sido descrita como tendo atividade antimicrobiana, no entanto, até os dias de hoje não foi testado para as espécies em estudo (Raposo et al., 2014). Os extratos testados não apresentam atividade inibitória ao *V. anguillarum* nem ao *V. alginolyticus*. Quanto à *P. damselae* subsp. *piscicida* apresenta sensibilidade a três dos quatro extratos testados (acetona, 10,0 mg/mL; etanol, 1,0 e 10,0 mg/mL; hexano, 10,0 mg/mL).

Os últimos extratos testados foram da microalga *T. chuii* verificando-se apenas inibição para a bactéria *V. anguillarum* (acetato de etilo, 10,0 mg/mL), reportado anteriormente por Costa e seus coautores (2006), Kokou e seus coautores (2011) e Molina-Cárdenas e Sanchez-Saavedra (2017). Não se verificou atividade antibacteriana contra *V. alginolyticus* e *P. damselae* subsp. *piscicida*, apesar de já ter sido referenciada como uma microalga que inibe estas estirpes bacterianas (Costa et al., 2006; Kokou et al., 2011; Molina-Cárdenas and Sánchez-Saavedra, 2017).

O método estatístico aplicado (teste T) revelou extratos sem significado estatístico por não existir uma diferença significativa quando comparado com o DMSO, no entanto, alguns extratos parecem ter inibição para as espécies estudadas. Por exemplo, o extrato de acetato de etilo da microalga *S. costatum* apresenta halos de inibição superiores aos de acetona para *V. anguillarum*, contudo, não se verificou diferenças significativas devido aos halos de inibição terem registado desvios padrões superiores. Assim, todos as análises subsequentes foram tidas em conta não apenas, as diferenças significativas estatísticas, mas também, uma análise crítica dos resultados obtidos.

A microalga que mais se destacou pelo seu poder inibitório foi a *S. costatum*. Dado que, a procura por novos fármacos tem incitado ao estudo de novos compostos naturais com benefícios para a saúde humana e de animais (De Moraes et al., 2015). Os biocompostos ativos produzidos, naturalmente, pelas microalgas têm sido descritos como tendo diversas atividades terapêuticas (De Moraes et al., 2015; Volk, 2008). Assim sendo, foi estudado os compostos do extrato de acetato de etilo da *S. costatum*. A extração acetato de etilo

permite extrair carotenoides com poder inibitório contra microrganismos (Ambati et al., 2018; Miazek et al., 2017; Rao et al., 2010).

O fracionamento do extrato que revelou maior capacidade inibitória resultou em sete frações, que foram separadas por cromatografia em coluna de sílica. Foi usado a combinação dos solventes, polar (acetato de etilo) e do apolar (hexano) pois, resultam em elevadas quantidades de carotenóides, quando comparadas com outros solventes (Saini and Keum, 2017). As suscetibilidades das bactérias, para estas frações, foram testadas, verificando-se, assim, a inibição tanto do *V. anguillarum*, como da *P. damselae* subsp. *piscicida*. As misturas que mais se destacaram correspondem às frações de 80% de acetato de etilo em hexano e de 100% de acetato de etilo, como tendo um maior poder inibitório para estas bactérias em estudo.

Seguidamente, as frações de 80% de acetato de etilo em hexano e 100% de acetato de etilo foram analisadas por HPLC, tendo sido verificado dois carotenoides presentes na amostra, fucoxantina e luteína. A fucoxantina foi reportada, anteriormente, como antibacteriano de bactérias como, por exemplo, *Listeria monocytogenes*, porém ainda não tinha sido descrita como antibacteriano de espécies da família Vibrionaceae (Rajauria and Abu-Ghannam, 2013; Sivagnanam et al., 2015). Os resultados obtidos por HPLC justificam o facto do extrato de acetona, também, exibir elevadas inibições, tendo em conta que, a acetona tem elevados rendimentos na extração da fucoxantina (Miazek et al., 2017).

As condições de produção das microalgas têm sido estudadas de forma a otimizar o rendimento da produção de fucoxantina (Xia et al., 2013). Este carotenóide tem-se tornado, nos últimos anos, um composto com elevada importância para a saúde humana, principalmente, pelo seu poder antioxidante (Jin et al., 2018), mas também foi reconhecido como anti-diabético e anti-obesidade (Maeda, 2015).

Por fim, de forma a avaliar a atividade antibacteriana das frações analisadas por HPLC, o TLC preparativo permitiu diferenciar em quatro frações, isolando, desta forma, a fração que corresponde à fucoxantina (F2). Esta, apresentou valores mais significativos quando comparados com as outras frações em estudo. Ainda assim, as frações, F1 e F3, também apresentam atividade antibacteriana para as bactérias testadas, o que poderá indicar que

outros biocompostos, também, são responsáveis por atividade antibacteriana contra as espécies de Vibrionaceae testadas. A extração de outros carotenoides por este solvente está descrito na literatura, tendo sido reportado por ter a capacidade de extrair carotenos e xantofilas (Chuyen et al., 2017; Saini and Keum, 2017). Concluindo assim, que *S. costatum* tem potencial para combater os principais problemas de perdas económicas na aquacultura, sendo a fucoxantina o principal composto com capacidade antibacteriana.

## 5. Conclusão

Todas as microalgas foram capazes de inibir pelo menos um dos patógenos. Das bactérias estudadas, a *P. damselae* subsp. *piscicida* revelou ser a bactéria mais sensível aos extratos aplicados.

Os extratos de acetato de etilo e acetona de *S. costatum* são potenciais antibacteriano contra *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e *P. damselae* subsp. *piscicida*, importantes agentes patogénicos da aquacultura. O fracionamento do extrato e posterior caracterização química mostrou que a fucoxantina poderá ser o composto bioativo responsável por esta atividade.

O uso de composto bioativos provenientes de microalgas ainda, está nos seus primórdios. Ainda assim, este trabalho mostrou ser possível a utilização das microalgas para combater o uso de antibióticos em aquacultura. Assim, no futuro, espera-se uma valorização das microalgas e dos seus potenciais compostos.

## 6. Agradecimentos

Agradeço à Necton S.A. pela cedência da biomassa e pela disponibilização das instalações laboratoriais para a realização dos ensaios de suscetibilidade bacteriana. Ao grupo MarBiotech do Centro de Ciências do Mar, por conceder o uso dos laboratórios para a preparação dos extratos, fracionamento e caracterização química. E por fim, ao IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera, por facultarem as estirpes dos agentes patogénicos.

## 7. Referências Bibliográficas

- Ambati, R.R., Gogisetty, D., Gokare, R., Ravi, S., Bikkina, P.N., Bo, L., 2018. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects 8398. 1-22 doi:10.1080/10408398.2018.1432561
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S.K., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J. Pharm. Anal. 6, 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C., Deroûne, N., 2013. Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. PLoS One 8, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0084772
- Cao, J., Zhang, J., Ma, L., Li, L., Zhang, W., Li, J., 2018. Identification of fish source *Vibrio alginolyticus* and evaluation of its bacterial ghosts vaccine immune effects. Microbiologyopen 1–11. doi:10.1002/mbo3.576
- Carlson, J.M., Hyde, E.R., Petrosino, J.F., Manage, A.B.W., Primm, T.P., 2015. The host effects of *Gambusia affinis* with an antibiotic-disrupted microbiome. Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol. 178, 163–168. doi:10.1016/j.cbpc.2015.10.004
- Chen, W., Yu, S., Zhang, C., Zhang, J., Shi, C., Hu, Y., Suo, B., Cao, H., Shi, X., 2011. Development of a single base extension-tag microarray for the detection of pathogenic *Vibrio* species in seafood. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 1979–1990. doi:10.1007/s00253-010-2959-7
- Chuyen, H. V, Roach, P.D., Golding, J.B., Parks, S.E., Nguyen, M.H., 2017. Original article Optimisation of extraction conditions for recovering carotenoids and antioxidant capacity from Gac peel using response surface methodology 1–9. doi:10.1111/ijfs.13361
- Costa, R., Makridis, P., Costa, R.A., Dinis, M.T., 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*.

- Aquaculture 255, 76–81. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.12.010
- Couso, I., Vila, M., Vigara, J., Cordero, B.F., Vargas, M.Á., Rodríguez, H., León, R., 2012. Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway in response to high light stress in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur. J. Phycol. 47, 223–232. doi:10.1080/09670262.2012.692816
- De Moraes, M.G., Vaz, B.D.S., De Moraes, E.G., Costa, J.A.V., 2015. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. Biomed Res. Int.. 16, 1-15. doi:10.1155/2015/835761
- Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A., Smith, V.J., 2009. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Mar. Biotechnol. 11, 45–52. doi:10.1007/s10126-008-9118-5
- Dubert, J., Barja, J.L., Romalde, J.L., 2017. New insights into pathogenic vibrios affecting bivalves in hatcheries: Present and future prospects. Front. Microbiol. 8, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2017.00762
- El-sayed, H.S., Ibrahim, H.A.H., Beltagy, E.A., Khairy, H.M., 2014. Effects of short term feeding of some marine microalgae on the microbial profile associated with *Dicentrarchus labrax* post larvae. Egypt. J. Aquat. Res. 40, 251–260. doi:10.1016/j.ejar.2014.08.001
- Essam, H.M., Abdellrazeq, G.S., Tayel, S.I., Torky, H.A., Fadel, A.H., 2016. Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. Microb. Pathog. 99, 41–50. doi:10.1016/j.micpath.2016.08.003
- Falaise, C., François, C., Travers, M., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Mouget, J., 2016. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. Mar. Drugs 14, 1–27. doi:10.3390/md14090159
- Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., Zhang, X., 2014. Marine algae-derived bioactive peptides

- for human nutrition and health. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9211–9222.  
doi:10.1021/jf502420h
- FAO, 2018. The state of World Fisheries and Aquaculture, in: Meeting the Sustainable Development Goals. Rome, pp. 1-877.
- FAO, 2016. The state of world fisheries and aquaculture, in: Contributing to Food Security and Nutrition for All. Rome, pp. 1-200.
- Giordano, D., Costantini, M., Coppola, D., Lauritano, C., Núñez Pons, L., Ruocco, N., di Prisco, G., Ianora, A., Verde, C., 2018. Biotechnological Applications of Bioactive Peptides From Marine Sources. *Adv. Microb. Physiol.* 1–50.  
doi:10.1016/bs.ampbs.2018.05.002
- Gómez, G.D., Balcázar, J.L., 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 145–154.  
doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x
- Hossain, M.S., Aktaruzzaman, M., Fakhruddin, A.N.M., M. J. Uddin, M.J., Rahman, S. H. Chowdhury, M.A.Z., K., A.M., 2012. Antimicrobial susceptibility of vibrio species isolated from brackish water shrimp culture environment 36, 213–220.  
doi:10.3329/jbas.v36i2.12964
- Ina-Salwany, M.Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Fathin-Amirah, M., Mohd, A., Amal, M.N.A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., Zamri-Saad, M., 2018. Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. *J. Aquat. Anim. Health* 2, 117–128.  
doi:10.1002/aah.10045
- Jin, X., Zhao, T., Shi, D., Bao, M., Qiyang, Y., 2018. Protective role of fucoxanthin in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in experimental adult rats 1–9.  
doi:10.1002/ddr.21451
- Jyotirmayee, P., Sachidananda, D., Basanta, K. Das, 2014. Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. *African J. Pharm. Pharmacol.* 8, 809–818.  
doi:10.5897/AJPP2013.0002

- Kalatzis, P., Castillo, D., Katharios, P., Middelboe, M., 2018. Bacteriophage Interactions with Marine Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy. *Antibiotics* 7, 1–23. doi:10.3390/antibiotics7010015
- Kim, H.-J., Ryu, J.-O., Lee, S.-Y., Kim, E.-S., Kim, H.-Y., 2015. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiol.* 15, 1–11. doi:10.1186/s12866-015-0577-3
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., Divanach, P., 2012b. Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquac. Res.* 43, 1520–1527. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02955.x
- Lauritano, C., Martín, J., De La Cruz, M., Reyes, F., Romano, G., Ianora, A., 2018. First identification of marine diatoms with anti-tuberculosis activity. *Sci. Rep.* 8, 1–10. doi:10.1038/s41598-018-20611-x
- Leite, L., Jude-Lemeilleur, F., Raymond, N., Henriques, I., Garabetian, F., Alves, A., 2017. Phylogenetic diversity and functional characterization of the Manila clam microbiota: a culture-based approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 21721–21732. doi:10.1007/s11356-017-9838-z
- Maeda, H., 2015. Nutraceutical Effects of Fucoxanthin for Obesity and Diabetes Therapy: A Review. 64, 125-132 doi:10.5650/jos.ess14226
- Miazek, K., Kratky, L., Sulc, R., Jirout, T., Aguedo, M., Richel, A., Goffin, D., 2017. Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18071429
- Minniti, G., Hagen, L.H., Porcellato, D., Jørgensen, S.M., Pope, P.B., Vaaje-Kolstad, G., 2017. The skin-mucus microbial community of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Front. Microbiol.* 8, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2017.02043
- Molina-Cárdenas, C.A., Sánchez-Saavedra, M. del P., 2017. Inhibitory effect of benthic diatom species on three aquaculture pathogenic vibrios. *Algal Res.* 27, 131–139. doi:10.1016/j.algal.2017.09.004

- Molina-Cárdenas, C., Sánchez-Saavedra, M., Lizárraga-Partida, M., 2014. Inhibition of pathogenic *Vibrio* by the microalgae *Isochrysis galbana*. *Appl. Phycol.* 26, 2347–2355. doi:10.1007/s10811-014-0270-1
- Novais, C., Campos, J., Freitas, A.R., Barros, M., Silveira, E., Coque, T.M., Antunes, P., Peixe, L., 2018. Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. *Sci. Total Environ.* 625, 1102–1112. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.265
- Rajan, P.R., Lin, J.H.Y., Ho, M.S., Yang, H.L., 2003. Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1375–1380. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02119.x
- Rajauria, G., Abu-Ghannam, N., 2013. Isolation and partial characterization of bioactive fucoxanthin from *Himanthalia elongata* brown seaweed: A TLC-based approach. *Int. J. Anal. Chem.* 1–6. doi:10.1155/2013/802573
- Rao, A.R., Reddy, A.H., Aradhya, S.M., 2010. Antibacterial properties of *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* micro algal extracts. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 4, 809–819.
- Raposo, M.F.D.J., De Morais, A.M.M.B., De Morais, R.M.S.C., 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci.* 101, 56–63. doi:10.1016/j.lfs.2014.02.013
- Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., 2013. The Family Vibrionaceae, *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. Berlin. 659-747 doi:10.1007/978-3-642-38922-1
- Saini, R.K., Keum, Y., 2017. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem.* 240, 90–103. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.099
- Salgado, H.R.N., Roncari, A.F.F., 2005. Microbiological assay for the determination of azithromycin in ophthalmic solutions. *Yaoxue Xuebao* 40, 544–549.
- Sivagnanam, S.P., Yin, S., Choi, J.H., Park, Y.B., Woo, H.C., Chun, B.S., 2015. Biological

properties of fucoxanthin in oil recovered from two brown seaweeds using supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Mar. Drugs* 13, 3422–3442. doi:10.3390/md13063422

Volk, R.B., 2008. A newly developed assay for the quantitative determination of antimicrobial (anticyanobacterial) activity of both hydrophilic and lipophilic test compounds without any restriction. *Microbiol. Res.* 163, 161–167. doi:10.1016/j.micres.2006.03.015

Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., Zhang, C., 2013. Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita* 2667–2681. doi:10.3390/md11072667

Zorriehzahra, M.J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Lazado, C.C., 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Vet. Q.* 36, 228–241. doi:10.1080/01652176.2016.1172132



## **Capítulo IV**

### **Considerações finais**



# 1. Conclusão Geral

A produção industrial de microalgas apresenta um elevado potencial para diferentes sectores (alimentar, energético e farmacêutico). O aumento de escala das culturas monoalgais de *Skeletonema costatum* e *Nannochloropsis* sp. foram concluídas com sucesso para fotobiorreator tubular industrial (PBR) e cultivado semi-continuamente.

Apesar da microalga *S. costatum* ser encontrada facilmente no meio ambiente, é ainda um desafio para os produtores de microalgas. A cultura estudada sofreu um decaimento de crescimento a partir do dia 30, por ser uma cultura sensível a vários fatores entre eles, contaminações ambientais, exige cuidados acrescidos na produção da mesma. Os nutrientes adicionados tiveram um papel preponderante na viabilidade desta experiência, as vitaminas que compõe o Nutribloom® (Necton, S.A.) combinadas com as características dos PBRs permitiram o seu cultivo, à escala industrial, com sucesso.

As espécies de *Nannochloropsis* sp. foram avaliadas mundialmente para a produção de biomassa, devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de lípidos. Os dados relativos a *Nannochloropsis* sp. indicam, que esta cultura está perfeitamente adaptada ao sistema de produção em questão, assim como ao tipo de nutrientes utilizados. Por ser uma espécie bem-adaptada os custos de produção são menores, o que torna esta microalga ainda mais interessante para o setor económico.

A capacidade antibacteriana das microalgas produzidas em PBRs tubulares industriais, por parte da Necton, S.A., foi testada. Os extratos orgânicos de acetato de etilo, acetona, etanol e hexano foram testados de forma a perceber os que seriam mais eficientes para a inibição do crescimento de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. De uma maneira geral os extratos de concentração superior (10 mg/mL) foram mais eficientes. O extrato de acetato de etilo da *S. costatum* inibe a bactéria *P. damsela* subsp. *piscicida*, mesmo a concentrações menores de 0,1 mg/mL. Esta bactéria foi a mais sensível aos extratos testados, por comparação com as de *Vibrio*.

Das seis microalgas testadas (*Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp., *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *S. costatum*, *Tetraselmis chuii*), *S. costatum* foi a responsável por um maior número extratos com capacidade antibacteriana das estirpes testadas da família Vibrionaceae. Já os extratos de acetato de etilo e acetona destacaram-se pelo seu poder inibitório. Desta forma, depois da purificação do extrato de acetato de etilo, foi identificada a fucoxantina como sendo o potencial composto responsável pela atividade antibacteriana.

Os carotenóides têm ganho um papel de destaque nos últimos anos, não só pela sua função natural (por exemplo, a pigmentação), mas também pelos benefícios que têm sido atribuídos para o ser humano. São distinguidos como antioxidantes, anti-tumorais e anti-inflamatórios (Guedes et al., 2011). Desta forma, através deste estudo foi possível encontrar mais uma característica importante para este grupo de compostos, a capacidade antibacteriana.

As diatomáceas, como é o caso da *S. costatum*, têm na sua constituição fucoxantina que possivelmente, é o responsável pela atividade antibacteriana atribuível aquela microalga (*S. costatum*). Este facto é corroborado pela, também, elevada inibição do extrato de acetona obtido por Miazek e colaboradores (2017).

Conclui-se assim, que a otimização da produção de *S. costatum* é de elevada importância. O seu uso em aquacultura está, ainda, mais favorecido pelos seus compostos bioativos, como a fucoxantina. Estes têm a capacidade de inibir agentes patogénicos que provocam prejuízos neste sector e desta forma, minimizar o uso de antibióticos.

## 1.1 Perspetivas futuras

A procura de novas espécies de interesse nutricional e económico pode ainda ser explorado, sendo o maior desafio criar as condições ideais para a produção das mesmas. As melhores condições para a produção de *S. costatum* ainda não são completamente conhecidas, de forma a evitar o decaimento da cultura ao fim de alguns dias de produção. A utilização de reatores de escala laboratorial (Algem<sup>®</sup>, Algenuity), que permitam simular as condições ambientais reais, através do software acoplado ao equipamento, podem ser úteis para um conhecimento mais aprofundado sobre esta espécie. Para além de permitirem, em paralelo, testar diferentes condições e registar parâmetros de crescimento (por exemplo, estações do ano) (Pereira et al., 2018).

Microalgas como a *Nannochloropsis* sp. são alvo de estudo ao longo dos últimos anos, contudo ainda existem áreas em que os estudos avançaram pouco, tais como, o potencial farmacêutico destes organismos. Os seus pigmentos são também um importante alvo de estudo, apesar de não ter sido reconhecido como a microalga com maior poder antibacteriano, outras atividades terapêuticas poderão ser exploradas.

A aplicação das microalgas como antibacterianos, está ainda no início, do que promete ser um longo percurso. A cada dia que passa as resistências aos antibióticos mais utilizados é superior (WHO, 2014), existindo a necessidade da procura de novos fármacos que sejam mais amigos do ambiente num contexto de aquacultura sustentável e de alterações climáticas. Assim, os mecanismos de ação por parte da fucoxantina poderão ser alvos de estudos futuros. A otimização da produção de fucoxantina por parte da microalga *S. costatum*, poderá melhorar a performance deste composto quando aplicadas *in vivo*.

Além disso, todas as microalgas investigadas poderiam ser uma potencial fonte de compostos bioactivos, pelo que, são necessários novos estudos para verificar outros potenciais compostos.

Como verificado no último ensaio outros compostos poderão ser responsáveis pela inibição das bactérias testadas, assim, um estudo mais aprofundado à cerca dos compostos com atividade antibacteriana seriam úteis.

Por fim, as bactérias estudadas não são os únicos agentes patogénicos problemáticos em aquaculturas. Outras bactérias, tais como, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas fluorescens*, são exemplos de bactérias, frequentemente, diagnosticadas. Assim, é de especial interesse verificar a atividade antimicrobiana por parte do composto encontrado (fucoxantina) contra outros microrganismos de patogénicos.

## Referências Bibliográfica

- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Malcata, F.X., 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Mar. Drugs* 9, 625–644. doi:10.3390/md9040625
- Miazek, K., Kratky, L., Sulc, R., Jirout, T., Aguedo, M., Richel, A., Goffin, D., 2017. Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18071429
- Pereira, H., Páramo, J., Silva, J., Marques, A., Barros, A., Maurício, D., Santos, T., Schulze, P., Barros, R., Gouveia, L., Barreira, L., Varela, J., 2018. Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp . CTP4 (Chlorophyta) for CO<sub>2</sub> mitigation : from an agar plate to 100-m<sup>3</sup> industrial photobioreactors. *Scientific Reports* 8, 1–11. doi:10.1038/s41598-018-23340-3
- WHO, 2014. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. *Bull. World Health Organ.* 61, 383–94.