

LINCOLN GARCIA CORONEL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS DE ALGAS FRENTE A BACTÉRIAS
PATOGENICAS PARA AQUICULTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção de grau de Mestre em Aquicultura

Orientador: Edegar Roberto Andreatta
Co-orientador: Felipe do Nascimento Vieira

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coronel, Lincoln Garcia

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de algas frente a bactérias patogênicas para aquicultura / Lincoln Garcia Coronel ; orientador, Edegar Roberto Andreatta ; coorientador, Felipe do Nascimento Vieira. - Florianópolis, SC, 2016.

52 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Aquicultura. 3. algas. 4. resistência múltipla. 5. Vibrio sp.. I. Andreatta, Edegar Roberto . II. Vieira, Felipe do Nascimento . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de algas frente a bactérias patogênicas para aquicultura

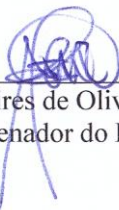
Por

LINCOLN GARCIA CORONEL

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



Dr. Felipe do Nascimento Vieira – *Presidente*



Dra. Leila Hayashi



Dr. Marcelo Maraschin



Dr. Walter Quadros Seiffert

Este trabalho é dedicado a minha família:
meus pais Alesandra e Edmar, meu irmão
Guilherme e minha sobrinha Alice. Especialmente
a minha madrinha Gi.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Alesandra e Edmar, por todo apoio. Ao meu irmão Guilherme pela parceria de sempre. A minha madrinha Gi por sempre me incentivar a não desistir dos meus objetivos.

A empresa Soriano por ceder a biomassa das algas e a CAPES pela bolsa de estudos durante todo o período do mestrado.

Ao meu amigo Ricardo por compartilhar seu vasto conhecimento comigo e me ajudar desde o início do mestrado com as dificuldades que surgiram, além do sua parceria infinita em diversos momentos dessa jornada.

Aos amigos que fiz aqui em Florianópolis e vou levar comigo para sempre, Orestes, Wiaslan, Douglas, Maria Luiza, Phill, Diego e Jorge, obrigado por tudo.

Ao meu orientador Edeimar R. Andreatta por ter aceitado me orientar e ter compartilhado comigo seu conhecimento.

Ao meu co-orientador Felipe do Nascimento Vieira por ter me dado a oportunidade de fazer o mestrado, por enriquecer meus conhecimentos com sua sabedoria e por ser uma pessoa que tenho como exemplo de honestidade.

Não posso deixar de agradecer ao pessoal do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC, principalmente ao professor Marcelo Maraschin, por ter cedido o laboratório e as pesquisadoras Fernanda e Cláudia pra me auxiliarem em todo o processo de realização dos extratos das algas, vocês foram fundamentais para o sucesso desse trabalho.

A minha amiga Natália que me ajudou muito durante toda a execução do meu experimento, além da amizade sincera que fizemos durante esse período, muito obrigado ‘Queriiii’.

A Rafaela, ou Rafa, que foi uma parceira para todos os projetos que surgiram, para as dificuldades, muitas horas discutindo, tentando encontrar alternativas com os extratos... Gratidão por tudo e que nossa parceria perdure no doutorado.

As nordestinas arretadas Tamiris, Hortência, Gicella, Paula, Renata e Priscila que sempre foram as responsáveis por muitos momentos felizes nesses dois anos.

Marysol por ter sido a pessoa que divulgou o programa de pós graduação em Aquicultura e que desde o meu estágio curricular me ajudou em tudo que precisei, muito obrigado, minha eterna veterana.

Norha por toda sua paciência comigo para me explicar as análises, e discutir sobre microbiologia, meu muito obrigado! A querida

Cris, por me ajudar nas análises de imunologia e sempre ser uma pessoa muito atenciosa e especial. Ao Delano que foi coletar algas comigo no Sambaqui e por sempre estar presente e me ajudar a solucionar as 'buchas' que apareciam.

Mari, Fernanda, Joselle, Ariane, Dimas, Wilson, Déia, Davi, e a toda a equipe do LCM que me ajudou, sem esse espírito de trabalho em equipe nada seria possível.

Quando você acha que sabe todas as perguntas, vem a vida e muda todas as respostas.

Bob Marley

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos das algas *Haematococcus pluvialis*, *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida* em cepas padrão e em isolados de bactérias patogênicas de organismos aquáticos (*Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio anguillarum*). O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos aquosos. Além disso, foi determinado o perfil de suscetibilidade a 12 antimicrobianos das bactérias pelo método de disco-difusão em ágar. O extrato aquoso da microalga *H. pluvialis* demonstrou CIM de 156,25 mg/mL, enquanto os extratos aquosos das macroalgas *K. alvarezii*, *S. filipendula* e *U. pinnatifida* obtiveram CIM de 625 mg/mL, 312,5 mg/mL e 39,062 mg/mL, respectivamente. A multirresistência foi verificada em 100% das cepas testadas. Os resultados sugerem que os extratos aquosos das algas exerceram atividade antimicrobiana frente as cepas de bactérias patogênicas da aquicultura, sendo o extrato da *U. pinnatifida* o que inibiu o crescimento dos micro-organismos com as menores concentrações.

Palavras chaves: Aquicultura; algas; resistência múltipla; *Vibrio* sp.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate antimicrobial activity of aqueous extracts from the seaweeds *Haematococcus pluviialis*, *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum filipendula* and *Undaria pinnatifida* on standard strains and on isolates of pathogenic bacteria from aquatic organisms (*Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio anguillarum*). Broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the aqueous extracts. Further, the susceptibility profile to 12 antimicrobials bacteria was determined by disk diffusion method on agar. Aqueous extract of the seaweed *H. pluviialis* showed MIC of 156.25 mg/mL while aqueous extracts of macroalgae *K. alyarezii*, *S. filipendula* and *U. pinnatifida* acquired MIC of 625 mg/mL, 312.5 mg/mL and 39.062 mg/mL, respectively. Multidrug resistance was found in 100% of the tested strains, suggesting that aqueous extracts of seaweed exerted antimicrobial activity against strains of pathogenic bacteria in aquaculture, being *U. pinnatifida* extract the one which inhibited micro-organisms growth with the lowest concentrations.

Keywords: Aquaculture, algae; multidrug resistance; *Vibrio* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil espectrofotométrico de varredura ($\lambda = 200 \text{ nm}-700 \text{ nm}$) dos extratos aquosos de <i>H. pluvialis</i> , <i>K. alvarezii</i> , <i>S. filipendula</i> e <i>U. Pinnatifida</i>	32
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de resistência aos antimicrobianos testados e o comportamento de inibição frente aos extratos das 12 cepas de micro-organismos.....	35
---	----

SUMÁRIO

CAPITULO I: Introdução	21
1 Compostos bioativos de origem natural	22
1.1 Compostos bioativos de macroalgas	23
1.2 Composto bioativos de microalgas.....	24
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS.....	26
CAPÍTULO II: Artigo original.....	27
5 INTRODUÇÃO	28
6 MATERIAL E MÉTODOS	29
6.1 Material biológico	29
6.2 Preparação dos extratos aquosos	29
6.3 Espectrofotometria de varredura UV-visível.....	30
6.4 Cepas de micro-organismos	30
6.5 Análises microbiológicas	30
7 RESULTADOS	32
7.1 Espectrofotometria de varredura UV-visível.....	32
7.2 Análises microbiológicas	32
8 DISCUSSÃO.....	36
9 CONCLUSÃO	39
Dentre os extratos avaliados, o extrato de <i>U. pinnatifida</i> apresentou o maior potencial antimicrobiano contra as cepas bacteriana avaliadas... 39	
10 AGRADECIMENTOS.....	39
11 REFERÊNCIAS	39
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	45
ANEXOS.....	51

CAPITULO I: Introdução

A aquicultura representa uma importante indústria na produção de proteína de origem animal, alcançando marca anual superior a 66 milhões de toneladas. A China lidera o ranking mundial da aquicultura, com uma produção superior a 41 milhões de toneladas, representando, aproximadamente, 61,7% da produção mundial do setor. A América Latina obteve a produção anual de, aproximadamente, 2,5 milhões de toneladas, sendo que o Brasil foi responsável pela produção de 707 mil toneladas, ocupando assim a 12º posição no ranking mundial dos países produtores de organismos aquáticos (FAO, 2014).

Entretanto, a aquicultura atravessa por dificuldades para o seu crescimento. Enfermidades bacterianas são consideradas um dos fatores que afetam o crescimento da atividade. Dentre as principais enfermidades bacterianas, destacam-se: a infecção por *Aeromonas* spp., responsável pela furunculose em peixes; septicemia hemorrágica em peixes cujo patógeno é a *Pseudomonas fluorescens*; columariose em peixes que tem o micro-organismo *Flexbacter columnaris* como agente etiológico; a corinebacteriose em salmonídeos, uma enfermidade bacteriana renal causada pelo bacilo Gram positivo *Renibacterium salmoninarum*, a micobacteriose em peixes provocada pelos patógenos *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*, *Edwardsiella tarda* responsável pelo desenvolvimento de edwardsielose em tilápias e a Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS, do inglês *Early Mortality Syndrome*) em camarões marinhos, sendo o *Vibrio parahaemolyticus* o patógeno responsável (MARTINS *et al.*, 2011).

A administração de antimicrobianos é o tratamento preconizado para as bacterioses na aquicultura. O objetivo da antibioticoterapia é matar ou inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos, além de combater a mortalidade dos animais (READ e FERNANDES, 2003). Contudo, o uso de antimicrobianos na produção aquícola apresenta riscos de contaminação ao ambiente, com possíveis e imprevisíveis consequências nos ecossistemas aquáticos, assim como seu impacto na saúde pública. Além disso, a transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos, através de contato direto ou da cadeia alimentar, e as diversas interações genéticas bacterianas com disseminação de genes de resistência, promovem problemas terapêuticos na medicina humana e veterinária. (GASTALHO *et al.*, 2014).

A resistência antimicrobiana é descrita como uma condição ao qual um micro-organismo é capaz de sobreviver à exposição a um agente antimicrobiano (BARIE, 2012). Sendo que nos últimos anos o

aparecimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos cresce de forma indiscriminada. Este fato mostra a necessidade constante de pesquisas e desenvolvimento de novas substâncias biologicamente ativas (RAFFA *et al.*, 2005).

1 Compostos bioativos de origem natural

A saúde dos organismos cultivados na aquicultura pode ser beneficiada sem o recurso de compostos artificiais. Existe a alternativa de substituir produtos sintéticos por substâncias biologicamente ativas presentes em algas, microalgas e plantas terrestres. Algumas das biomoléculas presentes nestes organismos têm demonstrado possuir propriedades imunestimulantes, antimicrobianas (BANSEMIR *et al.*, 2006; ARDO *et al.*, 2008) e antioxidantes (CUSTÓDIO *et al.*, 2012). As biomoléculas causam nenhum ou baixo impacto ambiental e podem ser ministradas aos animais de cultivo incorporadas no alimento vivo, congelado ou em rações (SAGDIÇ e ÖZCAN, 2003).

Os produtos naturais marinhos tornaram-se uma fonte de pesquisas promissoras, devido à existência de metabólitos secundários estruturalmente diferenciados em comparação aos das plantas terrestres, apresentam esqueletos carbônicos novos e combinações de grupos funcionais pouco comuns (SIMÕES *et al.*, 2004). Os mecanismos de adaptação dos organismos às condições ambientais, como radiações ionizantes, alta intensidade luminosa, raios UV, extremos de temperatura, poluentes e patógenos, originaram uma grande diversidade estrutural de metabólitos secundários durante a sua evolução, com funções ecológicas diversas. Além disso, os oceanos são responsáveis por 70% da superfície terrestre, abrigam diversas espécies marinhas, entre plantas, animais e microrganismos, sendo muitas delas ainda não estudadas (MAYER e HAMANN, 2005).

Em relação aos demais organismos marinhos, as algas denotam vantagem por apresentarem uma maior disponibilidade em relação, por exemplo, esponjas e ascídios, em razão da limitação de coleções (KOBAYASHI *et al.*, 1989). Além disso, as algas apresentam um grande potencial para o cultivo, o que tem atraído o interesse das indústrias em sua exploração (GOMBOTZ e WEE, 1998).

As algas são os organismos aquáticos mais antigos do planeta, havendo evidências de sua existência no período pré-cambriano, há 3,5 bilhões de anos (HORTA, 2000). Elas compõem uma diversidade de espécies que vão desde organismos unicelulares microscópicos a gigantes *kelps* (conjunto de grandes algas pardas). São seres

fotossintetizantes na grande maioria, porém não possuem folhas, raízes ou mesmo tecidos vasculares. As algas habitam variados habitats, como oceanos, os corpos de água doce, os solos, as rochas e até as árvores (VAN DEN HOECK, 1995). As algas se constituem em uma importante fonte de compostos bioativos, devido à capacidade de produzir metabólitos secundários com grande espectro de atividades biológicas. Foram detectados em tecidos de algas verdes, vermelhas ou pardas compostos com atividade antiviral, antifúngica, vermífuga, antimicrobiana e antioxidante (LINDEQUIST e SCHWEDER, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003; SMIT, 2004).

Segundo Bansemir *et al.* (2006), os extratos de 26 espécies de algas, usando solventes orgânicos com diferentes polaridades (diclorometano, metanol e água), demonstraram ser uma fonte promissora de compostos biologicamente ativos, podendo ser utilizados no tratamento profilático e terapêutico de doenças infecciosas que acometem a aquicultura.

1.1 Compostos bioativos de macroalgas

As macroalgas marinhas estão inseridas em três grupos principais: Phaeophyceae (algas pardas), Chlorophyta (algas verdes) e Rhodophyta (algas vermelhas) (ADL *et al.*, 2012). Esses organismos são constituídos de substâncias com grande potencial terapêutico, sendo muito utilizados na medicina oriental há milhares de anos para tratamento de enfermidades na China (HUANG *et al.*, 2006). Os primeiros relatos da atividade antimicrobiana de compostos provenientes de algas datam da segunda década do século XX (KHALEAFA *et al.*, 1975). Estudos sobre o potencial antimicrobiano de uma grande variedade de macroalgas demonstraram que a capacidade de síntese de compostos antimicrobianos não se restringe a apenas um grupo de algas (HELLIO *et al.*, 2000; DEL VAL *et al.*, 2001).

Metabólitos extraídos desses organismos são potentes compostos bioativos para a indústria farmacêutica. Sendo relatado que esses compostos possuem atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica contra micro-organismos patogênicos (LIMA-FILHO *et al.*, 2002). A literatura relata a existência de compostos antimicrobianos de estruturas variadas como policetídeos, florotaninos, terpenos halogenados e aglutininas encontrados em macroalgas, microalgas eucarióticas e cianobactérias (KÖNIG *et al.*, 1999; NAGAYAMA *et al.*, 2002).

As espécies do gênero *Sargassum*, por exemplo, contêm polissacarídeos biologicamente ativos à base de fucoídano que possuem

atividade antitumoral, antimicrobiana e antiviral (HUYNH *et al.*, 2011). O extrato de *Sargassum muticum* mostrou ação inibitória sobre bactérias Gram positivas e negativas (ZHUANG *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1988; ASKER *et al.*, 2007). A administração de extrato de *Sargassum duplicatum* via injeção e imersão aumentou a resistência imunológica do *L. vannamei* contra vibrioses (YEH *et al.*, 2006). O extrato de *Sargassum fusiforme* quando administrado oralmente aumentou a resistência contra vibrioses e a atividade imunológica do *Fenneropenaeus chinensis* (HUANG *et al.*, 2006). O extrato de *Sargassum polycystum* quando administrado na alimentação do *Penaeus monodon* demonstrou aumento na resistência contra o vírus da mancha branca (CHOTIGEAT *et al.*, 2004).

O extrato bruto da espécie de macroalga *K. alvarezii* foi testado frente à cepa patogênica de *Vibrio harveyi* e demonstrou eficácia na inibição do crescimento e redução dos fatores de virulência do microorganismo (SIVAKUMAR *et al.*, 2014). Bibiana *et al.* (2012) concluiu que os extratos de *K. alvarezii* com diferentes solventes orgânicos (éter etílico, benzina, acetona e ácido etanoico) apresentaram eficácia contra bactérias patogênicas Gram positivas e negativas.

A macroalga marrom *Undaria pinnatifida* pode ser cultivada e representa uma alternativa de alimento a ser incluído em rações de organismos aquáticos (TRAI FALGAR *et al.*, 2010). Lim *et al.* (2008) avaliou o extrato metanólico de *U. pinnatifida* utilizando a técnica de disco-difusão em ágar, obtendo, dessa forma, um halo inibitório frente ao crescimento de *Staphylococcus aureus*. Segundo Niu *et al.* (2015), a suplementação de 2,17 a 2,87% de *U. pinnatifida* na dieta do *P. monodon* melhorou significativamente o desempenho de crescimento, aumento da imunidade e da largura e altura da dobra intestinal.

1.2 Compostos bioativos de microalgas

Microalgas são organismos ricos em metabólitos e substâncias biologicamente ativas de diversas composições químicas, como peptídeos, glicídeos e alcalóides (UMA *et al.*, 2011). Possuem uma enorme biodiversidade, estimando-se que existam entre 200.000 a 800.000 espécies, tendo sido descritas apenas 35.000 (CARDOZO *et al.*, 2007). Esses organismos microscópicos estão sendo cada vez mais utilizadas nos diversos campos da biotecnologia, devido à variedade de atividades biológicas que estes organismos possuem (PRADHAN *et al.*, 2012). Dentre essas atividades biológicas, destacam-se a atividade

antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (BHAGAVATHY *et al.*, 2011).

As microalgas são consideradas um dos alimentos essenciais na dieta de diversos organismos marinhos criados em cativeiro. São altamente nutritivas, devido ao seu elevado teor em PUFAs (ácidos graxos poliinsaturados), especialmente em EPA (ácido eicosapentaenóico), ARA (ácido araquidônico) e DHA (ácido docosahexaenóico; NATRAH *et al.*, 2007). Devido ao seu perfil nutricional, as microalgas têm elevada importância na alimentação de larvas de peixe (BECKER, 2004), bivalves e crustáceos filtradores (WIKFORS *et al.*, 1996). Além do seu valor nutricional, as microalgas também têm sido o foco de estudos sobre a sua aplicação na produção de biocombustível (KOBBERG *et al.*, 2011) e na fixação de carbono (HSUEH *et al.*, 2009).

As principais microalgas cultivadas comercialmente são espécies dos gêneros *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorophyceae) e *Arthrospira* Stizenberger (Cyanophyceae) para a adição em alimentos naturais (“health food”), *Dunaliella salina* Teodoresco para a obtenção de betacaroteno e *Haematococcus pluvialis* Flotow para a obtenção de astaxantina (BECKER, 2004).

A espécie *Botryococcus braunii* é uma microalga de água doce que tem sido estudada como fonte de biocombustível. Além disso, tem sido estudada como fonte de compostos para a indústria de cosméticos (MENDES *et al.*, 2003). Outro exemplo de microalga com potencial bioativos é espécie de microalga *Haematococcus pluvialis*, considerada a fonte mais rica do mundo na produção de astaxantina, carotenoide que apresenta grande atividade antioxidante (GONG e CHEN, 1997; MACHMUDAH *et al.*, 2006; KITTIKAIWAN *et al.*, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

A utilização de antimicrobianos sintéticos (antibióticos) na indústria de produtos de origem animal apresenta riscos para o meio ambiente e com impacto na saúde pública devido à seleção de bactérias resistentes a antibióticos. A substituição parcial ou até mesmo total de quimioterápicos sintéticos por substâncias naturais biologicamente ativas frente a micro-organismos patogênicos mostram-se relevantes e com grande potencial. Tanto as macroalgas quanto as microalgas destacam-se nesse contexto por possuírem compostos bioativos com potencial terapêutico promissor frente às enfermidades que acometem a aquicultura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos da microalga *Haemotococcus pluviialis* e das macroalgas *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida* frente a bactérias patogênicas para a aquicultura.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos da microalga *Haemotococcus pluviialis* e das macroalgas *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida* na inibição *in vitro* de bactérias patogênicas e discutir a sensibilidade encontrada frente aos antimicrobianos.

4 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A dissertação é dividida em dois capítulos: o primeiro referente à introdução geral e revisão de literatura; e o segundo capítulo é um artigo original formatado segundo normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

CAPÍTULO II: Artigo original

Atividade antimicrobiana de extratos de algas frente a bactérias patogênicas da aquicultura

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos das espécies de algas *Haematococcus pluvialis*, *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida* em isolados de bactérias patogênicas de organismos aquáticos (*Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio anguillarum*) e cepas padrão. O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos aquosos. Além disso, foi determinado o perfil de suscetibilidade a 12 antimicrobianos das bactérias pelo método de disco-difusão em ágar. O extrato aquoso da microalga *H. pluvialis* demonstrou CIM de 156,25 mg/mL, enquanto os extratos aquosos das macroalgas *K. alvarezii*, *Sargassum filipendula* e *U. pinnatifida* obtiveram CIM de 625 mg/mL, 312,5 mg/mL e 39,062 mg/mL, respectivamente. A multirresistência foi observada nas cepas de *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio anguillarum*, ou seja, em 100% das cepas testadas. Os resultados sugerem que os extratos aquosos das algas exerceram atividade antimicrobiana mesmo em cepas multirresistentes de bactérias patogênicas da aquicultura, sendo que extrato de *U. pinnatifida* inibiu o crescimento dos micro-organismos com as menores concentrações.

Palavras chaves: *H. pluvialis*; *K. alvarezii*; *S. filipendula*; *U. pinnatifida*; resistência múltipla; *Vibrio sp.*

5 INTRODUÇÃO

A aquicultura é um importante setor na produção de proteína animal, alcançando uma produção anual total superior a 66 milhões de toneladas (FAO, 2014). No Brasil a atividade cresceu 31,1% em 2011 em relação ao ano anterior, totalizando uma produção de 707 mil toneladas (FAO, 2014).

Apesar do seu crescimento, a indústria aquícola mundial enfrenta dificuldades devido à presença de doenças infecciosas, as quais causam prejuízos aos produtores, podendo tornar a atividade pouco lucrativa (TAVECHIO *et al.*, 2009). Dessa forma, a administração de antimicrobianos vem sendo utilizada com o objetivo de eliminar ou inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos e, conseqüentemente, reduzir a mortalidade dos organismos aquáticos (READ e FERNANDES, 2003).

Entretanto, o uso indiscriminado e errôneo, como a exposição a antibióticos em concentrações subinibitórias, pode levar ao surgimento de resistência, tanto em bactérias comensais do intestino humano, quanto em bactérias dos organismos aquáticos, com possível disseminação de genes de resistência em diversas populações bacterianas (CABELLO, 2006; GORDON *et al.*, 2007).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013) já proibiu o uso de diversos antibióticos, tais como: cloranfenicol e nitrofuranos (IN nº 09, 27/06/2003), quinolonas e sulfonamidas (IN nº 26, 9/07/2009), espiramicina e eritromicina (IN nº 14, 17/05/2012) como aditivo alimentar na produção animal. Este fato mostra a necessidade constante de pesquisas e desenvolvimento de estudos sobre novas substâncias biologicamente ativas como alternativas aos quimioterápicos que atuem na inibição de patógenos, prevenindo as enfermidades, bem como promotores de crescimento e sem a presença de efeitos colaterais (RAFFA *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2010).

As algas se caracterizam por ser uma importante fonte de compostos bioativos devido a capacidade de produzir metabólitos secundários com grande espectro de atividades biológicas. Foram detectados em tecidos de algas verdes, vermelhas ou pardas compostos com atividade antiviral, antifúngica, vermífuga, antimicrobiana e antioxidante (LINDEQUIST e SCHWEDER, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos das espécies de algas *H.*

pluvialis, *K. alvarezii*, *S. filipendula* e *U. pinnatifida* frente a bactérias patogênicas para a aquicultura.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram executados no Laboratório de Camarões Marinhos (Anexo 1) e no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, ambos pertencentes a da Universidade Federal de Santa Catarina, no sul do Brasil.

6.1 Material biológico

As amostras da alga nativa *Sargassum filipendula* foram coletadas na praia do Sambaqui, Florianópolis, Santa Catarina, em maio de 2015. A biomassa da *Kappaphycus alvarezii* (Anexo 2) e da *Haematococcus pluvialis* foram coletadas do cultivo dos setores de macroalgas e Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM). Já a amostra da alga exótica *Undaria pinnatifida* foi cedida pela empresa argentina Soriano S/A.

6.2 Preparação dos extratos aquosos

Com exceção da microalga *H. pluvialis*, todas as macroalgas passaram por um processo de limpeza para serem congeladas a -20°C e posteriormente, liofilizadas. O processo baseia-se na lavagem com água destilada por três vezes, banho de 1 minuto em solução de formiato de amônio 0,5 mol/L e enxague com água destilada por três vezes novamente. Para obtenção do extrato metanólico, a biomassa das algas liofilizadas foi moída em nitrogênio líquido no almofariz com pistilo (Anexo 3). Alíquotas de 10 g de biomassa moída de cada alga foram homogeneizadas em Becker com 100 mL de metanol 80% e realizada a extração durante 1h. Os extratos obtidos foram centrifugados (4000 rpm, por 10 minutos, temperatura ambiente) e o sobrenadante cuidadosamente recolhido. O solvente foi evaporado em um evaporador rotativo sob vácuo a uma temperatura de 55°C . O resíduo aquoso foi filtrado em papel de filtro *Whatman* e armazenado em recipiente de vidro âmbar a -20°C , com concentração de 625 mg/mL. Para controle negativo foi utilizado o metanol 80% evaporado em um evaporador rotativo sob vácuo a uma temperatura de 55°C . Sendo o resíduo aquoso, utilizado nas análises *in vitro*.

6.3 Espectrofotometria de varredura UV-visível

O perfil espectral UV-visível das amostras de extratos das algas foi determinado a partir de uma varredura exploratória. Para obtenção das medidas de absorção óptica dos compostos bioativos presentes nos extratos aquosos, foi utilizado um Espectrofotômetro UV-Vis (Gold Spectrum lab 53 UV-Vis spectrophotometer, BEL photonics, Brasil) operando na região de 200nm a 700nm.

6.4 Cepas de micro-organismos

As cepas bacterianas utilizadas para as análises microbiológicas *in vitro* foram divididas em cepas padrão (padrão Gram-negativo *Escherichia coli* ATCC 25102, *Vibrio harveyi* ATCC 14126, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio vulnificus* LAM 64, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0053, padrão Gram-positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) ATCC 43300), cepas marinhas descritas como patogênicas para aquicultura (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*) e cepas de água doce descritas como patogênicas para aquicultura (*Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus agalactiae*).

Para ativação das cepas, uma alíquota de 100 µL dos isolados preservados a -20°C em solução de caldo de coração e cérebro (BHI, do inglês *Brain Heart Infusion*) e glicerol foi inoculada em tubo de 10 mL contendo caldo BHI para cepas de água doce e BHI suplementado com 3% de NaCl para as cepas de *Vibrio* e incubado a 35°C por 24h.

6.5 Análises microbiológicas

Para obtenção da concentração mínima inibitória (CIM) foi utilizado o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços (Anexo 4). Nos testes com os extratos das algas frente aos micro-organismos *C. freundii*, *Escherichia coli* ATCC 25102, *P. aeruginosa* ATCC 0053, *P. fluorescens*, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) ATCC 43300 e *S. agalactiae* foram adicionados 100 µL do meio PB (do inglês *Poor Broth* 1% de peptona, 0,5% de NaCl, pH 7,4) a cada poço da microplaca de 96 poços de fundo chato e 100 µL de cada extrato aquoso no primeiro poço. Posteriormente foi realizada uma diluição seriada fator dois até o 12° poço. Finalmente, 20µL dos micro-organismos patogênicos, citados acima, foram

adicionados a cada poço em uma concentração ajustada de 1×10^3 UFC mL⁻¹ de acordo com a escala nefelométrica de McFarland. As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 h. Para as análises com as cepas do gênero *Vibrio*, foi realizado o mesmo procedimento, com substituição do meio de cultura PB por meio PWS (do inglês *Peptone Water Saline* 1% de peptona, 3% de NaCl, pH 7,0). Os ensaios da CIM foram realizados em triplicata.

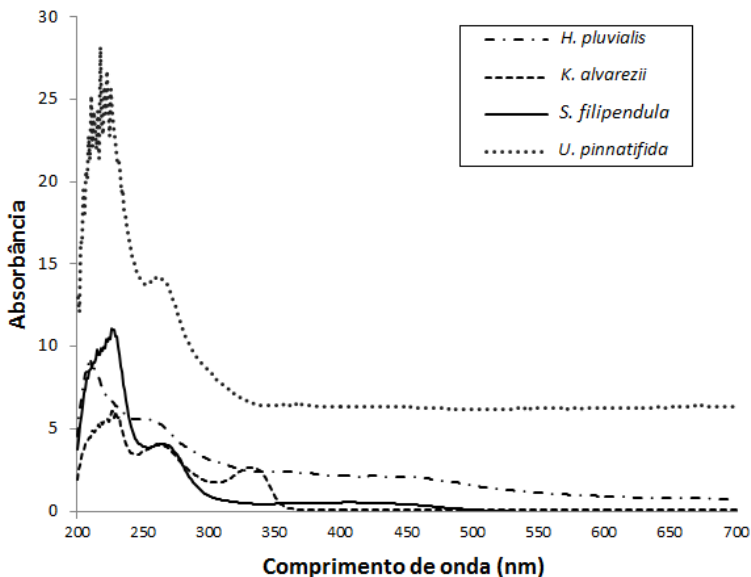
Para efeito comparativo do grau de suscetibilidade dos isolados de *C. freundii*, *P. fluorescens*, *S. agalactiae*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* foi realizado o teste de suscetibilidade a antimicrobiano (TSA) por meio do método de disco-difusão em ágar Mueller Hinton (HiMedia Laboratories®) seguindo a técnica de Kirby-Bauer modificado (Bauer et al., 1966). Foram utilizados os seguintes discos de antimicrobianos pertencentes às classes: (1) beta-lactâmicos - penicilina (10UI), ampicilina (10µg), piperacilina associada ao tazobactam (100/10µg) e amoxicilina associada ao ácido clavulânico (20/10µg), (2) aminoglicosídeos - gentamicina (10µg), amicacina (30µg) e tobramicina (10µg), (3) fluoroquinolonas - enrofloxacin (5µg), ciprofloxacina (5µg), norfloxacina (10µg), levofloxacina (5µg) e ácido nalidíxico (30µg), (4) fenicóis - cloranfenicol (30µg), (5) macrolídeos - eritromicina (15µg) e azitromicina (15µg), (6) sulfamidas – sulfametoxazol associado ao trimetropin (1,25/23,75µg) e (7) tetraciclinas - tetraciclina (30µg), (8) cefalosporinas – ceftazidima (30µg), cefoxitina (30µg), cefepime (30µg) e cefalexina (30µg), (9) lincosaminas – clindamicina (2µg), (10) carbapenêmicos – meropenem (10µg), (11) glicopeptídeos – vancomicina (30µg) e (12) ansamicinas – rifampicina (5µg). A leitura do método de difusão em disco foi realizada por meio da medição dos halos inibitórios de cada disco e comparando com os valores apresentados em uma tabela apropriada, conforme o fabricante dos discos (Laborclin®), determinando assim a sensibilidade ou resistência da bactéria aos antimicrobianos testados. A multirresistência, quando observada, foi avaliada conforme Youn *et al.* (2011), os quais definiram a multirresistência aos antimicrobianos como a resistência a mais de três antimicrobianos de classes diferentes. Amostra de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle de qualidade dos discos.

7 RESULTADOS

7.1 Espectrofotometria de varredura UV-visível

A figura 1 apresenta o perfil espectral dos extratos aquosos das algas *H. pluvialis*, *K. alvarezii*, *S. filipendula* e *U. pinnatifida*. Pode-se observar que os extratos de *H. pluvialis*, *K. alvarezii* e *U. pinnatifida* apresentaram grupos cromóforos que absorveram luz entre 200 nm e 700 nm, enquanto que o extrato de *S. filipendula* apresentou bandas de absorção entre 200 nm e 520 nm (Figura 1).

Figura 1: Perfil espectrofotométrico de varredura ($\lambda = 200 \text{ nm} - 700 \text{ nm}$) dos extratos aquosos de *H. pluvialis*, *K. alvarezii*, *S. filipendula* e *U. pinnatifida*.



A partir dos perfis espectrais de varredura UV-visível das amostras em estudo, pode-se inferir a presença de compostos fenólicos em quantidades significativas, considerando-se os valores observados de máximas de absorbâncias típicas dessa classe de metabólitos.

7.2 Análises microbiológicas

Os resultados obtidos nos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* demonstraram que o extrato da microalga *H. pluvialis* apresentou

ação inibitória sobre nove espécies de bactérias, sendo o extrato mais eficiente em relação aos extratos das macroalgas. Este extrato se mostrou eficiente frente a três cepas (3/12), sendo 28,6% (2/7) de cepas padrão e 50% (1/2) de eficiência nas cepas isoladas de água marinha (Tabela 1).

O extrato de *U. pinnatifida* apresentou ação inibitória contra 11 micro-organismos patogênicos. Além disso, o extrato foi o mais eficiente, em comparação aos outros extratos, em 75% das bactérias testadas (9/12), sendo 71,4% (5/7) em cepas padrão, 66,7% (2/3) em cepas isoladas de água doce e 100% em bactérias isoladas de água marinha (Tabela 1).

O extrato de *S. filipendula* foi eficaz frente aos 12 micro-organismos testados. Além disso, foi o que obteve melhor eficiência, em relação aos outros extratos, frente à cepa de água doce *C. freundii*, com inibição na concentração de 156,25 mg/mL. O extrato de *K. alvarezii* apresentou atividade antimicrobiana em 91,7% (11/12) das cepas testadas, contudo as concentrações foram a partir de 312,5 mg/mL, em relação as concentrações dos outros extratos, foram consideradas altas. O controle negativo não inibiu o crescimento bacteriano.

Conforme os resultados encontrados na técnica de microdiluição em caldo, a inibição de crescimento de 33,3% das cepas ocorreu a partir de 78,125 mg/mL com o extrato de *H. pluvialis*, enquanto que o extrato de *K. alvarezii* ocorreu a partir da concentração de 312,5 mg/mL em 50% dos isolados. A CIM do extrato de *S. filipendula* com atividade inibitória em 58,5% dos micro-organismos ocorreu a partir da concentração de 156,25 mg/mL, enquanto o extrato de *U. pinnatifida* demonstrou eficiência na concentração de 19,531 mg/mL em 50% das cepas testadas (Tabela 1).

Em relação a atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram-positivas, o extrato da microalga *H. pluvialis* inibiu o crescimento de *S. agalactiae* na concentração de 39,062 mg/mL. Em contrapartida, os extratos das macroalgas *K. alvarezii*, *S. filipendula* e *U. pinnatifida* apresentaram atividade a partir de 312,5 mg/mL, 156,25 mg/mL e 19,531 mg/mL, respectivamente. Quanto a atividade inibitória sobre as bactérias Gram-negativas, os extratos de *H. pluvialis*, *K. alvarezii*, *S. filipendula* e *U. pinnatifida* demonstraram ação a partir de 78,125 mg/mL, 312,5 mg/mL, 156,25 mg/mL e 156,25 mg/mL (Tabela 1).

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cinco isolados de organismos aquáticos observado por meio do método de disco-difusão em ágar mostrou que 80% dos isolados foram resistentes à cefalexina e tobramicina, 60% à ampicilina, amoxicilina associado ao

ácido clavulânico, enrofloxacina, ceftoxitina e gentamicina e 40% à cefepime, ampicacina e sulfazotrim. O cálculo da multirresistência aos antimicrobianos, realizado segundo Youn *et al.* (2011), apontou resistência a pelo menos um componente de três ou mais classes de antimicrobianos em 100% dos isolados testados (Tabela 1).

Tabela 1: Perfil de resistência aos antimicrobianos testados e o comportamento de inibição frente aos extratos das 12 cepas de micro-organismos.

Cepas	<i>H. pluvialis</i>		<i>K. alvarezii</i>		<i>S. flitpendula</i>		<i>U. pinnatifida</i>		Perfil de resistência
	CIM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CIM (mg/mL)		
<i>C. freundii</i>	NI	NI	312,5	156,25	NI	NI	NI	Cfx/Enro/Tob	
<i>E. coli</i> ATCC 25102	78,125	78,125	156,25	39,062	19,531	19,531	19,531	NT	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 0053	78,125	78,125	78,125	156,25	39,062	39,062	39,062	NT	
<i>P. fluorescens</i>	39,062	39,062	39,062	78,125	2,442	2,442	2,442	Amp/Cfx/Cfo/Cpm/Nal/Sut/Tob	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	NI	NI	312,5	156,25	19,531	19,531	19,531	NT	
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300	NI	NI	312,5	156,25	19,531	19,531	19,531	NT	
<i>S. agalactiae</i>	39,062	39,062	312,5	78,125	19,531	19,531	19,531	Cip/CpmGen/Sut	
<i>V. alginolyticus</i>	39,062	39,062	NI	78,125	19,531	19,531	19,531	Amp/Ami/Amp/Cfx/Cfo/Enro/Gen/Tob	
<i>V. Harveyi</i> ATCC 14126	19,531	19,531	312,5	78,125	78,125	78,125	78,125	NT	
<i>V. anguillarum</i>	19,531	19,531	312,5	156,25	19,531	19,531	19,531	Amp/Ami/Amp/Cip/Cfx/Cfo/Enro/Gen/Ppt/Tob	
<i>V. parahaemolyticus</i>	78,125	78,125	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	NT	
<i>V. vulnificus</i> LAM 64	78,125	78,125	156,25	156,25	156,25	156,25	39,062	NT	

NI = extrato não inibiu o crescimento da cepa testada. NT = não foi realizado teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) por se tratar de cepa padrão. Amp = ampicilina. Amc = amoxicilina associada ao ácido clavulânico, Ami = amicacina, Cfx = cefalexina, Cfo = cefoxitina, Cpm = cefepime, Cip = ciprofloxacina, Nal = ácido nalidíxico, Sut = sulfazotrim, Gen = gentamicina, Enro = enrofloxacina, Ppt = piperacilina associada ao tazobactam, Tob = tobramicina.

8 DISCUSSÃO

Os compostos bioativos presentes nos diferentes tipos de algas são responsáveis por conferir a atividade biológica desses organismos de tamanha diversidade metabólica (PARSAEIMEHR e CHEN, 2013). No presente trabalho, podemos observar através da espectrofotometria de varredura UV-visível, a presença da classe de compostos fenólicos nos extratos aquosos das quatro espécies de algas testadas. Segundo Adam *et al.* (1998) a presença de tais compostos justifica a atividade antimicrobiana de extratos de algas. Na região espectral de 290 a 380 nm ocorre a absorção de compostos fenólicos, mas também ocorre a absorção de proteínas e ácidos nucleicos (BACHEREAU *et al.*, 1998). Contudo, devido à utilização da solução metanol 80% para realizar a extração, é possível que as proteínas estejam precipitadas ou degradadas. Dessa forma, sugerimos a presença da classe de compostos fenólicos e podemos considerar que essas moléculas são responsáveis por conferir aos extratos das algas seu potencial antimicrobiano *in vitro* frente às bactérias patogênicas da aquicultura.

Quanto as análises microbiológicas, o extrato aquoso da microalga *H. pluvialis* obteve resultados de CIM inferiores a 78,125 mg/mL frente a Gram-negativos. Além disso, apresentou eficiência tanto nos isolados de água doce, quanto de água marinha, ressaltando que contra à cepa de água marinha de *V. anguillarum* o crescimento foi inibido na concentração de 19,531 mg/mL, a menor concentração observada, em relação aos outros extratos. A atividade antimicrobiana observada ocorre provavelmente devido aos ácidos graxos de cadeia curta, tais como ácido butanoico, metil lactato e fenóis simples. Estes estão presentes na astaxantina, carotenóide encontrado em altos teores na *H. pluvialis*, responsáveis pela inibição de bactérias e fungos, além de possuir atividade antioxidante (WANG *et al.*, 2000; SANTOYO *et al.*, 2009). Rao *et al.* (2010) encontraram uma CIM a partir de 400 ppm do extrato de *H. pluvialis* frente a cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas.

Dentre os extratos de macroalgas avaliados, o que demonstrou maior potencial antimicrobiano, devido a capacidade de inibir as cepas com as menores concentrações na técnica de microdiluição em caldo, foi o extrato aquoso de *U. Pinnatifida*, evidenciando, dessa forma, sua possível aplicabilidade em ambientes de água doce e marinha, e também, em cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, os isolados de água doce e marinha em que o extrato apresentou eficiência na inibição, foram considerados multirresistentes conforme Youn *et al.*

(2011), conseqüentemente, possuem maior dificuldade de inibição. Segundo Silva *et al.* (2013), macroalgas marinhas demonstraram atividade antibacteriana contra espécies do gênero *Vibrio* virulentas e resistentes a antibióticos, observação que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. Cabral (2012) avaliou extratos etanólicos de *U. pinnatifida* em proporções de 60%, 80% e 100%, sendo este o qual demonstrou atividade inibitória frente a *Klebsiella pneumoniae* e *Listeria monocytogenes*, com CIM entre 19,53 e 39,06 mg/mL, valores próximos aos observados na CIM frente as bactérias Gram-negativas testadas no presente estudo. Entretanto, os solventes utilizados são distintos, e o metanol 80% é a solução mais indicada para extração de compostos fenólicos, os quais são apontados como um dos diversos compostos bioativos, responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano (VIEIRA *et al.*, 2009).

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *S. filipendula* observada neste trabalho ocorreu a partir da concentração de 156,25 mg/mL, sendo o único extrato, dentre os avaliados, que obteve atividade antimicrobiana frente a 100% (12/12) das cepas testadas. Além disso, foi o mais eficiente, em relação aos outros extratos avaliados, contra as cepas Gram-negativas de *E. coli* e *C. freundii* com CIM de 39,062 mg/mL e 156,25 mg/mL, respectivamente. Dessa forma, podemos comprovar seu caráter inibitório seletivo frente a bactérias Gram-negativas. Sastry e Rao (1995) apontam a molécula bioativa *dioctyl phthalate* (DOP) como responsável pela atividade antimicrobiana do extrato de *Sargassum wightii* frente a *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnie*, *V. cholerae* e *P. aeruginosa*. O extrato de *Sargassum dentifolium* com o solvente diclorometano, testado *in vitro* por Shanab (2007), pela metodologia de disco-difusão, apresentou halos de 12mm para *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecalis*, e de 11mm para *Escherichia coli* e *Staphylococcus albus*. Além da ação inibitória sob o crescimento de bactérias relatada na literatura, o ácido algínico, polissacarídeo presente na parede celular de algas marinhas pardas, isolado de *S. wightii* demonstrou potente ação anti-inflamatória e antioxidante (PARSAEIMEHR e CHEN, 2013).

A macroalga *K. alvarezii* tem em sua composição bioquímica a presença de carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróis e fenóis (RAJASULOCHANA *et al.*, 2009). Os metabólitos secundários terpenóides, florotaninos e fenóis são os compostos apontados como responsáveis pela atividade antimicrobiana que as macroalgas marinhas exercem frente a micro-organismos

patogênicos (PRABHA *et al.*, 2013). Exemplo disso, são os resultados observados no presente estudo, onde o extrato aquoso de *K. alvarezii* foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de 11 bactérias avaliadas a partir de 312,5 mg/mL. Sivakumar *et al.* (2014), embora tenham utilizado a técnica de disco-difusão em ágar, tida como menos precisa (NASCIMENTO *et al.*, 2007), apontam um halo de inibição de 8,6 mm na concentração de 300 µg do extrato bruto de *K. alvarezii* frente a isolados de *V. harveyi* provenientes da larvicultura de *P. monodon*. Esse resultado corrobora com os observados no presente estudo, onde o extrato aquoso de *K. alvarezii* foi capaz de inibir o crescimento de 80% (4/5) das cepas de *Vibrio* testadas, incluindo a espécie de *V. harveyi*. A única cepa testada que o extrato de *K. alvarezii* não inibiu foi a do *V. alginolyticus*. Tal bactéria é relatada na literatura como um dos patógenos responsáveis por provocar na macroalga *K. alvarezii* a enfermidade *ice-ice*. Dessa forma, sugerimos que a inatividade observada do extrato da *K. alvarezii* frente a cepa de *V. alginolyticus* esteja associada à enfermidade *ice-ice*.

No presente trabalho observamos a predileção da atividade antimicrobiana da microalga de água doce *H. pluvialis* por micro-organismos oriundos de ambientes marinhos, enquanto as macroalgas de águas marinhas, *K. alvarezii*, *S. filipendula*. e *U. pinnatifida*, mostraram-se mais eficazes na inibição do crescimento de cepas provenientes de água doce. Os micro-organismos provenientes de água doce não apresentavam mecanismos de defesa às biomoléculas ativas presentes nas algas marinhas, assim como as bactérias de água salgada expostas ao extrato da microalga de água doce *H. pluvialis*, pois tais compostos não pertencem ao seu habitat, assim, foi observada a inibição. Dessa forma, sugere-se que esse seja o motivo para tal predileção. Manivannan *et al.* (2011) observou característica semelhante em seu estudo, onde as algas marinhas *Turbinaria conoides*, *Padina gymnospora* e *Sargassum tenerrimum* demonstraram atividade antimicrobiana seletiva por micro-organismos naturais de água doce.

A CIM dos extratos das algas para as 12 espécies de bactérias testadas variou de 2,442 a 312,5 mg/mL, ou seja, foi necessária uma maior concentração dos extratos para exercer atividade antimicrobiana, quando comparado com as concentrações de estudos semelhantes realizados. No entanto, autores como Hood *et al.* (2003) sustentam a impossibilidade da comparação direta entre pesquisas de atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais devido à falta de padronização dos métodos.

Quanto ao perfil de susceptibilidade dos cinco isolados observado no método de disco-difusão, os resultados obtidos são semelhantes aos descritos por Gastalho *et al.* (2014) que indicam uma resistência mais comum de isolados Gram-negativos de organismos aquáticos à cefalosporinas. No entanto uma porcentagem relativamente alta de isolados foi resistente a outros antimicrobianos, destacando a tobramicina, gentamicina e enrofloxacin. O cálculo da multirresistência aos antimicrobianos ressaltou que 100% dos isolados foram resistentes a pelo menos um componente de três ou mais classes de antimicrobianos conforme Youn *et al.* (2011). De acordo com Guardabassi e Kruse (2010), este resultado é um alerta para a emergência de cepas multirresistentes na aquicultura. Estes achados justificam a importância da implementação de medidas de controle do uso de antimicrobianos sintéticos na aquicultura. Contudo, não houve relação entre multirresistência aos antimicrobianos e resistência aos extratos das algas por nós testados.

9 CONCLUSÃO

Os extratos aquosos de *H. pluvialis*, *K. alvarezii*, *S. filipendula* e *U. pinnatifida* exercem atividade antimicrobiana *in vitro* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas para organismos aquáticos.

Dentre os extratos avaliados, o extrato de *U. pinnatifida* apresentou o maior potencial antimicrobiano contra as cepas bacterianas avaliadas.

10 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa Soriano por ceder a biomassa da macroalga *Undaria pinnatifida* e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela bolsa de mestrado concedida para Lincoln Garcia Coronel e apoio financeiro (AUXPE 2071/2014).

11 REFERÊNCIAS

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 1739- 1745, 1998.

BACHEREAU, F.; MARIGO, G.; ASTA, J. Effects of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. *Physiologia Plantarum*, v. 104, p. 203-210, 1998.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental microbiology**, v. 8, p. 1137-1144, 2006.

CABRAL, I. S. R. **Extracts of seaweed as antioxidants and antimicrobial agents and their effects on quality of Minced tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. São Paulo, 2012. 139 f. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Universidade de São Paulo, 2012.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, p. 18-19, 2014.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 28-44, 2014.

GORDON, L.; GIRAUD, E.; GANIÈRE, J. P.; ARMAND, F.; BOUJU-ALBERT, A.; DE-LA-COTTE, N. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. **Journal of applied microbiology**, v. 102, p. 1167-1176, 2007.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**, p. 17–30, 2010.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **J. Essent. Oil Res.**, v. 15, p. 428-433, 2003.

LIM, C.; LÜCKSTÄDTS, C.; KLESIUS, P.H. Review: Use of organic acids, salts in fish diets. **Global Aquaculture Advocate**, v.5 (9/10), p. 45 - 46, 2010.

LINDEQUIST, U.; SCHWEDER, T. Marine biotechnology. In: REHM, H. J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim, Germany, 2001. p. 441–484.

MANIVANNAN, K.; KARTHIKAI-DEVI, G.; ANANTHARAMAN, P.; BALASUBRAMANIAN, T. Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 114-120, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-proibidos>>. Acesso em: 15 de outubro de 2015.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA-JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 108-113, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

PARSAEIMEHR, A.; CHEN, F. Algal bioactive diversities against pathogenic microbes. In: MÉNDEZ-VILAS, A, editor. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, Vol 2. Badajoz: Formatex, 2013: p.796-803.

PRABHA, V.; PRAKASH, D. J.; SUDHA, P. N. Analysis of bioactive compounds and antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent extracts. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 4, p. 306-310, 2013.

RAFFA, R. B.; IANNUZZO J. R.; LEVINE D. R.; SAEID, K. K.; SCHWARTZ, R. C.; SUCIC, N. T. Bacterial Communication “Quorum Sensing” via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 312, p. 417-423, 2005.

RAJASULOCHANA, P.; DHAMOTHARAN, R.; KRISHNAMOORTHY, P. Primary phytochemical analysis of *Kappaphycus* sp. **J. Am. Sci.**, v. 5, p. 91-96, 2009.

RAO, A. R.; REDDY, R. L. R.; BASKARAN, V.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. **J. Agric. Food Chem.**, v. 11, p. 8553-8559, 2010.

READ, P.; FERNANDES, T. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. **Aquaculture**, v. 226, p. 139-163, 2003.

SANTOYO S, RODRÍGUEZ-MEIZOSO I, CIFUENTES A, JAIME L, GARCÍA-BLAIRSY REINA G, SEÑORANS F J, IBÁÑEZ E. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1213-1218, 2009.

SASTRY, V. M. V. S.; RAO, G. R. K. Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. **Bot. Mar.**, v. 37, p. 357-360, 1995.

SHANAB, S. M. M. Antioxidant and Antibiotic Activities of Some Seaweeds (Egyptian Isolates). **Int. J. Agri. Biol.**, v. 9, p. 184-198, 2007.

SILVA, G. C.; ALBUQUERQUE-COSTA, R.; OLIVEIRA-PEIXOTO, J. R.; MACEDO-CARNEIRO, P. B. D.; FERNANDES-VIEIRA, R. H. S. D. Tropical Atlantic marine macro algae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant *Vibrio*. **Lat. Am. J. Aquat. Res.**, v. 4, p. 183-188, 2013.

SIVAKUMAR, K.; KANNAPPAN, S.; DINESHKUMAR, M.; PATIL, K. P. Antagonism of marine macro alga *Kappaphycus alvarezii* extract against luminescence disease causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 458-469, 2014.

TAVECHIO, W.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controlo de patógenos em piscicultura. **Boletim Inst. Pesca**. São Paulo, v. 35(2), p. 335-341, 2009.

VIEIRA, M. A.; MARASCHIN, M.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R. D. M. C. Análise de compostos fenólicos, metilxantinas, tanino e atividade antioxidante de resíduo do

processamento da erva-mate: uma nova fonte potencial de antioxidantes.
In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER
PRODUCTION, 2, São Paulo: 2009, p. 1-11.

WANG X, WILLÉN R, WADSTRÖM, T. Astaxanthin-rich algal meal
and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cAmice.
Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 44, p. 2452-2457, 2000.

YOUN, J.; YOON, J. W.; KOO, H. C.; LIM, S. K.; PARK, Y.H.
Prevalence and antimicrogram of *Staphylococcus intermedius* group
isolates from veterinary staff, companion animals, and the environment
in veterinary hospitals in Korea. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 23, p. 268-
274, 2011.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ADL, SM.; SIMPSON, A. G.; LANE, C. E.; LUKEŠ, J.; BASS, D.; BOWSER, S. S.; BROWN, M. W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; Le GALL, L.; LYNN, D. H.; McMANUS, H.; MITCHELL, E. A.; MOZLEY-STANRIDGE, S. E.; PARFREY, L. W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C. L.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F. W. The revised classification of eukaryotes. **J. Eukaryot Microbiol.**, v. 59, p. 429-493, 2012.

ARDO, L.; YIN, G.; XU, P.; VARADI, L.; SZIGETI, G.; JENEY, Z.; JENEY, G. 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**, v. 275, p. 26-33, 2008.

ASKER, M. M. S.; MOHAMED, S. F.; ALI, F. M.; EL-SAYED, O. H. Chemical structure and antiviral activity of water-soluble sulphated polysaccharides from *Sargassum latifolium*. **Journal Appl. Sci. Res.**, v. 3, p. 1178-1185, 2007.

BANSEMIR, A.; BLUME, M.; SCHRÖDER, S.; LINDEQUIST, U. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, v. 252, p. 79-84, 2006.

BARIE, P. S. Multidrug-resistant organisms and antibiotic management. **Surgical Clinics North America**, v. 92, n. 2, p. 345-391, 2012.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p.312-351.

BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY, S. B. I. Green algae *Chlorococcum humicola*- a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 11-17, 2011.

BIBIANA, M. A.; NITHYA, K.; MANIKANDAN, M. S.; SELVAMANI, P.; LATHA, S. Antimicrobial evaluation of the organic extracts of *Sargassum wightii* (brown algae) and *Kappaphycus alvarezii*

(red algae) collected from the coast of Meemesal, Tamilnadu. **Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.**, v. 2, p. 439-446, 2012.

CARDOZ, K. H. M.; GUAUATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A.; LOPES, N.; CAMPOS, S.; TORRES, M.; SOUZA, A.; COLEPICOLA, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CHOTIGEAT, W.; SUPRAPA, T.; KIDCHAKAN, S.; AMORNRAT, P. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, v. 233, p. 23-30, 2004.

CUSTÓDIO, L.; JUSTO, T.; SILVESTRE, L.; BARRADAS, A.; DUARTE, C. V.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; RAUTER, A. P.; ALBERÍCIO, F.; VARELA, J. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 131(1), p. 134-140, 2012.

DEL VAL, A. G.; PLATAS, G.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; GORROCHATEGUI, J.; SUAY, I. Screeninf of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). **Int. Microbiol.**, v. 4, p. 35-40, 2001.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, p. 18-19, 2014.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 28-44, 2014.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginates matrices. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 31, p. 267-285, 1998.

GONG, X.; CHEN, F. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 30, p. 829–833, 1997.

HELLIO, C.; BREMER, G.; PONS, A. M.; GAL, Y. L.; BOURGOUGNON, D. Inhibition of the development of

microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 543-9, 2000.

HORTA, P.A. **Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: taxonomia e biogeografia**. 2000. 301 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

HSUEH, H. T.; LI, W. J.; CHEN, H. H.; CHU, H. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 33-39, 2009.

HUANG, X.; ZHOU, H.; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 750-757, 2006.

HUYNH, T. G.; YEH, S. T.; LIN, Y. C.; SHYU, J. F.; CHEN, L. L.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, p. 286-293, 2011.

KHALEAFA, A. F.; KHARBOUSH, M. A. M.; METWALLI, A.; MOHSEN, A. F.; SERWI, A. Antibiotic (fungicidal) action from extracts of some seaweeds. **Botanica Marina**, v. 23, p. 163- 165, 1975.

KITTIKAIWAN, P.; POWTHONGSOOK, S.; PAVASANT, P.; ARTIWAN, S. Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 378–385, 2007.

KOBAYASHI, J.; MURAYAMA, T.; OHIZUMI, Y.; OHTA, T.; NOZOE, S.; SASAKI, T. Metachromin C, a new cytotoxic sesquiterpenoid from the Okinawan marine sponge *hzppospngza* *metachromza*. **J. Nat. Prod.**, v. 52, p. 1173-7, 1989.

KOBERG, M.; COHEN, M.; BEN-AMOTZ, A.; GEDANKEN, A. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4265-4269, 2011.

KÖNIG, G. M. D.; WRIGHT, A. D.; LINDEN, A. Plocamium hamatum and its monoterpenes: chemical and biological investigations of the tropical marine red alga. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1047-1053, 1999.

LIM, J. H.; JUNG, K. S.; LEE, J.; JUNG, E.; KIM, D. K.; KIM, Y.; KIM, Y-W.; PARK, D. The study on antimicrobial and antifungal activity of the wild seaweeds of Jeju Island. **J. Soc. Cosmet. Scient. Korea**, v. 34, p. 201-207, 2008.

LIMA-FILHO, J. V. M.; CARVALHO, A. F. F. U.; FREITAS, S. M.; MELO, V. M. M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 311-313, 2002.

LINDEQUIST, U.; SCHWEDER, T. Marine biotechnology. In: REHM, H. J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim, Germany, 2001. p. 441-484.

MACHMUDAH, S.; SHOTIPRUK, A.; GOTO, M.; SASAKI, M.; HIROSE, T. Extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis using supercritical CO₂ and ethanol as entrainer. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 3652-3657, 2006.

MARTINS, A. M. C. R. P. F.; CATROXO, M. H. B.; HIPÓLITO, M. **A importância da piscicultura e algumas doenças virais e bacterianas píceas**. São Paulo, 2011 (Divulgação Técnica). Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=156>.

Acesso em: 28 out. 2014.

MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comp. Biochem. Phys. C.**, v. 140, p. 265-286, 2005.

MENDES, R. L.; NOBRE, B. P.; CARDOZO, M. T.; PEREIRA, A. P.; PALAVRA, A. F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorganica Chimica Acta**, v. 356, p. 328-334, 2003.

NAGAYAMA, K.; IWAMURA, Y.; SHIBATA, T.; HIRAYAMA, I.; NAKAMURA, T. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, p. 889-893, 2002.

NATRAH, F. M. I.; YOSSUF, F. M.; SHARIFF, M.; ABAS, F.; MARIANA, N. S. Screening of Malasian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 711-718, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIU, J.; CHENA, X.; LUA, X.; JIANG, S.; LIN, H.; LIU, Y.; HUANG, Z.; WANG, J.; WANG, Y.; TIAN, L. Effects of different levels of dietary wakame (*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 435, p. 78-85, 2015.

PRADHAN, J.; DAS, P. K.; SAHU, S.; MARHUAL, N. P.; SWAIN, A. K.; MISHRA, B. K.; EKNATH, A. E. Traditional antibacterial activity of freshwater microalga *Spirulina platensis* to aquatic pathogens. **Aquacul. Res.**, v. 43, p. 1287-1295 2012.

RAFFA, R. B.; IANNUZZO J. R.; LEVINE D. R.; SAEID, K. K.; SCHWARTZ, R. C.; SUCIC, N. T. Bacterial Communication “Quorum Sensing” via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 312, p. 417-423, 2004.

READ, P.; FERNANDES, T. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. **Aquaculture**, v. 226, p. 139-63, 2003.

SAGDIÇ, O.; ÖZCAN, M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. **Food Control**, v. 14, p. 141-143, 2003.

SIMÕES, C. O. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SIVAKUMAR, K.; KANNAPPAN, S.; DINESHKUMAR, M.; PATIL, K. P. Antagonism of marine macro alga *Kappaphycus alvarezii* extract against luminescence disease causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 458-469, 2014.

SMIT, A. J. Medicinal and Pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **J. Appl. Phycol.**, v. 16, p. 245-262, 2004.

TRAI FALGAR, R. F.; KIRA, H.; TUNG, T.; MICHAEL, F. R.; LAINING, A.; YOKOYAMA, S.; SHIKAWA, M.; KOSHIO, S.; SERRANO, A. E.; CORRE, V. Influence of dietary fucoidan supplementation on growth and immunological response of juvenile *Marsupenaeus japonicus*. **Journal of the World Aqua. Society.**, v. 41, p. 235-244, 2010.

UMA, R. V.; SIVASUBRAMANIAN, D.; DEVARAJ, S. N.; Preliminary phycochemical analysis and *in vitro* antibacterial screening of Green micro algae, *Desmococcus Olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 2, n. 3, p. 74-81, 2011.

WIKFORS, G. H.; PATTERSON, G. W.; GOSH, P.; LEWIN, R. A.; SMITH, B. C.; ALIX, J. H. Growth of post-set oysters, *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp. **Aquaculture**, v. 143, p. 411-419, 1996.

YEH, S. T.; LEE, C. S.; CHEN, J. C. Administration of hot-water extract of Brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 45, p. 332-336, 2006.

ZHANG, H. L.; ZHANG, Z. E.; WU, P. P. Study on the effective ingredients and anti-tumor in *Sargassum fusiforme*. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 1-4, 1988. 1988.

ZHUANG, C.; ITOH, H.; MIZUNO, T.; ITO, H. Antitumor active fucoidan from the Brown seaweed Umitorano (*Sargassum thunbergii*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 7, p. 563-567, 1995.

ANEXOS

Anexo 1. Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).



Fonte: Acervo do LCM.

Anexo 2. Biomassa de *Kappaphycus alvarezii* coletada do setor de macroalgas do LCM.



Fonte: Arquivo pessoal.

Anexo 3. Biomassa da alga *Sargassum filipendula* liofilizadas e moída em nitrogênio líquido no almofariz com pistilo.



Fonte: Arquivo pessoal

Anexo 4. Preparo da técnica microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços.



Fonte: Arquivo pessoal