



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Compostos bioactivos de microalgas com
interesse em aquacultura como
imunoestimulantes, antioxidantes e
antibióticos**

Nuno Gonçalo Ramos Mendes

Mestrado em Aquacultura e Pescas

Especialização em Aquacultura

Faro

2011

Instituições onde foi realizado o trabalho

Trabalho realizado no Laboratório 2.55 do grupo de Biotecnologia Marinha “Marine Biotech. Group”, edifício 7, Centro de Ciências do Mar (CCMAR). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve.

Período em que decorreu o trabalho

O trabalho prático teve início a 16 de Fevereiro de 2011 e terminou a 11 de Agosto de 2011.

Nome, posição e afiliação de outros investigadores que tenham colaborado significativamente no trabalho

Coordenador do trabalho – Professor Doutor João Varela (Marine Biotech. Group, CCMAR).

Supervisora – Doutora Luísa Custódio (Marine Biotech. Group, CCMAR).

Data

Julho de 2011

Título da dissertação

Compostos bioactivos de microalgas com interesse em aquacultura como imunoestimulantes, antioxidantes e antibióticos.

Júri

Presidente: Doutor Jorge Dias, Investigador do Laboratório de Aquacultura, CCMAR.

Vogais: Professor Doutor João Varela, Marine Biotech. Group, CCMAR.

Doutora Luísa Custódio (Marine Biotech. Group, CCMAR).

Agradecimentos

Quero agradecer às pessoas que de uma forma mais directa contribuíram para a realização deste trabalho. Um muito obrigado:

À Doutora Luísa Custódio e Professor Doutor João Varela cuja orientação foi de extrema importância e também à Professora Doutora Luísa Barreira pela ajuda na elaboração do relatório;

À Professora Doutora Margarida Reis e Doutor Paulo Pedro pela ajuda na metodologia com estirpes bacterianas;

Ao Doutor Jorge Dias pelo auxílio e fornecimento das douradas, à Vera e Helena do laboratório de aquacultura;

Aos colegas envolvidos em parte da realização experimental João Palmeira e Ivy Lomotey;

A todos os colegas de laboratório incluindo Hugo Pereira, Catarina Duarte, Dinis, Fernando, Maria e Maria João, Cristina, Pabla e Eva.

Resumo

As microalgas têm um papel fundamental na produção de diversos organismos marinhos, principalmente na sua fase larvar, sendo indispensáveis à sua criação. Para além da sua importância nutricional, diversos estudos apontam para a existência de outros compostos com propriedades imunomodulatórias em microalgas. Estes compostos podem ajudar a reduzir os impactos nos surtos de zoonoses em instalações de aquacultura, nomeadamente na de *Sparus aurata*.

Neste trabalho estudou-se a actividade biológica de extractos aquosos das microalgas *Tetraselmis chuii* (T-iso), *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus sp.* e *Botryococcus braunii* em relação à sua influência no *respiratory burst* de fagócitos de *Sparus aurata* e à capacidade antimicrobiana sobre *Listonella anguillarum*, *Vibrio fischeri* e *Photobacterium damsela piscicida* dos extractos aquosos, de hexano acetona e éter dietílico das referidas microalgas. Também se determinou a actividade antioxidante dos extractos aquosos por método de DPPH e por capacidade quelante de Fe^{2+} e Cu^{2+} .

O presente trabalho apontou para a existência de propriedades antioxidantes, determinadas pelo método DPPH, nos extractos aquosos com 10 mg/mL de *T. chuii*, *B. braunii*, *Scenedesmus sp.* e *N. oculata*, tendo registado actividades antioxidantes de 73,2±2,4%; 38,6±4,9%; 23,0±3,1% e 18,6±3,0%, respectivamente. Todos os extractos aquosos mostraram capacidade quelante de Fe^{2+} , com a *I. galbana* e a *Scenedesmus sp.* a terem o registo mais elevado de, respectivamente, 101,24±2,69% e 102,09±1,03%. A actividade quelante de Cu^{2+} de *I. galbana*, *T. chuii*, *B. braunii*, *Scenedesmus sp.* e *N. oculata* foi respectivamente de 32,53 ± 5,89%, 18,43 ± 18,56%, 26,27 ± 18,03%, 9,68 ± 16,84% e 29,32 ± 17,76%.

O estudo da indução da produção de ROS apenas revelou diferenças significativas nas amostras de 2 dos 3 peixes estudados individualmente, destacando-se as microalgas *I. galbana* e *Scenedesmus sp.*. No entanto não houve diferenças significativas considerando a média dos 3 peixes, concluindo-se que os fagócitos reagem de forma diferente de peixe para peixe ao estímulo provocado por estas microalgas. Quanto à indução da produção de NO, apenas a *I. galbana* estimulou a sua produção.

Não foram observadas propriedades antibióticas nos extractos aquosos estudados, sobre *L. anguillarum* nem contra *P. damsela piscicida*.

Palavras – chave: microalgas; actividade antioxidante; actividade antimicrobiana; actividade quelante, *respiratory burst*.

Índice

	Pág.
1. Introdução	1
1.1. Aquacultura de dourada	1
1.2. Doenças infecciosas em aquacultura	4
1.2.1. Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS)	10
1.2.2. Espécies Reactivas de Azoto (RNS)	12
1.3. Combate a doenças infecciosas em aquacultura	12
1.4. Compostos bioactivos de origem natural	14
1.5. Microalgas	16
1.6. Compostos antioxidantes	17
2. Objectivos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Colheita de amostras	19
3.2. Preparação dos extractos	19
3.3. Isolamento de fagócitos do rim (<i>head kidney</i>)	19
3.3.1. Determinação da toxicidade dos extractos	21
3.3.2. Determinação da produção de óxido nítrico	21
3.3.3. Determinação da produção de ROS	21
3.4. Actividade antioxidante de DPPH	22
3.5. Actividade quelante de cobre	23
3.6. Actividade quelante de ferro	23
3.7. Actividade antimicrobiana	24
3.7.1. Origem das estirpes bacterianas	24
3.7.2. Curvas de crescimento	24
3.7.3. Antibiogramas	24
4. Resultados	26
4.1. Toxicidade dos extractos	26
4.1.1. Determinação da produção de óxido nítrico	26
4.1.2. Determinação do <i>respiratory burst activity</i>	28
4.3. Actividade antioxidante de DPPH	33
4.4. Actividade quelante de ferro	35
4.5. Actividade quelante de cobre	37

	Pág.
4.6. Actividade antibiótica	37
4.6.1. Antibiogramas	41
5. Discussão e Conclusão	44
6. Bibliografia	50

Lista de acrónimos

AND – Ácido Desoxirribonucleico.

DHA – Ácido Docosohexaenóico.

DMSO – Sulfóxido dimetílico ou *Dimethyl sulfoxide*.

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo.

EDTA – Ácido Etilenodiaminatetracético.

EPA – Ácido Eicosapentaenóico.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations.

HBSS – *Hank's Buffered Salt Solution*.

L-15 – Meio de cultura Leibovitz.

PMA – Acetato de forbolmiristato ou *Phorbol Myristate Acetate*.

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados ou *Poly Unsaturated Fatty Acids*.

RNS – Espécies reativas de azoto ou *Reactive Nitrogen Species*.

ROS – Espécies reativas de oxigénio ou *Reactive Oxygen Species*.

RSA – Actividade de captação de radicais livres ou *Radical Scavenging Activity*.

SBF – Soro Fetal de Bovino.

TA – Temperatura Ambiente.

TSA – Agar triptona de soja ou *Tryptone Soya Agar*.

TSB – Agar triptona de soja líquido ou *Tryptone Soya Broth*.

UA – Unidades de Absorvância.

USCB - United States Census Bureau.

1. Introdução

Nos últimos anos assistimos ao crescimento da população mundial, estimando-se que se ultrapasse os 7.000 milhões de habitantes em 2012 (USCB., 2011) e conseqüentemente, a uma necessidade de encontrar recursos em quantidade e qualidade suficientes para alimentar um tão vasto número de pessoas. Uma das formas de aumentar a quantidade de recursos disponíveis, nomeadamente a proveniente dos oceanos, é a aquacultura, processo esse que se tem desenvolvido rapidamente nas últimas décadas.

A indústria da aquacultura aumentou de forma significativa a sua importância como fonte de proteína animal para satisfazer a crescente procura dos mercados mundiais, tendo o seu crescimento quadruplicado nos últimos 20 anos (Naylor *et al.* 2000). O consumo de peixe em todo o mundo, em 2006, foi de cerca de 106 milhões de toneladas, entre os quais, apenas 43% provieram de aquacultura (FAO, 2007). Uma das razões para o aumento do consumo de peixe de aquacultura é o decréscimo dos *stocks* selvagens de muitas espécies devido ao impacte de diversas actividades humanas, entre as quais a pesca (Tidwell & Allan, 2001). O exemplo que melhor ilustra o sucesso e crescimento da aquacultura é o salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.), cuja produção em aquacultura supera largamente as capturas selvagens (Asche, 1996). Outra espécie produzida em grande quantidade em aquacultura, principalmente na região mediterrânica, é a dourada (*Sparus aurata* L.; fig. 1A). A dourada é uma espécie subtropical, da família Sparidae, cuja distribuição se estende desde o Mediterrâneo até às regiões costeiras da zona Este Atlântica, entre o Senegal e a Escócia (FishBase, 2011). Pode atingir um comprimento máximo de 70 cm e habita predominantemente a zona infralitoral, em fundos arenosos (Saldanha, 1997). A sua produção mundial em aquacultura ultrapassou as 120 mil toneladas em 2007, tendo este sido o ano de maior produção registado até à data (FAO, 2011).

1.1. Aquacultura de dourada

S. aurata (fig. 1A) é um peixe hermafrodita protândrico com desenvolvimento ovário assíncrono (Chavanne *et al.*, 2008) e os machos atingem a maturidade sexual por volta dos dois anos (20-30 cm). A escala temporal em que ocorre a alteração sexual de machos para fêmeas é incerta, embora geralmente ocorra ao fim de 1 a 2 anos de actividade do peixe como macho. Normalmente existe uma parte do cardume, tanto em

cativeiro com na Natureza em que alguns elementos não têm função sexual activa. A determinação sexual é importante quando se pretende obter casais para desova (Bruslé-Sicard & Fourcault, 1997).

O sistema de produção de dourada (fig. 2) inclui, em muitas instalações de aquacultura, grupos de reprodutores, embora estes também possam ser capturados na natureza. Após a desova, as larvas (fig. 1B) são mantidas em tanques de 600 a 10.000 litros (fig. 3A), alimentando-se endogenamente durante 3 a 4 dias. Após este período começam a alimentar-se de rotíferos, que são bioencapsulados com microalgas de perfil nutricional adequado. 10 dias pós eclosão começam a ser alimentadas com *nauplius* de *Artemia salina* até as larvas completarem a metamorfose. Durante o período em que é necessário fornecer alimento bioencapsulado noutros organismos, por norma são adicionadas microalgas à água do tanque as quais, para além de terem uma função nutritiva, também contribuem para a limpeza da água e fornecimento de oxigénio (Wittenrich, 2007; FAO, 2011).



Figura 1 – Dourada adulta (A) e larva de dourada (B). Fonte (A):

http://extra.istitutoveneto.it/venezia/divulgazione/pirelli/pirelli_2005_en/Banca_Dati_Ambientale/192.168.10.66/pirelli_new/divulgazione/valli/index9e43.html

Após o momento em que se começam a alimentar de compostos preparados, os juvenis são colocados em tanques progressivamente maiores (fig. 3B). Os juvenis de maiores dimensões podem ser mantidos em jaulas no oceano ou em lagoas de água salgada. O processo de produção de dourada em cativeiro demora cerca de um ano, altura em que os peixes atingem um peso de mercado de cerca de 300 a 400 g (FAO, 2011).

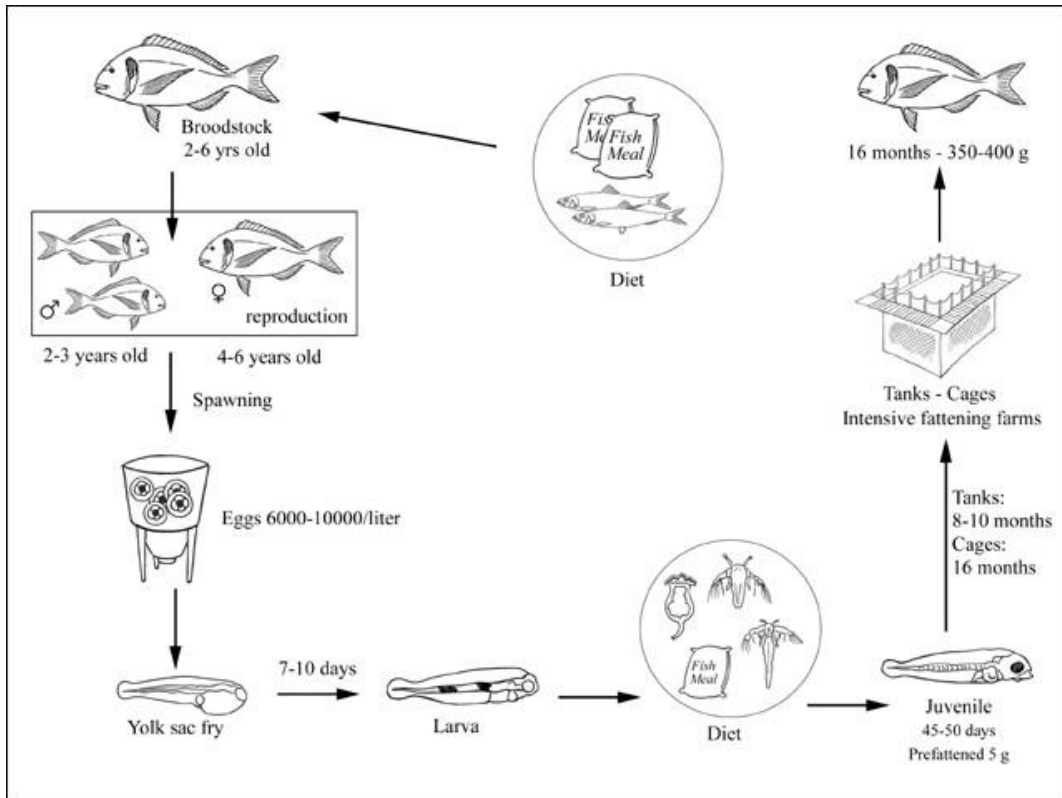


Figura 2 – Esquema do ciclo de cultivo de dourada e respectivas fases de desenvolvimento. Fonte: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en



Figura 3 – Tipos de tanques de cultivo de dourada, com um exemplo de tanque larvar (A) e *raceways* para crescimento de juvenis (B). Fonte: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en

1.2. Doenças infecciosas em aquacultura

Uma das maiores dificuldades que a aquacultura moderna enfrenta é a ocorrência de doenças infecciosas. A alta densidade de peixe mantida nos tanques e a elevada quantidade de matéria orgânica em suspensão e dissolvida resultante, criam um meio propício para o crescimento e transmissão de agentes patogénicos (Shoemaker *et al.*, 2000). As altas densidades de peixe conduzem a um aumento de *stress* a que os animais estão sujeitos, enfraquecendo o seu sistema imunológico (Moriarty, 1999).

A contínua exposição dos organismos a factores de *stress* vai portanto, diminuir a sua resistência a agentes patogénicos. A ocorrência de doenças infecciosas, na maioria das espécies cultivadas causa epizootias, ou seja, doenças contagiosas que atacam um número elevado de animais ao mesmo tempo e na mesma região e que se propagam com rapidez. A primeira bactéria a ser relacionada como causadora de doença em peixes foi a *Listonella (Vibrio) anguillarum*, em 1718 (Nygaard, 2006). Os agentes patogénicos mais comuns são as bactérias Gram-negativas *Aeromonas spp.* e *Vibrio spp.*. Estes dois géneros pertencem à família Vibrionaceae e causam grande mortalidade em instalações de aquacultura devido à alta densidade de *stock* em instalações confinadas. *Aeromonas spp.* contaminam preferencialmente peixes de água doce, enquanto o *Vibrio spp.* causa maior contaminação em peixes de água salgada. As espécies descritas de *Vibrio* incluem *V. (Listonella) anguillarum*, *V. ordalli*, *V. damsela*, *V. carchariae*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* e *V. salmonicida* (Reed & Francis-Floyd, 1996), entre muitas outras.

Os oomicetos *Saprolegnia parasitica* e os fungos *Fusarium spp.* são o segundo tipo de infecção mais comum, sendo particularmente vulneráveis a elas os crustáceos decápodes e o salmão (*Salmo sp.*, Pottinger & Day, 1999; Subasinghe *et al.*, 2000).

As bactérias Gram-positivas do género *Streptococcus* afectam maioritariamente espécies de água doce, como por exemplo a tilápia (*Oreochromis spp.* Shoemaker *et al.*, 2000). Outro agente patogénico que tem causado zoonoses graves em diversas espécies de peixe, como por exemplo a *Solea senegalensis* K., é a bactéria *Photobacterium damsela piscicida*, antes designada por *Pasteurella piscicida* (Zorrilla *et al.*, 1999; Arijó *et al.*, 2005). A doença causada pelo *P. damsela piscicida* caracteriza-se pela presença de nódulos brancos nos órgãos internos, normalmente nos rins e baço, e feridas na pele. A mortalidade da *S. senegalensis* é particularmente elevada quando a temperatura da água ultrapassa os 18°C (Díaz-Rosales, 2007).

Relativamente à produção de dourada, os agentes patogénicos mais frequentes são: *Vibrio* (ou *Listonella*) *aguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harvey* e *V. splendidus* – causadores de vibriose; *Photobacterium damsela piscicida* – causador de pasteureólise ou pseudotuberculose; *Pseudomonas fluorescens* – causador de septicémia; *Flexibacter spp.* – causadoras de necrose, peritite cranial e vertebral e *Aeromonas spp.* causadoras de furunculose (Balebona, 1998). Na Tabela 1 encontram-se resumidas as doenças que mais afectam a dourada de aquacultura.

Devido às perdas económicas associadas à prevenção e tratamento de infecções, impactos ambientais sobre os ecossistemas e questões de segurança humana, os vários agentes patogénicos referidos são alvo de grande preocupação para a indústria da aquacultura. Uma vez que alguns destes patógenos como o *Vibrio spp.* (Blake *et al.* 1979), *Aeromonas spp.* (Gracey *et al.*, 1982) e *Streptococcus spp.* (Appelbaum, 1992) são potenciais transmissores de zoonoses, ou seja, podem contagiar o ser humano, sendo necessário garantir a segurança dos produtos de aquacultura de forma a não colocar em risco a saúde pública. O *Vibrio spp.* em particular, é transmissível por consumo de peixe ou marisco infectado podendo causar gastroenterite (Ottaviani *et al.*, 2010), septicémia (Anderson *et al.*, 2004) e cólera (Jain *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Doenças que mais afectam a dourada e respectivas medidas de controlo

(Fonte: FAO, 2011)

Doença	Agente	Tipo	Síndrome	Medidas
Pasteurólise ou Pseudo tuberculose	<i>Photobacterium damsela</i> <i>piscicida</i>	Bactéria Gram -	Anorexia; necrose das brânquias	Vacinação de reprodutores e juvenis; Uso de imunoestimulantes e tratamentos vitamínicos; antibióticos; desinfecção da água
Vibriose	<i>Photobacterium damsela</i> <i>damsela</i>	Bactéria Gram -	Pele escura; letargia; abdómen distendido; hemorragias	Evitar alimentos com alto teor lipídico; antibióticos; desinfecção da água
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Bactéria Gram -	Hemorragias; pele escura; lesões na pele	Antibióticos; desinfecção da água
	<i>Vibrio (Listonella) anguillarum</i>	Bactéria Gram -	Letargia; anorexia; cabeça em posição descendente	Antibióticos; desinfecção da água
Linfocistes	<i>Iridoviridae</i>	Vírus	Pseudo tumor branco	Reduzir a alimentação; reduzir a biomassa

Contudo, e sendo em primeiro lugar agentes patogénicos de organismos marinhos, estes parasitas podem afectar as populações selvagens de diversas espécies, e não só os organismos directamente relacionados com o *stock* de criação. Como exemplo, a bactéria *A. salmonicida*, tem a capacidade de infectar a maioria dos salmonídeos, podendo infectar também muitas outras espécies de peixe, tais como *Carassius auratus auratus*, *Salvelinus fontinalis* M., *Thymallus thymallus* L., *Coregonus spp.*, *Lota lota* L. e *Leuciscus leuciscus* L. (Austin, 1993; Hirvelä-Koski,

2005). Daí o perigo da ocorrência de surtos de agentes patogénicos em instalações de aquacultura, transmissíveis pela água, que podem contaminar todo o ecossistema envolvente. Problemas deste género podem ainda ser disseminados de forma mais ampla quando ocorrem fugas de peixes infectados para o meio selvagem. Registos de problemas deste género já causaram declínios graves, ou mesmo a extinção de populações isoladas que tinham defesas reduzidas contra estirpes de agentes patogénicos aos quais nunca tinham sido expostas (Heggberget *et al.* 1993). Alguns exemplos disto incluem a extinção de 30 populações de salmão por contaminação com Plelmintes *Gyrodactylus salaris*, mortalidade de salmão adulto selvagem por contaminação com furunculose (Heggberget *et al.* 1993) ou o contágio por parasitas dos género *Bothriocephalus spp.*, normalmente presente na carpa chinesa *Hypophthalmichthys molitrix* e endémica do rio Amur, na China, mas que actualmente se encontra disseminada por todo o mundo devido ao comércio de ciprinídeos para aquacultura (Boomker *et al.*, 1980). Por todas estas razões torna-se essencial evitar a ocorrência de doenças em peixes de aquacultura.

1.2. Sistema imunitário dos peixes

O sistema imunitário protege o organismo contra doenças, identificando e eliminando os agentes patogénicos e combatendo o desenvolvimento de tumores (Shankaran *et al.*, 2001). Outra função importante do sistema imunitário consiste em participar no processo que mantém a homeostasia durante o processo de crescimento do organismo após a reacção a uma resposta inflamatória ou danos nos tecidos lesados (Magnadotir, 2010).

A organização anatómica do sistema linfóide dos peixes teleósteos (fig. 4) inclui o timo, rim cefálico (*head kidney*), baço e a mucosa associada ao tecido do sistema linfóide (Iwama & Nakanishi, 1996). Os peixes dependem de mecanismos de defesa, específicos ou adaptativos e não específicos, também designados de inatos, que os protegem de agentes patogénicos, incluindo bactérias, vírus e outros parasitas (Iwana & Nakanishi, 1996). Embora ambos os sistemas imunitários inato e adaptativo tenham mecanismos de protecção contra organismos invasores, diferem de várias formas. O sistema imunitário adaptativo necessita de algum tempo para reagir contra o organismo invasor da primeira vez que o detecta no organismo, enquanto o sistema imunitário

inato inclui sistemas de defesa que, na sua maioria, estão sempre presentes e prontos para serem mobilizados em caso de infecção.

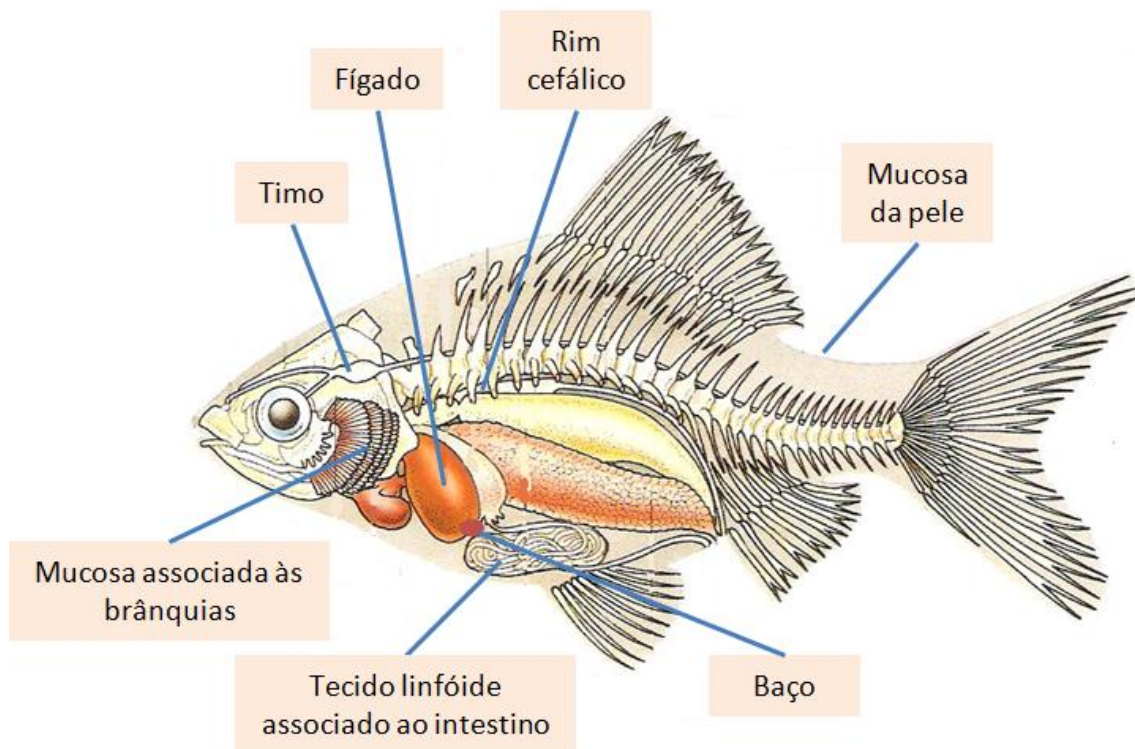


Figura 4 - Estruturas do sistema imunitário de um peixe teleosteo, fêmea. Adaptado de Scott (1996).

O sistema imunitário adaptativo é específico para um antígeno e reage apenas contra o organismo que induz a sua resposta. Pelo contrário, o sistema imunitário inato não é específico para um antígeno e reage da mesma forma para uma grande variedade de organismos. O sistema adaptativo também possui memória imunológica, ou seja, reconhece um organismo invasor, ou uma das suas moléculas, que tenham entrado em contacto com células desse sistema reagindo mais rapidamente à exposição posterior ao mesmo organismo. Pelo contrário, o sistema imunitário inato não possui memória imunológica, daí não ter capacidade de desencadear mecanismos de defesa mais eficazes e rápidos em caso de exposições subsequentes ao mesmo agente como o adaptativo (Iwama & Nakanishi, 1996).

O conjunto de órgãos do sistema imune dos peixes é menos complexo que o dos mamíferos, tendo um potencial de resposta mais limitado para combater invasões por agentes patogénicos, daí a maior importância do sistema inato dos peixes (Tort *et al.*, 2003). Comparativamente aos mamíferos, os peixes têm menor afinidade para

anticorpos e daí uma menor resposta contra esses anticorpos, possuem também uma memória imunitária mais fraca. Por outro lado, possuem tecido linfóide associado à pele, brânquias e intestino que protegem os peixes contra agentes patogénicos. A epiderme dos peixes está repleta de secreções, proteínas antimicrobianas, lisozimas, fosfatases e tripsina, embora a sua quantidade e actividade varie entre espécies (Fast *et al.*, 2002).

Nos peixes é de salientar a importância da zona anterior do rim, *head kidney*, que não tem função renal (Zapata 1981) e contém uma grande quantidade de tecido linfóide (Iwama & Nakanishi, 1996).

O sistema imunitário inato é dividido em três constituintes: epitélios e mucosas, constituintes humorais e componentes celulares. Os epitélios são barreiras físicas contra agentes invasores enquanto que as mucosas são barreiras físicas e químicas. Os constituintes humorais ganham importância quando as barreiras físicas são rompidas e ocorre infecção, dando início ao processo inflamatório. Os factores humorais estão presentes no soro embora também possam ser formados no local da infecção e incluem o sistema complemento, o sistema de coagulação (Magnadottir, 2010) e lectinas que actuam como aglutininas de bactérias (Russell & Lumsden 2005). Os peixes também têm células citotóxicas não-específicas que atacam tumores, acreditando-se que sejam os equivalentes às células *natural killers* dos mamíferos (Ellis, 2001; Fischer *et al.*, 2006).

O sistema imunitário inato inclui componentes celulares, das quais se destacam as células fagocíticas. Os fagócitos são células que fazem parte do sistema de imunidade inato e, como o próprio nome indica, fagocitam vírus invasores, inactivando-os intracelularmente e contribuindo para a regeneração dos tecidos afectados por uma infecção. As principais células do sistema imunitário inato dos peixes são os neutrófilos (granulócitos; fig. 5A) e os monócitos/macrófagos (fig. 5B), todas células fagocíticas (Magnadottir, 2010). Estas células podem ser extraídas do organismo e ser cultivadas em laboratório, de forma a estudar as suas diversas propriedades (Ortuño *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Díaz-Rosales *et al.*, 2007). Na prática, a forma mais simples de separar fagócitos dos outros componentes celulares é fazer uma centrifugação por gradiente de densidade com Percoll (Blaxhall & Hood, 1985; Secombes *et al.*, 1990; Chung & Secombes, 1988 *in* Novoa *et al.*, 1996). É fácil purificar o meio de forma a termos apenas fagócitos pois como têm grande capacidade

de aderência a superfícies, basta deixar as células em repouso por algumas horas e estas assentam no fundo da placa de cultivo. Ao aderirem à superfície permitem-nos eliminar o sobrenadante e realizar algumas lavagens de forma a eliminar contaminantes, permanecendo os fagócitos sempre aderentes ao fundo (Secombes, 1990; Lamas & Ellis, 1994; Iwama & Nakanishi, 1996).

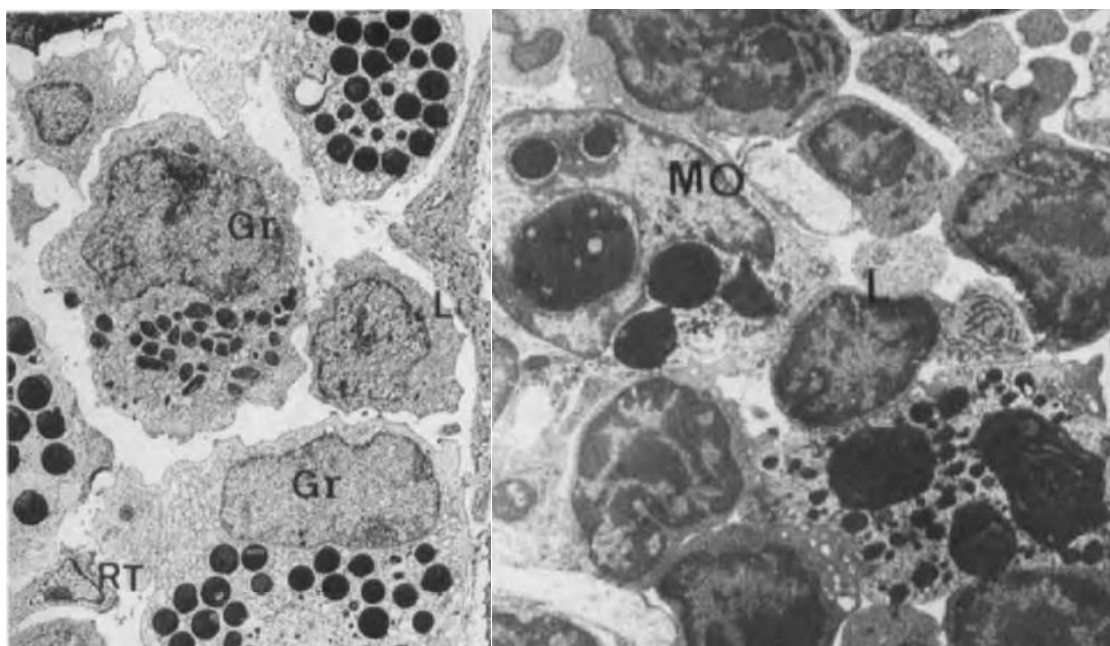


Figura 5 - A: Granulócitos (Gr) e células linfóides (L) no órgão de Leydig, de uma *Raja radiata*, 3500x. B: Macrófago (MO) envolto por clusters de tecido linfóide meningeal de *Triakis scyllia*. Fonte: Iwama & Nakanishi, 1996.

1.2.1. Espécies reativas de oxigénio (ROS)

Os fagócitos têm a capacidade de destruir agentes patogénicos, intracelularmente, usando uma série de mecanismos, que usualmente são designados como dependentes ou independentes de oxigénio (Secombes *in* Iwama & Nakanishi, 1996). Quando são fagocitadas partículas, ocorre um aumento do consumo de oxigénio independente da respiração mitocondrial e da glicólise, conduzindo à produção de óxido nítrico e a espécies reativas de oxigénio (ROS do inglês *reactive oxygen species*; Secombes & Fletcher, 1992), como por exemplo radical o anião superóxido O_2^- , radical hidroxilo $HO\bullet$, radical hidroperoxilo $HO_2\bullet$, peróxido de hidrogénio H_2O_2 , ácido hipobromoso $HOBr$ ou ozono O_3 (Cadenas & parker, 2002). É a este processo que se dá o nome de *respiratory burst* (Nagelkerke *et al.*, 1990). De acordo com Hardie *et al.*

(1996), o O_2^- produzido por fagócitos de peixe não é particularmente tóxico para agentes bacterianos patogénicos, mas o peróxido de hidrogénio e os seus derivados são, tendo um papel importante no hospedeiro contra agentes patogénicos (Castro *et al.*, 2004). Daí a importância do seu estudo para o combate a doenças em aquacultura.

Por outro lado, após a fagocitose é necessário eliminar as espécies reactivas de oxigénio, pois algumas delas, como o anião superóxido, têm um tempo de vida relativamente longo, apresentando a capacidade de se deslocar para o espaço extracelular (Kontos *et al.*, 1985) e, até certo ponto, as espécies reactivas de oxigénio também são tóxicas para os organismos onde são produzidas. Ao serem libertadas pelos fagócitos podem causar danos a compostos bioquímicos sensíveis no espaço intracelular. Essas lesões são causadas por lipoperoxidação, proteólise ou degradação de ADN (Weiss, 1989). É devido a este perigo que existem actualmente vários estudos sobre antioxidantes, de forma a encontrar formas de proteger os organismos quando afectados por excesso de produção de espécies reactivas de oxigénio (Secombes, 1990; Brand-William *et al.*, 1995; Tocher *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2010).

O balanço entre a produção de ROS e de antioxidantes determina o grau de *stress* oxidativo. Os antioxidantes são, como o nome indica, moléculas com capacidade de reagir com outros compostos impedindo a oxidação de substâncias. A produção de ROS tem sido associada ao envelhecimento celular, respostas a *stress* e proliferação de cancro, ou seja, a produção de ROS pode ser benéfica em determinadas situações, como a invasão do organismo por agentes patogénicos, mas se essa produção for excessiva também pode ser prejudicial ao organismo. Contudo, a capacidade das ROS induzirem danos e morte celular tem vindo a ser explorada como tratamento de células cancerígenas, através de mecanismos mediados por radicais livres (Villamor, 2004).

De acordo com Secombes (1996) e Neumann *et al.* (2001) os macrófagos e neutrófilos dos peixes também produzem espécies reactivas de oxigénio durante o processo de *respiratory burst*, em concreto o radical anião superóxido (O_2^-), sendo isto associado a uma capacidade dos fagócitos eliminarem agentes patogénicos bacterianos, por esse anião ser tóxico para bactérias patogénicas (Hardie *et al.*, 1996; Campos-Pérez *et al.*, 1997). Um exemplo de espécies vulneráveis a radicais oxidativos é a bactéria *P. damselae piscicida* (Skarmeta *et al.*, 1995; Barnes *et al.*, 1999).

Algumas reacções de oxidação-redução com metais como intervenientes, tais como ferro e cobre, também podem potenciar o *stress* oxidativo. O ferro é

particularmente relevante neste aspecto, uma vez que através da reação descrita por Haber-Weiss/Fenton gera radicais hidroxilo por reação do íon ferro II com peróxido de hidrogénio, seguindo-se uma série de reacções que geram mais ROS (Koppenol, 2000). O ferro tem também relevância relativamente à proliferação de bactérias na água, uma vez que é essencial para o seu desenvolvimento (Tort *et al.*, 2003). Assim torna-se importante reduzir os níveis deste composto na água para valores o mais próximo de zero possível quando ocorre algum surto bacteriano.

1.2.2. Espécies reactivas de azoto (RNS *reactive nitrogen species*)

Também algumas moléculas reactivas compostas por azoto têm a capacidade de destruir agentes patogénicos (Secombes, 1990). Estas moléculas são também produzidas por fagócitos de peixe e têm actividade biocida sobre agentes patogénicos (Scott *et al.*, 1985) e células cancerígenas (Hibbs Jr., 1991). O radical livre NO• é considerado a primeira molécula efectora citotóxica contra agentes patogénicos, embora compostos como os iões nitrito e nitrato, as nitrosaminas (Iyengar *et al.*, 1987) e o peroxinitrito [ONOO⁻] sejam mais tóxicas (Zhu *et al.*, 1992). O NO• pode reagir inclusive, com o íon superóxido, formando peroxinitrito que causa nitratação de proteínas e danos celulares (Beckman, 1990 *in* Tiravanti *et al.*, 2004). A toxicidade induzida por NO• é um mecanismo antimicrobiano atribuído preferencialmente a macrófagos, embora os neutrófilos também possam ser estimulados a produzir esta molécula (Evans *et al.*, 1996). Uma das moléculas que induz produção de NO• em macrófagos de peixe é a transferrina, que é uma proteína serológica (Stafford *et al.* 2001), considerada como uma forma primitiva de imunorregulação do sistema inato e em particular, de funções anti microbiológicas de macrófagos (Neumann *et al.*, 2001).

Contudo, o óxido nítrico é um importante sinalizador de muitos processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação, inibição da agregação de plaquetas e neurotransmissão (Moncada, 1997 *in* Tiravanti *et al.*, 2004).

1.3. Combate a doenças infecciosas em aquacultura

De forma a evitar e combater agentes patogénicos em instalações de aquacultura, recorria-se muitas vezes a antibióticos e produtos químicos (tab. 1). Nos anos 80 a aquacultura de salmão norueguesa sofreu um surto de vibriose que só não levou ao

colapso desta indústria porque se utilizaram grandes quantidades de antibióticos (Sommerset *et al.*, 2005).

O uso de antibióticos era prática comum, não só para tratar surtos de doença como também em tratamento profilático, sendo também usados como promotores de crescimento. A sua utilização era vista como uma alternativa mais económica que a aplicação de medidas adicionais de higiene e a redução da densidade de *stock* (Grave *et al.*, 1996).

Segundo Hansen *et al.* (1992), alguns dos antibióticos mais utilizados como as quinolonas (ácido oxálico e flumequina) e a oxitetraciclina não são facilmente biodegradáveis, podendo permanecer activos por longos períodos de tempo no sedimento e são bioacumuláveis nos tecidos do *stock* criado e de outros organismos que contactem com este. A utilização excessiva de antibióticos pode conduzir ao desenvolvimento de bactérias resistentes a esses antibióticos, sendo necessário doses cada vez maiores para controlar os seus surtos (Gudding *et al.*, 1999). Uma das razões para as bactérias poderem potencialmente tornar-se patogénicas para o ser humano deve-se ao desenvolvimento do armamento metabólico das bactérias resistentes poder ser transmitido, por meio de transferência horizontal de genes, para os ecossistemas terrestres (Kruse & Sorum, 1994).

De forma a evitar os problemas causados pela utilização excessiva de antibióticos, a União Europeia proibiu a sua utilização como promotores de crescimento em todos os produtos para alimentação humana, a 1 de Janeiro de 2006 (IP/05/1687 Brussels, 22 December 2005). Devido a esta decisão a indústria da aquacultura tem vindo a desenvolver esforços que permitam encontrar alternativas à utilização de antibióticos.

Nalguns sistemas de piscicultura já se recorre à vacinação, podendo este método ser utilizado em situações de surto infeccioso (Iwama & Nakanishi, 1996), ou como tratamento profilático para larvas, sendo a vacinação dada aos progenitores antes do processo de fecundação (Hanif *et al.*, 2005). Apesar da importância dos crustáceos, moluscos e algas marinhas a nível da produção mundial em aquacultura, estes organismos não possuem um sistema imunológico específico e adaptado o que torna impossível a utilização de vacinas. É no cultivo de peixe que a vacinação toma particular importância. Um exemplo da sua importância foi a imersão de peixes em vacinas baseadas em meio de cultura inactivo de formalina se ter revelado eficaz no

controlo de surtos de vibriose, nos E.U.A. na década de 1970 e na Noruega na década de 1980 (Sommerset *et al.*, 2006). A eficácia da vacinação resultou na maior recorrência a este tipo de tratamento em detrimento dos antibióticos (Sommerset *et al.*, 2005). Segundo Sommerset *et al.* (2006), as vacinas utilizadas actualmente em aquacultura são produzidas por grandes empresas, tais como Intervet International (Holandesa), Novartis Animal Health (Suíça), Schering Plough Animal Health (E.U.A.), Pharmaq (Norueguesa) e Bayer Animal Health (Bayotek)/Microtek. Inc. (Alemã/Canadiana).

As terapias alternativas à utilização de antibióticos, tais como a vacinação intravenosa (Antipa *et al.*, 1980) e por imersão (Gould, 1978), a utilização de extractos de angiospérmicas terrestres (Ardo *et al.*, 2008), algas (Bansemir *et al.*, 2006) e microalgas marinhas (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2006) constituem um novo ramo da aquacultura e têm demonstrado resultados promissores.

1.4. Compostos bioactivos de origem natural

A saúde dos peixes de aquacultura pode ser melhorada sem o recurso a compostos artificiais. Existe a possibilidade de recorrer a substâncias biologicamente activas, presentes em algas, microalgas e plantas superiores, como eventuais substitutos de produtos químicos usados actualmente, uma vez que algumas das biomoléculas presentes nestes organismos têm demonstrado possuir propriedades imunoestimulantes, antibióticas (Bansemir *et al.*, 2006; Ardo *et al.*, 2008) e antioxidantes (Custódio *et al.*, 2012). As biomoléculas em causa não causam impacto ambiental e podem ser incorporadas em alimento vivo, congelado ou em rações (Sagdiç & Özcan, 2003). A diversidade de algas e plantas é tal que existe um potencial enorme de encontrar novos compostos biologicamente activos com propriedades interessantes e utilizáveis.

As plantas terrestres são usadas à milénios para prevenir e tratar doenças humanas (Choudhary *et al.*, 2007;. Kapil & Sharma, 1997;. Nascimento *et al.*, 2000). E muitas plantas aparentam ter potencial para utilização em aquacultura, devido às suas várias propriedades. Ardo *et al.*(2008) verificaram que ao incorporar extractos de *Astragalus membranaceus* e *Lonicera japonica* no alimento de tilápia do Nilo, ocorria um estímulo da fagocitose e do *respiratory burst* das células fagocíticas do sangue. Também Rao *et al.* (2006) e Mohamad & Abrasali (2010) demonstraram a ocorrência do aumento da produção do anião superóxido por leucócitos de peixes, após

alimentação com extractos de *Achyranthes aspera* e *Inula helenium*, *Tussilago farfara*, *Brassica nigra*, *Ichinacea purpurea* e *Chelidonium majus*.

As algas são uma importante de compostos bioactivos, por terem a capacidade de produzir metabolitos secundários com grande espectro de actividades biológicas. Foram detectados em tecidos de algas verdes, vermelhas ou castanhas compostos com actividade antiviral, antifúngica, citostática, vermífuga, antibacteriana e antioxidante (Lindequist & Schweder, 2001; Newman *et al.*, 2003). Vários autores descreveram também a existência de actividade inibitória de compostos presentes em macroalgas, contra agentes patogénicos humanos, fúngicos e leveduras, embora apenas alguns tenham demonstrado os efeitos contra agentes patogénicos piscícolas (Sridhar & Vidyavathi, 1991; Mahasneh *et al.*, 1995; Val *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2003). Contudo, diversos compostos extraídos de macroalgas podem actuar como imunoestimulantes para algumas espécies de peixe, destacando-se os polissacarídeos (Fujiki *et al.*, 1997). Um bom exemplo é a carragenina, abundante em determinadas algas vermelhas, particularmente na espécie *Chondrus crispus*, que induziu um aumento da actividade fagocítica de macrófagos e de resistência contra infecções bacterianas, após ter sido injectada em carpas da espécie *Cyprinus carpio* (Fujiki *et al.*, 1997). Outro exemplo é o composto *fucoïdan*, extraído da alga castanha *Sargassum polycystum*, que tem propriedades antibacterianas (Chotigeat *et al.*, 2004). Segundo Bansemir *et al.* (2006), os extractos de 26 espécies de algas em cultivo, preparados usando solventes orgânicos com diferentes polaridades (diclorometano, metanol e água), aparentaram ser uma fonte interessante de compostos biologicamente activos, podendo ser utilizados no tratamento profilático e terapêutico de doenças infecciosas em peixes. Também Castro *et al.* (2004) estudaram a actividade metabólica de fagócitos de *Scophthalmus maximus* que, quando expostos a extractos aquosos de *Ulva rigida*, *Enteromorpha sp.* e *Chondrus crispus*, revelaram uma indução no aumento da actividade oxidativa celular, estando essas propriedades imunoestimulantes associadas a polissacarídeos.

As algas também possuem propriedades antioxidantes, com potencial interesse para dietas de peixes de aquacultura. Entre os compostos antioxidantes existentes nas algas destaca-se o α -tocoferol, uma biomolécula sintetizada apenas por organismos fotossintéticos (Gómez-Coronado *et al.*, 2004), tendo também uma função transportadora de electrões e ainda relacionada com a permeabilidade de membranas, por realizar a estabilização da membrana celular (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003). O

resultado da sua introdução em dietas de peixes de aquacultura é um melhor crescimento e saúde do *stock* (Tocher *et al.*, 2002).

1.5. Microalgas

As microalgas são “algas” microscópicas encontradas vulgarmente em ambientes marinhos ou de água doce. Tanto podem existir sob forma unicelular como em grupos ou cadeias. A sua biodiversidade é enorme, estimando-se que existam entre 200.000 a 800.000 espécies, tendo sido descritas apenas 15.000 (Cardozo *et al.*, 2007). Segundo Cardozo *et al.* (2007), foram identificados quimicamente mais de 15.000 compostos originários de algas. É nesta característica que as microalgas ganham particular importância, uma vez que produzem compostos únicos como alguns carotenóides, antioxidantes, ácidos gordos, enzimas polímeros, péptidos, tóxicos e esteróis.

As microalgas são um dos alimentos essenciais para diversos organismos marinhos criados em cativeiro. São altamente nutritivas, devido ao seu elevado teor em PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acids* ou ácidos gordos polinsaturados), especialmente em ácido eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA), ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) e ácido docosohexaenóico (22:6n-3, DHA; Brown *et al.*, 1997; Natrah *et al.*, 2007). Devido ao seu perfil nutricional, estas têm igualmente uma elevada importância na alimentação de larvas de peixe (Becker, 2004; Wittenrich, 2007), e de bivalves e crustáceos filtradores (Wikfors *et al.*, 1996).

As microalgas podem ser adicionadas directamente à água (método de água “verde”) ou bioencapsuladas noutros organismos tais como rotíferos e artémia, actuando estes como transportadores dos nutrientes das microalgas para o predador final (Wittenrich, 2007). Pode-se bioencapsular no mesmo organismo várias espécies de microalgas, fornecendo assim maior variedade nutricional ao consumidor das mesmas (Wittenrich, 2007). Destacam-se, pelo seu conteúdo em lípidos essenciais para os peixes, os seguintes géneros de microalgas: *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* e *Tetraselmis* (López *et al.*, 1994; Lourenço *et al.*, 1997; Chen, 2001; Krienitz & Wirth, 2006). Para além do seu valor como alimento larvar, as microalgas também têm sido alvo de estudos sobre a sua aplicação na produção de biocombustível (Koberg *et al.* 2011) e na fixação de carbono (Hsueh *et al.*, 2009).

Uma das espécies mais usadas para a alimentação de bivalves e larvas de peixe é a microalga *I. galbana* clone *Tahiti*, vulgarmente designada por T-iso. A *I. galbana* é uma alga marinha rica em DHA, produzindo igualmente EPA, embora em menores concentrações (López *et al.*, 1994).

A *N. oculata* contém um elevado teor de EPA (Zittelli *et al.*, 1999; Tonon *et al.*, 2002), sendo um excelente complemento à alimentação larvar com T-iso. Uma das propriedades que esta espécie possui é a possibilidade de produção de α -tocoferol, um composto com alto poder antioxidante (Durmaz, 2007). Também as microalgas do género *Tetraselmis* têm capacidade de produzir este composto (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003), sendo também utilizadas em aquacultura como alimento de *Artemia salina*, bivalves, crustáceos e corais (Eirik *et al.*, 1998) devido ao seu alto teor de proteína, prolina, carotenóides e glícidos (Ghezelbash *et al.*, 2008).

A espécie *Botryococcus braunii* é uma microalga colonial de água doce que tem sido estudada como fonte de biocombustível devido ao seu alto teor em hidrocarbonetos líquidos, designados por botriocucenos (Samorì *et al.*, 2010) e lípidos (Metzger & Casadevall, 1992), tendo inclusivé sido estudada como fonte de compostos para máscaras de beleza (Mendes *et al.*, 2003).

As microalgas têm mostrado potencial para diversas aplicações, sendo já utilizadas em aquacultura à várias décadas. Como referido anteriormente, são fontes naturais de lípidos, entre eles ácidos gordos essenciais, proteínas, hidrocarbonetos, vitaminas (Becker, 2004), clorofila e carotenóides. São utilizadas para produzir diversos produtos cosméticos. Contudo, as microalgas ainda não são um grupo muito estudado, de um ponto de vista biotecnológico. Fazendo um paralelismo com as macroalgas e por estudos já realizados com microalgas, elas revelam potencial para diversas aplicações, entre elas a produção de compostos imunoestimulantes (Mendes *et al.*, 2003) e antioxidantes (Custódio *et al.*, 2012).

1.6. Compostos antioxidantes

Como referido anteriormente é necessário encontrar formas que protejam os organismos quando afectados por excesso de produção de espécies reactivas de oxigénio.

A característica principal dos antioxidantes é a sua capacidade de capturar electrões desemparelhados dos radicais livres. Os antioxidantes como ácidos fenólicos,

polifenóis e flavonóides, podem reagir com os radicais livres tais como peróxido e hiperperóxido, inibindo os mecanismos oxidativos que conduzem a doenças degenerativas graves. Diversos estudos sobre a actividade de captura de radicais livres concluíram que os antioxidantes presentes em diversos alimentos reduzem a incidência de doenças crónicas como cancro (Eichholzer *et al.*, 1999; Villamor, 2004) e doenças cardiovasculares (Sato *et al.*, 1990; Todd *et al.*, 1995). Como exemplo de compostos antioxidantes temos a vitamina C, vitamina E, carotenóides, polifenóis e flavonóides. Estes compostos estão presentes em frutas, na couve, bróculos e couve-flor (Sikora *et al.*, 2008), cenoura (Badr & Mahmoud, 2011), chá verde e preto, em vinhos e especiarias, entre outros (Cadenas e Packer, 2002). Os antioxidantes são por isso utilizados tanto pela indústria alimentar como na indústria farmacológica para retardar o processo de oxidação (Halliwell *in* Cadenas & Paker, 2002).

Sendo as microalgas uma fonte destes compostos, é importante realizar estudos que visem detectar a sua presença no maior número de espécies de microalgas possível e futuramente, detectar exactamente que compostos as constituem.

2. Objectivos

Actualmente sabe-se que diversos produtos químicos derivados de micro e macroalgas e de plantas terrestres podem alterar a actividade de determinados componentes do sistema imunitário dos peixes, aumentando a protecção contra algumas doenças. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos que os extractos completos ou fraccionados de microalgas têm sobre o sistema imunitário dos peixes, extractos esses que podem conter compostos bioquímicos com propriedades imuno-modulatórias. Neste contexto, os objectivos deste estudo incluíram: 1) a avaliação dos efeitos de extractos aquosos de cinco espécies de microalgas (*T. chuii*, *I. galbana* clone Tahiti, *N. oculata*, *Scenedesmus sp.* e *B. braunii*) sobre o *respiratory burst* de fagócitos de *Sparus aurata*; 2) a determinação da actividade antioxidante dos extractos aquosos pelo método DPPH e actividade quelante sobre Fe^{2+} e Cu^{2+} e 3) a determinação da capacidade antimicrobiana de extractos aquosos e também de extractos de hexano, acetona e éter dietílico sobre três espécies de bactérias Gram -, nomeadamente *Listonella (Vibrio) anguillarum*, *Vibrio fischeri* e *Photobacterium damsela piscicida*.

3. Materiais e Métodos

Neste trabalho foram utilizadas cinco espécies de microalgas, nomeadamente *I. galbana* clone Tahiti, vulgarmente designada por T-iso; *T. chuii*; *B. braunii*; *Scenedesmus sp.* e *N. oculata*. A metodologia utilizada e os reagentes usados foram iguais para todas as espécies descritas.

3.1. Colheita de amostras

As microalgas utilizadas neste estudo foram fornecidas pela empresa NECTON S.A., sob a forma de pasta congelada. Esta foi posteriormente liofilizada e preservada a -20°C.

3.2. Preparação de extractos

Nos ensaios de actividade antioxidante e de imunoestimulação foram realizados extractos em HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*, Sigma-Aldrich®), de forma a manter um pH e balanço osmótico apropriado para a manutenção dos fagócitos. Para a realização dos extractos das microalgas, a biomassa (1g) foi homogeneizada com 10 mL de HBSS, num agitador vortex e os extractos centrifugados (10 min., 10 000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi recolhido, filtrado com papel de filtro Whatman nº4, liofilizado e mantido a -20°C.

Nos ensaios de actividade antibiótica também foram utilizados extractos orgânicos e não orgânicos, os quais foram preparados do seguinte modo: as amostras de microalga (1g) foram homogeneizadas em 10 mL de hexano, os extractos foram centrifugados e o sobrenadante recolhido. Repetiu-se este procedimento 3 vezes e o sobrenadante foi recolhido e filtrado (Whatman nº4). Seguidamente, o resíduo foi sequencialmente extraído com éter e acetato de etilo, por um processo semelhante ao descrito para o hexano. Os extractos foram secos a baixa pressão, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos a 4°C.

3.3. Isolamento de fagócitos do rim (ou *head kidney*)

Utilizaram-se juvenis de *S. aurata*, com cerca de 100g, como material biológico, provenientes da estação experimental de aquacultura da Universidade do Algarve “Ramalhete” (Faro) e mantidos na estação experimental de Gambelas (LEOA). Os peixes

foram abatidos por dose letal de 2-fenoxietanol (60µg/L) de acordo com o trabalho de Ortuño *et al.* (2002).

O isolamento de fagócitos do *head kidney* foi adaptado de acordo com Secombes *et al.* (1990). Durante o isolamento do *head kidney*, o peixe foi mantido num recipiente com gelo e todo o trabalho foi feito em câmara de fluxo laminar. Inicialmente, foi extraída a maior quantidade possível de sangue do peixe, para evitar a contaminação do *head kidney* com células sanguíneas. O peixe foi então aberto e os órgãos internos ventrais removidos de forma a aceder ao *head kidney*. Este último foi retirado e colocado num suporte com filtro de *nylon*, com porosidade de 150 µm de diâmetro, macerado e lavado com meio de cultura Leibovitz (L-15, Sigma-Aldrich®) suplementado com 2% de soro fetal de bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) e 20 U/mL de heparina. A suspensão celular resultante dessa filtração foi colocada num *falcon* de 15 mL com Percoll 51 % (v/v, em água destilada, Sigma-Aldrich®), para separação celular por gradiente descontínuo. Após centrifugação (500 g, 4°C, 15 min), a camada de células resultante foi recolhida, colocada num novo *falcon* de 15 mL e lavada 2 vezes com meio de cultura L-15 suplementado com 0,1% de SBF e finalmente adicionou-se L-15 com 0,1% de SBF de forma a perfazer um volume total final de 1 mL.

A concentração de fagócitos foi verificada em câmara de Neubauer com solução de azul de tripano (0,4% p/v). O método consiste em adicionar azul de tripano (450 µL) à amostra com células (50 µL), fazer a contagem da densidade de células vivas em câmara de Neubauer. As células que se mantiveram vivas durante o manuseamento e conseguirem controlar as trocas iónicas na sua membrana permanecem transparentes intracelularmente.

Aliquotas de 100 µL desta suspensão de células foram colocadas numa placa de cultivo de células de 96 poços e incubadas à temperatura ambiente (TA) por 3 horas, protegidas da luz. Após este período de incubação, a camada superficial de meio L-15 foi removida e as células lavadas uma vez com meio L-15 com 5% de SBF, de forma a remover as células não aderentes. De seguida, adicionaram-se 100 µL do mesmo meio a cada poço e as células foram incubadas durante 16h e utilizadas nos vários ensaios.

3.3.1. Determinação da toxicidade dos extractos

De forma a verificar a toxicidade dos extractos para os fagócitos, foi realizado um teste de exposição das células aos diferentes extractos, na concentração de 10 mg/mL, durante 30 minutos e a toxicidade foi verificada utilizando o método de contagem celular com azul de tripano anteriormente descrito.

3.3.2. Determinação da produção de óxido nítrico

Após a incubação *overnight* dos fagócitos, o meio de cultura foi substituído em cada poço por 100 μ L de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®), e foram adicionados 20 μ L dos extractos em HBSS, nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL e incubados no escuro e à T.A., durante 30 minutos. A produção de óxido nítrico foi determinada através da quantificação do óxido nítrico inorgânico existente no sobrenadante pela reacção de Griess (Jun *et al.*, 1994). Para tal, 50 μ L do sobrenadante de cada poço foram misturados, noutra placa de 96 poços, com 100 μ L da solução de Griess. A solução de Griess é composta por sulfanilamida (1% em ácido fosfórico 2.5%, p/v) e diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED; 0,1% em ácido fosfórico 2.5%, p/v), na proporção de 1:1. Como controlo negativo utilizou-se HBSS. As placas foram incubadas durante 30 minutos à TA e a absorvância foi medida a 540 nm num leitor de placas Biotek Synergy 4. Cada ensaio foi repetido com fagócitos provenientes de três peixes diferentes.

3.3.3. Determinação da produção de ROS

A influência da aplicação dos extractos na actividade respiratória dos fagócitos de peixe foi determinada usando a redução de citocromo *c* férrico por libertação de radicais anião superóxido ($\text{OH}\cdot$), após estimulação das células com acetato de forbolmiristato (PMA, Secombes, 1990).

Após os fagócitos terem sido isolados e incubados durante 16h foram submetidos a 2 lavagens com HBSS e incubados com 900 μ L de HBSS com citocromo *c* férrico (2 mg/mL) e 100 μ L de PMA (10 μ g/mL) como controlo positivo; 900 μ L de HBSS com citocromo *c* férrico (2 mg/mL) e 100 μ L dos vários extractos em diferentes concentrações (1, 5 e 10 mg/mL) como tratamentos a estudar; 800 μ L de HBSS com citocromo *c* férrico (2 mg/mL) e 100 μ L de PMA (10 μ g/mL) e 100 μ L de de superóxido desmutase (SOD, 300 U/mL), como controlo positivo de especificidade. Os

fagócitos de três peixes diferentes foram expostos a extractos aquosos das cinco microalgas em estudo. As absorvâncias foram medidas a 550 nm, num leitor de placas Biotek Synergy 4, após 30 minutos, e em intervalos de 30 min. até a um limite máximo de 3h. Cada ensaio foi repetido com fagócitos provenientes de três peixes diferentes, apenas com extractos de concentração 10 mg/mL.

A redução do citocromo *c* férrico resulta na formação de bandas com espectro de absorção e o aumento da absorvância a 550 nm.

3.4. Actividade antioxidante de DPPH

A actividade antioxidante foi determinada através da avaliação da capacidade de captação do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). Este procedimento foi baseado no método desenvolvido por Brand-Williams *et al.* (1995) e adaptado a placas de 96 poços por Sánchez-Moreno *et al.* (1998). O DPPH é um radical que em solução metanólica tem cor violeta escura. Ao perder o electrão desemparelhado para compostos antioxidantes forma DPPH reduzido (difenil-picril-hidrazina) e perde a cor, ficando rosa claro ou amarelo, observando-se uma diminuição da absorvância a 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995). As amostras (22 µL) dos extractos nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL foram misturados em placas transparentes de 96 poços com 200 µL de solução de DPPH (120 µM) em metanol, e incubadas no escuro à TA durante 30 min. O controlo da cor foi feito com extracto (22µL) em metanol (200µL). A absorvância foi medida a 517 nm (Leitor de placas Biotek Synergy 4) e os resultados expressos como actividade antioxidante real (%) relativamente ao controlo e como concentração inibitória para 50% (IC₅₀), sendo esta a concentração capaz de reduzir o radical livre DPPH em 50 % (Sousa *et al.*, 2007).

A actividade antioxidante real foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{AAR (\%)} = 100 - (100 * \text{ABS}_{\text{real}}) / \text{ABS}_{\text{controlo negativo}}$$

em que $\text{ABS}_{\text{real}} = \text{ABS}_{\text{extracto}} - \text{ABS}_{\text{controlo da cor}}$.

Foi usado como controlo positivo a solução do antioxidante sintético BHT (E321, butil hidroxilotolueno), a 1 mg/mL e controlo negativo de HBSS.

3.5. Actividade quelante de cobre

A determinação da actividade quelante do ião Cu^{2+} foi feita usando violeta de pirocatecol de acordo com o método descrito por Megías *et al.* (2009). As amostras (30 μL nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram misturadas em placas transparentes de 96 poços com 200 μL do tampão acetato de sódio (50 mM, pH 6), 100 μL de sulfato de cobre (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, p/v), e 6 μL de violeta de pirocatecol (40 mM em acetato de sódio). Como controlo negativo foi utilizado 30 μL de tampão HBSS em substituição das amostras, e como controlo positivo utilizou-se 30 μL de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), um quelante sintético na concentração de 1 mg/mL . Como controlos de cor foram utilizados poços contendo 30 μL de amostra e 306 μL de tampão acetato de sódio. A absorvância foi lida a 632 nm (Leitor de placas Biotek Synergy 4) e os resultados expressos como actividade quelante real (%) de acordo com a fórmula:

$$\text{AQR (\%)} = 100 - 100 - (100 * \text{ABS}_{\text{real}}) / \text{ABS}_{\text{controlo negativo}}$$

em que $\text{ABS}_{\text{real}} = \text{ABS}_{\text{extracto}} - \text{ABS}_{\text{controlo da cor}}$.

3.6. Actividade quelante de ferro

A determinação da actividade quelante do ião Fe^{2+} foi efectuada por medição da formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina, de acordo com o método descrito por Megías *et al.* (2009). As amostras (30 μL nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL) foram misturadas em placas transparentes de 96 poços com 200 μL de água desionizada e 30 μL de FeCl_2 (0,1 mg/mL). Como controlo negativo foi utilizado 30 μL de tampão HBSS em substituição das amostras, e como controlo positivo utilizou-se 30 μL de EDTA, um quelante sintético na concentração de 1 mg/mL . Como controlos de cor foram utilizados poços contendo 30 μL de amostra e 306 μL de água destilada. Esperou-se 30 minutos e adicionaram-se 12,5 μL de ferrozina (40mM em água desionizada) a todos os poços, excepto nos de controlo da cor. Após 10 minutos a absorvância foi lida a 562 nm (Leitor de placas Biotek Synergy 4) e os resultados expressos como actividade quelante real (%) de acordo com a fórmula:

$$\text{AQR (\%)} = 100 - 100 - (100 * \text{ABS}_{\text{real}}) / \text{ABS}_{\text{controlo negativo}}$$

em que $\text{ABS}_{\text{real}} = \text{ABS}_{\text{extracto}} - \text{ABS}_{\text{controlo da cor}}$.

3.7. Actividade antimicrobiana

3.7.1. Origem das estirpes bacterianas

As bactérias utilizadas para este trabalho foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve. *V. fischeri* estava liofilizado e em embalagem própria, e *L. anguillarum* e *P. damselaepiscicida* em placas de TSA. Foram mantidas a 5°C até serem inoculadas.

3.7.2. Curvas de crescimento

A actividade antimicrobiana dos extractos foi testada em três estirpes de bactérias: *V. fischeri*, *L. anguillarum* e *P. damselaepiscicida*. Como meios de cultivo foram utilizados o meio sólido TSA (*tryptone soya agar*), em placas de Petri e o meio TSB (*tryptone soya broth*), tanto na recuperação das estirpes liofilizadas, como no crescimento em meio líquido. Cada estirpe foi repicada em condições de assepsia, em câmara de fluxo ascendente para um frasco de cultura com TSB estéril. Foram espalhadas em placas contendo meio TSA, pela técnica de riscado em meio sólido, semeando-se o inóculo com uma ansa de níquel-crómio, em sequências de estrias à superfície do meio. Foram realizadas sequências de estrias até esgotar o inóculo da ansa (estrias no sentido periferia-centro) de forma a permitir o desenvolvimento de colónias isoladas.

A curva de crescimento da cada estirpe foi feita de forma a determinar a densidade óptica correspondente à fase de crescimento exponencial de cada estirpe. Repicou-se cada amostra para um frasco com meio de cultura líquido de triptona de soja (TSB) estéril e mediu-se o crescimento da cultura por medição da absorvância a 550 nm, de hora a hora, até atingir a fase estacionária. O *Vibrio fischeri* foi cultivado a 15°C, enquanto que as outras duas estirpes foram incubadas a 25°C.

3.7.3. Antibiogramas

A actividade anti-microbiana dos extractos foi avaliada pelo método de difusão em agar baseado no método desenvolvido por Kirby-Bauer.

O teste de difusão em agar, consiste na propriedade de difusão em agar com meio de cultura, segundo um gradiente de concentração do composto antibacteriano contido num papel de filtro (Ferraro *et al.*, 2003). As estirpes bacterianas foram repicadas e ressuspensas em meio TSB, previamente autoclavado, e quando atingiram a

fase exponencial de crescimento foram utilizadas para dispersão nas placas de Petri, previamente preparadas com 25 mL de TSA autoclavado. A dispersão da suspensão bacteriana foi realizada com uma zaragatoa estéril, suavemente e em todas as direcções da superfície do meio. Após a superfície ter secado (10 minutos), colocaram-se os discos de papel estéreis (autoclavados) com 6 mm de diâmetro e impregnados com 10 µL de extractos na concentração de 10 mg/mL e colocados sobre a superfície do meio de cultura previamente inoculado com as suspensões bacterianas. Para tal utilizaram-se extractos aquosos (em HBSS) e extractos ressuspensos em DMSO de hexano, acetona e éter dietílico, na concentração de 10 mg/mL. Como controlos negativos utilizaram-se discos de papel sem qualquer extractos (secos) e discos de papel com HBSS, DMSO e como controlos positivos utilizaram-se discos com ampicilina (10 µg por disco) e tetraciclina (10 µg por disco). Foram realizados triplicados de cada ensaio.

As placas foram incubadas por 48 horas para *L. anguillarum* e *P. damselae piscicida* à T.A. e 72 horas para *V. fischeri* a 15°C. As placas foram então analisadas e os resultados expressos em média de mm do raio do halo de inibição em torno de cada disco (fig. 6).

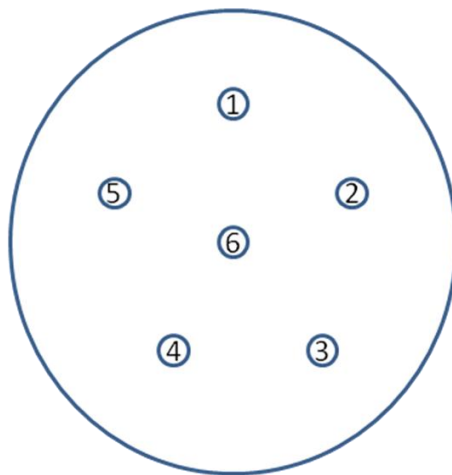


Figura 6 - Esquema da distribuição dos discos de papel nas placas com os extractos: 1- *I. galbana*, 2- *T. chuii*, 3- *B. Braunii*, 4- *Scenedesmus sp.*, 5- *N. oculata*, 6 – disco de papel seco.

4. Resultados

Os dados foram analisados estatisticamente usando o teste de Duncan, com um intervalo de confiança de 95% ($p=0,05$).

4.1. Toxicidade dos extractos

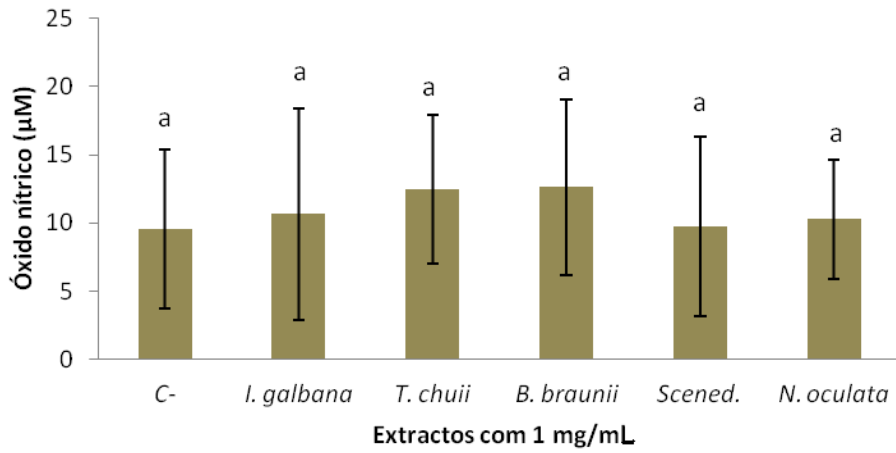
Inicialmente foi feito um teste de toxicidade aos extractos aquosos, das várias espécies de microalgas em estudo, sobre fagócitos de dourada. Nenhum dos extractos aquosos, em nenhuma das concentrações utilizadas (1, 5 e 10 mg/mL) revelou ser tóxico para os fagócitos de dourada. Desta forma, os extractos puderam ser utilizados sem qualquer condicionante, dentro do intervalo de concentrações testado, entre 1 e 10 mg/mL.

4.1.1. Determinação da produção de óxido nítrico

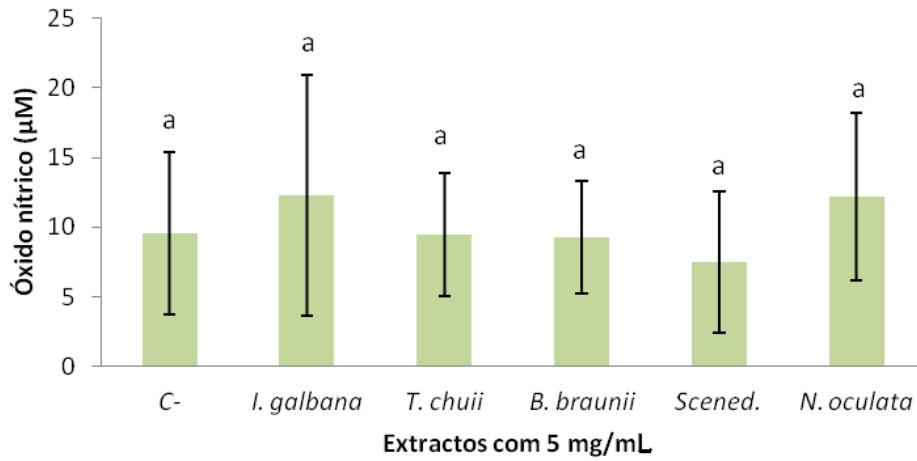
A quantidade de óxido nítrico libertada pelos fagócitos de dourada, expostos a extractos das três concentrações, foi analisada e mostrou que não ocorreram diferenças significativas interspecíficas em nenhuma das concentrações 1 e 5 mg/mL (fig. 7).

Dos extractos com 10 mg/mL, a espécie que induziu maior libertação deste composto foi a *I. galbana* (fig. 7).

Libertação de NO



Libertação de NO



Libertação de NO

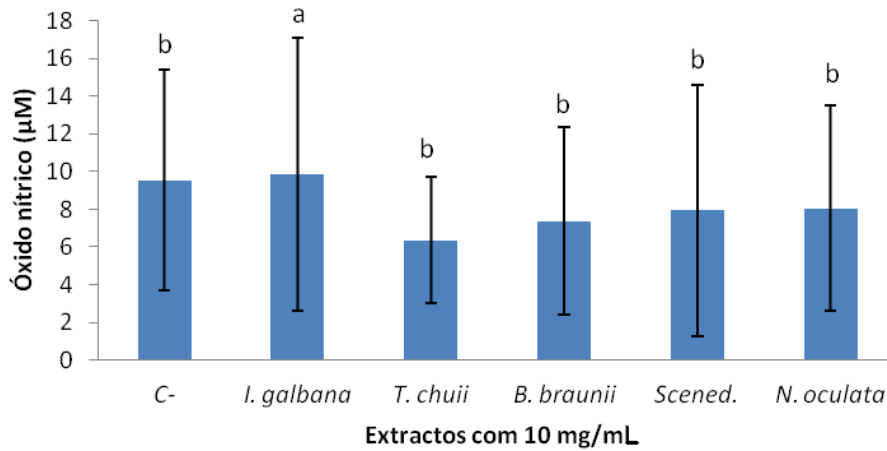


Figura 7 – Indução da libertação de óxido nítrico de fagócitos de dourada, expostos a extractos aquosos de cinco espécies de microalgas. Controlo negativo com PBS.

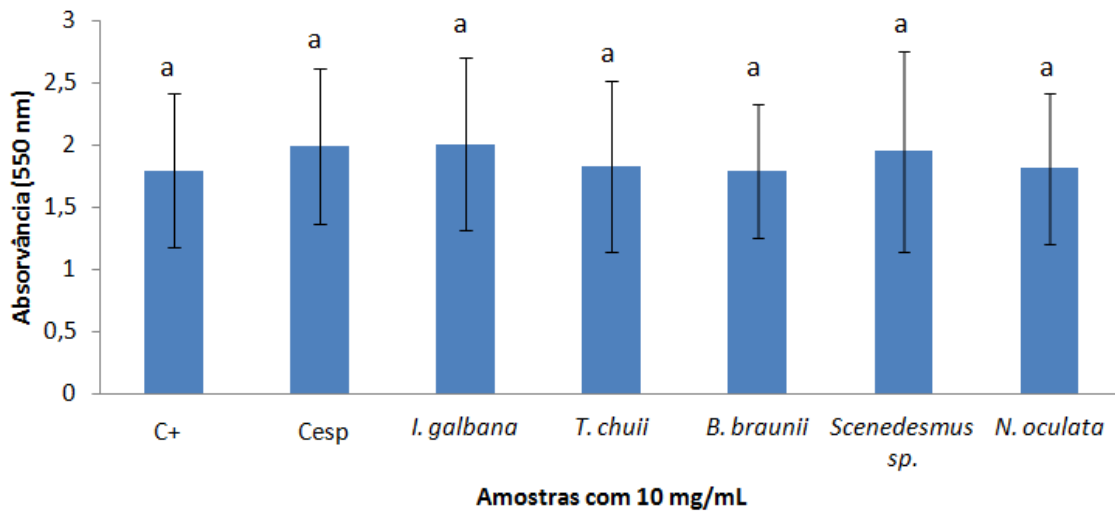
Assim, considerou-se que apenas o extracto aquoso de *I. galbana* com concentração de 10 mg/mL teve capacidade de induzir a libertação de óxido nítrico em fagócitos de dourada, com uma concentração máxima de 5,49 μM e média de $4,997 \pm 0,757 \mu\text{M}$.

4.1.2. Determinação da *respiratory burst activity*

A determinação da produção de espécies reativas de oxigénio por fagócitos de dourada revelou, por análise de teste Duncan, não haver diferenças significativas entre os extractos aquosos das várias microalgas, na análise geral de todos os peixes estudados, tanto após 1 hora como 2 horas, após estímulo com os extractos (fig. 8).

As únicas diferenças significativas observadas foram obtidas na análise individual dos peixes (fig. 9 e 10). Ou seja, analisando os peixes um a um, os seus replicados mostraram a existência de um estímulo que variou consoante o extracto da espécie utilizada. A análise dos peixes um a um foi feita porque organismos diferentes podem reagir de forma diferente ao mesmo estímulo, como se verificou (fig. 9 e 10). É de destacar a capacidade estimulatória das microalgas *I. galbana*, *Scenedesmus sp.* e *N. oculata* para a libertação de espécies reativas de oxigénio. Apesar disto não existe um padrão bem definido entre os vários peixes, inclusive não foram registadas diferenças significativas de produção de ROS nas amostras do peixe 3.

Libertação de ROS após 1 h- média dos 3 peixes



Libertação de ROS após 2h - média dos 3 peixes

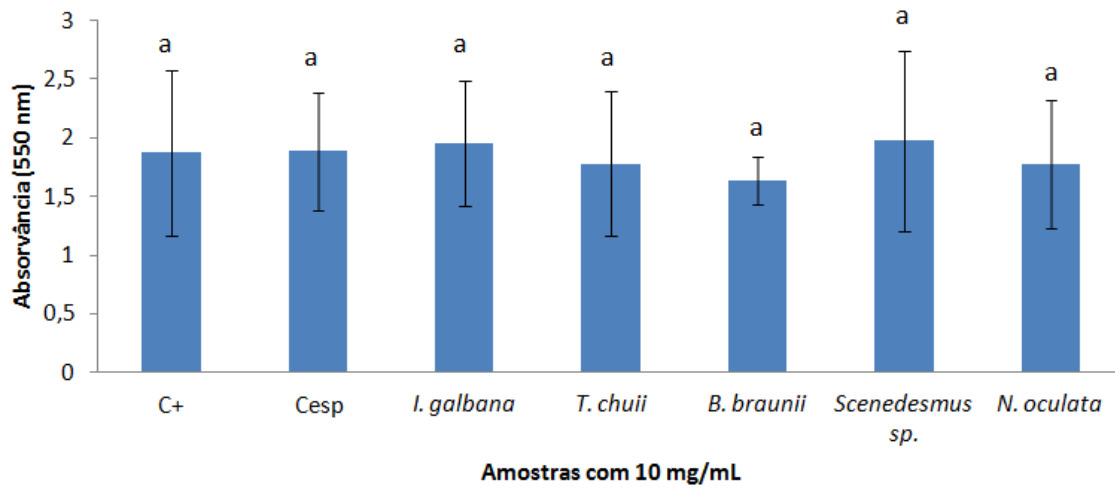
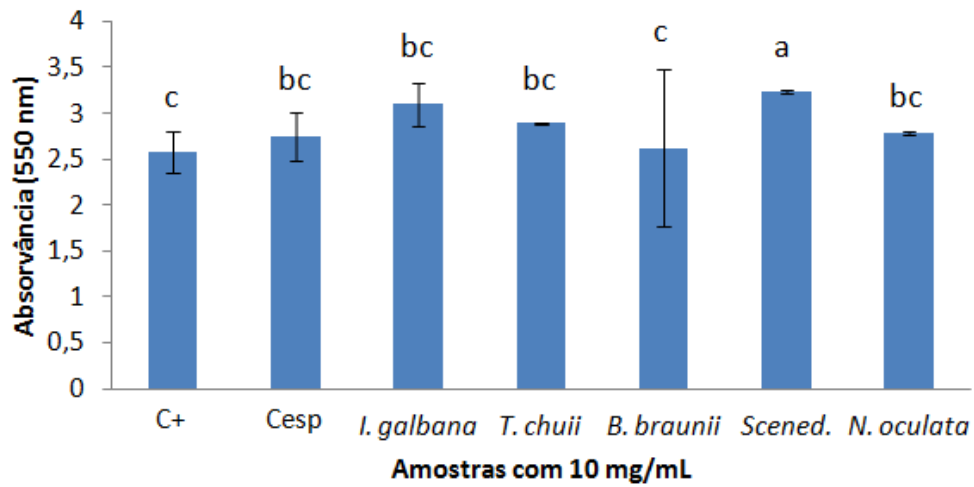
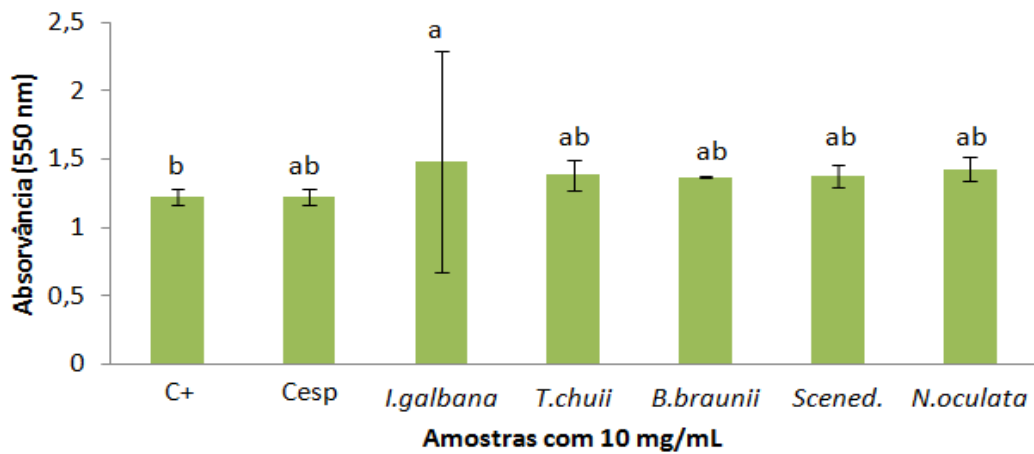


Figura 8 – Registo da libertação de ROS, após 1 e 2 duas horas de exposição de fagócitos de dourada a diferentes extractos e respectivos controlos, dos três peixes analisados. Cesp corresponde ao controlo de especificidade.

Libertação de ROS após 1h – peixe 1



Libertação de ROS após 1 hora - peixe 2



Libertação de ROS após 1h - peixe 3

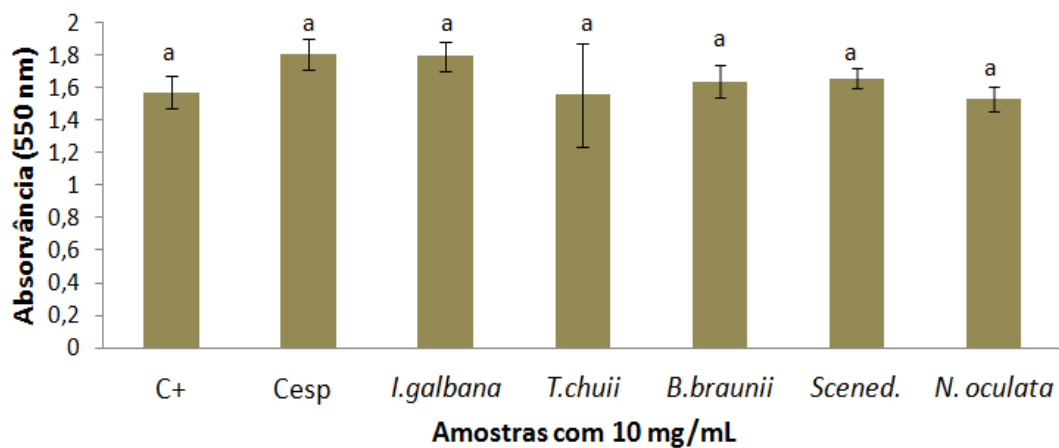
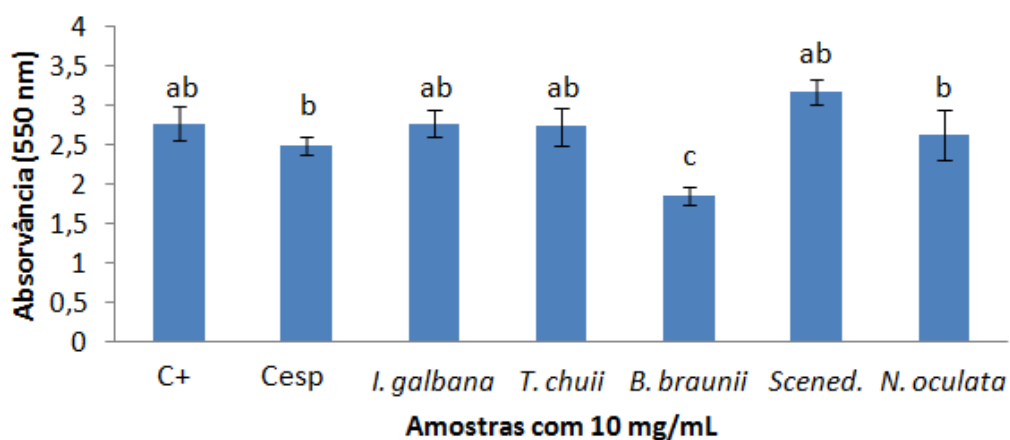
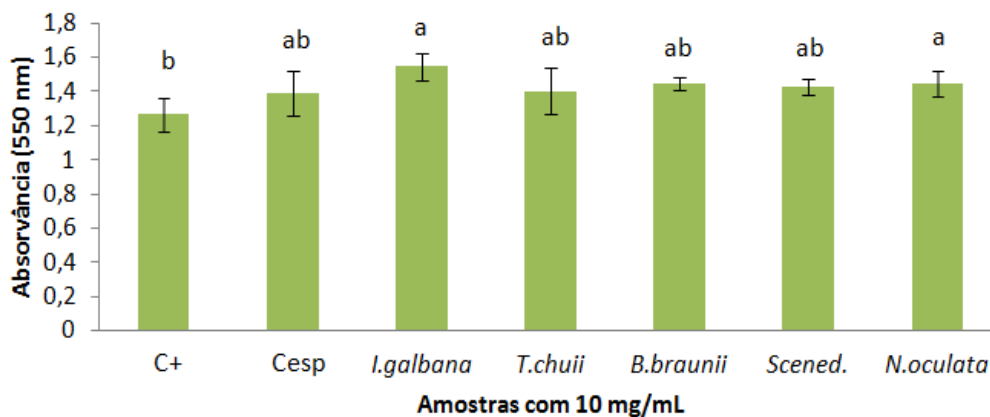


Figura 9 – Absorvância correspondente à libertação de ROS, registada ao fim de uma hora de exposição de fagócitos de dourada a diferentes extractos e respectivos controlos, dos três peixes analisados. Cesp corresponde ao controlo de especificidade.

Libertação de ROS após 2 horas - peixe 1



Libertação de ROS após 2 horas - peixe 2



Libertação de ROS após 2h - peixe 3

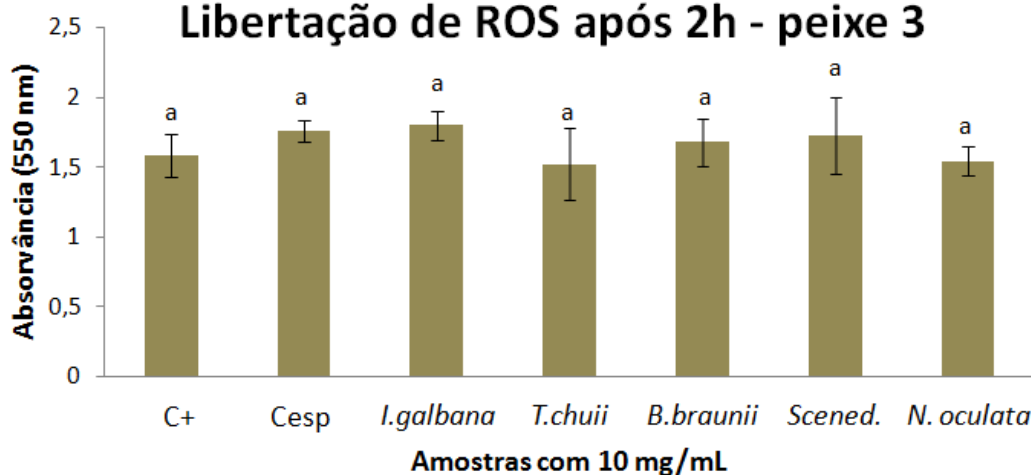


Figura 10 – Absorbância correspondente à libertação de ROS, registada ao fim de duas horas de exposição de fagócitos de dourada a diferentes extractos e respectivos controlos, dos três peixes analisados. Cesp corresponde ao controlo de especificidade.

Após uma hora de estímulo (fig. 9), a microalga *Scenedesmus sp.* no peixe 1 e a *I. galbana* nos peixes 1 e 2, foram as que induziram maior libertação média de ROS com uma absorvância média registada respectivamente de $3,23\pm 0,01$ UA; $3,10\pm 0,11$ UA e $1,48\pm 0,81$ UA. Como referido anteriormente nas amostras de fagócitos do peixe 3 não se registaram diferenças significativas à exposição dos diferentes extractos.

Após 2 horas de estímulo (fig. 10), nas amostras do peixe 3 também não se registaram diferenças significativas. Os extractos aquosos que desencadearam maior libertação de ROS foram os de *I. galbana* ($1,55\pm 0,08$ UA) e *N. oculata* ($1,45\pm 0,08$ UA) no peixe 2.

Comparando a evolução da média da produção de ROS dos três peixes estudados ao longo do tempo (fig. 11), é de registar a semelhança entre todos os extractos ao induzirem um pico após uma hora de exposição, um decréscimo muito acentuado após 2 horas e um pico mínimo após 2h30min, voltando a aumentar a produção de ROS após essa altura. O extracto de *Scenedesmus sp.* foi o único que induziu uma produção máxima após 2 horas de exposição.

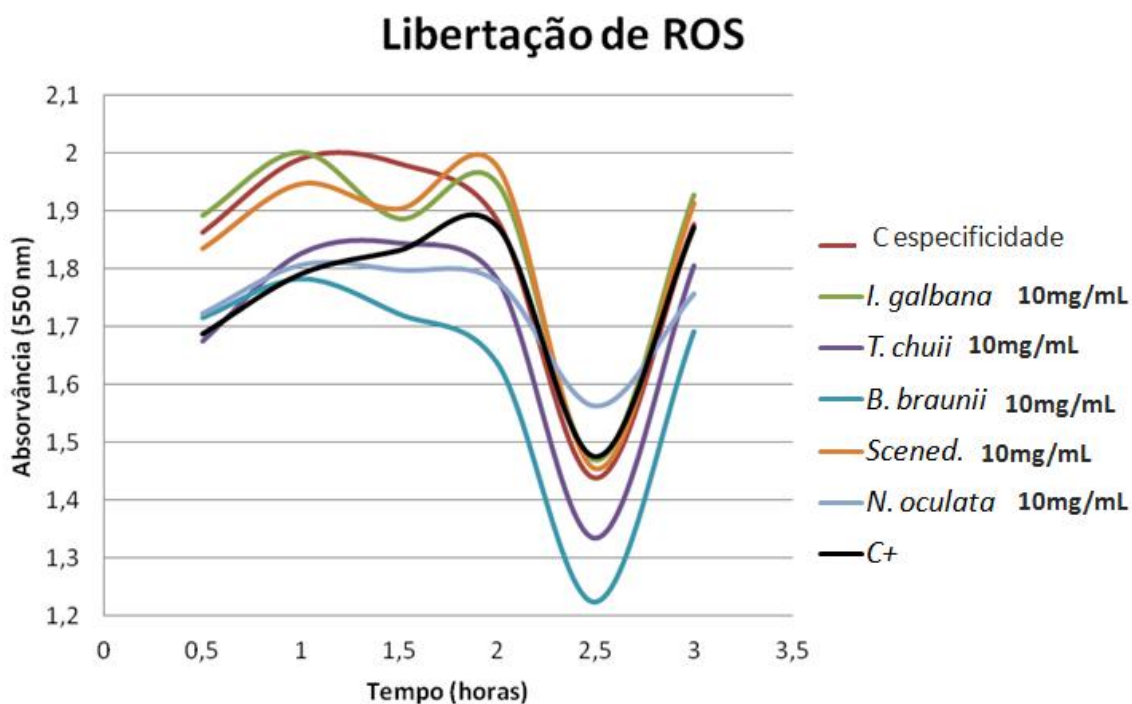


Figura 11 – Registo de libertação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) de fagócitos de dourada (média dos 3 peixes estudados), por redução de citocromio férrico c, ao longo do tempo, quando expostos a diversos extractos aquosos de microalgas.

4.3. Actividade antioxidante de DPPH

Foi determinada a actividade antioxidante das várias espécies de microalgas, recorrendo ao método de actividade de captação de radicais livres ou RSA (*radical scavenging activity*), utilizando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). O DPPH é um radical livre que em solução metanólica tem cor violeta escura, ao captar iões H⁺ de compostos antioxidantes forma DPPH reduzido (difenil-picril-hidrazina) e perde a cor, ficando rosa claro, diminuindo a absorvância a 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Os valores médios de actividade de cada extracto aquoso podem ser vistos na tabela 2. À excepção da *I. galbana*, todas as outras microalgas revelaram actividade antioxidante, embora apenas a *T. chuii* tenha revelado actividade superior a 50%.

Tabela 2 - Valores médios de actividade antioxidante (%) dos extractos aquosos das microalgas em estudo

Espécie	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
Controlo positivo	88,4 ± 1,6	88,4 ± 1,6	88,4 ± 1,6
<i>I. galbana</i>	-61,1 ± 3,0	-52,7 ± 3,6	-21,1 ± 5,9
<i>T. chuii</i>	17,8 ± 1,5	73,2 ± 2,4	71,0 ± 4,7
<i>B. braunii</i>	11,8 ± 2,4	27,5 ± 2,2	38,6 ± 4,9
<i>Scenedesmus sp.</i>	4,4 ± 2,0	11,7 ± 1,7	23,0 ± 3,1
<i>N. oculata</i>	7,3 ± 2,3	17,7 ± 12,2	18,6 ± 3,0

Na fig. 12 é possível ver as diferenças entre as três concentrações utilizadas de extracto aquoso de *T. chuii* e a significância de cada uma. A *T. chuii* foi a única espécie cuja média de actividade antioxidante da concentração 5 mg/mL foi superior à de 10 mg/mL, pois no geral todas as microalgas revelaram um aumento de actividade com o aumento da concentração (1, 5 e 10 mg/mL).

Actividade antioxidante - *T. chuii*

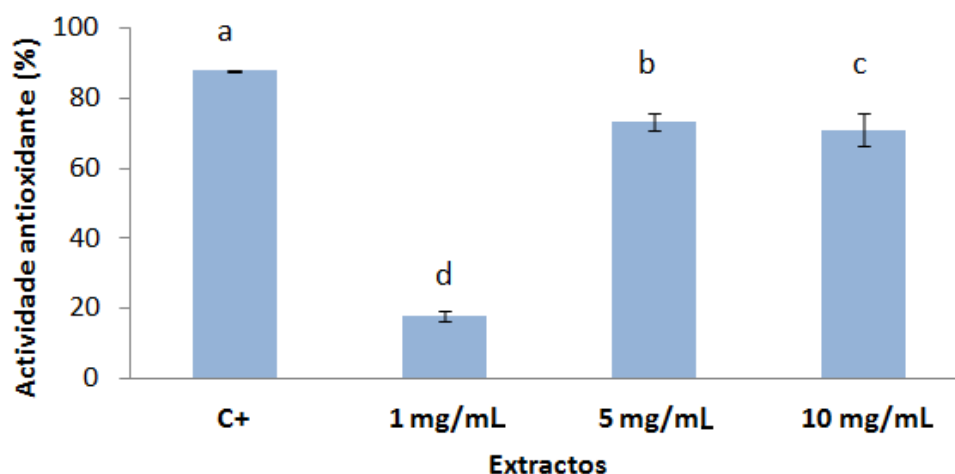


Figura 12 – Actividade antioxidante de extracto aquoso de *T. chuii*, comparando 3 concentrações e controlo positivo.

Os valores de concentração inibitória de 50% (IC_{50}), capazes de reduzir o radical DPPH em pelo menos 50%, estão representados na tabela 3, sendo que todos os valores representados por > 10 mg/mL correspondem a resultados onde a actividade antioxidante dos mesmos foi inferior a 50%, ou seja, o IC_{50} seria muito superior a 10 mg/mL e como tal está fora do intervalo de concentração analisado neste trabalho.

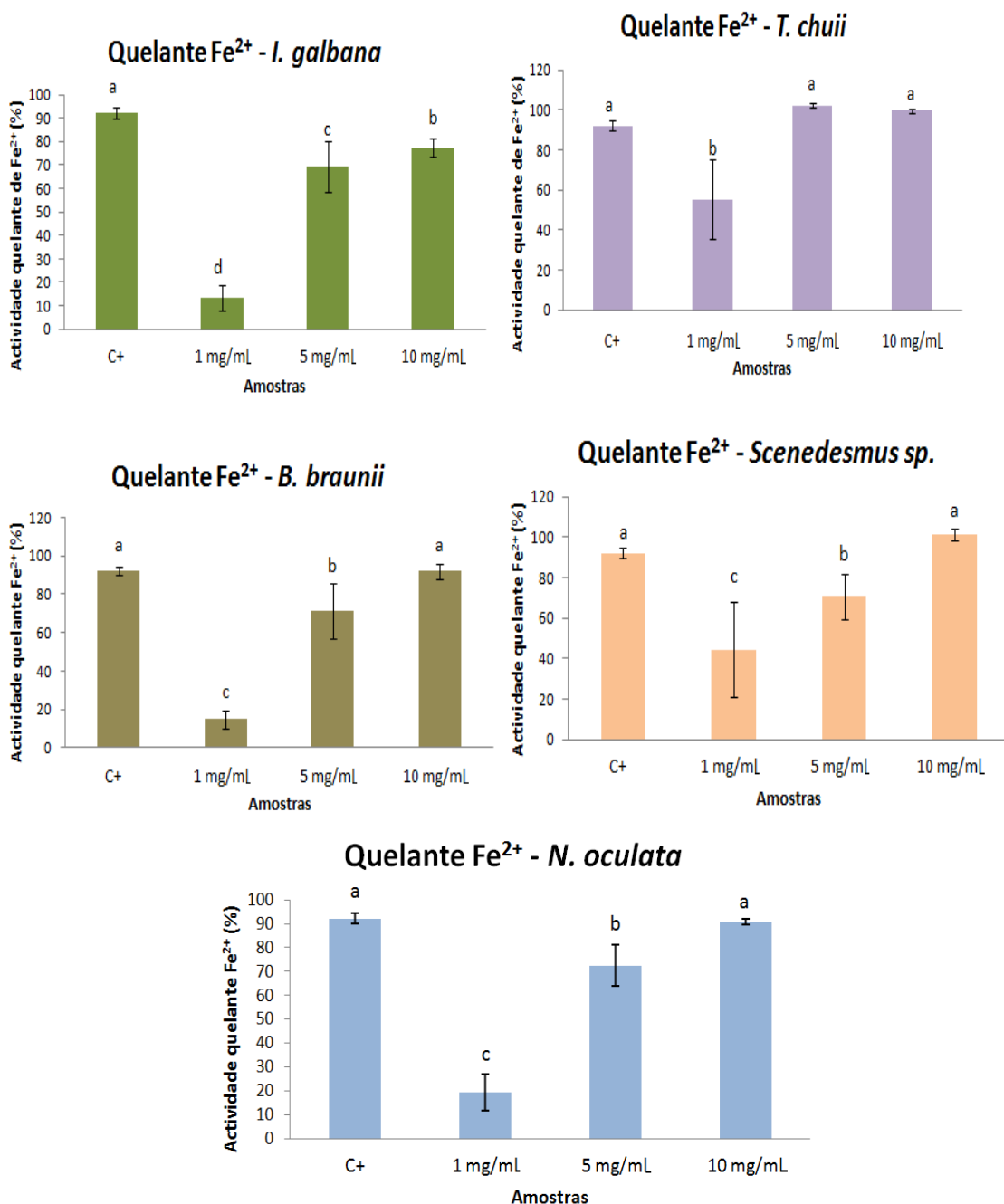
O extracto aquoso da microalga *T. chuii* foi, portanto, o que apresentou maior capacidade antioxidante, de entre as cinco espécies estudadas.

Tabela 3 - Valores médios de IC_{50} dos extractos aquosos das microalgas em estudo

Extracto	IC_{50}
<i>I. galbana</i> Tiso	> 10 mg/mL
<i>T. chuii</i>	$4,90 \pm 0,30$ mg/mL
<i>B. braunii</i>	> 10 mg/mL
<i>Scenedesmus</i> sp.	> 10 mg/mL
<i>N. oculata</i>	> 10 mg/mL

4.4. Actividade quelante de Fe²⁺

Do estudo da actividade quelante do ião Fe²⁺, foi possível verificar que todos os extractos tiveram capacidade quelante. Todas as microalgas, à excepção de *T. chuii*, registaram diferenças significativas entre as várias concentrações (1, 5 e 10 mg/mL). Todas à excessão da *I. galbana* revelaram actividade quelante de Fe²⁺ idêntica ao controlo positivo, ou seja, com actividade idêntica ao EDTA, um quelante sintético.



Figuras 13 – Registo da média da actividade quelante de Fe²⁺ das concentrações 1, 5 e 10 mg/mL, das cinco microalgas em estudo, e respectivo controlo positivo.

Como a maioria dos extractos com 10mg/mL revelaram ter uma actividade quelante de Fe^{2+} idêntica ao controlo positivo ($92,21 \pm 2,27\%$), compararam-se as médias desses extractos entre eles. Dessa comparação verificou-se que *T. chuii* e *Scenedesmus sp.* foram os extractos (com 10 mg/mL) com maior actividade quelante, tendo registado uma diferença significativamente superior ao controlo positivo (fig. 14). Tiveram valor médio idêntico ao controlo referido as microalgas *B. braunii* e *N. oculata*, enquanto que a *I. galbana* foi a única com valor inferior.

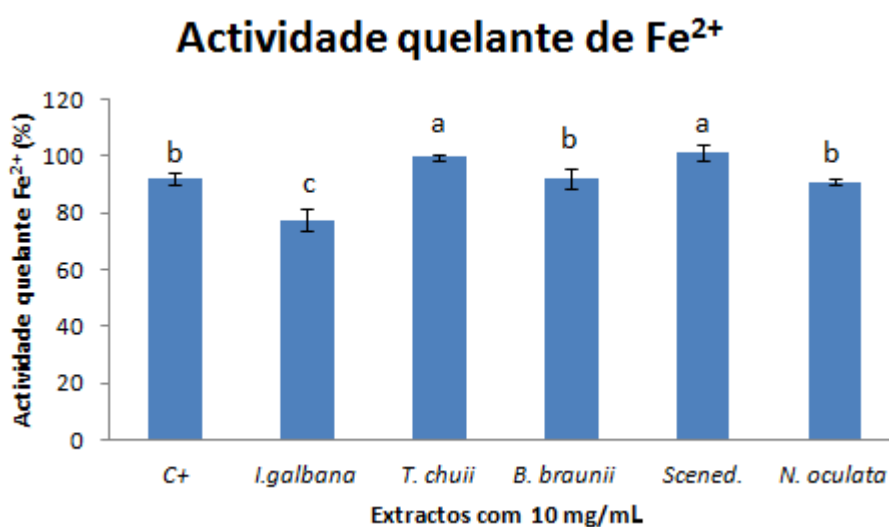


Figura 14 – Comparação entre actividade quelante de Fe^{2+} entre extractos de 10 mg/mL das cinco microalgas em estudo e respectivo controlo positivo.

Como todos os extractos das microalgas em estudo tiveram valores de actividade quelante superiores a 50%, determinou-se o valor de IC_{50} de cada uma delas. Como pode ser visto na tabela 4, a espécie com maior actividade quelante de Fe^{2+} (menor IC_{50}) foi a *T. chuii* e a com menor actividade a *Scenedesmus sp.*, embora a diferença entre espécies seja reduzida. A *T. chuii* revelou ter actividade quelante de tal forma elevada que até extractos com 0,2 mg/mL registaram actividade superior a 50%.

Tabela 4 – Registo dos valores médios de IC₅₀ de actividade quelante de Fe²⁺

Extracto de:	IC ₅₀ (mg/mL)
<i>I. galbana</i> T-iso	4,518±0,178
<i>T. chuii</i>	<0,2
<i>B. braunii</i>	4,670 ± 0,061
<i>Scenedesmus sp.</i>	4,742 ± 0,071
<i>N. oculata</i>	4,513 ± 0,092

4.5. Actividade quelante de Cu²⁺

Relativamente à capacidade quelante de Cu²⁺, nenhum dos extractos aquosos de microalgas teve mais de 50% de actividade, portanto não se determinou o valor IC₅₀. Os valores obtidos são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios de actividade quelante (%) de Cu²⁺.

Espécie	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
Controlo positivo	72,30 ± 1,43	72,30 ± 1,43	72,30 ± 1,43 a
<i>I. galbana</i>	-18,74 ± 17,75	20,15 ± 16,33	32,53 ± 5,89 b
<i>T. chuii</i>	-28,71 ± 22,29	2,85 ± 10,29	18,43 ± 18,56 bc
<i>B. braunii</i>	-38,11 ± 10,01	-5,92 ± 14,88	26,27 ± 18,03 b
<i>Scenedesmus sp.</i>	-33,75 ± 19,22	-17,25 ± 20,96	9,68 ± 16,84 c
<i>N. oculata</i>	-1,58 ± 6,04	3,53 ± 11,69	29,32 ± 17,76 b

As espécies com maior actividade quelante de cobre II foram a *I. galbana*, *N. oculata* e *B. braunii*, embora nenhuma tenha revelado valores superiores ao controlo positivo.

4.6. Actividade antibiótica

A primeira parte da experiência que visou testar a actividade antibiótica dos extractos de microalgas, consistiu em acompanhar o crescimento das três estirpes bacterianas, de forma a saber o intervalo de densidade óptica a que correspondia a fase exponencial de crescimento das culturas. É importante ser determinado este intervalo pois é aconselhável repicar as estirpes quando a cultura está em crescimento máximo, de

forma a aumentar a possibilidade de sobrevivência e contínuo crescimento da estirpe quando se realizam os antibiogramas.

A *Listonella anguillarum* revelou-se como a estirpe com mais rápido crescimento, das três em estudo. Na fig. 15, podemos ver que apenas ao fim de 4 horas iniciou o seu crescimento exponencial. Realizaram-se mais amostragens mas a densidade óptica máxima obtida foi de 0,576, correspondente a uma percentagem de transparência de 26%, ao fim de 9 horas pós inoculação.



Figura 15 – Curva de crescimento inicial de *Listonella anguillarum*, cultivada em meio TSB, a 25 °C, com absorvância medida a 550 nm.

Como se pode observar pela fig. 16, a cultura de *L. anguillarum* apresentou um crescimento irregular, sendo o máximo de D.O. igual a 0,576, tendo estabilizado o seu crescimento ao fim de cerca de 50 horas. Os valores de absorvância considerados como fazendo parte da fase de crescimento exponencial situaram-se entre 0,2 e 0,4. Na cultura de *L. anguillarum* registou-se um pico de crescimento 8 horas pós inoculação, seguido imediatamente de um *crash* da cultura. Esta situação pode ter ocorrido devido à depleção de nutrientes após o crescimento esponencial. Após as 20 horas de cultivo a cultura voltou a crescer embora muito mais lentamente, atingindo a fase estacionária após 48 horas de cultivo.

As falhas nas curvas de crescimento devem-se a uma ausência da obtenção de dados sobre o crescimento das culturas nesses intervalos de tempo. Na cultura de *L. anguillarum* e de *P. damsela piscicida* não se registou a evolução de crescimento entre

as 44 e as 46 horas (fig. 16 e 17) e na de *V. fischeri* entre as 116 e as 120 horas. Esta ausência de dados não prejudicou a experiência porque apenas se pretendeu determinar a fase de crescimento exponencial, de forma a saber a melhor densidade óptica para realizar as inoculações.

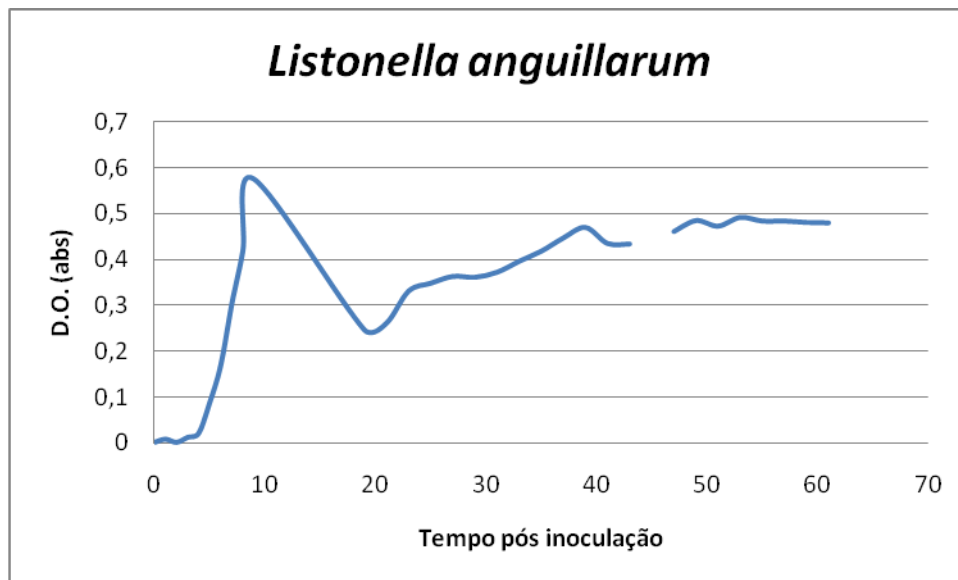


Figura 16 – Curva de crescimento completa de *Listonella anguillarum*, cultivada em TSB, a 25 °C (T.A.), com absorvância medida a 550 nm.

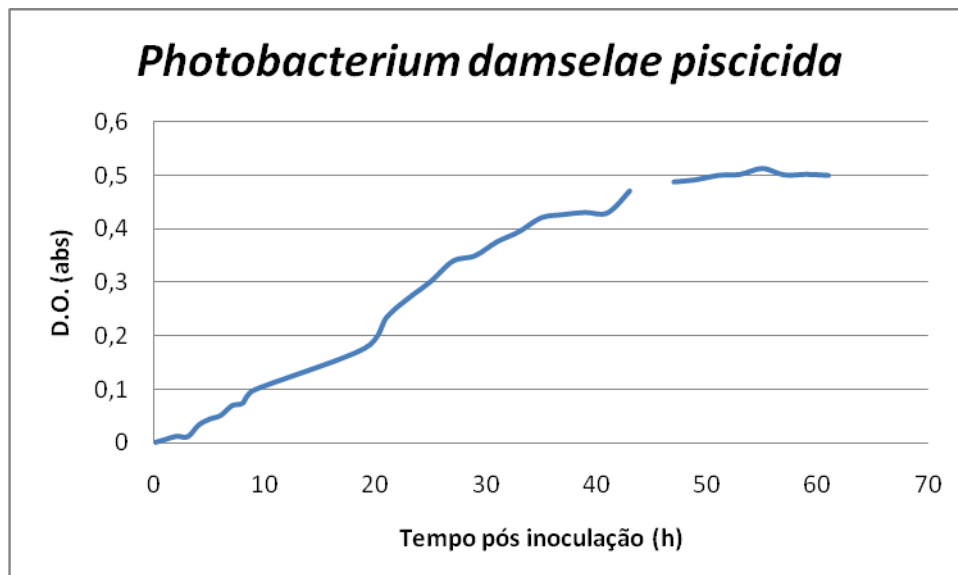


Figura 17 – Curva de crescimento de *Photobacterium damsela piscicida*, cultivado em TSB, a 25°C (T.A.), com absorvância medida a 550 nm.

O *P. damselaepiscicida* foi a estirpe que iniciou o crescimento exponencial mais cedo, embora, comparando com a *L. anguillarum*, tenha demorado mais a atingir o pico máximo de D.O., com um valor de 0,512, correspondente a uma percentagem de transparência de 30,8%, ao fim de 55 horas. A estabilização de crescimento ocorreu ao fim de cerca de 45 horas. Os valores de absorvância considerados como fazendo parte da sua fase de crescimento exponencial situaram-se entre 0,2 e 0,4.

De todas as 3 estirpes estudadas, o *Vibrio fischeri* foi o mais complexo de trabalhar. Para além de apenas crescer a 15°C, sendo para tal necessário uma câmara com controlo de temperatura, o seu crescimento inicial foi extremamente lento, fazendo com que as medições iniciais fossem desprezadas. Contudo, e porque a finalidade desta parte da experiência era apenas saber a que valores de absorvância correspondia à fase de crescimento, o objectivo não foi comprometido.

Na fig. 18 é possível ver a curva de crescimento obtida do *V. fischeri*, ao longo do tempo. Como referido anteriormente, o *V. fischeri* apenas cresceu a 15°C, embora tenha sido testada a sua capacidade de crescimento a 25°C (T.A.). O valor máximo de absorvância registado foi de 0,529, correspondente a uma percentagem de transparência de 29,7%, ao fim de 129 horas de inoculação. A estabilização do crescimento deu-se ao fim de 125 horas, com um valor de D.O. de 0,5. Os valores considerados como pertencentes à fase de crescimento exponencial situaram-se entre 0,3 e 0,5.

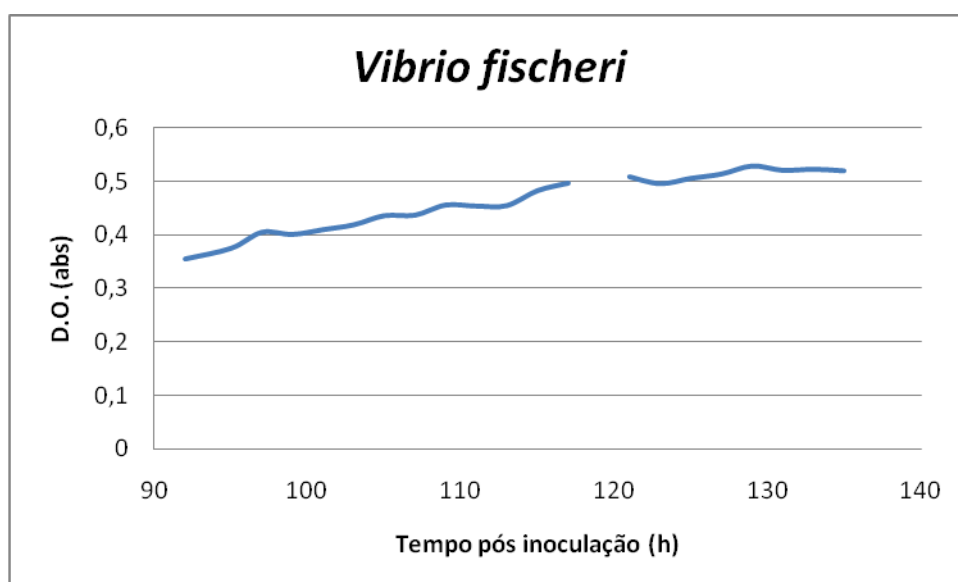


Figura 18 – Curva de crescimento de *Vibrio fischeri*, cultivado em TSB, a 15 °C, com absorvância medida a 550 nm.

Assim, foi possível determinar que densidade a que cada estirpe podia ser utilizada para “pintar” as placas para os antibiogramas.

Relativamente ao tempo de duplicação das estirpes estudadas, a cultura de *L. anguillarum* duplicou em 2h09min, a de *P.damselae piscicida* duplicou em 3h05min e a de *V. fisheri* em 34h51min.

4.6.1. Antibiogramas

Foi testada a capacidade antibacteriana por método de difusão em agar (TSA) de extractos aquosos, de hexano, éter dietílico e de acetona, das cinco espécies de microalgas, contra *Vibrio fisheri*, *Listonella (Vibrio) anguillarum* e *Photobacterium damselae piscicida*. Os halos de inibição resultantes são proporcionais à capacidade inibitória de cada extracto.

Como controlos foram usados discos de papel secos (utilizados para colocar o extracto a usar) e discos de papel com DMSO, HBSS e com os antibióticos ampicilina e tetraciclina.

Os resultados dos controlos negativos foram registados, incluindo os de antibióticos, estando descritos nas tabelas 6 e 7. Como referido anteriormente, o *V. fisheri* não cresceu nas placas de agar (TSA e *marine agar*), portanto não foram obtidos resultados de antibiogramas sobre esta estirpe.

Tabela 6 – Registo dos halos de controlo dos antibiogramas de *L. anguillarum*

Controlos	Média dos raios dos halos de inibição de <i>L. anguillarum</i> (mm)
Papel	0
HBSS	0
DMSO	0
Ampicilina	0
Tetraciclina	31



Figura 19 – Resultado de um dos antibiogramas controlo de *L. anguillarum*, onde é bem visível o halo causado pelo disco com tetraciclina.

Tabela 7 – Registo dos halos de controlo negativo dos antibiogramas de *P. damsela piscicida*

Controlos	Média dos raios dos halos de inibição de <i>P. damsela piscicida</i> (mm)
Papel	0
HBSS	0
DMSO	0
Ampicilina	35
Tetraciclina	26



Figura 20 - Resultado de um dos antibiogramas controlo de *P. damsela piscicida*, onde é bem visível o halo causado pelo disco com ampicilina (superior esquerdo) e do disco com tetraciclina (superior direito).

Como é possível de observar nas tabelas 6 e 7, os antibiogramas controlo de papel, HBSS e DMSO não inibiram o crescimento de nenhuma das duas estirpes consideradas, *L. Anguillarum* e *P. damselaepiscicida*, o que remeteria para uma total interferência nos resultados dos antibiogramas. Assim, pudemos concluir que papel, DMSO e HBSS não interferiram com os resultados obtidos.

Relativamente aos antibióticos utilizados, a ampicilina apenas inibiu o crescimento de *P. damselaepiscicida*, sendo o antibiótico com maior capacidade de actuar contra esta estirpe. A tetraciclina inibiu o crescimento de ambas as estirpes, sendo a inibição maior sobre *L. anguillarum*, tendo um raio de halo de inibição com 31 mm.

Nenhum dos extractos de microalgas revelou capacidades antibacterianas contra *L. anguillarum* nem contra *P. damselaepiscicida* (Tabelas 8 e 9). O *V. fischeri* revelou uma incapacidade de crescer tanto em placas de TSA como de agar marinho, mesmo tendo sido mantidos em câmara com controlo de temperatura para 15°C durante toda a experiência.

Tabela 8 – Registo dos halos de inibição dos extractos de microalgas contra *L. anguillarum*

Extractos	Aquosos	Exano	Acetona	Éter dietílico
Papel	0	0	0	0
<i>I. galbana</i>	0	0	0	0
<i>T. chuii</i>	0	0	0	0
<i>B. braunii</i>	0	0	0	0
<i>Scenedesmus sp.</i>	0	0	0	0
<i>N. oculata</i>	0	0	0	0

Tabela 9 – Registo dos halos de inibição dos extractos de microalgas contra *P. damselaepiscicida*

Extractos	Aquosos	Exano	Acetona	Éter dietílico
Papel	0	0	0	0
<i>I. galbana</i>	0	0	0	0
<i>T. chuii</i>	0	0	0	0
<i>B. braunii</i>	0	0	0	0
<i>Scenedesmus sp.</i>	0	0	0	0
<i>N. oculata</i>	0	0	0	0

5. Discussão e Conclusão

Devido às elevadas densidades de peixe mantidas em tanques de aquacultura, normalmente ocorre um aumento de *stress* a que os animais estão sujeitos, levando ao enfraquecimento do seu sistema imunológico (Moriarty, 1999). A resultante vulnerabilidade para contrair doenças causadas por agentes patogénicos como *L. anguillarum*, *V. fischeri* e *P. damselaepiscicida* (Balebona, 1998) levou à recorrente utilização de antibióticos nas instalações de aquacultura (Grave *et al.*, 1996). Contudo, após a proibição da sua utilização como promotores de crescimento na União Europeia, tornou-se urgente encontrar compostos que de alguma forma previnam a ocorrência de doenças e auxiliem o sistema imunitário dos peixes a combater os agentes patogénicos invasores.

As células fagocíticas são uma das mais importantes defesas dos peixes contra invasões de agentes patogénicos (Magnadottir, 2010) e produzem uma série de compostos ao realizarem a fagocitose. Entre esses compostos incluem-se os ROS (Secombes & Fletcher, 1992) e os RNS (Secombes, 1990). A produção destes compostos pode ser benéfica, quando há necessidade de eliminar agente patogénicos (Castro *et al.*, 2004), mas também pode ser prejudicial, quando há excesso dessa produção (Hardie *et al.*, 1996). A dourada, sendo uma espécie cultivada essencialmente na região Mediterrânica, estando sujeita às variações sazonais de temperatura e consequente influência no seu ciclo biológico. Durante o Inverno esta espécie fica mais vulnerável à “síndrome de Inverno”, uma vez que devido às baixas temperaturas

diminui a ingestão de alimento. Este processo causa mortalidade crónica no Inverno, em especial quando a temperatura começa a subir (Gallardo *et al.*, 2003), pois nesta fase os peixes têm diversas alterações fisiológicas que os tornam mais sujeitos a infecções por agentes patogénicos (Eggset *et al.*, 1997; Gallardo *et al.*, 2003). Ou seja, é no final do Inverno que a utilização de imunostimulantes deve ser mais utilizada e estudada.

Actualmente diversos estudos têm vindo a ser realizados para determinar as propriedades imunomodulatórias de compostos extraídos de plantas (Ardo *et al.*, 2008), algas (Bansemir *et al.*, 2006) e microalgas marinhas (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2006), que ajudem a controlar os níveis de ROS e RNS produzidos pelos organismos.

Os resultados obtidos no presente estudo apontam para uma potencial importância dos extractos aquosos de microalgas marinhas como fontes de compostos antioxidantes e imunostimulantes.

Os extractos estudados não revelaram ter poder antibiótico directo contra *L. anguillarum* nem *P. damselae piscicida* pois não ocorreu qualquer inibição ao crescimento destas estirpes. O *V. fischeri* não cresceu nas placas com meio TSA e portanto as propriedades destes extractos contra essa estirpe não puderam ser estudadas.

Contudo, este estudo mostrou que alguns extractos aquosos de microalgas revelaram poder imunostimulatório. O extracto aquoso de *I. galbana* com 10 mg/mL foi capaz de estimular a libertação de NO em fagócitos de dourada de forma significativamente superior ao controlo e a todas as outras microalgas. O valor máximo registado após estimulação com extracto de *I. galbana* foi de 5,49 μ M e o valor médio de 4,997 \pm 0,757 μ M, tendo o controlo sido de 3,775 \pm 0,866 μ M. Existem poucos estudos sobre libertação de NO por fagócitos de peixe e nenhum estudo identificado, que tenha testado o efeito de extractos de microalgas em fagócitos de dourada. Contudo, no estudo de Tafalla & Novoa (1999), onde foram utilizados lipopolissacarídeos de bactérias como estímulo de macrófagos de *Scophthalmus maximus*, foram registados valores de concentrações entre 5 e 15 μ M. Portanto o extracto de *I. galbana* teve uma indução semelhante ao dos lipopolissacarídeos bacterianos do trabalho referido. No trabalho de Pietsch *et al.* (2008), também após estímulo com lipopolissacarídeos bacterianos, houve registo de libertação de NO entre 50 a 70 μ M.

Relativamente à libertação de ROS e à análise das médias dos três peixes não foram registadas diferenças significativas entre os extractos aquosos das microalgas em estudo. Apenas se verificaram diferenças significativas na análise individual dos peixes

1 e 2, destacando-se a capacidade estimulatória das microalgas *I. galbana* e *Scenedesmus sp.* para a libertação de ROS. Este estudo aponta para uma diferença de sensibilidade ao estímulo entre peixes da mesma espécie. É necessário ter em consideração a variação individual, pois os peixes podem estar sujeitos a diferentes níveis de *stress* durante a sua manipulação. Esta aparenta ser uma das causas para a falta de diferenças significativas na análise geral das médias dos três peixes.

Da análise da média dos três peixes verificou-se que o pico máximo de libertação de ROS ocorreu após uma hora de estímulo, para todos os extractos aquosos. O extracto de *Scenedesmus sp.* teve o pico máximo após 2 horas. Sendo assim, não se pode afirmar que globalmente tenha existido um extracto aquoso das cinco microalgas em estudo que tenha estimulado a produção de ROS de forma significativa, considerando todos os peixes analisados. Os fagócitos de diferentes peixes parecem reagir de forma diferente entre si, à exposição a estes extractos aquosos. No entanto, de uma forma geral produziram a maior quantidade de ROS entre 1 a 2 horas de exposição. Também Castro *et al.* (2004) mostraram que as macroalgas *Ulva rigida* e *Chondrus crispus* estimularam a produção de ROS em fagócitos de pregado (*Psetta maxima L.*), por método de *nitroblue tetrazolium*. Contrariamente a estes resultados, estudos realizados por Daels-Rakotoarison *et al.* (2002) apontam para uma inibição da produção de ROS expondo neutrófilos polimorfonucleares a extractos sequenciais (acetona/água 6:4; diclorometano; acetato de etilo; clorofórmio) de *Rosa canina*, um arbusto mediterrânico. Porém, diferentes tipos de extracção conduzem a diferentes compostos extraídos e, como tal, a comparação é limitada.

Devido à grande diferença de resultados entre peixes diferentes para o estudo de libertação de óxido nítrico e ROS, uma forma melhor de fazer este estudo é utilizando células (fagócitos) clone, embora isto levante o problema de falta de variedade natural que ocorre nos organismos por terem fagócitos que podem ter células-mãe diferentes. Para obter maior número de células podem utilizar-se peixes de dimensões maiores. É essencial reduzir ao mínimo as diferenças de factores *stressantes* infligidas aos peixes, de forma a reduzir o erro e as diferenças entre *specimen*. Sendo a produção de ROS uma forma de resposta imunitária, se um peixe estiver doente ou uma amostra contaminada com agentes patogénicos, por exemplo, os fagócitos irão apresentar níveis diferentes de produção de ROS.

Este estudo mostrou que alguns extractos aquosos de microalgas revelaram poder antioxidante. Os resultados obtidos através do método de DPPH apontam para a existência de compostos com propriedades antioxidantes nos extractos aquosos com 10 mg/mL de *T. chuii*, *B. braunii*, *Scenedesmus sp.* e *N. oculata*, sendo os valores máximos obtidos de 73,2±2,4%; 38,6±4,9%; 23,0±3,1% e 18,6±3,0%; respectivamente. A microalga *T.chuii* teve uma actividade inibitória de 50% do DPPH de 4,900±0,301mg/mL, em média, revelando-se como aquela com maior capacidade antioxidante deste composto. Esta actividade foi superior à da verificada no trabalho de Hwang *et al.* (2010) em que a actividade antioxidante do extracto aquoso da alga *Ecklonia cava* foi apenas de 48±2,8% com uma concentração de 100 µg/mL e um IC₅₀ de 1,58 mg/mL. No entanto é de referir algumas diferenças no protocolo experimental pois, Hwang *et al.* (2010) realizaram extractos com água quente (100°C por 20 min.) que pode alterar os produtos finais do extracto; uma concentração ligeiramente inferior de DPPH (0,1 mM) que faz com que a coloração inicial das amostras seja mais clara e cause menor absorvância; e de relação solução-DPPH [1:1 em Hwang *et al.* (2010) e 1:9 no presente trabalho] que altera a quantidade de DPPH reduzido no final da reação, com consequente alteração da cor e respectiva absorvância.

Outro estudo comparativo para este método, onde se estudou a actividade antioxidante por DPPH de microalgas em extracto metanólicos, foi o de Natrah *et al.* (2007), em que foram obtidos apenas valores negativos de actividade antioxidante, com registo máximo de -4,56±0,2% de *I. galbana*, -6,32±0,7% de *S. quadricauda*, -11,35±0,6% de *N. oculata* e -24,60±1,7% de *T. tetrathele*, embora por outros métodos (por ensaio de ferro tiocianato e por ensaio de ácido tiobarbitúrico) tenham obtido valores positivos de actividade antioxidante. Os autores desse trabalho não apresentaram nenhuma razão para a obtenção de valores negativos. No presente trabalho os valores negativos do extracto de *I. galbana* deveram-se a uma coloração mais escura nas amostras com extracto que as de controlo negativo.

Do estudo da actividade quelante do ião Fe²⁺, foi possível verificar que todos os extractos tiveram capacidade quelante embora o de *I. galbana* (10 mg/mL) não tenha induzido uma actividade quelante superior ao controlo positivo, tanto em média como em valor absoluto. As espécies com maior actividade quelante foram a *T-chuii* com 102,09±1,03% e a *Scenedesmus sp.* com 101,24±2,69%, embora esta última tenha o maior valor de IC₅₀. Isto deveu-se a ter registado um valor reduzido nas concentrações 1

e 5 mg/mL, mas elevado valor a 10 mg/mL. Comparando com o trabalho de Wang *et al.* (2010), onde foi utilizado o mesmo protocolo para a determinação da actividade quelante de Fe^{2+} de *Sargassum hemiphyllum* e obtido um valor de IC_{50} de 2,07 mg/mL, claramente inferior ao das microalgas do presente estudo, ou seja, as microalgas apesar de revelarem valores mais elevados de actividade quelante em percentagem, revelaram ser necessário maior concentração para atingir o IC_{50} . O mesmo acontecendo quando se compara estes resultados sobre microalgas com os de algumas espécies de plantas já estudadas como *Feijoa sellowiana*, *Sambucus ebulus* e *Zea mays* por exemplo, que revelaram IC_{50} próximos de 1,5 mg/mL (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008).

Como referido nos resultados, nenhum extracto aquoso revelou actividade quelante de Cu^{2+} superior a 50%. As espécies com maior actividade foram *I. galbana* e *N. oculata* e *B. braunii* com respectivamente $32,53 \pm 5,89\%$, $29,32 \pm 17,76\%$ e $26,27 \pm 18,03\%$. A espécie com menor actividade foi a *Scenedesmus sp.* com um máximo de $9,68 \pm 16,84\%$.

Quanto ao estudo das propriedades antibióticas dos extractos aquosos e dos extractos em DMSO de hexano, acetona e éter dietílico das cinco microalgas em estudo, nenhum revelou poder antibacteriano contra *L. anguillarum* nem contra *P. damselaepiscicida*. Tendo em consideração o trabalho de Katircioglu *et al.* (2006) seria de esperar que, pelo menos os extractos de acetona e éter revelassem alguma actividade antibiótica uma vez que, no trabalho referido, os extractos de acetona e éter de diversas espécies de microalgas revelaram actividade antimicrobiana em bactérias Gram negativas. Também Bansemir *et al.* (2006) obtiveram actividade antibiótica de 23 espécies de macroalgas contra *L. anguillarum*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* e *Yersinia rickeri*, embora estes tenham resultado de extractos de diclorometano.

Este trabalho visou estudar algumas características que fazem das microalgas o elo fundamental de uma aquacultura sustentável e menos propensa à proliferação de agentes patogénicos. Apesar da importância nutricional das microalgas, talvez não seja só esta característica que permite aos aquacultores terem registos de elevadas taxas de sobrevivência quando se inclui microalgas nas dietas dos peixes.

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que os extractos aquosos e os extractos em DMSO de hexano, acetona e éter dietílico das microalgas cinco microalgas estudadas não apresentaram propriedades antibióticas contra *L. anguillarum*

e *P. damselae piscicida*, na concentração de 10 mg/mL. No entanto parece ser possível que tenham capacidade antibacteriana contra outras estirpes de bactérias ou em concentrações superiores. Contudo, destacou-se a capacidade imuno-estimulatória das microalgas *I. galbana*, *Scenedesmus sp.* e *N. oculata*. Destacou-se também a capacidade antioxidante dos extractos aquosos de *T. chunii*, *B. braunii*, *Scenedesmus sp.* e *N. oculata*, pelo método de DPPH. Nenhum dos extractos revelou elevado poder quelante de cobre mas todos revelaram elevado poder quelante de Fe^{2+} . Parece ser possível determinar o valor IC_{50} da actividade quelante das microalgas em estudo, basta aumentar a concentração dos extractos utilizados. É necessário proceder a mais estudos de forma a determinar exactamente que compostos antioxidantes e imunoestimulantes estão presentes nas microalgas e como se relacionam com o bem estar dos animais de aquacultura e com a qualidade do produto final das pisciculturas.

6. Bibliografía

- Appelbaum PC, 1992. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Clinical Infectious Diseases, 15: 77-83.
- Anderson AML, Varkey JB, Petti CA, Liddle RA, Frothingham R & Woods CW, 2004. *Vibrio cholerae* septicemia: Case report, discussion of literature, and relevance to bioterrorism. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 49 (4): 295-297.
- Antipa R, Gould R & Amend DF, 1980. *Vibrio anguillarum* vaccination of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), by direct and hyperosmotic immersion. J. Fish Dis. 3: 161-165.
- Ardo L, Yin G, Xu P, Varadi L, Szigeti G, Jeney Z & Jeney G, 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica* and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *aeromonas hydrophila*. Aquaculture 275: 26-33.
- Arijo S, Chabrillo M, Díaz-Rosales P, Rico RM, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Toranzo AE & Moriñigo MA, 2005. Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Bulletin of European Association of Fish Pathologists 25: 148-154.
- Asche F, 1996. Specification of Dynamic Demand Systems: The Demand for Salmon in the European Union. Ph. D. dissertation. Norwegian School of Economics and Business Administration.
- Austin B, 1993. Environmental issues in the control of bacteria diseases of farmed fish. In: Environment and Aquaculture in Developing Countries. ICLARM Conference Proceedings 31. ICLARM, Manila. pp 237-251.
- Bahr HM & Mahmoud KA, 2011. Antioxidant activity of carrot juice in gamma irradiated beef sausage during refrigerated and frozen storage. Food Chemistry 127(3): 1119-1130.
- Balebona MC, Zorrilla I, Moriñigo MA & Borrego JJ, 1998. Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L) in southwestern Spain from 1990 to 1996. Aquaculture 166: 19-35.

- Bansemir A, Blume M, Schröder S & Lindequist U, 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 252: 79–84.
- Barnes AC, Balebona MC, Horne M & Ellis AE, 1999. Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology* 145: 483-494.
- Becker W, 2004. Cap. 21 do livro: Richmond, A., 2004. Handbook of Microalgal Culture – Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG & Heublein PC, 1979. Disease Caused by a Marine Vibrio-Clinical Characteristics and Epidemiology. *New England Journal of Medicine* 300: 1-5.
- Blaxhall PC & Hood K, 1985. Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a Percoll gradient. *J. Fish Biol.* 27: 749–755.
- Boomker J, Huchzermeyer FW & Naude TW, 1980. Bothriocephalosis in the common carp in the Eastern Transvaal. *Journal of South African Veterinary Association* 51(4): 263–264.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME & Berset C, 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30.
- Brown MR, Garland CD, Jeffrey SW, Jameson ID & Leroi JM, 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.* 5: 285–296.
- Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK & Dunstan, 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331.
- Cadenas E & Packer L, 2002. Handbokk of antioxidants. 2nd Edition, Marcel Dekker, Inc.. New York, E.U.A..
- Campos-Pérez JJ, Ellis AE, Secombes, C.J., 1997. Investigation of factors influencing the ability of *Renibacterium salmoninarum* to stimulate rainbow trout macrophage burst activity. *Fish Shellfish Immunol.* 7: 555–566.
- Carballo-Cárdenas EC; Tuan PM, Janssen M & Wijffles RH, 2003. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and

- Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering* 20(4-6): 139-147.
- Cardozo KHM, Guauatini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon A, Lopes N, Campos S, Torres M, Souza A, Colepicolo P & Pinto E, 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 60–78.
- Castro R, Ignacio Z & Iamas J, 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture* 229: 67–78.
- Chen Y, 2001. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. *Aquaculture* 195(1-2): 71-80.
- Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K & Phongdara A, 2004. Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp, *Aquaculture* 233: 3-30.
- Choudhary MI, Jalil S, Todorova M, Trendafilova A, Mikhova B, Duddeck H & Attar-ur-rahman, 2007. Inibitory effect of lactone fractions and individual components from three species of the *Achillea millefolium* complex of Bulgarian origin on the human neutrophils respiratory burst activity, *Natural Product Research* 21: 1032-1036.
- Chung S & Secombes CJ, 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comp. B&hem. Physiol.* 89B: 539-544.
- Chen Z, Vonshak A & Richmond A, 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J. Phycol.* 24: 328-332.
- Custódio L, Justo T, Silvestre L, Barradas A, Duarte CV, Pereira H, Barreira L, Rauter AP, Alberício F & Varela J, 2012. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry* 131(1): 134-140.
- Daels-Rakotoarison DA, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Luyckx M, Dine T, Bailleul F, Cazin M & Cazin J-C, 2002. Effects of *Rosa canina* Fruit Extract on Neutrophil Respiratory Burst. *Phytother. Res.* 16: 157–161.
- Díaz-Rosales P, Felices C, Abdala R, Figueroa FL, Pinchetti JL, Moriñigo MA & Balebona MA, 2007. *In vitro* effect of the red alga *Hydropuntia cornea* (J.

- Agartha) on the respiratory burst activity of solea (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) phagocytes. *Aquaculture Research* 38: 1411-1418.
- Durmaz Y, 2007. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* 272: 717–722.
- Ebrahimzadeh MA, PourmoradF & Bekhradnia AR, 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology* 7(18): 3188-3192.
- Eggset G, Mortense A, Johansen LH, Sommer AI, 1997. Susceptibility to furunculosis, cold water vibriosis, and infectious pancreatic necrosis (IPN) in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L. as a function of smolt status by seawater transfer. *Aquaculture* 158: 179-91.
- Eirik O, Gilles K & Hamilto JK, 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J. Mar. Biotechnol.* 7: 65-70.
- Ellis AE, 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 827–839.
- Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM & Cohen J, 1996. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9553-9558.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department. 2007. *The State of the World Fisheries and Aquaculture 2006*, Roma.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department. 2011. A world overview of species of interest to fisheries. *Sparus aurata*. FIGIS Species Fact Sheets. Texto por Domenec Lloris. Species Identification and Data Programme – SIDP. Em: Fao Fisheries and Aquaculture Department [online].
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en
- Fast MD, Sims DE, Burka JF, Mustafa A, Ross NW, 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 132: 645-657.
- Ferraro MJ, Wikler MA, Craig WA, Dudley MN, Eiopoulos GM, Hecht DW, Hindler J, Reller LB, Sheldon AT, Swenson JM, Tenover Fc, Testa RT & Weinstein MP, 2003. Padronização dos testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-

Difusão; Norma Aprovada – 8ª edição. M2-A8, Vol. 23 No 1, Substitui a Norma M2-A7, Vol. 20 No. 1.

- Fidalgo JP., Cid A, Torres E, Sukenic A & Herrero C, 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galgana*. *Aquaculture* 166(1-2): 105-116.
- Fischer U, Utke K, Somamoto T, Köllner B, Ototake M & Nakanishi T, 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 20: 209–226
- FishBase, 2011. www.fishbase.org.
- Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T, 1997. Effects of n-carrageenan on the non-specific defense system of carp *Cyprinus carpio*. *Fish. Sci.* 62: 934– 938.
- Gallardo M, Sala-Rabanal M, Ibarz A, Padros F, Blasco J, Fernandez-Borras J & Sánchez J, 2003. Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223: 15-27.
- Ghezelbash F, Farboodnia T, Heidari R & Agh N, 2009. Biochemical Effects of different salinities and luminance on green microalgae *Tetraselmis chuii*. *Research Journal of Biological Sciences* 3(2): 217-221.
- Gómez-Coronado DJM, Ibañez E, Rupérez FJ & Barbas C, 2004. Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. *Journal of Chromatography A* 1054(1-2): 227-233.
- Gould RW, 1978. Development of a new vaccine delivery system for immunizing fish and investigation of the positive antigens in *Vibrio anguillarum*. Ph.D. Thesis, Oregon State University, Corvallis.
- Gracey M., Burke V. & Robinson J., 1982. *Aeromonas* Associated Gastroenteritis. *The Lancet*: 320: 1304-1306.
- Grave K, Markestad A & Bangen M, 1996. Comparison in prescribing patterns of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during the periods 1980–1988 and 1989–1994. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 19: 184–191.
- Gudding R, Lillehaug A & Evensen Å, 1999. Recent developments in fish vaccinology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72: 203–212.
- Hanif A, Bakopoulos V, Leonardos I & Dimitriadis GJ, 2005. The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by

- Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology* 19: 345-361.
- Hansen PK, Lunestad BT & Samuelsen OB, 1992. Effects of oxytetracycline, oxolinic acid, and flumequine on bacteria in an artificial fish farm sediment. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 1307–1312.
- Hardie LJ, Ellis AE & Secombes CJ, 1996. In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates inhibition of *Renibacterium salmoninarum* growth concomitant with augmented generation of respiratory burst products. *Dis. Aquat. Org.* 25: 175– 183.
- Heggberget TG, Johnsen BO, Hindar K, Jonsson B, Hansen LP, Hvidsten NA & Jensen AJ, 1993. Interactions between wild and cultured Atlantic Salmon: a review of the Norwegian Experience. *Fisheries Research*: 123-146.
- Hibbs Jr. JB, 1991. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with anti-tumour and antimicrobial activity. *Res. Immunol.* 142: 565-569.
- Hsueh HT, Li WJ, Chen HH & Chu H 2009. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 95: 33–39.
- Hwang P, Wu C, Gau S, Chien S & Hwang D, 2010. Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *sargassum hemiphyllum*. *Journal of Marine Science and Technology* 18(1): 41-46.
- Iyengar R, Stuehr DJ & Marletta MA, 1987. Macrophages synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6369-6373.
- Iwama G & Nakanishi T, 1996. *The fish immune system: Organism, pathogen, and Environment.* Academic Press, E.U.A..
- Jain M, Goel AK, Bhattacharya P, Ghatole M & Kamboj M, 2011. Multidrug resistant *Vibrio cholerae* O1 El Tor carrying classical ctxB allele involved in a cholera outbreak in South Western India. *Acta Tropica* 117(2): 152-156.
- Jun CD, Choi BM, Ryu H, Um JY & Kwak HJ, 1994. Synergistic cooperation between phorbol ester and IFN γ for induction of nitric oxide synthesized in murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* 153: 3684– 90.

- Kapil A & Sharma S, 1997. Immunopotentiating compounds from *Tinospora cordifolia*, *Journal of Ethnopharmacology* 58: 89-95.
- Katircioglu H, Beyatli Y, Aslim B, Yüksekdag Z & Atici T, 2006. Screening for Antimicrobial Agent Production of Some Microalgae in Freshwater. *The Internet Journal of Microbiology* 2(2).
- Koberg M, Cohen M, Ben-Amotz A & Gedanken A, 2011. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology* 102: 4265–4269.
- Koppenol WH, 2000. Facts and fiction in free radical biochemistry: The Haber-Weiss Cycle. Oxygen Society Annual Meeting, San Diego, CA Nov 17-20.
- Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins IW, Povlishock JT, Rowe GT & Hess ML, 1985. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.* 57: 142–151.
- Krienitz L & Wirth M, 2006. The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 36(3): 204-210.
- Kruse H & Sørum H, 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments, *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4015–4021.
- Lamas J & Ellis AE, 1994. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 4: 201-219.
- Liao WR, Lin JY, Shieh WY, Jeng WL, 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 30: 433–439.
- Lindequist U & Schweder T, 2001. Marine biotechnology. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology* 10: 441–484.
- López AD, Castillo CI, Sanchez JL, Pérez JA & Camacho F, 1994. Quantitative genetics of fatty acid variation in *Isochrysis galbana* (prymnesiophyceae) and *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30: 553–558.
- Lourenço SO, Marquez UML, Mancini-Filho J, Barbarino E & Aida E, 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148: 153-168.

- Magnadottir B, 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar. Biotechnol.* 12: 361-379.
- Mahasneh I, Jamal M, Kashashneh M, Zibdeh M, 1995. Antibiotic activity of marine algae against multiantibiotic resistant bacteria. *Microbio.* 83: 23–26.
- Megías C, Pastor-Cavada E, Torres-Fuentes C, Girón-Calle J, Alaiz M, Jua R, *et al*, 2009. Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. *European Food Research and Technology*, 230: 353-359.
- Mendes RL, Nobre, BP, Cardozo MT, Pereira AP & Palavra AF, 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta* 356: 328- 334.
- Metger P & Casadevall, 1992. Ether lipids from *Botryococcus braunii* and their biosynthesis. *Phytochemistry* 31(7): 2341-2349.
- Mohamed S & Abasali H, 2010. Effect of plant extracts supplemented diets on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in comon carp (*Cyprinus carpio*). *Agricultural Journal* 5(2): 119-127.
- Moriarty DJW, 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.
- Moriarty DJW, 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria, *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Canada.
- Nagelkerke LAJ, Pannevis MC, Hulihan DF & Secombes CJ, 1990. Oxygen uptake of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytes following stimulation of the respiratory burst. *Journal of Experimental Biology* 154: 339-353.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC & Silva GL, 2000. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic Resistant Bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 247-256.
- Natrah FMI, Yossuf FM, Shariff M, Abas F & Mariana NS, 2007. Screening of Malasian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *J. Appl. Phycol.* 19: 711-718
- Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM., Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H & Troell M, 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024.

- Neumann NF, Stafford JL, Barreda D, Ainsworb J, Belosevic M, 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defence. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 807-825.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM, 2003. Natural products as source of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022–1037.
- Nygaard S, 2006. Vibriosis, as caused by the bacteria *Listonella (Vibrio) anguillarum*, was the first of the known bacterial fish diseases. *Fish Health and Environment Inc.* Novembro.
- Ortuño J, Esteban MA & Meseguer J, 2002. Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to crowding stress. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89: 29–36.
- Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, Canonico C, Potenziani S, Santarelli S, Masini L, Scuota S & Carruto A, 2010. *Vibrioparahaemolyticus-associated* gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66(4): 452-455.
- Pottinger TG., Day JG, 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 129-141.
- Rao YV, Das BK, Pradhan J & Chakrabarti R, 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish immunol.* 20: 263-273.
- Reed PA & Francis-Floyd R, 1996. *Vibrio* Infections of Fish. University of Florida, Department of Fisheries and aquatic Sciences publications: FA-31.
- Rodríguez A, Cuesta A, Ortuño J, Esteban MA & Meseguer J, 2003. Immunostimulant properties of cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96: 183–192.
- Russell S, Lumsden JS, 2005. Function and heterogeneity of fish lectins. *Vet Immunol Immunopathol* 7th Int. Vet. Immunol. Symp. 108: 111–120.
- Sagdiç O & Özcan M, 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control* 14: 141–143.
- Saldanha L, 1997. *Fauna Submarina Atlântica*, 3ª edição, Publicações Europa-América.

- Samorì C, Torri C, Samorì G, Fabbri D, Galletti P, Guerrini F, Pistocchi R & Tagliavini E, 2010. Extraction of hydrocarbons form microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. *Bioresource Technology* 101: 3274–3279.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA & Saura-Calixto F, 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of Science Food and Agriculture* 76: 270-276.
- Sato K, Niki E & Shimasaki H, 1990. Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch. Biochem. Biophys.* 279: 402–405.
- Scott P, James S & Sher A, 1985. The respiratory burst is not required for killing of intracellular and extracellular parasites by a lymphokine-activated macrophage cell line. *Eur Journal of Immunol.* 15: 553-558.
- Scott PW, 1996. *O grande livro do aquário*. Livros e livros, Lisboa.
- Secombes CJ, 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *Tech. Fish Immunol.* 1: 137-154.
- Secombes CJ, 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwawa, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 63–103.
- Secombes CJ & Fletcher TC, 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2: 53-71.
- Segal AW & Abo A, 1993. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *TIBS* 18: 43-47.
- Shahidi F, Janitha PK & Wanasundara PD, 1992. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 32: 67-103.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ & Schreiber RD, 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107–1111.
- Shoemaker CA, Evans JJ & Klesius PH, 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188: 3-4.
- Sikora E, Cieřlik E, Leszczyńska T, Filipiak-Florkiewicz A & Pisulewski PM, 2008. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry* 107(1): 55-59.

- Skarmeta AM, Bandín L, Santos Y & Toranzo AE, 1995. In vitro killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 51-57.
- Skjervold PO, Fjæra SO, Ostby PB, 1999. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture* 175: 93–101.
- Sommerset I, Krossoy B, Biering E & Frost P, 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines* 4(1): 89-101.
- Sommerset I, Norbio IAS, Krossoy B, Biering E & Frost P, 2006. Vaccines for fish in Aquaculture. MSD Animal Health, September, online publication: <http://www.thefishsite.com/articles/150/vaccines-for-fish-in-aquaculture>
- Sousa S, Silva H, Vieira G, Ayres M, Costa C, Araújo D, Cavalcante L, Barros E, Araújo P, Brandão M & Chaves M., 2007. Fenóis Totais e Actividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova* 30: 351 – 355.
- Sridhar, K.R., Vidyavathi, N., 1991. Antimicrobial activity of seaweeds. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 5: 455–496.
- Stafford JL, Neumann NF & Belosevic M, 2001. Products of proteolytic cleavage of transferring induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Vev. Comp. Immunol.* 25: 101-115.
- Subasinghe RP, Bondad-Reantaso MG & McGladdery SE, 2000. Aquaculture Development, Health and Wealth, Aquaculture in the Third Millennium, FAO Document Repository: 167-191.
- Szabó C, Ischiropoulos H & Radi R, 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. Nature Publishing Group. 662(6).
- Tafalla C & Novoa B, 2000. Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Developmental & Comparative Immunology* 24(6-7): 623-631.
- Tidwell JH & Geoff AL, 2001. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries, *EMBO reports* 2: 958-963.
- Tiravanti E, Samouilov A & Zweier JL, 2004. Nitrosyl-Heme complexes are formed in the ischemic heart. *The Journal of Biological Chemistry* 279(12): 11065-11073.
- Tocher DR, Mourente G, Eecken A, Evjemo JO, Diaz E, Belli JG, Geurden I, Lavens P & Olsen Y, 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut

- (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.), *Aquaculture Nutrition* 8: 195-207.
- Todd S, Woodward M, Bolton-Smith C & Tunstall-Pedoe H, 1995. An investigation of the relationship between antioxidant vitamin intake and coronary heart disease in men and women using discriminant analysis. *Journal of Clinical Epidemiology* 48(2): 297-305.
- Tonon T, Harvey D, Larson TR & Graham A, 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61: 15–24.
- Tort L, Balasch JC & Mackenzir S, 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptative responses. *Inmunología* 22(3): 277-286.
- USCB – United States Census Bureau, 2011. World POPClock Projection. 11/11/2011. www.census.gov/population/popclockworld.html
- Val AG, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, Vicente F, Portillo E, Rio MJ, Reina GG & Peláez F, 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.* 4: 35–40.
- Villamor N, Montserrat E & Colomer D, 2004. Cytotoxic effects of B lymphocytes mediated by reactive oxygen species. *Curr. Pharm. Des.* 10: 841– 53.
- Weiss SJ, 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-376.
- Wikfors GH, Patterson GW, Gosh P, Lewin RA, Smith BC & Alix JH, 1996. Growth of post-set oysters, *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp.. *Aquaculture* 143: 411-419.
- Wittenrich, M., 2007. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes. Microcosm/TFH.
- Zapata AG, 1981. Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 685-690.
- Zhu L, Gunn C & Beckman JS, 1992. Bactericidal activity of peroxyxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 452-457.
- Zittelli GC, Lavista F, Bastianini A, Rodolfi L, Vincenzini M & Tredici MR, 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology* 70: 299–312.

Zorrilla I, Balebona MC, Morinigo MA, Sarasquete C & Borrego JJ, 1999. Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* 22: 167-172.