



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

***O impacto da resistência a antibióticos e o potencial do mar para
oferecer novos compostos antimicrobianos***

Filipa Veiga Martinez de Amorim

2021

***O impacto da resistência a antibióticos e o potencial do mar para
oferecer novos compostos antimicrobianos***

Filipa Veiga Martinez de Amorim

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia de Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Sónia Gonçalves Pereira e
coorientação da Doutora Sónia Duarte Barroso

2021

“However difficult life may seem, there is always something you can do, and succeed at. It matters that you don’t just give up” –
Stephen Hawking

RESUMO

Hoje em dia a resistência global a antibióticos é um problema sério que se tem agravado ao longo dos anos, sendo que o rápido aparecimento de bactérias resistentes com a capacidade de se adaptarem aos antibióticos é um assunto de elevada preocupação. O objetivo deste trabalho prende-se com a pesquisa da atividade antimicrobiana de subprodutos de origem marinha, no concernente ao muco epidérmico de peixes de água salgada, e de água doce, no concernente à sêmea de arroz.

Segundo a literatura, o muco epidérmico dos peixes apresenta uma elevada atividade antimicrobiana, contendo diversos peptídeos antimicrobianos que, conjugados à renovação constante deste muco, protege os peixes contra microrganismos patogénicos. A sêmea do arroz apresenta uma constituição elevada de peptídeos multifuncionais que reagem contra os agentes patogénicos apresentando desta forma uma atividade antimicrobiana. Considerando esta informação decidiu-se testar a capacidade antimicrobiana de ambos em bactérias obtidas numa unidade de cuidados de saúde (ambientes e utentes), onde a probabilidade destes microrganismos terem resistência a antimicrobianos é mais elevada, e ainda em bactérias padrão (*Bacillus subtilis*, *Enterobacter* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*).

Foram assim obtidos extratos destes subprodutos de diversas espécies de peixes e de arroz, de forma a extrair proteínas, hidratos de carbono e lípidos para testar a sua capacidade antimicrobiana. Os resultados destes ensaios foram negativos, sendo que a utilização de outros solventes, um maior tempo de exposição aos mesmos, métodos de extração e testes de atividade antimicrobiana alternativos, podem ser testados na tentativa de obter melhores resultados de futuro.

Palavras – Chave: compostos antimicrobianos, muco de peixe, sêmea de arroz, extratos, resistência a antibióticos

ABSTRACT

Nowadays, the global resistance to antibiotics is a serious problem that has worsened over the years, and the rapid emergence of resistant bacteria with the ability to adapt to antibiotics is a matter of great concern. The aim of this work is to research the antimicrobial activity of marine by-products, concerning the epidermal mucus of marine fish, and freshwater, concerning rice bran.

According to the literature, the epidermal mucus of fish presents a high antimicrobial activity, containing several antimicrobial peptides which, combined with the constant renewal of this mucus, protects fish against pathogenic microorganisms. Rice bran has a high constitution of multifunctional peptides that react against pathogens, thus presenting an antimicrobial activity. Considering this information, it was decided to test the antimicrobial capacity of both on bacteria obtained from a health care unit (environments and users), where the probability of these microorganisms having resistance to antimicrobials is higher, and also on standard bacteria (*Bacillus subtilis*, *Enterobacter sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*).

Extracts of these by-products were thus obtained from several fish species and from rice, in order to extract proteins, carbohydrates and lipids to test their antimicrobial capacity. The results of these tests were negative, being that the use of other solvents, a longer time of exposure to them, extraction methods and alternative antimicrobial activity tests, can be tested in an attempt to obtain better results in the future.

Keywords: antimicrobial compounds, fish mucus, rice bran, extracts, antibiotic resistance

ÍNDICE

Resumo.....	v
Abstract	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Lista de acrónimos.....	xii
Introdução	xiii
1. <i>One Health</i>	1
2. Bactérias patogénicas e antimicrobianos.....	2
3. Resistência Antibacteriana	3
a. Tipos de Resistências.....	4
4. Novos compostos antimicrobianos	4
a. Muco epidérmico do peixe.....	5
b. Sêmea de arroz.....	6
Objetivo	8
Materiais e métodos	10
1. Amostragens e isolamentos bacterianos	11
2. Teste de suscetibilidade a antibióticos	12
3. Amostragens e extrações do muco epidérmico do peixe	13
a. Extrato Bruto	14
b. Extrato Aquoso.....	14
c. Extrato Ácido	15
d. Extrato Orgânico.....	15
4. Amostragens e extrações da sêmea do arroz	16
a. Extrato Bruto	16
b. Extrato de Hexano	17
c. Extrato Etanólico	17
5. Análise quantitativa dos extratos.....	18
a. Quantificação de proteínas	18
b. Quantificação de lípidos	19
c. Quantificação de glícidos	20
6. Avaliação da capacidade antibacteriana	21
Resultados	22
1. Amostragens e isolamentos bacterianos em unidade de saúde.....	23
2. Perfis de suscetibilidade antimicrobiana	24
3. Análise quantitativa dos extratos.....	26

a. Análise glicosídica.....	26
b. – Análise lipídica.....	29
c. – Análise Proteica.....	32
4. – Avaliação da capacidade antimicrobiana dos extratos	35
Discussão de Resultados e conclusão	36
Referências Bibliográficas	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Cronograma da descoberta de antibióticos e o correspondente desenvolvimento de resistência aos antibióticos (Davies, 1996).	2
Figura 2 – Principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos medicamentos antimicrobianos (Silva <i>et al.</i> , 2008).....	3
Figura 3 - Propriedades antimicrobianas em peixes teleósteos (Tiralongo <i>et al.</i> , 2020).	5
Figura 4 - Proporção relativa dos principais componentes da cariopse do arroz (Orthofer, 1996).	6
Figura 5 - Amostras em solução de cloreto de sódio a 0,9%.....	11
Figura 6 – Espécimes de onde foram realizadas as colheitas de muco epidérmico; 1) robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>); 2) abrótea (<i>Phycis phycis</i>); 3) cantarilho (<i>Helicolenus dactylopterus</i>); 4) raia – lenga (<i>Raja clavata</i>); 5) corvina (<i>Argyrosomus regius</i>); 6) pescada (<i>Merluccius merluccius</i>); 7) peixe-galo (<i>Zeus faber</i>); 8) ruivo (<i>Chelidonichthys cuculus</i>); 9) safio (<i>Conger conger</i>).	13
Figura 7 - Amostras de muco epidérmico de peixe.	14
Figura 8 – Depósito das amostragens após as extrações	15
Figura 9 – Extrato etanólico da amostra de sêmea (1C).....	17
Figura 10 – Ensaio da quantificação proteica.....	18
Figura 11 - Ensaio da quantificação lipídica.	19
Figura 12 – Ensaio da quantificação glicosídica.	20
Figura 13 – Exemplo de ensaios de suscetibilidades antimicrobiana de diferentes bactérias aos diferentes extratos do muco epidérmico do peixe (extrato bruto, extrato aquoso, extrato ácido e extrato orgânico) e da sêmea do arroz (extrato bruto, extrato de hexano e extrato etanólico). a) Ensaio de suscetibilidade antimicrobiana dos diferentes extratos no muco epidérmico do peixe; b) Ensaio de suscetibilidade antimicrobiana dos diferentes extratos na sêmea do arroz.	21
Figura 14 – Exemplos de crescimento bacteriano observado em placas de MacConkey simples (S/ATB) e MacConkey com CTX.....	23
Figura 15 - Presumíveis resistências aos antimicrobianos testados para os isolados a) de origem ambiental; b) de origem humana.	25
Figura 16 – Concentração de glícidos nos extratos do muco epidérmico do peixe. Resultados expressos em mg de glucose/mL de extrato (média ± desvio padrão), e por espécie de peixe; a) Extrato Bruto; b) Extrato aquoso; c) Extrato ácido; d) Extrato orgânico. 2 – Abrótea; 3 – Cantarilho; 4 – Raia – lenga; 5 – Corvina; 6 – Pescada; 7 – Peixe-galo; 9 – Safio.	27
Figura 17 – Concentração de glícidos nos extratos da sêmea do arroz. Resultados expressos em mg de glucose/mL de extrato (média ± desvio padrão), e por tratamento de sêmea de arroz; a) Extrato bruto; b) Extrato de hexano; c) Extrato etanólico. 1C – porção 1 do arroz carolino; 1C – porção 2 do arroz carolino; 3C – porção 3 do arroz carolino; 1A – porção 1 do arroz agulha; 2A – porção 2 do arroz agulha; 3A – porção 3 do arroz agulha.	28

Figura 18 – Concentração de lípidos nos extratos do muco epidérmico do peixe. Resultados expressos em mg de colesterol/mL de extrato (média ± desvio padrão), e por espécie de espécie; a) Extrato Bruto; b) Extrato aquoso; c) Extrato ácido; d) Extrato orgânico; 2 – Abrótea; 3 – Cantarilho; 4 – Raia – lenga; 5 – Corvina; 6 – Pescada; 7 – Peixe-galo; 9 – Safio.	29
Figura 19 – Concentração de lípidos nos extratos de sêmea do arroz. Resultados expressos em mg de colesterol/mL de extrato (média ± desvio padrão) e por tratamento de sêmea de arroz; a) Extrato bruto; b) Extrato de hexano; c) Extrato etanólico. 1C – porção 1 do arroz carolino; 1C – porção 2 do arroz carolino; 3C – porção 3 do arroz carolino; 1A – porção 1 do arroz agulha; 2A – porção 2 do arroz agulha; 3A – porção 3 do arroz agulha.	31
Figura 20 – Concentração de proteínas nos extratos do muco epidérmico do peixe. Resultados expressos em mg de BSA/mL de extrato (média ± desvio padrão), e por espécie de peixe; a) Extrato Bruto; b) Extrato aquoso; c) Extrato ácido; d) Extrato orgânico. 2 – Abrótea; 3 – Cantarilho; 4 – Raia – lenga; 5 – Corvina; 6 – Pescada; 7 – Peixe-galo; 9 – Safio.	32
Figura 21 – Concentração de proteína nos extratos de sêmea de arroz. Resultados expressos em mg de BSA/mL de extrato (média ± desvio padrão) e por tratamento de sêmea de arroz; a) Extrato bruto; b) Extrato de hexano; c) Extrato etanólico. 1C – porção 1 do arroz carolino; 1C – porção 2 do arroz carolino; 3C – porção 3 do arroz carolino; 1A – porção 1 do arroz agulha; 2A – porção 2 do arroz agulha; 3A – porção 3 do arroz agulha.	34
Figura 22 – Exemplos de ensaios de suscetibilidade antimicrobiana aos extratos em estudo; a) Ensaio do extrato orgânico de muco epidérmico de peixe; b) Ensaio do extrato orgânico da sêmea de arroz (esquerda) e do muco epidérmico (direita) com o extrato orgânico.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Antibióticos e respectivas concentrações utilizados nos antibiogramas.	12
Tabela II - Espécies de arroz	16

LISTA DE ACRÓNIMOS

AMR – Resistência a antibióticos

ARB – Bactérias resistentes

ARG – Genes de resistência a antimicrobianos

MDR – Bactérias Multirresistentes

XDR – Bactérias extremamente resistentes

UCI – Unidade de cuidados intensivos

PAM – peptídeo antimicrobiano

MEM – Meropenemo

IMI – Imipenemo

ATM – Aztreonam

AML – Amoxicilina

AUG – Amoxicilina + ácido clavulânico

CTX – Cefotaxima

CAZ – Ceftazidima

FOX – Cefoxitina

AK – Amicacina

CIP – Ciprofloxacina

PTFE – politetrafluoroetileno

BSA – Bovine Serum Albumin

MacConkey S/ATB – Meio de cultura MacConkey sem suplementação de antibiótico

MacConkey CTX – Meio de cultura MacConkey suplementado com Cefotaxima

MacConkey MEM – Meio de cultura MacConkey suplementado com Meropenemo

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a resistência aos antimicrobianos (AMR), tem sido um problema grave de saúde pública a nível mundial, tendo sido estimadas aproximadamente cerca de 4,95 milhões de mortes devido à AMR (Murray et al., 2022). Torna-se assim ainda mais importante a colaboração da indústria farmacêutica e da biotecnologia com a área da saúde para ajudar a combater este problema, facultando novas moléculas antimicrobianas. As bactérias fazem parte de um grupo com milhares de espécies, sendo algumas consideradas patogénicas, e portanto, prejudiciais para o ser humano. Outras bactérias encontram-se na flora microbiana do ser humano, ou microbiota, sendo portanto bactérias benéficas, algumas com funções essenciais para o nosso corpo (Schreiber *et al.*, 2021).

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, os antimicrobianos tornaram-se medicamentos centrais para a saúde humana (Bennett & Chung, 2001). O desenvolvimento de novos medicamentos ao longo dos anos tem tido por base um número pequeno de moléculas, sendo a grande maioria destas de origem natural. Os recursos naturais são assim importantes fontes para possíveis abordagens terapêuticas e desenvolvimento de novos produtos na química, biologia molecular e na biologia celular (Cragg & Newman, 2005), entre outros.

1. *One Health*

A resistência antimicrobiana é um problema mundial que se caracteriza por interações complexas, que envolvem diversas populações microbianas e que afetam diretamente a saúde dos seres humanos, animais e o ambiente (McEwen *et al.*, 2018). A abordagem “*One Health*” é uma abordagem coordenada e multisectorial para dar resposta a esta problemática, através da colaboração de múltiplas profissões das ciências da saúde, veterinária, produção, entre outras. (FAO, 2016), com implicações a nível local, nacional e global de maneira a alcançar uma melhor saúde para todos: seres humanos, animais domésticos, animais selvagens, plantas e o meio ambiente (McEwen *et al.*, 2018).

2. Bactérias patogénicas e antimicrobianos

As bactérias patogénicas causam diversas doenças e têm diferentes formas de crescer, sobreviver e disseminar-se no corpo humano. Por outro lado, o corpo humano apresenta um sistema de defesa natural contra estes, e outros, agentes patogénicos, o nosso sistema imunitário. No entanto, por vezes é impossível o controlo da infeção apenas por este mecanismo natural, sendo necessário à Medicina recorrer a antimicrobianos para debelar a infeção, matando, no caso dos antibióticos, ou impedindo a multiplicação das bactérias patogénicas, no caso dos bacteriostáticos, permitindo assim ao nosso sistema imunitário atuar no controlo da infeção ao diminuir a carga microbiana do patogénico (Arora *et al.*, 2017).

À luz do processo de seleção natural darwinista, os microrganismos confrontados com a pressão de seleção antimicrobiana, pelo uso excessivo de antimicrobianos, melhoraram a sua capacidade de sobreviver à sua presença, adquirindo e expressando genes de resistência e partilhando esses genes com outras bactérias (Figura 1). (McEwen *et al.*, 2018).

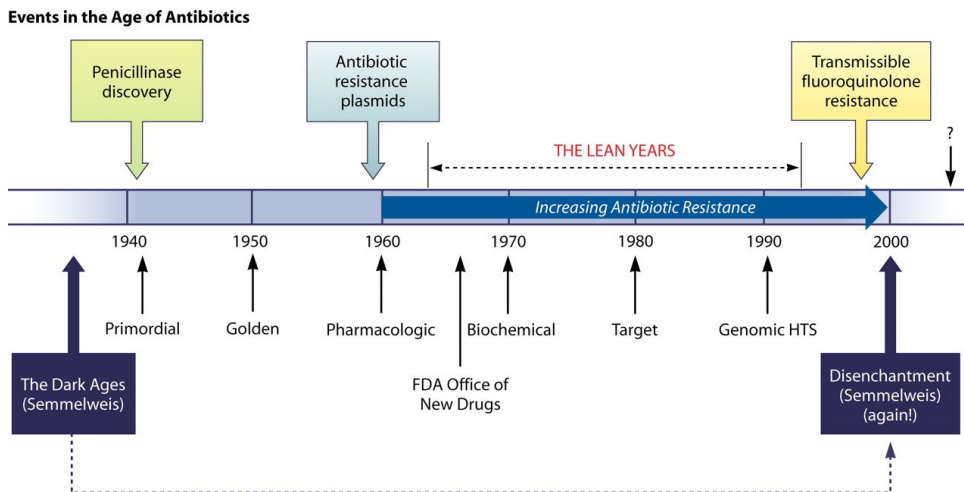


Figura 1 – Cronograma da descoberta de antibióticos e o correspondente desenvolvimento de resistência aos antibióticos (Davies, 1996).

3. Resistência Antibacteriana

Primordialmente as espécies bacterianas são organismos sensíveis aos antimicrobianos, mas quando expostas recorrentemente a estas moléculas vão-se adaptando às mesmas, acabando por se tornar resistentes à sua ação (Figura 2) (Arora *et al.*, 2017).

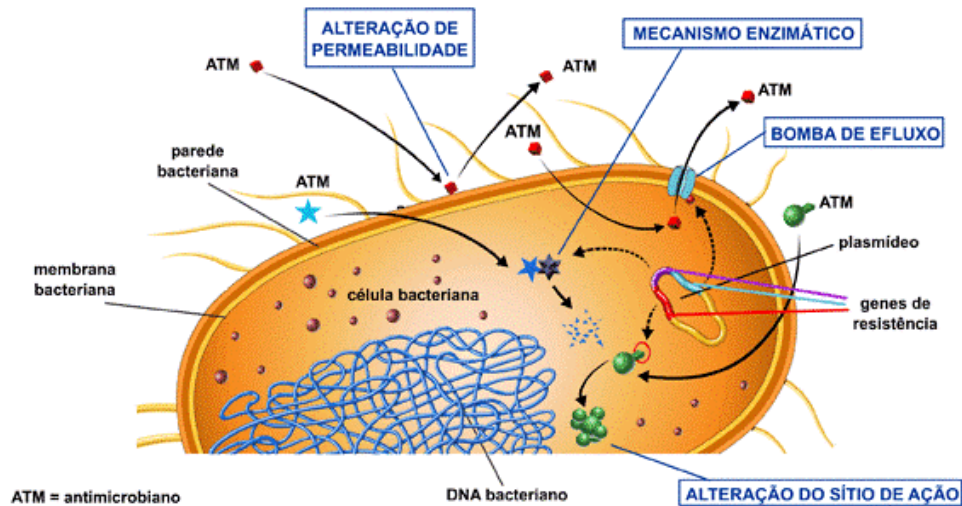


Figura 2 – Principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos medicamentos antimicrobianos (Silva *et al.*, 2008)

Estas podem ocorrer naturalmente através da adaptação microbiana ao seu ambiente, sendo contudo intensificada pela utilização inadequada e excessiva de agentes antimicrobianos (FAO, 2016). A resistência antimicrobiana subdivide-se em resistência intrínseca, propriedade inerente à bactéria, que lhe confere naturalmente resistência a um ou mais antimicrobianos específicos; e em resistência adquirida, através da transformação ou aquisição de genes específicos que permite à bactéria passar a resistir a determinados antimicrobianos, por diversos mecanismos bioquímicos, onde se inclui a produção de enzimas que inativam ou destroem os antimicrobianos. Um exemplo são as β – lactamases que, através da inibição das ligações de “crosslinking” dos peptídeos durante a biossíntese dos peptidoglicanos, inativam a maioria dos β – lactâmicos. (Arora *et al.*, 2017). Assim, quando uma bactéria apresenta este mecanismo de resistência, as opções terapêuticas reduzem-se muito, dado os β – lactâmicos serem o maior grupo de antimicrobianos atualmente disponível. Tal situação reveste-se de implicações muito negativas para a saúde humana, dado tornar-se mais difícil tratar estas infeções, por falta de opção terapêutica. Este

problema da resistência aos antimicrobianos torna-se ainda mais grave, quando se percebe que nos últimos anos a indústria farmacêutica não investiu no desenvolvimento de novos antimicrobianos para responder ao aparecimento de resistências aos β - lactâmicos e outras classes (Pickens *et al.*, 2019).

a. Resistência antimicrobiana no ambiente

Vários estudos detetaram a existência de diversos genes de resistência aos antimicrobianos em ambientes aquáticos e em águas residuais, mas as bactérias mais alarmantes, as bactérias resistentes aos antimicrobianos, com os seus respetivos genes de resistência antimicrobiana encontram-se maioritariamente em ambientes hospitalares. Contudo, a sua disseminação para o ambiente é já uma importante realidade (Schreiber *et al.*, 2021).

As infeções causadas por bactérias multirresistentes (MDR) aumentam a morbidade, a mortalidade e os custos dos cuidados de saúde. Segundo o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América, ao longo dos anos, começou a existir um aumento exponencial de bactérias MDR e bactérias extremamente resistentes (XDR) (Müller *et al.*, 2018). As Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), apresentam maiores taxas de infeções MDR que outras unidades hospitalares (El Mekes *et al.*, 2020). Alguns exemplos de bactérias MDR com elevado impacto na saúde humana são *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (El Mekes *et al.*, 2020) e enterobactérias (Müller *et al.*, 2018), entre outras

4. Novos compostos antimicrobianos

Nas últimas três décadas, as indústrias farmacêuticas têm produzido alguns novos compostos antimicrobianos. Contudo a resistência a estes novos compostos rapidamente surgiu e aumentou, pois estes são altamente eficientes na modificação e aquisição de genes de resistência (Tyor & Kumari, 2016). Dos maiores desafios enfrentados pela inovação no desenvolvimento de antimicrobianos encontra-se a descoberta de novos compostos para a produção de novos compostos antimicrobianos (Fernandes, 2015).

a. Muco epidérmico do peixe

O peixe defende-se contra potenciais microrganismos invasores através de um sistema complexo de mecanismos de defesa inatos e adaptativos. A camada epidérmica do peixe é uma das principais superfícies mucosas e barreiras imunitárias dos peixes e apresenta células glandulares especializadas que geram mucinas e outras substâncias com propriedades antimicrobianas (Manikantan *et al.*, 2016).

As propriedades antimicrobianas do muco cutâneo dos peixes variam de espécie para espécie, desempenhando um papel protetor e eficaz tanto em microrganismos patogênicos humanos como de peixes (Kumari *et al.*, 2019). O muco epidérmico do peixe é composto maioritariamente por água e glicoproteínas, sendo a mais específica a mucina (Kumar *et al.*, 2019). Os compostos do muco epidérmico do peixe apresentam uma atividade inibitória que varia conforme os diversos agentes patogênicos (Figura 3).

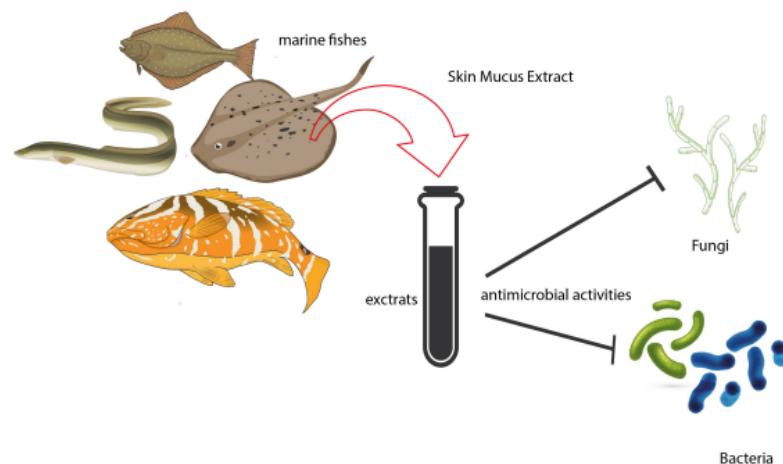


Figura 3 - Propriedades antimicrobianas em peixes teleósteos (Tiralongo *et al.*, 2020).

A mucina é uma glicoproteína que atua como recetor de microrganismos que desempenham um papel decisivo na expulsão, colonização e invasão de agentes patogênicos (Gomez *et al.*, 2013). A lisozima é uma proteína bacteriolítica que apresenta uma capacidade de quebrar o peptidoglicano bacteriano. A protease é outra proteína importante do muco epidérmico, com um papel significativo no mecanismo imunitário inato, dificultando a invasão e a viabilidade dos agentes patogênicos no peixe.

Esta enzima, ativa e aumenta a produção de componentes imunológicos, tais como imunoglobulinas e peptídeos antimicrobianos (AMP) (Subramanian *et al.*, 2007). Segundo a literatura, os AMP segregados pelo muco epidérmico do peixe apresentam um papel vital no combate contra os microrganismos patogénicos (Lee *et al.*, 2020).

b. Sêmea de arroz

A indústria agroalimentar apresenta uma elevada quantidade de subprodutos de diversas origens sendo a maioria das vezes subutilizados como ração de animal ou rejeitados como resíduos. A utilização destes recursos é importante a nível económico e de reciclagem comercial (Taniguchi *et al.*, 2017).

O arroz é a segunda cultura alimentar mais cultivada em todo o mundo. O grão de arroz é constituído por duas camadas: a casca, que corresponde a cerca de 20% do peso do grão e a cariopse (Figura 4). (Sohail *et al.*, 2016). Este cereal é constituído principalmente por amido, tendo também na sua constituição, mas em menores quantidades proteínas, lípidos e fibras. Estes compostos não se encontram distribuídos uniformemente nos grãos de arroz, apresentando nas camadas externas mais proteínas e lípidos enquanto o centro do grão de arroz apresenta mais quantidade de amido (Arab *et al.*, 2011).

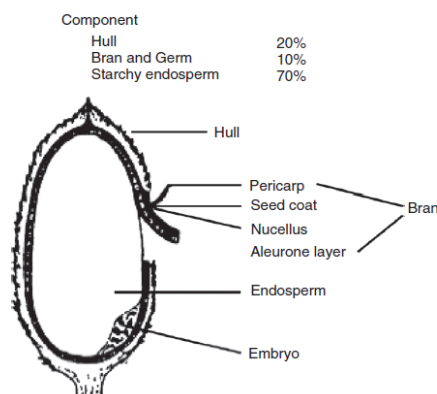


Figura 4 - Proporção relativa dos principais componentes da cariopse do arroz (Orthofer, 1996).

Hoje em dia o processamento do arroz está bastante otimizado, mas associa-se uma produção elevada de subprodutos, um deles a sêmea de arroz (Sohail *et al.*, 2016), derivado do polimento do arroz. Na sêmea de arroz existem grandes quantidades de antioxidantes como os tocoferóis, os tocotrienóis e oryzanóis. Tem também cerca de 20% de lípidos. (Lloyd *et al.*, 2000). Segundo a literatura os peptídeos multifuncionais presentes na sêmea do arroz apresentam atividade antimicrobiana, tornando-se assim um produto natural de interesse para a pesquisa destes compostos. (Taniguchi *et al.*, 2017).

OBJETIVO

A resistência antimicrobiana é um problema de saúde mundial. Neste contexto, a pesquisa e obtenção de novos compostos com potencial antimicrobiano é um assunto com elevado interesse biotecnológico. Desta forma, o objetivo deste trabalho consiste na obtenção de extratos de proteínas, glicídios e lípidos para avaliar a sua eventual atividade antimicrobiana contra bactérias AMR obtidas numa unidade de saúde. Os subprodutos utilizados foram o muco epidérmico de diferentes espécies de peixes, tais como, *Dicentrarchus labrax*, *Phycis phycis*, *Helicolenus dactylopterus*, *Raja clavata*, *Argyrosomus regius*, *Merluccius merluccius*, *Zeus faber*, *Chelidonichthys cuculus* e *Conger conger*; da semente de arroz foram utilizadas a *Oryza sativa* japónica e a *Oryza sativa* indica.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostras e isolamentos bacterianos

Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de amostras por zangado em utentes e superfícies numa unidade de saúde de Leiria, Portugal. As colheitas foram realizadas entre novembro de 2020 e abril de 2021, assepticamente e transportadas numa solução de cloreto de sódio a 0,9% até ao laboratório (Figura 5), onde foi feita a inoculação de cada amostra (0,1 mL) em 3 placas de Petri com condições diferentes: 1) meio de cultura MacConkey agar simples, 2) meio de cultura MacConkey agar com o antibiótico cefotaxima (CTX) 1 µg/mL, 3) meio de cultura MacConkey agar com o antibiótico meropenemo (MEM) 0,5 µg/mL.

Depois de inoculadas, as placas foram incubadas a 37°C durante 24h, procedendo-se então ao registo do número, aspeto e cor das colónias. Cada colónia selecionada foi purificada e posteriormente preservada a - 80°C.

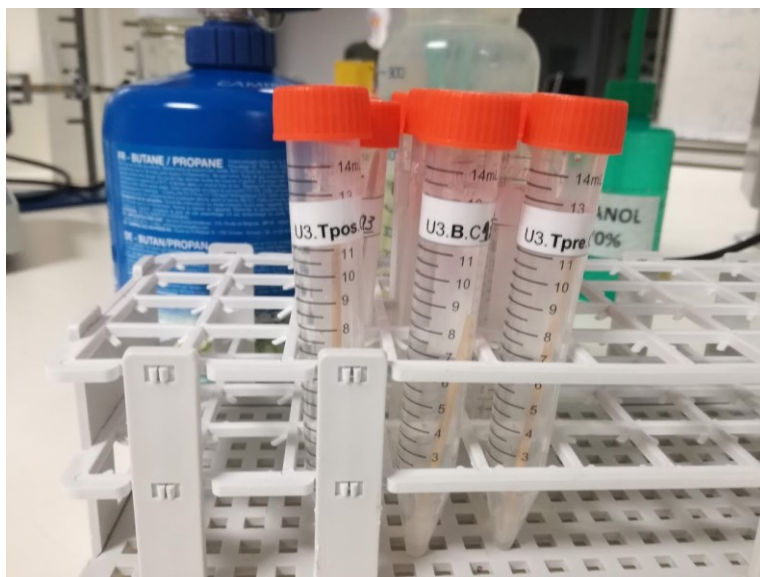


Figura 5 - Amostras em solução de cloreto de sódio a 0,9%.

2. Teste de suscetibilidade a antibióticos

Após repicada e isolada, cada colónia foi cultivada numa placa de Petri com meio de cultura Mueller-Hinton agar, 37°C, 24 horas. Segundo o método dos quatro quadrantes, ou Kirby-Bauer (Jorgensen & Turnidge, 2015), preparou-se uma suspensão bacteriana em soro fisiológico com turbidez de 0,5 segundo o padrão McFarland, e embebeu-se uma zaragatoa estéril nessa suspensão, removeu-se o excesso de líquido e com essa zaragatoa, inoculou-se nova placa de Mueller-Hinton agar, com cerca de 4 mm de altura, fazendo passar a zaragatoa duas vezes por toda a área da placa (Siedlecka & Piekarska, 2017).

De seguida, foram colocados os discos de antibiótico (Tabela I) na superfície do agar e as placas foram colocadas a 37°C durante 18h, a que se seguiu a leitura e registo dos resultados.

Tabela I – Antibióticos e respetivas concentrações utilizados nos antibiogramas.

Antibiótico	Sigla	Concentração (µg)
Meropenemo	MEM	10
Imipenemo	IMI	10
Aztreonam	ATM	30
Amoxicilina	AML	30
Amoxicilina + ácido clavulanico	AUG	3
Cefotaxima	CTX	30
Ceftazidima	CAZ	30
Cefoxitina	FOX	30
Amicacina	AK	30
Ciprofloxacina	CIP	5

3. Amostragens e extrações do muco epidérmico do peixe

A recolha do muco epidérmico dos peixes foi realizada em Peniche, Portugal entre abril e maio de 2021 (Figura 6). O muco epidérmico do peixe foi recolhido por amostragem por uma espátula da zona dorsal do peixe de modo a prevenir mistura com excreções urogenitais (Kumari et al., 2019). Após ser recolhido, o muco foi preservado a 4°C durante o transporte até ao laboratório, onde foi imediatamente processado (Figura 7).



Figura 6 – Espécimes de onde foram realizadas as colheitas de muco epidérmico; 1) robalo (*Dicentrarchus labrax*); 2) abrótea (*Phycis phycis*); 3) cantarilho (*Helicolenus dactylopterus*); 4) raia – lenga (*Raja clavata*); 5) corvina (*Argyrosomus regius*); 6) pescada (*Merluccius merluccius*); 7) peixe-galo (*Zeus faber*); 8) ruivo (*Chelidonichthys cuculus*); 9) safio (*Conger conger*).

O muco foi posteriormente submetido a extrações com diferentes solventes com o objetivo de obter compostos diferentes para posterior avaliação da sua atividade antimicrobiana. Os extratos foram obtidos como descrito abaixo, por adaptação do procedimento segundo diversos autores, e foram armazenadas a -80°C até à sua utilização.



Figura 7 - Amostras de muco epidérmico de peixe.

a. Extrato Bruto

Para a obtenção do extrato bruto centrifugou-se a amostra a $3019 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Após centrifugação, o pellet foi descartado (Figura 8) e o sobrenadante filtrado com um filtro estéril de acetato de celulose ($0,22 \mu\text{m}$, VWR) de maneira a esterilizar o extrato (Tyor & Kumari, 2016).

b. Extrato Aquoso

Para a obtenção do extrato aquoso, adicionou-se cloreto de sódio (Biochem) a 0,85% à amostra inicial do muco epidérmico do peixe numa proporção de 1:1. A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a $3019 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . Após centrifugação, o pellet foi descartado (Figura 8) e o sobrenadante filtrado com um filtro estéril de acetato de celulose ($0,22 \mu\text{m}$) de maneira a esterilizar o extrato (Lee *et al.*, 2020).

c. Extrato Ácido

Para a obtenção do extrato ácido, adicionou-se à amostra ácido acético (Fluka) a 3% numa proporção de 1:1. A mistura foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 3019 x g durante 20 minutos a 4°C. Após centrifugação, o pellet foi descartado (Figura 8) e o sobrenadante filtrado com um filtro estéril de PTFE (0,22 µm, Branchia) de maneira a esterilizar o extrato (Lee *et al.*, 2020).

d. Extrato Orgânico

Para a obtenção do extrato orgânico, foi adicionado à amostra etanol (Aga) a 95%, numa proporção de 1:1. Homogeneizou-se a mistura em vórtex e centrifugou-se a 3019 x g durante 20 minutos a 4°C. Após centrifugação, o pellet foi descartado (Figura 8) e o sobrenadante foi filtrado com filtro estéril de PTFE (0,22 µm) de maneira a esterilizar o extrato (Hellio *et al.*, 2002).



Figura 8 – Depósito das amostragens após as extrações

4. Amostras e extrações da semente do arroz

A recolha das amostras foi realizada no vale do Mondego, Portugal no mês de junho de 2021. Após colheita em cada etapa de branqueamento, as amostras foram sujeitas a processamento por micro-ondas durante 3 minutos, repetido três vezes, para evitar que a amostra sofresse oxidação (Arab *et al.*, 2011). Depois de processadas, as amostras foram armazenadas a 4°C até à sua utilização. Para este ensaio foram utilizadas duas espécies de arroz (Tabela II).

Tabela II - Espécies de arroz

Amostra	Nome comum	Espécie
C	Carolino	<i>Oryza sativa japonica</i>
A	Agulha	<i>Oryza sativa indica</i>

As amostras de semente de arroz foram submetidas a extrações com diferentes solventes com o objetivo de obter compostos diferentes para posterior avaliação da sua atividade antimicrobiana. Os extratos foram obtidos como descrito abaixo, por adaptação do procedimento por diversos autores, e foram armazenados a -80°C até à sua utilização.

a. Extrato Bruto

Para a obtenção do extrato bruto, a 10g de amostra, adicionou-se 100 mL de água destilada e a mistura foi homogeneizada em banho-maria a 40°C numa placa de agitação durante 15 minutos. Após homogeneização, a solução foi a centrifugar a 3019 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente, o pellet foi descartado e o sobrenadante colocou-se a filtrar a vácuo com papel de filtro qualitativo. De seguida a amostra foi novamente centrifugada a 3019 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente e por fim descartou-se o pellet e o sobrenadante foi filtrado com um filtro estéril de acetato de celulose (0,22 µm) de maneira a esterilizar o extrato. O extrato foi armazenado a - 80°C até à sua utilização (Martillanes *et al.*, 2020).

b. Extrato de Hexano

Para a obtenção do extrato de hexano, a cada 10g de amostra, adicionou-se 100 mL de hexano (Fisher) e a mistura foi homogeneizada em banho-maria a 40°C numa placa de agitação durante 15 minutos, de forma a homogeneizar a solução. Após homogeneização, filtrou-se a suspensão a vácuo com papel de filtro qualitativo. De seguida a amostra foi centrifugada a 3019 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente e por fim descartou-se o pellet e o sobrenadante foi filtrado com filtro estéril de PTFE (0,22 µm) de maneira a esterilizar o extrato. O extrato foi posteriormente armazenado a - 80°C até à sua utilização (Orthofer, 1996).

c. Extrato Etanólico

Para a obtenção do extrato etanólico, a 10g de amostra, adicionou-se 100 mL de etanol absoluto e a mistura foi homogeneizada em banho-maria a 40°C numa placa de agitação durante 15 minutos. Após homogeneização filtrou-se a suspensão a vácuo com papel de filtro qualitativo. De seguida a amostra foi centrifugada a 3019 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente e por fim descartou-se o pellet e o sobrenadante foi filtrado com filtro estéril de PTFE (0,22 µm) de maneira a esterilizar o extrato (Figura 9). O extrato foi armazenado a - 80°C até à sua utilização (Martillanes *et al.*, 2020).

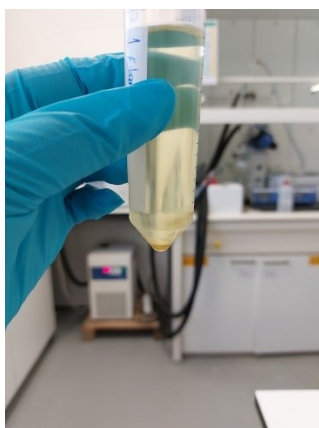


Figura 9 – Extrato etanólico da amostra de sêmea (1C).

5. Análise quantitativa dos extratos

a. Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteína, usou-se o método de Bradford (Kruger, 2009), adaptado para microplaca (Figura 10). Para o controlo negativo foi utilizada água destilada e para o controlo positivo foi utilizada uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich) com concentrações conhecidas. Preparou-se uma solução mãe de BSA com concentração de 10 mg/mL (solução I). A partir da solução I, preparou-se uma solução mais diluída, a 0,1 mg/mL (solução II) a partir da qual foram preparadas soluções padrão com diferentes concentrações. As soluções padrão de BSA foram preparadas em eppendorfs de 2 mL. Sempre que necessário, as amostras foram diluídas com tampão fosfato com uma concentração de 100 mM e pH 7.

Numa placa de 96 poços, foram pipetados 10 μ L de água destilada para os brancos, 10 μ L das soluções C1 a C6 para o padrão e 10 μ L de amostra para os poços da amostra. De seguida, adicionaram-se 200 μ L do reagente de Bradford (Merck) em todos os poços e homogeneizou-se com o auxílio de uma micropipeta. Aguardou-se 2 minutos e leu-se a absorvância a 595 nm. Todas as determinações foram efetuadas em quadruplicado. Construiu-se uma curva de calibração usando as concentrações das soluções padrão e correspondentes absorvâncias. Os resultados foram expressos em mg BSA/ mL extrato.

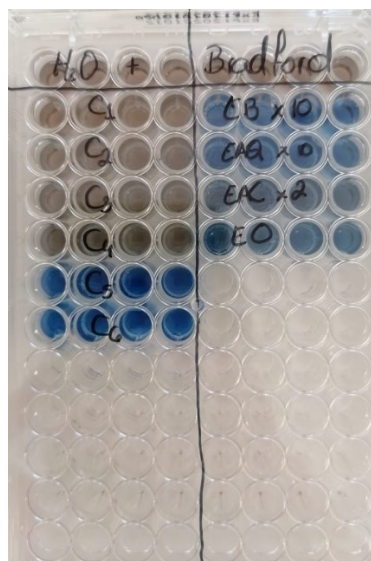


Figura 10 – Ensaio da quantificação proteica.

b. Quantificação de lípidos

Para a quantificação lipídica foi utilizado o método de Bligh & Dyer (Bligh *et al.*, 1959; Marsh & Weinstein, 1966), adaptado para microplaca de extração usando uma mistura de água e clorofórmio (Figura 11). Para controlo positivo foi utilizada uma solução padrão mãe de colesterol com uma concentração de 3,2 mg/mL.

As soluções padrão de colesterol foram preparadas a partir da solução mãe, em tubos de vidro. Para cada amostra, procedeu-se da seguinte forma. Para um eppendorfs de 2 mL pipetaram-se 60 μ L de amostra e adicionaram-se 500 μ L de clorofórmio (Fisher), 500 μ L de metanol (Chem-Lab) e 440 μ L de água destilada. De seguida as amostras foram centrifugadas a 2000g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, e o subnadante (fase orgânica) foi diluído em clorofórmio numa proporção de 1:3. Transferiram-se 100 μ L de solução diluída de clorofórmio para um tubo de ensaio.

Após todas as soluções estarem preparadas, adicionaram-se 500 μ L de ácido sulfúrico (Fluka), com agitação lenta, em todos os tubos de vidro (tanto nas soluções padrão como nas amostras). As soluções foram incubadas a 200°C durante 10 minutos. Após arrefecimento adicionaram-se 1500 μ L de água destilada diretamente na amostra, com agitação lenta. Para uma placa de 96 poços, foram pipetados 300 μ L de cada amostra em quadruplicados e leu-se a absorvância a 375 nm. Construiu-se uma curva de calibração usando as concentrações das soluções padrão e correspondentes absorbâncias. Os resultados foram expressos em mg colesterol/mL extrato.



Figura 11 - Ensaio da quantificação lipídica.

c. Quantificação de glicídios

A quantificação de glicídios foi realizada através do método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico (Masuko et al., 2005). Como controlo negativo usou-se água destilada e como controlo positivo foi utilizada uma solução padrão de glucose (Biochem) a 1 mg/mL (solução mãe). A partir desta solução-mãe foram preparadas soluções padrão de várias concentrações.

Para uma placa de 96 poços foram pipetados 30 μ L de água (controlo negativo), 30 μ L das diferentes concentrações padrão (controlo positivo) e 30 μ L de cada amostra (todos em quadruplicado). Adicionaram-se 150 μ L de ácido sulfúrico (Fluka) concentrado em cada poço e colocou-se a placa numa estufa a 90°C durante 15 minutos (Figura 12).

Seguidamente, foram adicionados 30 μ L de fenol (Fisher) a 5% aos poços de amostra (30 μ L de água destilada para os brancos), deixou-se arrefecer durante 10 minutos. Leu-se a absorvância a 490 nm. Construiu-se uma curva de calibração usando as concentrações das soluções padrão e correspondentes absorvâncias. Os resultados foram expressos em mg glucose/mL extrato.



Figura 12 – Ensaio da quantificação glicosídica.

6. Avaliação da capacidade antibacteriana

De forma a avaliar a capacidade antibacteriana dos extratos obtidos foram selecionadas algumas bactérias obtidas no ponto 1, em função do seu perfil presuntivo de resistência aos diferentes antimicrobianos: bactérias MDR (com 3 ou mais resistências presuntivas aos diferentes antimicrobianos testados – halos inferiores a 16 mm), bactérias AMR (com 1 ou 2 resistências presuntivas a diferentes antimicrobianos testados – halos inferiores a 16 mm), bactérias suscetíveis (sem resistências presuntivas aos diferentes antimicrobianos testados – halos superiores a 16 mm).

Para a avaliação da capacidade antimicrobiana dos extratos recorreu-se à realização de antibiogramas (Figura 13). Depois de inoculada a placa com meio de cultura Mueller-Hinton, colocou-se discos sem antibiótico, inoculados imediatamente de seguida com 10 μ L de cada extrato (Anexos) e no disco central 10 μ L do solvente do extrato utilizado para controlo negativo (Vandepitte J. *et al.*, 2003).

Por fim, as placas foram incubadas a 37°C durante 24h, seguidos da leitura e registo dos resultados. Foram realizados duplicados para cada amostra.

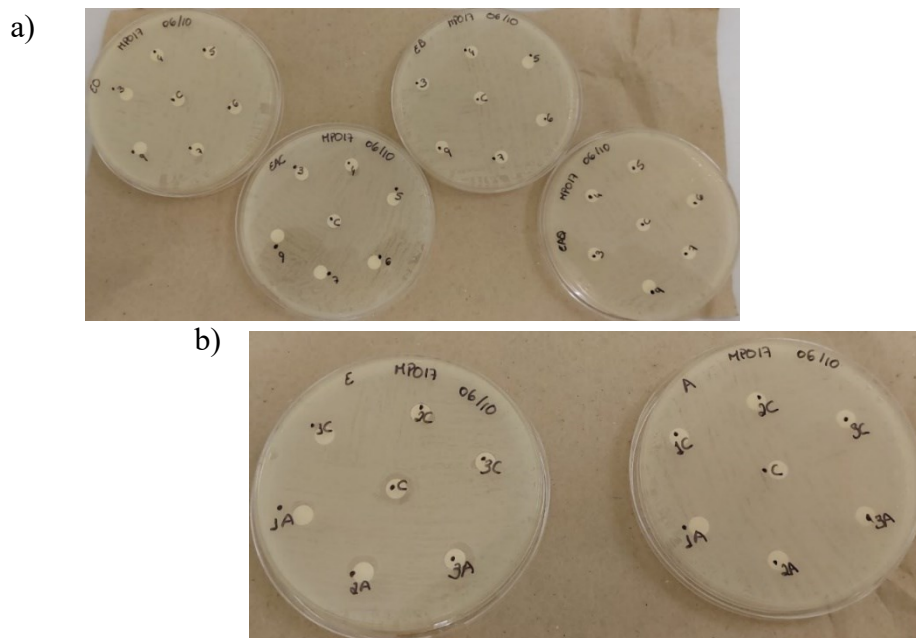


Figura 13 – Exemplo de ensaios de suscetibilidades antimicrobiana de diferentes bactérias aos diferentes extratos do muco epidérmico do peixe (extrato bruto, extrato aquoso, extrato ácido e extrato orgânico) e da sêmea do arroz (extrato bruto, extrato de hexano e extrato etanólico). a) Ensaio de suscetibilidade antimicrobiana dos diferentes extratos no muco epidérmico do peixe; b) Ensaio de suscetibilidade antimicrobiana dos diferentes extratos na sêmea do arroz.

RESULTADOS

1. Amostras e isolamentos bacterianos em unidade de saúde

Os ambientes de saúde são locais onde ocorre uma maior dispersão de bactérias MDR e onde as mesmas podem mais facilmente adquirir resistência a novos antimicrobianos (Lowry *et al.*, 1951). Na unidade de saúde associada a este estudo foram recolhidas cerca de 1105 amostras, sendo 23% de origem humana e as restantes do ambiente. Das colheitas humanas, 34% foram nas mãos, 34% da boca e 32% do ânus. Das amostras ambientais, 26% foram provenientes da mesa de cabeceira, 26% da grade lateral da cama, 26% da campainha da cama e 23% da maçaneta interna da porta da casa de banho.

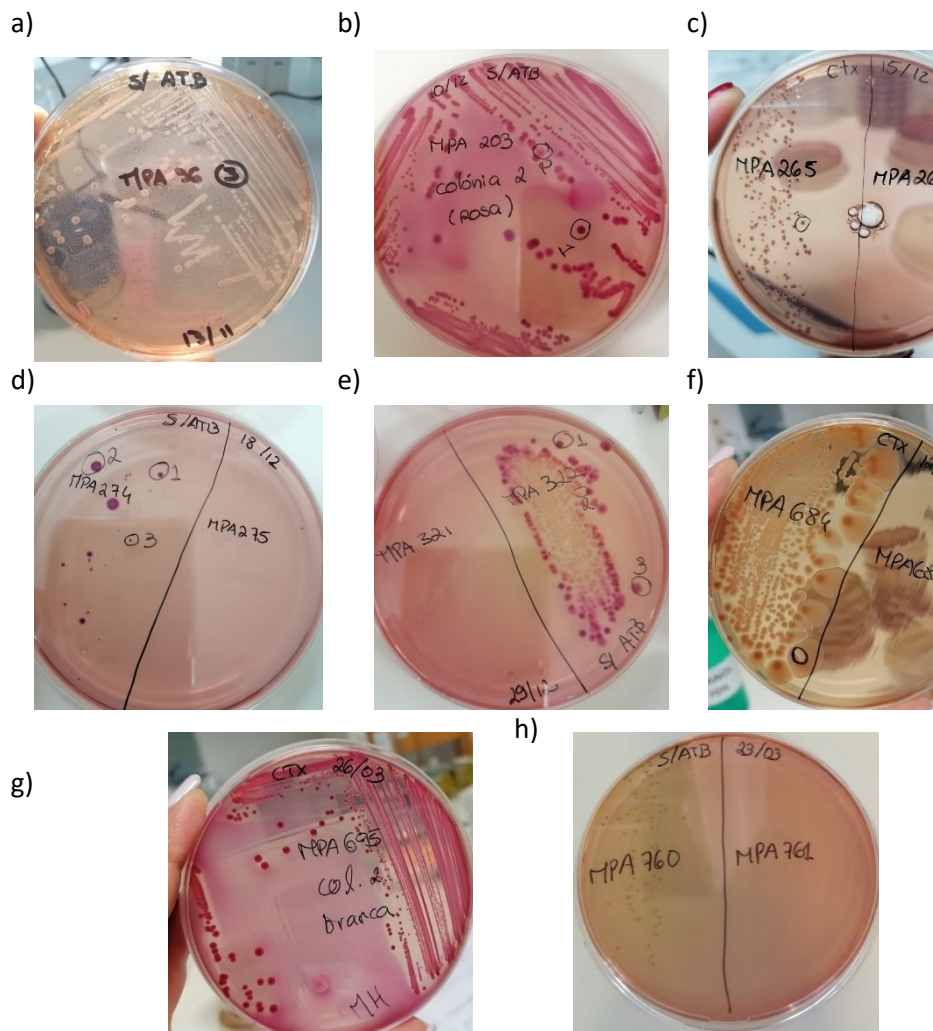


Figura 14 – Exemplos de crescimento bacteriano observado em placas de MacConkey simples (S/ATB) e MacConkey com CTX.

Das 1105 amostras recolhidas, foram isoladas 356 bactérias em igual número de origem ambiental e de origem humana, sendo que cerca de 21% das bactérias foram isoladas no meio de cultura MacConkey agar com CTX, 9% em MacConkey agar com MEM e 69% em MacConkey agar simples. A figura 14 exemplifica alguns dos aspetos morfológicos observados.

2. Perfis de suscetibilidade antimicrobiana

Uma vez que não foi possível proceder à identificação das espécies bacterianas, não foi possível fazer a interpretação destes resultados em termos de resistência ou suscetibilidade aos antimicrobianos testados, mas apenas uma presunção da sua possível resistência, tomando como critério descrito para as enterobactérias, bactérias alvo de seleção ao se utilizar o meio de cultura MacConkey. Assim, admitiu-se que halos inferiores a 16 mm representariam presumíveis resistências ao antimicrobiano em teste e halos superiores a 16 mm representariam presumíveis suscetibilidades ao antimicrobiano em teste. A figura 15 a) apresenta as percentagens de presumíveis resistências a cada antimicrobiano testado para os isolados de origem ambiental e a figura 15 b) para os isolados de origem humana.

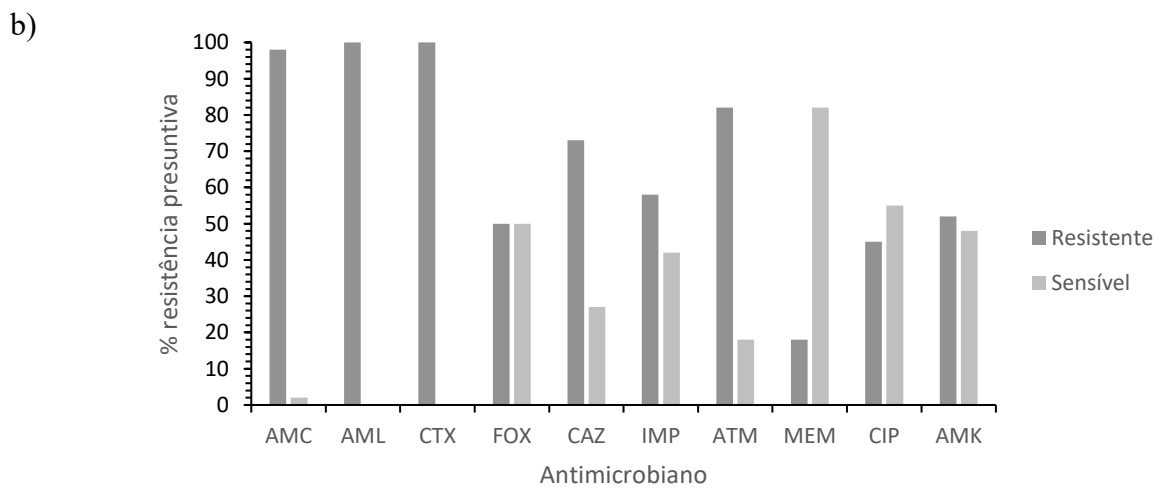
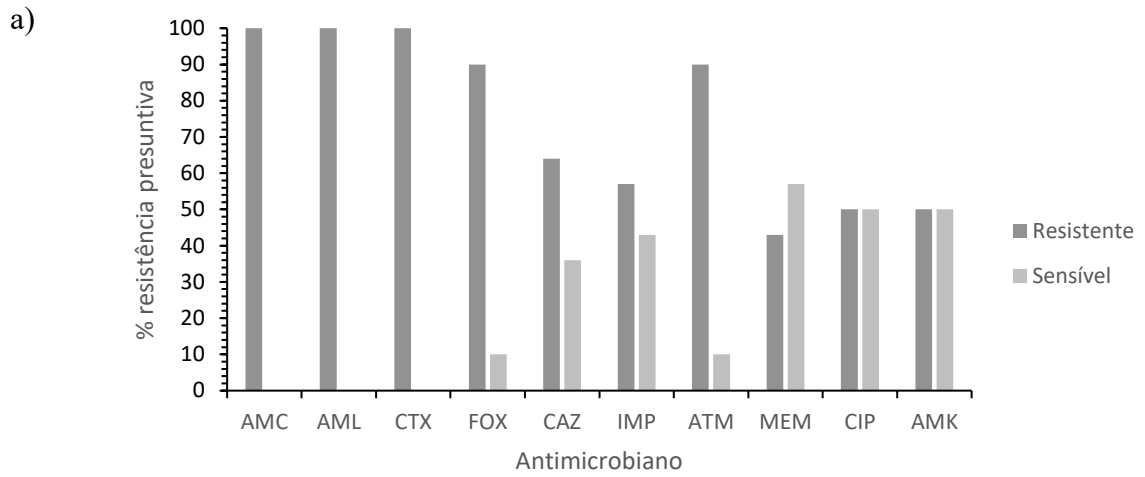


Figura 15 - Presumíveis resistências / presumíveis suscetibilidades aos antimicrobianos testados para os isolados a) de origem ambiental; b) de origem humana.

3. Análise quantitativa dos extratos

a. Análise glicosídica

i. Muco epidérmico do peixe

O muco epidérmico do peixe apresenta uma quantidade elevada de glúcidos, variando consoante os organismos em estudo. Os resultados da análise glicosídica nos extratos do muco epidérmico do peixe encontram-se representados na Figura 16. Os extratos brutos foram os que apresentaram maiores concentrações de glúcidos, sendo que a Abrótea, a Pescada e o Peixe-galo (2, 6 e 7, respetivamente) apresentaram uma maior quantidade de glúcidos no seu muco epidérmico, variando entre 0,57 mg de glucose/mL de extrato e 0,66 mg de glucose/mL de extrato (Figura 16, gráfico a). A concentração de glúcidos nos extratos aquoso, ácido e orgânico foram mais baixas, como se pode observar nos gráficos b-d da Figura 16. Nos extratos aquosos, os peixes Pescada, Peixe-galo e Safio (6, 7 e 9 respetivamente) apresentavam as maiores quantidades de glúcidos, variando entre 0,20 mg de glucose/mL de extrato e os 0,40 mg de glucose/mL de extrato (Figura 16, gráfico b). Nos extratos ácidos, obtiveram-se menores quantidades de glúcidos, sendo que a Pescada, o Peixe-galo e o Safio (6, 7 e 9 respetivamente) apresentavam as maiores quantidades de glúcidos variando entre 0,15 mg de glucose/mL de extrato e os 0,25 mg de glucose/mL de extrato (Figura 16, gráfico c). Por fim, os extratos etanólicos foram os que apresentaram os valores mais baixos de hidratos de carbono, sendo que os peixes que apresentaram as concentrações mais elevadas de glúcidos no seu muco foram a Corvina, o Peixe-galo e o Safio (5, 7 e 9 respetivamente), com valores entre os 0,05 mg de glucose/mL de extrato e os 0,16 mg de glucose/mL de extrato (Figura 16, gráfico d).

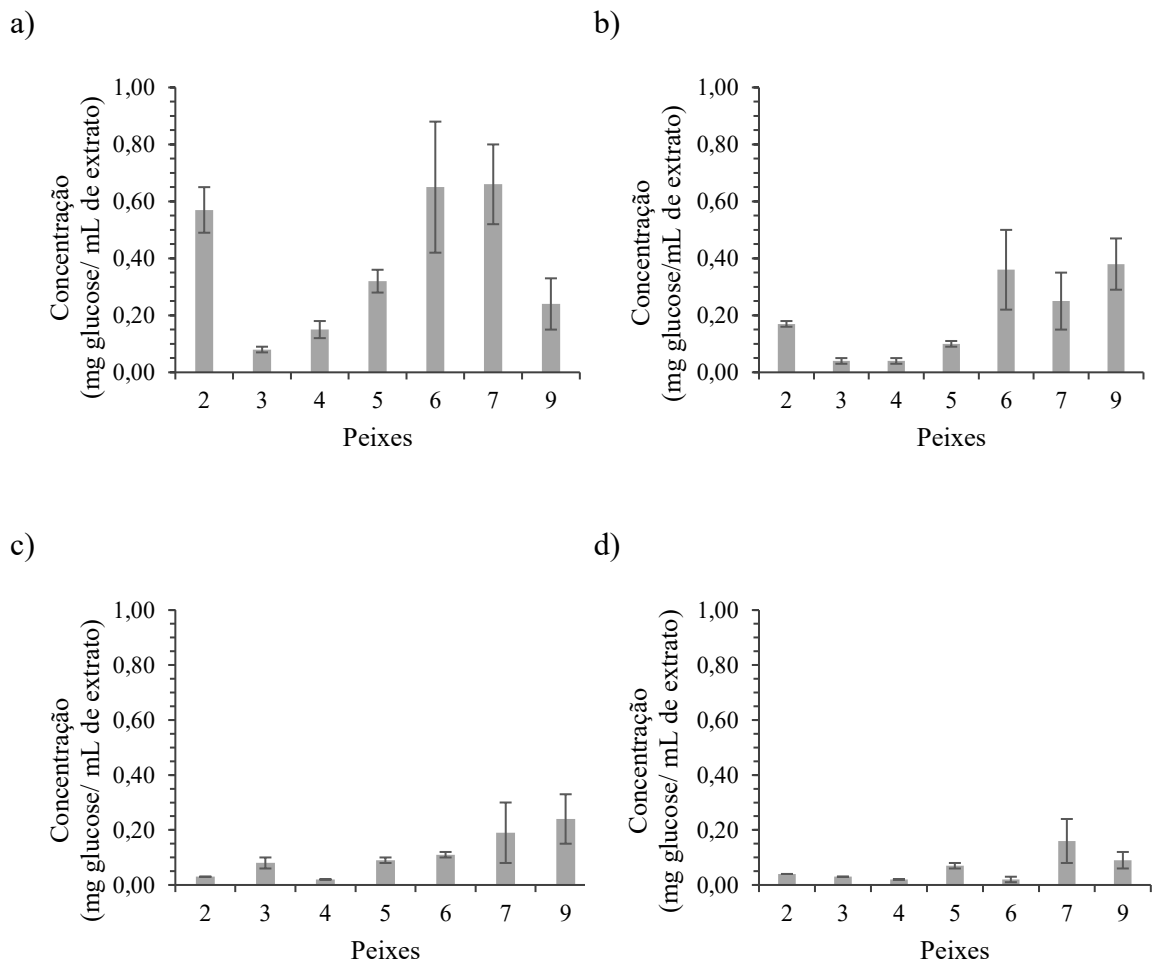


Figura 16 – Concentração de glicídios nos extratos do muco epidérmico do peixe. Resultados expressos em mg de glucose/mL de extrato (média \pm desvio padrão), e por espécie de peixe; a) Extrato Bruto; b) Extrato aquoso; c) Extrato ácido; d) Extrato orgânico. 2 – Abrótea; 3 – Cantarilho; 4 – Raia – lenga; 5 – Corvina; 6 – Pescada; 7 – Peixe-galo; 9 – Safio.

ii. – Sêmea do arroz

Na figura 17 apresentam-se os resultados obtidos da análise de hidratos de carbono nos extratos de sêmea de arroz. Os tratamentos da sêmea do arroz que apresentam uma maior quantidade de hidratos de carbono são a segunda e terceira estação de branqueamento do arroz carolino (2C e 3C) e a primeira estação de branqueamento do arroz agulha (1A), sendo que estes apresentaram valores entre 4,50 mg de glucose/mL de extrato e 6,35 mg de glucose/mL de extrato (Figura 17, gráfico a).

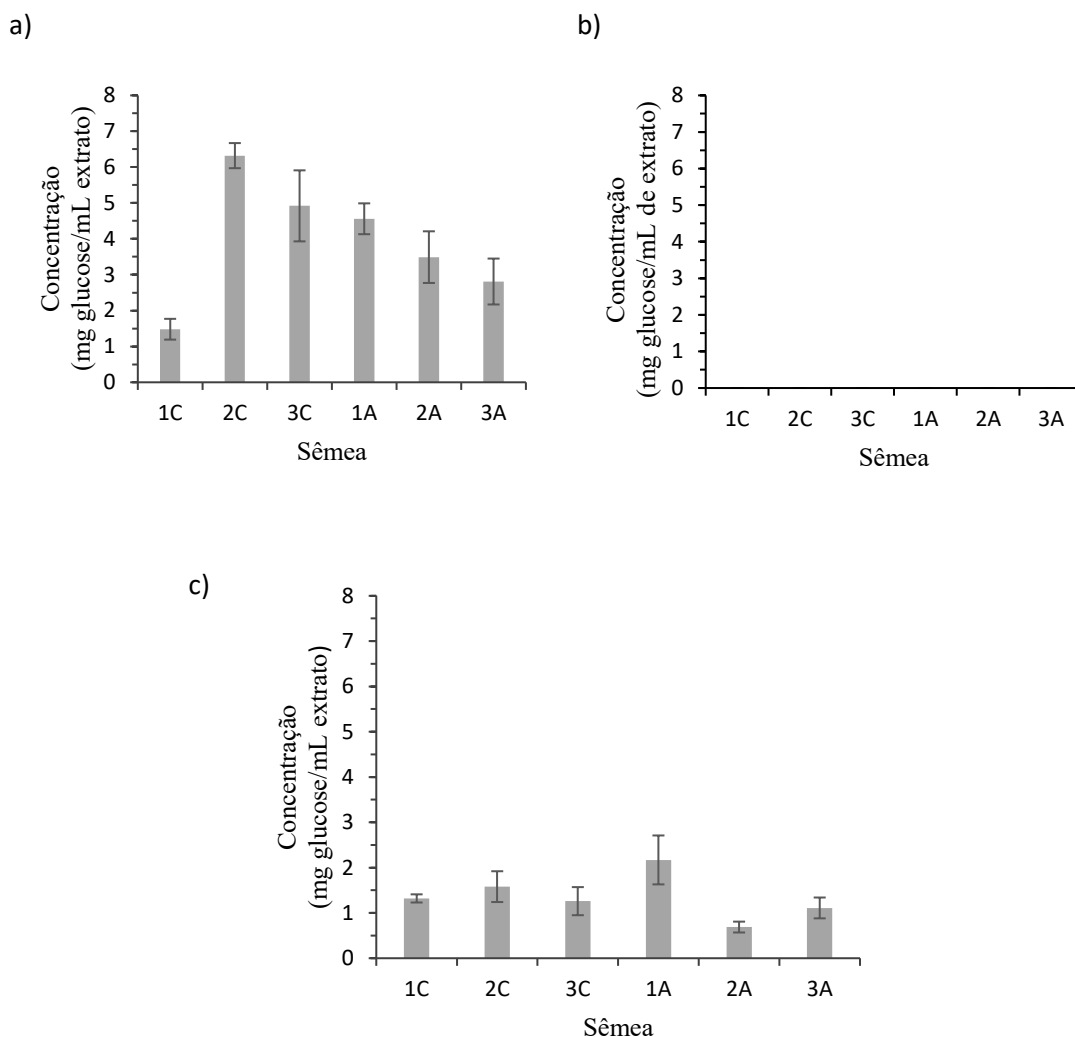


Figura 17 – Concentração de glicídios nos extratos da sênea do arroz. Resultados expressos em mg de glucose/mL de extrato (média \pm desvio padrão), e por tratamento de sênea de arroz; a) Extrato bruto; b) Extrato de hexano; c) Extrato etanólico. 1C – porção 1 do arroz carolino; 2C – porção 2 do arroz carolino; 3C – porção 3 do arroz carolino; 1A – porção 1 do arroz agulha; 2A – porção 2 do arroz agulha; 3A – porção 3 do arroz agulha.

Os extratos de hexano não apresentaram hidratos de carbono quantificáveis pelo método usado (figura 17, gráfico b). Por fim os extratos etanólicos apresentaram valores baixos de glicídios sendo que os que apresentaram valores mais altos foram as frações obtidas na primeira e segunda estação de branqueamento do arroz carolino e na primeira estação do arroz agulha (1C, 2C e 1A), com valores entre 1,30 mg de glucose/mL de extrato e 2,20 mg de glucose/mL de extrato (Figura 17, gráfico c).

b. – Análise lipídica

iii. Muco epidérmico do peixe

Ao analisar o gráfico a) da figura 18, é possível verificar que o conteúdo lipídico dos extratos do muco epidérmico dos peixes em estudo varia entre 0,019 mg de colesterol/mL de extrato e 0,048 mg de colesterol/mL de extrato, sendo que as espécies que apresentaram valores mais elevados foram a abrótea, a pescada e o safio (2, 6 e 9, respetivamente). Os extratos aquosos apresentaram entre os 0,013 mg de colesterol/mL de extrato e os 0,038 mg de colesterol/mL de extrato, tendo a abrótea, a pescada e o safio (2, 6 e 9, respetivamente) as concentrações mais elevadas (Figura 18, gráfico b).

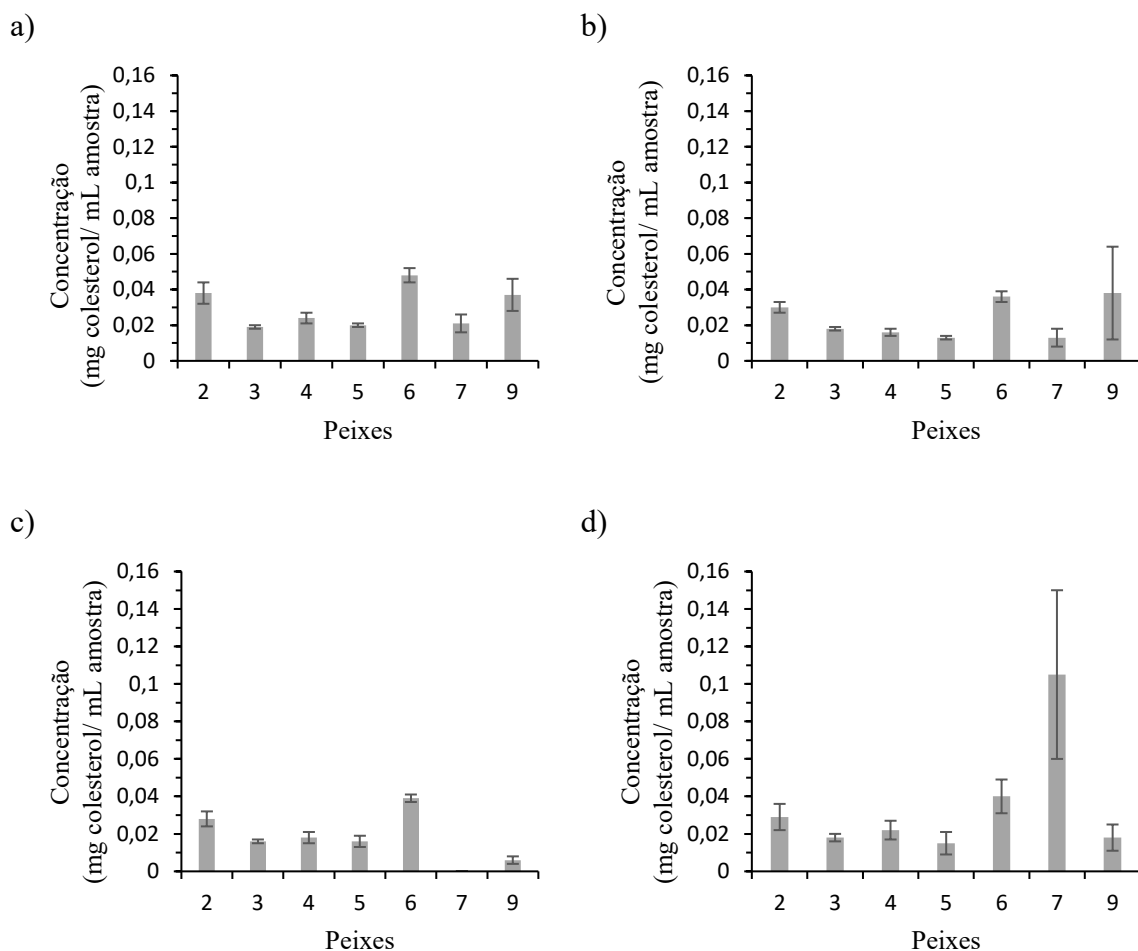


Figura 18 – Concentração de lípidos nos extratos do muco epidérmico do peixe. Resultados expressos em mg de colesterol/mL de extrato (média \pm desvio padrão), e por espécie de espécie; a) Extrato Bruto; b) Extrato aquoso; c) Extrato ácido; d) Extrato orgânico; 2 – Abrótea; 3 – Cantarilho; 4 – Raia – longa; 5 – Corvina; 6 – Pescada; 7 – Peixe-galo; 9 – Safio.

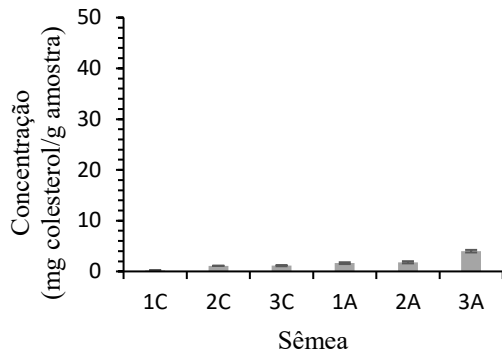
Na extração ácida, as quantidades de lípidos mantiveram o mesmo padrão lipídico quando comparada com a extração aquosa, tendo-se obtido concentrações entre os 0 mg de colesterol/mL de extrato no muco epidérmico do peixe – galo (7) e os 0,039 mg de colesterol/mL de extrato no muco epidérmico da pescada (6). As espécies de peixe que apresentaram maior conteúdo de lípidos foram a abrótea, a pescada e o safio (Figura 18, gráfico c). Por fim os extratos etanólicos apresentaram um conteúdo lipídico variando entre 0,015 mg de colesterol/mL de extrato e 0,105 mg de colesterol/mL de extrato, sendo que esta última corresponde ao muco epidérmico da espécie 7 (Figura 18, gráfico d).

iv. – Sêmea do arroz

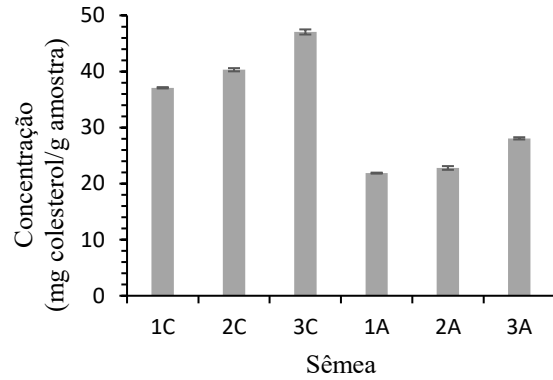
Os resultados da quantificação lipídica nos extratos das sêmeas de arroz estão representados na figura 19. Os tratamentos da sêmea do arroz que apresentam uma maior quantidade de lípidos são a primeira, segunda e terceira estação de branqueamento do arroz agulha (1A, 2A e 3A). Os valores lipídicos variaram entre 0,19 mg de colesterol/mL de extrato e 3,99 mg de colesterol/mL de extrato (Figura 19, gráfico a).

Os extratos de hexano apresentaram maior concentração de lípidos, apresentando os valores mais altos as amostras da primeira, segunda e terceira estação de branqueamento do arroz carolino (1C, 2C e 3C), com concentrações compreendidas entre os 21,87 mg de colesterol/mL de extrato e os 47,05 mg de colesterol/mL de extrato. (Figura 19, gráfico b). Por fim, os extratos etanólicos apresentaram valores mais baixos de lípidos quando comparados com a extração com hexano. As amostras apresentam valores compreendidos entre 7,29 mg de colesterol/mL de extrato e 12,54 mg de colesterol/mL de extrato, sendo os valores mais altos da primeira e terceira estação de branqueamento do arroz carolino e da terceira estação de branqueamento do arroz agulha (1C, 3C e 3A) (Figura 19, gráfico c).

a)



b)



c)

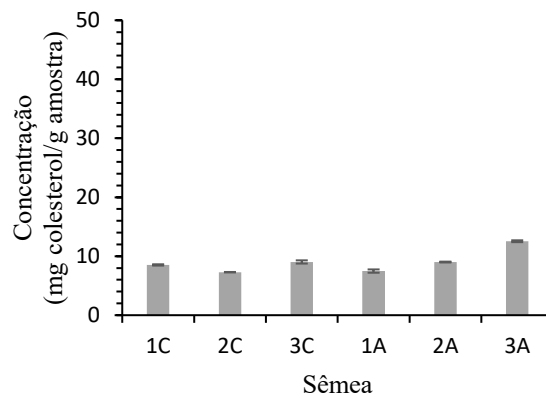


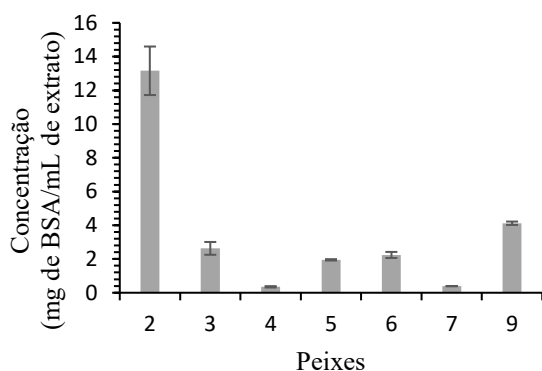
Figura 19 – Concentração de lípidos nos extratos de sênea do arroz. Resultados expressos em mg de colesterol/mL de extrato (média \pm desvio padrão) e por tratamento de sênea de arroz; a) Extrato bruto; b) Extrato de hexano; c) Extrato etanólico. 1C – porção 1 do arroz carolino; 2C – porção 2 do arroz carolino; 3C – porção 3 do arroz carolino; 1A – porção 1 do arroz agulha; 2A – porção 2 do arroz agulha; 3A – porção 3 do arroz agulha.

c. – Análise Proteica

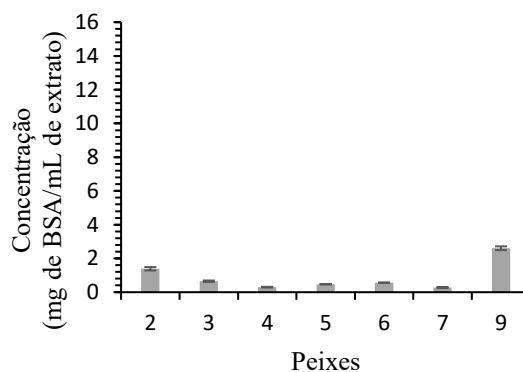
v. – Muco epidérmico do peixe

Os resultados da quantificação de proteína nos extratos do muco epidérmico do peixe estão representados na figura 20. Nos extratos brutos, a concentração de proteína varia entre 0,35 mg de BSA/mL de extrato e 13,16 mg de BSA/mL de extrato, sendo que as espécies que apresentaram valores mais elevados foram as 2, 3 e 9 (Figura 20, gráfico a).

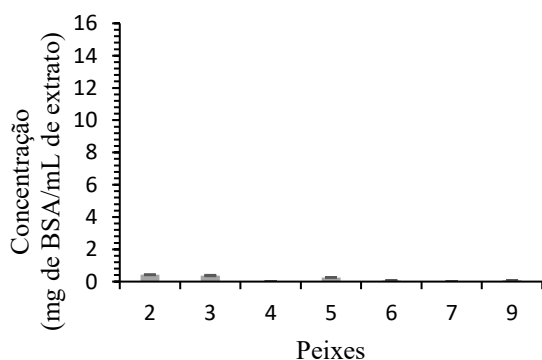
a)



b)



c)



d)

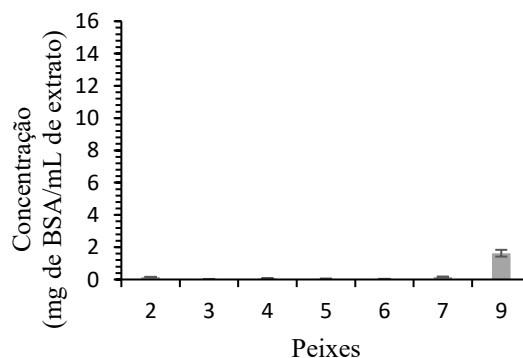


Figura 20 – Concentração de proteínas nos extratos do muco epidérmico do peixe. Resultados expressos em mg de BSA/mL de extrato (média \pm desvio padrão), e por espécie de peixe; a) Extrato Bruto; b) Extrato aquoso; c) Extrato ácido; d) Extrato orgânico. 2 – Abrótea; 3 – Cantarilho; 4 – Raia – língua; 5 – Corvina; 6 – Pescada; 7 – Peixe-galo; 9 – Safio.

Os extratos aquosos apresentaram conteúdos de proteína variando entre os 0,27 mg de BSA/mL de extrato e os 2,60 mg de BSA/mL de extrato, tendo as espécies 2, 3 e 9 as concentrações mais elevadas (Figura 20, gráfico b).

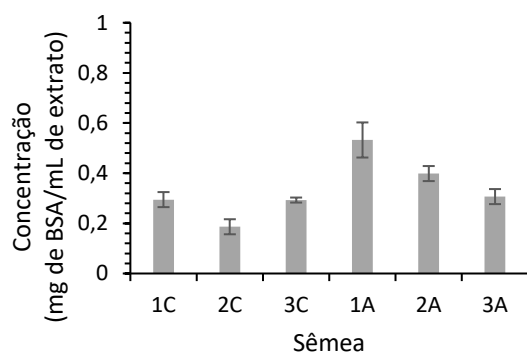
Os extratos ácidos apresentaram menores conteúdos de proteínas, tal como foi observado para os extratos aquosos, tendo-se obtido concentrações entre os 0,023 mg de BSA/mL de extrato no muco epidérmico da espécie 4 e os 0,42 mg de BSA/mL de extrato no muco epidérmico da espécie 2. As espécies de peixe que apresentaram maiores concentrações de proteínas nos extratos ácidos foram a 2, 3 e 5 (Figura 20, gráfico c). Nos extratos orgânicos obtiveram-se conteúdos de proteínas entre 0,030 mg de BSA/mL de extrato e 1,63 mg de BSA/mL de extrato, sendo que a concentração mais elevada foi obtida para o extrato orgânico do muco epidérmico da espécie 9 (Figura 20, gráfico d).

vi. – Sêmea de arroz

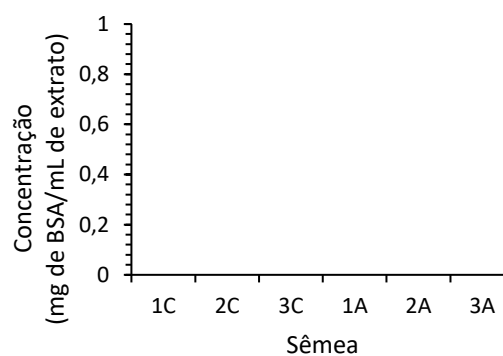
Ao observar os gráficos da figura 21, é possível observar que os tratamentos da sêmea do arroz que apresentam uma maior quantidade de proteínas no extrato bruto são a primeira, segunda e terceira estação de branqueamento do arroz agulha (1A, 2A e 3A). Os valores proteicos variaram entre 0,19 mg de BSA/mL de extrato e 0,53 mg de BSA/mL de extrato (Figura 21, gráfico a).

Os extratos de hexano não apresentaram proteína quantificável no método usado (Figura 21, gráfico b). Os extratos etanólicos apresentaram maiores concentrações de proteína que os extratos aquosos sendo que os que apresentaram valores mais altos foram a primeira estação de branqueamento do arroz carolino, a primeira e terceira estação de branqueamento do arroz agulha (1C, 1A e 3A), variando entre 0,32 mg de BSA/mL de extrato e 0,48 mg de BSA/mL de extrato (Figura 21, gráfico c).

a)



b)



c)

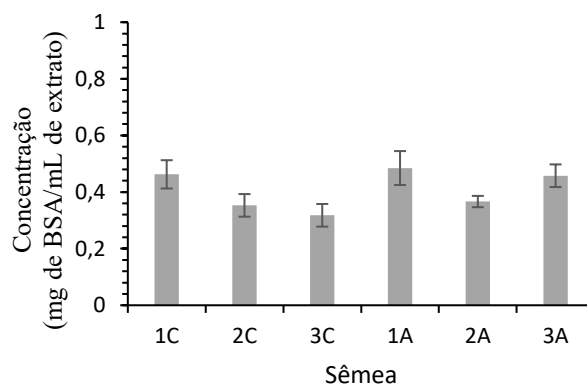


Figura 21 – Concentração de proteína nos extratos de sênea de arroz. Resultados expressos em mg de BSA/mL de extrato (média \pm desvio padrão) e por tratamento de sênea de arroz; a) Extrato bruto; b) Extrato de hexano; c) Extrato etanólico. 1C – porção 1 do arroz carolino; 2C – porção 2 do arroz carolino; 3C – porção 3 do arroz carolino; 1A – porção 1 do arroz agulha; 2A – porção 2 do arroz agulha; 3A – porção 3 do arroz agulha.

4. – Avaliação da capacidade antimicrobiana dos extratos

Para a avaliação da capacidade antimicrobiana dos extratos, foram utilizadas 38 bactérias divididas em 3 grupos conforme indicado no ponto 2. Para além destas foram ainda utilizadas bactérias padrão: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Enterobacter hormaechei* ATCC 49162, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Staphylococcus epidermidies* ATCC 14990.

Ao serem testados os diferentes extratos nas diferentes bactérias, em duplicado, o resultado obtido foi negativo em todos os casos, sendo que existiu o aparecimento de halos nos discos contendo extratos e discos de controlo relativos aqueles em que o solvente era etanólico. O aparecimento destes halos pode ser justificado pelo solvente utilizado, tal como mostra a figura 22.

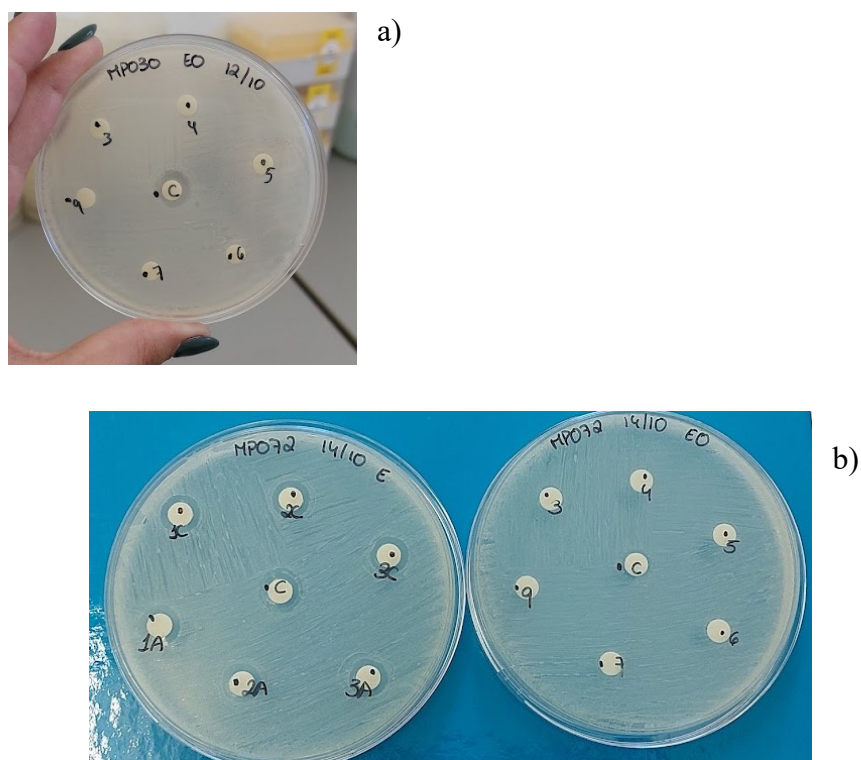


Figura 22 – Exemplos de ensaios de suscetibilidade antimicrobiana aos extratos em estudo; a) Ensaio do extrato orgânico de muco epidérmico de peixe; b) Ensaio do extrato orgânico da sêmea de arroz (esquerda) e do muco epidérmico (direita) com o extrato orgânico.

DISCUSSÃO DE RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os peixes apresentam subprodutos ricos em proteínas, minerais e enzimas. O muco epidérmico do peixe é um composto essencial na imunidade inata destes animais, pois atuam como uma barreira de defesa. A composição, viscosidade e taxa de secreção varia consoante a espécie e apresenta variações em resposta à atividade microbiana. Este subproduto segrega AMP e apresenta elevadas quantidades de compostos que protegem os peixes contra os microrganismos como a proteína C-reativa, lisozimas, lectinas e flavoenzimas (Tyor *et al*, 2016).

Ao longo do ano, a quantidade e a qualidade do muco epidérmico dos peixes varia conforme a estação do ano e as condições ambientais, como o pH, o stress e a idade, admitindo-se que a secreção do muco epidérmico seja maior no Verão que no Inverno (Tyor *et al*, 2016). Neste ensaio a recolha do muco epidérmico foi realizada durante os meses de Abril e Maio, em 9 espécies diferentes e o número de indivíduos não foi uniforme entre lotes pois não foi possível existir controlo do mesmo, não existindo desta forma um volume padrão de muco obtido em cada recolha. Depois da realização das extrações e devido à pequena quantidade de muco obtido, foi necessário descartar as amostras obtidas a partir de Robalo (*Dicentrarchus labrax*) e Ruivo (*Chelidonichthys cuculus*).

Segundo diversos autores, o muco epidérmico do peixe é uma boa fonte de compostos antimicrobianos, considerando até ser um subproduto com elevado interesse de estudo na utilização do mesmo para a defesa contra produtores de β -lactamases como a *E.coli*, *Haemophilus* sp., *K.pneumoniae* e *S.aureus* (Guardiola *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2020; Tyor *et al*, 2016).

Na análise quantitativa efetuada nos extratos de muco epidérmico de peixe verificou-se que os extratos brutos e aquosos eram mais ricos em glícidos e proteínas, enquanto os extratos orgânicos eram mais ricos em lípidos. Isto está de acordo com o esperado pois as proteínas e hidratos de carbono são mais solúveis em solventes polares, enquanto os lípidos são mais solúveis em solventes apolares. A extração ácida não mostrou ser eficiente na extração de nenhuma classe específica de compostos.

Na análise antimicrobiana efetuada os resultados foram negativos, traduzidos, portanto na resistência das bactérias testadas aos extratos a que foram expostas. Tal pode ter acontecido devido aos solventes utilizados e, à concentração dos extratos usados nos testes, diferentes em função das espécies utilizadas a partir do qual foram obtidos. Tecnicamente,

deveria ter sido feita essa aferição da concentração, para que fosse igual entre ensaios, mas considerando a sua origem, admite-se também como plausível que a variação observada se deva à estação do ano, pois conforme a temperatura da água aumenta, maior é a quantidade de muco de peixe, à existência de gelo nas amostras, o que fez com que os extratos ficassem diluídos e à variabilidade interespecies, que conforme foram alterando vão apresentando compostos diferentes (Tyor *et al.*, 2016).

O arroz é um produto que apresenta atividades antioxidantes e antimicrobianas. (Taniguchi *et al.*, 2017). A sêmea do arroz é rica em macromoléculas de interesse, com 38,1% de proteínas, 30% de lípidos e 14,2% de hidratos de carbono (Parrado *et al.*, 2006). Os valores obtidos neste trabalho, no extrato bruto, não diferem muito do descrito por estes autores. Observou-se, contudo, algumas diferenças entre os extratos obtidos de sêmea das diferentes estações de recolha, quanto à composição lipídica, glicosídica e proteica, mas que não são significativas para este estudo.

Na análise quantitativa dos extratos de sêmea de arroz verificou-se que os extratos brutos eram mais ricos em glícidos, os extratos de hexano mais ricos em lípidos, e os extratos etanólicos eram mais ricos em proteínas. Estes resultados são compatíveis com o tipo de extração efetuada, visto que solventes orgânicos como hexano são eficientes na solubilização de lípidos, enquanto solventes mais polares são mais eficientes na solubilização de proteínas e hidratos de carbono, como referido acima.

Segundo alguns autores, a sêmea do arroz apresenta atividade antimicrobiana considerando-se desta forma um subproduto com interesse para este estudo. Para a atividade antimicrobiana se expressar é necessário a extração correta dos compostos, sendo que os mesmos não são tão facilmente extraídos através de solventes aquosos, existindo a necessidade de utilizar um solvente químico para que ocorra a degradação química da parede celular vegetal de forma a existir uma melhor extractabilidade do conteúdo celular (Lloyd *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2016; Taniguchi *et al.*, 2017).

Neste trabalho, não foi observada atividade antimicrobiana no muco epidérmico do peixe e na sêmea do arroz. Atendendo à baixa concentração de alguns extratos, teria feito sentido ter acrescentado uma etapa de concentração dos mesmos, a fim de poder testar não só a mesma concentração dos diferentes extratos em cada um dos ensaios de suscetibilidade antimicrobiana, como diferentes concentrações de cada extrato, recorrendo a esta

abordagem. Neste trabalho, a abordagem adotada foi a utilização do mesmo volume de extrato em cada ensaio, mas efetivamente tal corresponde não só a diferentes concentrações dos extratos em teste, como pode ter-se traduzido numa concentração insuficiente, que importa explorar em estudos futuros, antes de se excluir a hipótese testada neste trabalho, de que extratos brutos, aquosos, ácidos e orgânicos de muco de peixe e extratos brutos, de hexano e etanólicos de sêmea de arroz têm atividade antimicrobiana.

A fim de melhorar o rendimento de extração do muco de peixe, e atenta a informação disponível na literatura da variação sazonal da produção de muco, também esta componente do trabalho pode ser otimizada, fazendo as recolhas apenas nos meses de maior produção de muco, o mesmo acontecendo com as espécies e o número de indivíduos a amostrar. Por questões técnicas, não foi possível neste trabalho determinar o número exato de indivíduos amostrados em cada momento de recolha, o que seria útil para ajudar a determinar o número adequado de indivíduos a amostrar para a obtenção de determinada quantidade de cada um dos extratos. É, portanto, uma abordagem que pode ser otimizada futuramente. Quanto à componente laboratorial de extração dos compostos, e apesar das técnicas estarem já bastante otimizadas, poder-se-ia considerar para trabalhos futuros a alteração da utilização de outros solventes de extração, na tentativa de obter outros compostos, a alteração do tempo de extração, a fim de otimizar a quantidade de compostos extraídos a partir de cada solvente, e ainda a realização de ensaios sobre a concentração de extrato impregnada nos discos de papel utilizada nos testes de suscetibilidade, já descrito acima. Por último, e no concernente à componente microbiológica, seria também de interesse a realização da identificação prévia das bactérias, para melhor orientar a interpretação de resultados dos perfis de suscetibilidade antimicrobiana e consequente seleção mais exata de bactérias MDR para os estudos de atividade antimicrobiana dos extratos em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arab, F., Alemzadeh, I., & Maghsoudi, V. (2011). Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Scientia Iranica*, *18*(6), 1402–1406.
<https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.09.014>
- Arora, G., Sajid, A., & Kalia, V. C. (2017). Drug resistance in bacteria, fungi, malaria, and cancer. *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer*, 1–629.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-48683-3>
- Bennett, J. W., & Chung, K. T. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in Applied Microbiology*, *49*, 163–184. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(01\)49013-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(01)49013-7)
- Bligh, E.G. and Dyer, W. J. (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8).
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, *77*(1), 7–24. <https://doi.org/10.1351/pac200577010007>
- Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiología (Madrid, Spain)*, *12*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1128/membr.00016-10>
- El mekes, A., Zahlane, K., Ait said, L., Tadmouy Ouafi, A., & Barakate, M. (2020). The clinical and epidemiological risk factors of infections due to multi-drug resistant bacteria in an adult intensive care unit of University Hospital Center in Marrakesh-Morocco. *Journal of Infection and Public Health*, *13*(4), 637–643. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.012>
- FAO. (2016). The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. *British Medical Journal*, *317*(7161), 25.
- Fernandes, P. (2015). The global challenge of new classes of antibacterial agents: An industry perspective. *Current Opinion in Pharmacology*, *24*, 7–11.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.06.003>
- Gomez, D., Sunyer, J. O., & Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*, *35*(6), 1729–1739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.032>
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Abellán, E., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2014). Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, *40*(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.018>
- Hellio, C., Pons, A. M., Beaupoil, C., Bourgougnon, N., & Gal, Y. Le. (2002). Antibacterial, antifungal

- and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20(3), 214–219. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00172-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00172-3)
- Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. *Manual of Clinical Microbiology*, 1253–1273. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.CH71>
- Kim, S. M., & Lim, S. T. (2016). Enhanced antioxidant activity of rice bran extract by carbohydrase treatment. *Journal of Cereal Science*, 68, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.01.006>
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford Method. *Basic Protein and Peptide Protocols*, 17–24. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>
- Kumar, P., Rajeshwaran, T., Priya, P., Kailasam, M., Biswas, G., Ghoshal, T. K., ... Arasu, A. R. T. (2019). Comparative Immunological and Biochemical Properties of the Epidermal Mucus from Three Brackishwater Fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 89(1), 95–103. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0923-3>
- Kumari, S., Tyor, A. K., & Bhatnagar, A. (2019). Evaluation of the antibacterial activity of skin mucus of three carp species. *International Aquatic Research*, 11(3), 225–239. <https://doi.org/10.1007/s40071-019-0231-z>
- Lee, Y., Bilung, L. M., Sulaiman, B., & Chong, Y. L. (2020a). The antibacterial activity of fish skin mucus with various extraction solvents and their in-vitro evaluation methods. *International Aquatic Research*, 12(1), 1–21. [https://doi.org/10.22034/IAR\(20\).2020.670998](https://doi.org/10.22034/IAR(20).2020.670998)
- Lee, Y., Bilung, L. M., Sulaiman, B., & Chong, Y. L. (2020b). The antibacterial activity of fish skin mucus with various extraction solvents and their in-vitro evaluation methods. *International Aquatic Research*, 12(1), 1–21. [https://doi.org/10.22034/IAR\(20\).2020.670998](https://doi.org/10.22034/IAR(20).2020.670998)
- Lloyd, B. J., Siebenmorgen, T. J., & Beers, K. W. (2000). Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chemistry*, 77(5), 551–555. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.5.551>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Manikantan, G., Lyla, S., Khan, S. A., Vijayanand, P., & Jothi, G. E. G. (2016). Bioactive potency of

- epidermal mucus extracts from greasy grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsskal, 1775). *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(7), 510–520. <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016j6-34>
- Marsh, J. B., & Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7(4), 574–576. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)39274-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)39274-9)
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Gil, M. V., Ayuso-Yuste, M. C., & Delgado-Adámez, J. (2020). Antioxidant and antimicrobial evaluation of rice bran (*Oryza sativa* L.) extracts in a mayonnaise-type emulsion. *Food Chemistry*, 308, 125633. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125633>
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, (19), 521–547. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., ... Bierbaum, G. (2018). Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(5), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Orthoefer, F. T. (1996). Rice Bran Oil Detection. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 393–409. <https://doi.org/10.1002/047167849X.bio015.pub2>
- Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J. F., Collantes de Terán, L., & Bautista, J. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chemistry*, 98(4), 742–748. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.016>
- Pickens, C. I., & Wunderink, R. G. (2019). Principles and Practice of Antibiotic Stewardship in the ICU. *Chest*, 156(1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.01.013>
- Schreiber, C., Zacharias, N., Essert, S. M., Wasser, F., Müller, H., Sib, E., ... Exner, M. (2021). Clinically relevant antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments – An optimized

- culture-based approach. *Science of the Total Environment*, 750.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142265>
- Siedlecka, A., & Piekarska, K. (2017). The evaluation of the classical Kirby-Bauer antibiogram method for the determination of antibiotic resistant microorganisms in tap water. *E3S Web of Conferences*, 17. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20171700081>
- Silva, Estevão Urbano; Corrêa, L. (2008). USO RACIONAL DE ANTIMICROBIANOS E A RESISTÊNCIA MICROBIANA. Retrieved April 7, 2022, from https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/res_principais2.htm
- Sohail, M., Rakha, A., Butt, M. S., & Jawad, M. (2016). Rice Bran Nutraceuticals : A Comprehensive Review, 8398(March). <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1164120>
- Subramanian, S., MacKinnon, S. L., & Ross, N. W. (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 148(3), 256–263.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.06.003>
- Taniguchi, M., Kameda, M., Namae, T., Ochiai, A., & Saitoh, E. (2017). Identification and characterization of multifunctional cationic peptides derived from peptic hydrolysates of rice bran protein. *Journal of Functional Foods*, 34, 287–296.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.046>
- Tiralongo, F., Messina, G., Lombardo, B. M., Longhitano, L., Li Volti, G., & Tibullo, D. (2020). Skin Mucus of Marine Fish as a Source for the Development of Antimicrobial Agents. *Frontiers in Marine Science*, 7(September), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.541853>
- Tyor, A. K., & Kumari, S. (2016). Biochemical characterization and antibacterial properties of fish skin mucus of fresh water fish, *Hypophthalmichthys nobilis*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(6), 132–136.
- Vandepitte J., J. Verhaegen, Engbaek K., World Health Organization, Piot P., Heuck C.C., Rohner P., C. C. H. (2003). *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*. Retrieved from https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=UHY0DgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=vandepitte+2003&ots=dCbgKwj8DA&sig=zXxxQFCFThLiXpc9Ail5mCRa8WA&redir_esc=y#v=onepage&q=vandepitte+2003&f=false

ANEXOS

Quantificação de biomassa

- Análise glicosídica
 - Extratos de peixe

	Extrato bruto (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato aquoso (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato ácido (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato orgânico (mg/mL)	Biomassa (mg)
2	0,57	0,0057	0,17	0,0017	0,03	0,0003	0,04	0,0004
3	0,08	0,0008	0,04	0,0004	0,08	0,0008	0,03	0,0003
4	0,15	0,0015	0,04	0,0004	0,02	0,0002	0,02	0,0002
5	0,32	0,0032	0,10	0,0010	0,09	0,0009	0,07	0,0007
6	0,65	0,0065	0,36	0,0036	0,11	0,0011	0,02	0,0002
7	0,66	0,0066	0,25	0,0025	0,19	0,0019	0,16	0,0016
9	0,24	0,0024	0,38	0,0038	0,24	0,0024	0,09	0,0009

- Extratos de sêmea de arroz

	Extrato com hexano (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato com água (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato com etanol (mg/mL)	Biomassa (mg)
1C	0	0	1,48	0,0148	1,32	0,0132
2C	0	0	6,32	0,0632	1,58	0,0158
3C	0	0	4,92	0,0492	1,26	0,0126
1A	0	0	4,56	0,0456	2,17	0,0217
2A	0	0	3,49	0,0349	0,69	0,0069
3A	0	0	2,81	0,0281	1,11	0,0111

- Análise Lipídica

- Extratos de peixe

	Extrato bruto (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato aquoso (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato ácido (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato orgânico (mg/mL)	Biomassa (mg)
2	0,038	0,00038	0,17	0,0017	0,03	0,0003	0,04	0,0004
3	0,019	0,00019	0,04	0,0004	0,08	0,0008	0,03	0,0003
4	0,024	0,00024	0,04	0,0004	0,02	0,0002	0,02	0,0002
5	0,020	0,00020	0,10	0,0010	0,09	0,0009	0,07	0,0007
6	0,048	0,00048	0,36	0,0036	0,11	0,0011	0,02	0,0002
7	0,021	0,00021	0,25	0,0025	0,19	0,0019	0,16	0,0016
9	0,037	0,00037	0,38	0,0038	0,24	0,0024	0,09	0,0009

- Extratos de sêmea de arroz

	Extrato com hexano (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato com água (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato com etanol (mg/mL)	Biomassa (mg)
<i>1C</i>	37,09	0,371	0,19	0,0019	8,52	0,0852
<i>2C</i>	40,31	0,403	1,11	0,0111	7,29	0,0729
<i>3C</i>	47,05	0,471	1,14	0,0114	9,03	0,0903
<i>1A</i>	21,87	0,219	1,63	0,0163	7,48	0,0748
<i>2A</i>	22,79	0,228	1,80	0,0180	9,01	0,0901
<i>3A</i>	28,07	0,281	3,99	0,0399	12,54	0,125

- Análise Proteica

- Extratos de peixe

	Extrato bruto (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato aquoso (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato ácido (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato orgânico (mg/mL)	Biomassa (mg)
2	13,16	0,1316	1,388	0,01388	0,427	0,00427	0,154	0,00154
3	2,63	0,0263	0,651	0,00651	0,375	0,00375	0,030	0,00030
4	0,35	0,0035	0,297	0,00297	0,024	0,00024	0,066	0,00066
5	1,95	0,0195	0,468	0,00468	0,256	0,00256	0,045	0,00045
6	2,24	0,0224	0,561	0,00561	0,074	0,00074	0,036	0,00036
7	0,39	0,0039	0,278	0,00278	0,029	0,00029	0,164	0,00164
9	4,12	0,0412	2,605	0,02605	0,086	0,00086	1,629	0,01629

- Extratos de sêmea de arroz

	Extrato com hexano (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato com água (mg/mL)	Biomassa (mg)	Extrato com etanol (mg/mL)	Biomassa (mg)
1C	0	0	0,295	0,00295	0,463	0,00463
2C	0	0	0,186	0,00186	0,353	0,00353
3C	0	0	0,293	0,00293	0,318	0,00318
1A	0	0	0,532	0,00532	0,485	0,00485
2A	0	0	0,398	0,00398	0,366	0,00366
3A	0	0	0,307	0,00307	0,458	0,00458