



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Produção, Isolamento e Caracterização de Compostos Bioativos da Microalga Vermelha *Porphyridium cruentum*

CAROLINA LEAL CINTRA

(Licenciada em Ciências da Engenharia Química)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientador (es):

Professora Doutora Magda Sofia Soares C. C. Nobre
Semedo (ISEL/IPL)

Professora Doutora Sónia Martins (ISEL/IPL)

Doutora Maria Helena Sequeira Cardoso (Allmicroalgae)

Júri:

Presidente:

Professor Doutor Nelson Alberto Frade da Silva (ISEL/IPL)

Vogais:

Professora Doutora Ana Leite Oliveira (ESB/UCP)

Professora Doutora Ana Maria G.H. Barreiros Joanaz de
Melo (ISEL/IPL)

Professora Doutora Magda Sofia Soares C. C. Nobre
Semedo (ISEL/IPL)

30 setembro 2022



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Produção, Isolamento e Caracterização de Compostos Bioativos da Microalga Vermelha *Porphyridium cruentum*

CAROLINA LEAL CINTRA

(Licenciada em Ciências da Engenharia Química)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientador (es):

Professora Doutora Magda Sofia Soares C. C. Nobre
Semedo (ISEL/IPL)

Professora Doutora Sónia Martins (ISEL/IPL)

Doutora Maria Helena Sequeira Cardoso (Allmicroalgae)

Júri:

Presidente:

Professor Doutor Nelson Alberto Frade da Silva (ISEL/IPL)

Vogais:

Professora Doutora Ana Leite Oliveira (ESB/UCP)

Professora Doutora Ana Maria G.H. Barreiros Joanaz de
Melo (ISEL/IPL)

Professora Doutora Magda Sofia Soares C. C. Nobre
Semedo (ISEL/IPL)

30 setembro 2023

Agradecimentos

A realização desta dissertação contou com importantes apoios e incentivos, aos quais quero deixar um agradecimento especial.

O primeiro agradecimento é para as minhas orientadoras, Professora Doutora Magda Semedo e Professora Doutora Sónia Martins, por todo o conhecimento transmitido, por toda a dedicação e trabalho que tiveram comigo, mas acima de tudo pela motivação que me deram, pelo apoio e pela disponibilidade demonstrada. Sem elas, este trabalho não seria possível e muito lhes devo pela oportunidade e ajuda ao longo destes meses. Também na qualidade de orientadora, gostaria de agradecer à Doutora Maria Helena Cardoso por toda a aprendizagem, disponibilidade, apoio e amizade durante e após o estágio na Allmicroalgae.

À Doutora Joana Laranjeira da Silva, pela oportunidade de estágio na Allmicroalgae. Aos meus colegas de estágio e a toda a equipa da UID da Allmicroalgae, Diana Cátia, Ana, Gonçalo, Inês e Pedro, não só por toda a aprendizagem, ajuda e apoio, mas também por me receberem tão bem, pela amizade e boa disposição que transmitiam diariamente.

À Professora Doutora Ana Sofia Figueiredo, pelos desafios lançados, pelo tempo que passou comigo no Laboratório de Ambiente e pela disponibilidade e dedicação demonstrada ao longo de todo o trabalho. À Professora Doutora Patrícia Barata e à Professora Doutora Alexandra Costa por toda a disponibilidade, tanto no Laboratório de Química Orgânica, como nas idas ao IST, por todo o apoio, ajuda, empenho e boa disposição com que me recebiam sempre.

Ao Laboratório de Biotecnologia, ao Centro de Investigação de Engenharia Química e Biológica e ao Laboratório de Química Orgânica pela possibilidade de realizar ensaios necessários à elaboração do trabalho.

Ao IPL pelo apoio e financiamento do projeto IPL/2021/MiRedB-Act_ISEL.

Aos meus amigos de mestrado e companhia de muitas horas no laboratório, Sara Olímpia e Bruno, pela amizade, apoio, encorajamento e bons momentos que me proporcionaram. À Catarina por todas as horas de estudo e de laboratório, mas principalmente pela amizade, pela alegria, pela ajuda, pelo apoio, por todos os momentos que passámos juntas, dentro e fora do ISEL, por manter a minha calma e por sermos a melhor parilha.

Aos meus amigos da Marinha Grande e de Coimbra, destacando os “Maracujás”, os “Amores”, “Indi” e “MACC”, que mesmo só me vendo aos fins de semana, estiveram presentes comigo todos os dias, à distância de uma notificação no Whatsapp ou de uma chamada, nem que fosse para perguntar se as minhas algas estavam vivas.

Ao João Eduardo, por toda a motivação, incentivo, encorajamento, compreensão, mas principalmente pelo carinho, companhia, disponibilidade e por estar sempre ao meu lado, nos melhores e piores momentos.

Por fim, quero deixar um agradecimento muito especial à minha família, principalmente ao meu pai, à minha mãe e ao meu irmão. Por me terem dado esta oportunidade, mas muito mais que isso, por estarem sempre comigo, mesmo nos piores momentos, pela paciência, compreensão, apoio, incentivo, por acreditarem em mim (muitas vezes mais que eu) e por me ajudarem a ultrapassar todas as dificuldades que senti até chegar aqui. Sem eles, todo este percurso não seria possível.

Resumo

As microalgas são reconhecidas como fonte de compostos bioativos de alto valor acrescentado, que possuem uma ampla gama de aplicações. *Porphyridium cruentum* é uma microalga vermelha que possui uma gama de constituintes intracelulares e extracelulares interessantes, como polissacáridos, ficobiliproteínas e ácidos gordos polinsaturados.

A biomassa de *P. cruentum* foi produzida sob duas condições diferentes de concentração de NO_3^- , MN (6mM) e HN (18 mM) em diferentes escalas de produção: laboratorial e em fotobiorreatores *flat panel* (FBR FP), tendo sido recolhida no início da fase estacionária de crescimento.

A biomassa produzida em FBR FP foi separada do meio de cultura através de ultrafiltração (UF) utilizando uma membrana polimérica de acetato de celulose (AC) de 139 kDa. A partir do meio de cultura recuperado, os polissacáridos extracelulares foram fraccionados também por UF através de duas membranas de AC com limite de exclusão molecular de 10 kDa e 4 kDa.

De forma a avaliar a produção de compostos intracelulares nas diferentes condições de crescimento foram realizados dois métodos de extração: extração convencional em multi-etapas (ME) e extração assistida por micro-ondas (MAE). Os extratos resultantes foram avaliados quanto ao conteúdo em biomoléculas e propriedades antioxidantes.

A biomassa produzida à escala laboratorial apresentou o maior conteúdo em biomoléculas intracelulares, sendo possível alcançar $1270,230 \pm 105,960$ mg de polissacáridos neutros/g biomassa, $81,263 \pm 2,656$ mg de polissacáridos sulfatados/g biomassa e $36,858 \pm 0,702$ mg de proteína total/g biomassa, obtido por ME. Já a biomassa produzida em FBR FP apresentou o maior conteúdo em compostos fenólicos totais e flavonóides totais, alcançando $8,665 \pm 0,181$ mg GAE/g biomassa e $51,782 \pm 2,315$ mg CE/g biomassa, respetivamente, obtido por MAE utilizando KOH 0,1 M como solvente. O extrato FHCl proveniente da ME realizada a MN1 foi ainda sujeito a fracionamento por cromatografia de troca iónica.

De forma a identificar diferenças estruturais nos extratos, caracterizar parcialmente biomoléculas detetadas e avaliar as propriedades fotofísicas foram aplicadas as técnicas espectroscópicas, FTIR e espectroscopia de fluorescência, respetivamente.

Palavras-Chave: Microalgas vermelhas; *Porphyridium cruentum*; ultrafiltração; compostos bioativos; propriedades antioxidantes.

Abstract

Microalgae are recognized as a source of high added value bioactive compounds, which have a wide range of applications. *Porphyridium cruentum* is a red microalga that has a range of interesting intracellular and extracellular constituents such as polysaccharides, phycobiliproteins and polyunsaturated fatty acids.

P. cruentum biomass was produced under two different conditions of NO_3^- , MN (6mM) and HN (18mM) at different production scales: laboratory and in flat panel photobioreactors (FBR FP), having harvested at the beginning of the stationary phase.

The biomass produced in FBR FP was separated from the culture medium by ultrafiltration (UF) using a polymeric membrane of cellulose acetate (CA) with a MWCO of 139 kDa. From the recovered culture medium, extracellular polysaccharides were also fractionated by UF through two AC membranes with molecular exclusion limits of 10 kDa and 4 kDa.

To evaluate the production of intracellular compounds under different growth conditions, two extraction methods were performed: conventional multi-step extraction (ME) and microwave-assisted extraction (MAE). The resulting extracts were evaluated for biomolecule content and antioxidant properties.

Biomass produced on a laboratory scale showed the highest content of intracellular biomolecules, reaching $1270,230 \pm 59,105,960$ mg of neutral polysaccharides/g biomass, $81,263 \pm 2,656$ mg of sulfated polysaccharides/g biomass and $36,858 \pm 0,702$ mg of total protein/g biomass, obtained by ME. The biomass produced in FBR FP had the highest content of total phenolic compounds and total flavonoids, reaching $8,665 \pm 0,181$ mg GAE/g biomass and $51,782 \pm 2,315$ mg CE/g biomass, respectively, obtained by MAE using 0,1 M KOH as solvent. The FHCi extract from the ME performed on MN1 was further subjected to fractionation by ion exchange chromatography.

To identify structural differences in the extracts, partially characterize detected biomolecules and evaluate the photophysical properties, spectroscopic techniques were applied, FTIR and fluorescence spectroscopy, respectively.

Key Words: Red microalgae; *Porphyridium cruentum*; ultrafiltration; bioactive compounds; antioxidant properties.

Divulgação Científica

Do trabalho final de mestrado, resultaram as seguintes comunicações em conferência:

- C. Cintra, M. H. Cardoso, A. S. Figueiredo, P. D. Barata, M. C. Semedo, S. Martins “Produção, Isolamento e Caracterização de Compostos Bioativos da Microalga Vermelha *Porphyridium cruentum*”, iFEQB2022 (8ª Edição), 10-12 de maio de 2022, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Carolina Cintra, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Maria Helena Cardoso, Joana L. Silva, “Produção da Microalga Vermelha *Porphyridium cruentum* para a Obtenção Compostos Bioativos”, Encontro Ciência’22, 16-18 de maio de 2022, Centro de Congressos de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- C. Cintra, M.C. Semedo, S. Martins, P.D. Barata, A.S. Figueiredo, M.H. Cardoso, J.L. Silva, “Production and Isolation of Extracellular Bioactive Compounds from the Red Microalgae *Porphyridium cruentum*”, 5th International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering (GreenCHEM-22), 20-22 July 2022, Università degli Studi Niccolò Cusano, Rome, Italy.
- C. Cintra, M.C. Semedo, S. Martins, P.D. Barata, A.I. Costa, M.H. Cardoso, J.L. Silva, “Production and Extraction Strategies for High-Value Bioactive Compounds from *Porphyridium cruentum*”, 5th International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering (GreenCHEM-22), 20-22 July 2022, Università degli Studi Niccolò Cusano, Rome, Italy.
- C. Cintra, S. Martins, M.C. Semedo, P.D. Barata, A.I. Costa, A.S. Figueiredo, H. Cardoso, “Functional Properties of Bioactive Compounds from *Porphyridium cruentum* and their Application in Food Industry”. I International Meeting Molecules4Life, 20-22 setembro 2023, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Índice

Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Abreviaturas e Siglas	xix
1. Introdução.....	3
1.1. Microalgas.....	3
1.1.1. Microalgas Vermelhas.....	6
1.1.2. <i>Porphyridium cruentum</i>	7
1.2. Compostos Bioativos.....	8
1.2.1. Polissacáridos.....	8
1.2.2. Ficobiliproteínas (PBPs).....	10
1.2.3. Ácidos gordos polinsaturados (PUFAs).....	11
1.3. Extração e Purificação de Compostos Bioativos.....	12
1.3.1. Processos de Separação por Membranas	13
1.3.2. Extração por Métodos Convencionais.....	14
1.3.3. Extração por Métodos Não Convencionais	15
1.3.4. Purificação de Compostos Bioativos	15
1.4. Doseamento de Compostos Bioativos.....	16
1.5. Atividade Antioxidante	21
1.6. Técnicas de Caracterização Estrutural de Compostos Bioativos	24
1.6.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	25
1.6.2. Espectroscopia de Fluorescência	26
2. Enquadramento	29
3. Materiais e Métodos.....	33
3.1. Reagentes.....	33
3.2. Material Biológico	33
3.3. Métodos	33
3.3.1. Cultivo e Manutenção das Culturas.....	33
3.3.2. Separação da Biomassa do Meio de Cultura por Centrifugação	34

3.3.3. Preparação e Caracterização da Membrana de Ultrafiltração	34
3.3.4. Separação da Biomassa do Meio de Cultura por Ultrafiltração	38
3.3.5. Fracionamento dos Exopolissacáridos por Ultrafiltração	39
3.3.6. Isolamento de Compostos Bioativos Extracelulares	40
3.3.7. Extração de Compostos Bioativos Intracelulares	41
3.3.8. Doseamento de Biomoléculas.....	43
3.3.9. Determinação da Atividade Antioxidante.....	46
3.3.10. Fracionamento de Biomoléculas Intracelulares por Cromatografia de Troca Iónica.....	48
3.3.11. Técnicas Espectroscópicas para Caracterização Estrutural.....	48
4. Resultados e Discussão.....	53
4.1. Controlo e Manutenção das Culturas de <i>Porphyridium cruentum</i>	53
4.2. Processo de Separação por Membranas.....	55
4.2.1. Caracterização da Membrana de 139 kDa	55
4.2.2. Separação da Biomassa do Meio de Cultura	57
4.2.3. Fracionamento dos Exopolissacáridos.....	60
4.3. Quantificação de Biomoléculas Extracelulares	63
4.3.1. Biomoléculas Extracelulares Produzidas à Escala Laboratorial	63
4.3.2. Biomoléculas Extracelulares Produzidas em Fotobiorreatores <i>Flat Panel</i> ..	66
4.4. Quantificação de Biomoléculas Intracelulares	73
4.4.1. Biomassa de <i>P. cruentum</i> Produzida à Escala Laboratorial	74
4.4.2. Biomassa de <i>P. cruentum</i> Produzida em Fotobiorreatores <i>Flat Panel</i>	82
4.4.3. Comparação dos Teores de Biomoléculas Intracelulares Produzidas à Escala Laboratorial com as Produzidas em Fotobiorreatores <i>Flat Panel</i>	85
4.5. Propriedades Antioxidantes.....	87
4.5.1. Biomoléculas Extracelulares	87
4.5.2. Biomoléculas Intracelulares	88
4.5.3. Comparação das Propriedades Antioxidantes da Biomassa Produzidas à Escala Laboratorial e em Fotobiorreatores <i>Flat Panel</i>	93

4.6. Fracionamento de Biomoléculas Intracelulares por Cromatografia de Troca Iônica	95
4.7. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	97
4.9. Espectroscopia de Fluorescência.....	100
Conclusões e Perspetivas Futuras.....	105
Referências Bibliográficas	111
Anexos	129
Anexo I: Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	129
Anexo II: Amostra utilizada na Espectroscopia de Fluorescência.....	129

Índice de Figuras

Figura 1 – Raceway (A) e thin layer cascade (B) da Allmicroalgae.....	4
Figura 2 - Fotobiorreatores em coluna vertical (A) , tubular (B) e flat panel (C) da Allmicroalgae.....	5
Figura 3 - Cultura de células de <i>Porphyridium cruentum</i> ao microscópio ótico (adaptado) [20].	7
Figura 4 - Estrutura química do amido florideano [26].	9
Figura 5 - Estruturas químicas da xilose (A) , galactose (B) , glucose (C) e do ácido glucurónico (D) (adaptado) [28].	9
Figura 6 - Estruturas químicas de polissacáridos sulfatados: carragenano (A) , fucano (B) e ulvano (C) [30].	10
Figura 7 – Reação química da glucose no método fenol-ácido sulfúrico [77].	18
Figura 8 - Estrutura química do azul de toluidina [85].	19
Figura 9 - Estrutura química do corante Congo red [87].	19
Figura 10 - Estrutura do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 [90].	20
Figura 11 - Estruturas moleculares do ácido ascórbico, glutationa, tocoferóis e compostos fenólicos (adaptado) [99].	22
Figura 12 - Reação química do radical ABTS com um composto antioxidante (adaptado) [106].	23
Figura 13 - Reação química do radical DPPH com um composto antioxidante (adaptado) [106].	24
Figura 14 - Banho de coagulação para formação das membranas.	35
Figura 15 - Instalação de membranas de ultrafiltração.	36
Figura 16 - Diagrama do processo de ultrafiltração aplicado aos FBR FP MN1, MN2 e HN3 (A) e aos FBR FP MN3, HN1 e HN2 (B)	39
Figura 17 - Esquema ilustrativo do método de extração convencional multi-etapas, fracionado em 5 etapas, com água fria e em ebulição, seguido de condições ácidas e alcalinas.	42
Figura 18 - Crescimento das culturas de <i>P. cruentum</i> em autotrofia em modo descontínuo, à escala laboratorial (A) e em FBR FP (B)	53
Figura 19 - Curvas de crescimento das culturas de <i>P. cruentum</i> à escala laboratorial (IA) e em fotobiorreatores flat panel (IIA) sob as diferentes concentrações de nitratos (IB e IIB)	54
Figura 20 - Observação ao microscópio ótico de uma cultura de <i>Porphyridium cruentum</i> (630x).	55

Figura 21 - Representação linear do fluxo de permeação à água pura em função da pressão transmembranar aplicada.....	56
Figura 22 - Determinação do MWCO da membrana de acetato de celulose, 139 kDa.	56
Figura 23 - Separação da biomassa do meio de cultura proveniente dos fotobiorreatores <i>flat panel</i> (A); retentado (B) e permeado (C) após o processo de ultrafiltração.....	57
Figura 24 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado e do retentado (B) para a cultura MN1.	57
Figura 25 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado e do retentado (B) para a cultura MN2.	58
Figura 26 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado e do retentado (B) para a cultura MN3.	58
Figura 27 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado (B) para a cultura HN1.	58
Figura 28 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado e do retentado (B) para a cultura HN2.....	58
Figura 29 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado (B) para a cultura HN3.	59
Figura 30 - Fluxo dos permeados das membranas de 10 kDa e 4 kDa para a cultura MN1 (A), MN2 (B) e HN3 (C).....	61
Figura 31 - Efeito das condições de crescimento de <i>P. cruentum</i> , 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO ₃ ⁻ , na produção de polissacáridos extracelulares neutros, ácidos, sulfatados e proteína extracelular total, quantificados diretamente no meio de cultura e após precipitação com etanol a 90% (V/V) e dissolução em NaOH 1M.	64
Figura 32 - Polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados separados por ultrafiltração e quantificados na alimentação, nos permeados, no sobrenadante, no retentado e na camada de gel, provenientes dos meios de crescimento FBR FP MN1 (A), MN2 (B) e HN3 (C).	67
Figura 33 - Proteína total doseada nas frações recolhidas, durante 20 minutos do permeado 1, provenientes do meio de crescimento FBR FP MN3.....	68
Figura 34 - Polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados quantificados na alimentação, permeados 2, sobrenadante e retentados 2, provenientes do meio de crescimento FBR FP MN3.....	69
Figura 35 – Polissacáridos neutros e proteína total presentes no permeado 1, ao longo do tempo de permeação, para o meio de crescimento FBR FP HN1.	70

Figura 36 - Polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados quantificados na alimentação, permeados 2, sobrenadante e retentados 2 no FBR FP HN1.	70
Figura 37 - Polissacáridos neutros no permeado 1, ao longo do tempo de permeação, para o FBR FP HN2.	71
Figura 38 - Polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados quantificados na alimentação, permeados 2, sobrenadante e retentados 2 no FBR FP HN2.	71
Figura 39 - Efeito das condições de crescimento de <i>P. cruentum</i> , 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO ₃ ⁻ , na produção de polissacáridos neutros (A), polissacáridos ácidos (B), polissacáridos sulfatados (C) e proteína total (D), extraídos por ME.	74
Figura 40 - Efeito das condições de crescimento de <i>P. cruentum</i> , 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO ₃ ⁻ , na produção das ficobiliproteínas: ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C), extraídas por ME.	76
Figura 41 - Espectro de UV-Vis dos extratos obtidos por multi-etapas (MN1 como exemplo) (A) e publicado na literatura (B) [137].	77
Figura 42 - Efeito das condições de crescimento de <i>P. cruentum</i> , 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO ₃ ⁻ , na produção de polissacáridos neutros, ácidos, sulfatados e proteínas extraídos por MAE EtOH, 150 °C, 15 min (A) e MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min (B).	78
Figura 43 - Efeito das condições de crescimento de <i>P. cruentum</i> , 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO ₃ ⁻ , na produção de ficobiliproteínas, extraídas por MAE: EtOH, 150 °C, 15 min (A) e KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min (B).	79
Figura 44 - Efeito das condições de crescimento de <i>P. cruentum</i> , 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO ₃ ⁻ , na produção de lípidos, extraídos por MAE EtOH, 150 °C, 15 min.	80
Figura 45 - Efeito das condições de crescimento de <i>P. cruentum</i> , 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO ₃ ⁻ , na produção de polissacáridos neutros, ácidos, sulfatados e proteínas extraídos por MAE a 120°C durante 30 min, utilizando como solvente KOH 0,1 M (A) e HCl 0,1 M (B).	83
Figura 46 - Efeito das condições de crescimento de <i>P. cruentum</i> , 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO ₃ ⁻ , na produção de ficobiliproteínas extraídos por MAE a 120°C durante 30 min, utilizando como solvente KOH 0,1 M (A) e HCl 0,1 M (B).	84
Figura 47 - Compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante, quantificados diretamente no meio de crescimento após precipitação com álcool e dissolução em NaOH 1M.	88
Figura 48 - Influência dos parâmetros de crescimento na produção de compostos fenólicos totais (A) e flavonóides totais (B) extraídos por ME.	89

Figura 49 - Influência dos parâmetros de crescimento na produção de compostos fenólicos totais e flavonóides totais extraídos por MAE (A) EtOH, 150 °C, 15 min (B) KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min.....	89
Figura 50 - Atividade antioxidante determinada pelo método do radical ABTS nos extratos obtidos por ME (A) e MAE EtOH, 15 min, 150 °C (B)	90
Figura 51 - Compostos fenólicos totais e flavonóides totais extraídos por MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min (A) e MAE HCl 0,1 M, 120 °C, 30 min (B)	92
Figura 52 - Atividade antioxidante dos extratos obtidos por MAE a 120 °C durante 30 min, em KOH 0,1 M e em HCl 0,1 M.....	93
Figura 53 - Cromatograma da fração FHCl obtida por ME a partir da biomassa MN1 produzida à escala laboratorial, aplicado em coluna contendo a resina DEAE-52. Sistema eluente 0-53 (a): gradiente de NaCl 1M; 54-56 (b): NaCl 1 M; 57-60 (c): NaCl 2M.	96
Figura 54 - Espectros de FTIR da biomassa inicial MN1 e HN1 produzida à escala laboratorial e em FBR FP, após liofilização (A) , ao extrato de MAE utilizando KOH 0,1 M como solvente realizado à biomassa MN1 e HN1 produzida à escala laboratorial e em FBR FP (B) , da camada gel obtida no processo de ultrafiltração (MWCO 139 kDa), permeado 2 e 3 e retentado 2 do FBR FP MN1 (C) e extrato selecionado para a cromatografia de troca iônica (ME FHCl MN1) e mistura das frações 6, 7, 8 e 9 (D) , em pastilhas de KBr. (Continua na página seguinte).	98
Figura 55 - Espectro de UV-Vis (vermelho), excitação (azul, monitorizado a 575 nm) e emissão (verde, $\lambda_{exc} = 550$ nm), em água.	101
Figura 56 - Espectros de FTIR da biomassa inicial produzida à escala laboratorial, após liofilização, em pastilhas de KBr.	129
Figura 57 - Extrato proveniente da fração aquosa FW1 da extração convencional em multi-etapas com iluminação natural (A) e sob lâmpada UV (366 nm) (B)	129

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Condições de precipitação dos compostos bioativos extracelulares.	40
Tabela 2 - Parâmetros da extração assistida por micro-ondas.	43
Tabela 3 - Fator de concentração e rejeição à turbidimetria no final do processo de separação da biomassa do meio de cultura, para cada FBR FP.	60
Tabela 4 - Fator de concentração e rejeição à turbidimetria no final de fracionamento dos exopolissacáridos.	61
Tabela 5 - Fluxo volumétrico dos permeados de cada fração para cada cultura.	62
Tabela 6 - Rejeição à turbidimetria no final de fracionamento dos exopolissacáridos.	63
Tabela 7 - Concentração de EPS presente em cada FBR FP.	72
Tabela 8 - Comparação dos métodos de extração, ME, MAE EtOH (150 °C, 15 min) e MAE KOH 0,1 M (120 °C, 30 min).	81
Tabela 9 - Comparação dos teores em biomoléculas intracelulares produzidas à escala laboratorial (MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min) e em FBR FP, após extração MAE.	85
Tabela 10 - Doseamento dos compostos fenólicos e flavonoides totais e actividade antioxidante, nos extratos obtidos por ME, MAE (EtOH; 150 °C, 15 min) e MAE (KOH 0,1 M; 120 °C, 30 min).	91
Tabela 11 - Comparação das propriedades antioxidantes dos extratos obtidos por MAE (EtOH, 150 °C, 15 min e KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min) a partir da biomassa produzida à escala laboratorial; e por MAE (KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min e HCl 0,1 M, 120 °C, 30 min) a partir da biomassa produzida em FBR FP.	94

Abreviaturas e Siglas

A

Abs _{cd0}	Valor de absorvância a determinado comprimento de onda
ABTS	Ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
APC	Alofocianina
ARA	Ácido araquidônico

B

BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
B-PE	B-ficoeritrina
BPS	Polissacáridos ligados
BSA	Albumina de soro bovino

C

CE	Equivalentes de catequina
C _F	Concentração de solutos na alimentação
C _P	Concentração de solutos no permeado
C-PC	C-ficocianina
C-PE	C-ficoeritrina

D

DO	Densidade ótica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

E

EPA	Ácido eicosapentanóico
EPS	Polissacáridos extracelulares
<i>Et al.</i>	<i>Et alia</i> (origem do latim, referência a outros)

F

FBR	Fotobiorreator
FBR FP	Fotobiorreator <i>flat panel</i>
FHCI	Fração da extração convencional por multi-etapas com solução aquosa de ácido clorídrico 0,6M
FKOH	Fração da extração convencional por multi-etapas com solução aquosa de hidróxido de potássio 1M
FNaOH	Fração da extração convencional por multi-etapas com solução aquosa de hidróxido de sódio 1M
FTIR	Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
FW1	Fração da extração convencional por multi-etapas com água à temperatura ambiente
FW2	Fração da extração convencional por multi-etapas com água a 100 °C

G

GAE	Equivalentes de ácido gálico
-----	------------------------------

GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

H

HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i>
HN	Alto fornecimento de nitratos (18 mM de NO ₃ ⁻)
HPAEC	Cromatografia de troca iônica de alta eficiência
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPTLC	Cromatografia em camada fina de alta eficiência

J

J _p	Fluxo de permeado
----------------	-------------------

L

LC-PUFAs	Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa
L _p	Permeabilidade hidráulica

M

MAE	Extração assistida por micro-ondas
ME	Extração convencional em multi-etapas
MN	Médio fornecimento de nitratos (6 mM de NO ₃ ⁻)
MNB	Meio nutritivo base
MNS	Meio nutritivo salgado
MS	Espectrometria de massa
MWCO	Limite de exclusão molecular

N

n.d.	Não detetado
------	--------------

P

P2, F1	Permeado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 1
P2, F5	Permeado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 5
P2, F10	Permeado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 10
P2, F15	Permeado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 15
P2, F20	Permeado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 20
PACE	Análise de polissacáridos por eletroforese em gel
PBPs	Ficobiliproteínas
PBS	Tampão fosfatos salino
PBSs	Ficobilissomas
PC	Ficocianina
PE	Ficoeritrina
PEC	Ficoeritrocianinas

PEG	Polietilenoglicol
PUFAs	Ácidos gordos polinsaturados
PV	Reagente de fosfovanilina
ΔP	Pressão transmembranar aplicada

R

R2, F1	Retentado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 1
R2, F5	Retentado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 5
R2, F10	Retentado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 10
R2, F15	Retentado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 15
R2, F20	Retentado após fracionamento dos exopolissacáridos (MWCO 10 kDa), fração 20
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigénio
R-PC	R-ficocianina
R-PCII	R-ficocianina II
R-PE	R-ficoeritrina
RPS	Polissacáridos libertados

S

SET	<i>Single Electron Transfer</i>
sPS	Polissacáridos sulfatados extracelulares

T

TE	Equivalentes de Trolox
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TOC	Carbono orgânico total
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

U

u.a.	Unidades arbitrárias
UF	Ultrafiltração
UID	Unidade de Investigação e Desenvolvimento
UV-Vis	Ultravioleta-visível

Capítulo 1

Introdução

1.1. Microalgas	3
1.2. Compostos Bioativos	8
1.3. Extração e Purificação de Compostos Bioativos	12
1.4. Doseamento de Compostos Bioativos	16
1.5. Atividade Antioxidante	21
1.6. Técnicas de Caracterização Estrutural de Compostos Bioativos	24

1. Introdução

As microalgas são uma fonte rica de nutrientes e compostos bioativos com diferentes atividades biológicas, como proteínas, entre as quais enzimas, lípidos, vitaminas, pigmentos, compostos antioxidantes, entre outros. O interesse por microalgas surgiu do aumento da procura por biomassa sustentável para a produção de componentes bioativos com várias aplicações comerciais em diversas áreas, incluindo farmacêutica, nutracêutica, cosmecêutica, biocombustíveis, biofertilizantes, tratamento de águas residuais, alimentação e proteômica [1]–[3].

Devido à possibilidade de produzirem em excesso e acumularem determinados metabolitos sob condições específicas de crescimento, à existência de diferentes espécies e estirpes, à flexibilidade metabólica, à adaptação a diversas condições de cultivo, ao uso mínimo de solos para a sua produção, à possibilidade de crescimento rápido e alta eficiência fotossintética, o número de estudos sobre a utilização de microalgas como fonte de produtos biologicamente atrativos tem vindo a crescer rapidamente [3]–[5].

1.1. Microalgas

As microalgas são microrganismos unicelulares, multicelulares, filamentosos ou sifonáceos, existentes em sistemas de água doce e salgada, que são categorizados como eucariotas, embora as cianobactérias procariontas também sejam incluídas muitas vezes na categoria de microalgas. Atualmente existem cerca de 200000 espécies identificadas com teores de nutrientes e compostos bioativos distintos, tendo aplicação em vários setores industriais [1], [6], [7].

Do ponto de vista filogenético, as microalgas eucariotas surgiram mais tarde do que as cianobactérias e resultaram de duas etapas de endossimbiose independentes. A sua classificação taxonómica depende da estrutura celular básica, do ciclo de vida e da composição dos pigmentos. Relativamente à composição dos pigmentos, existem nove classes, sendo que os grupos principais são *Phaeophyceae* (algas castanhas), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Pyrrophyceae* (dinoflagelados), *Bacillariophyceae* (diatomáceas), *Chrysophyceae* (algas douradas) e *Rhodophyceae* (algas vermelhas) [6], [8].

Estes microrganismos são fotossintéticos, pelo que absorvem a luz solar, capturam o CO₂ do ar, absorvem elementos, como fósforo e azoto, dos *habitats* aquáticos, e produzem cerca de 50% do oxigénio atmosférico. Além disso, têm outros requisitos

como os macronutrientes (Na, Mg, Ca e K) e micronutrientes (Mo, Mn, B, Co, Fe e Zn). A maioria das microalgas são portanto fotoautótrofas, no entanto, algumas também têm a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono, podendo ser heterotróficas ou mixotróficas. As necessidades nutricionais podem variar em função da espécie de microalga e o seu crescimento está dependente ainda da temperatura, do pH, da salinidade, da intensidade da luz, do tipo de fonte de carbono, da agitação e mistura no biorreator, entre outros fatores [2], [8], [9].

No que respeita aos sistemas de cultivo em larga escala, estes incluem sistemas abertos, onde há contacto direto com o meio ambiente, e sistemas fechados, onde é inexistente esse contacto da cultura com a atmosfera [10].

Os sistemas abertos são divididos em águas naturais (lagoas e lagos) e lagoas artificiais (circulares e *raceways*, Figura 1). Para aplicação comercial, os sistemas abertos são os mais usados, uma vez que apresentam menores custos, boa troca gasosa com a atmosfera, arrefecimento por evaporação, facilidade de operar, de limpar e de aumento de escala. Contudo, existe um maior risco de contaminação, altas perdas por evaporação, requerem grandes áreas e dependem fortemente do clima [1], [11].

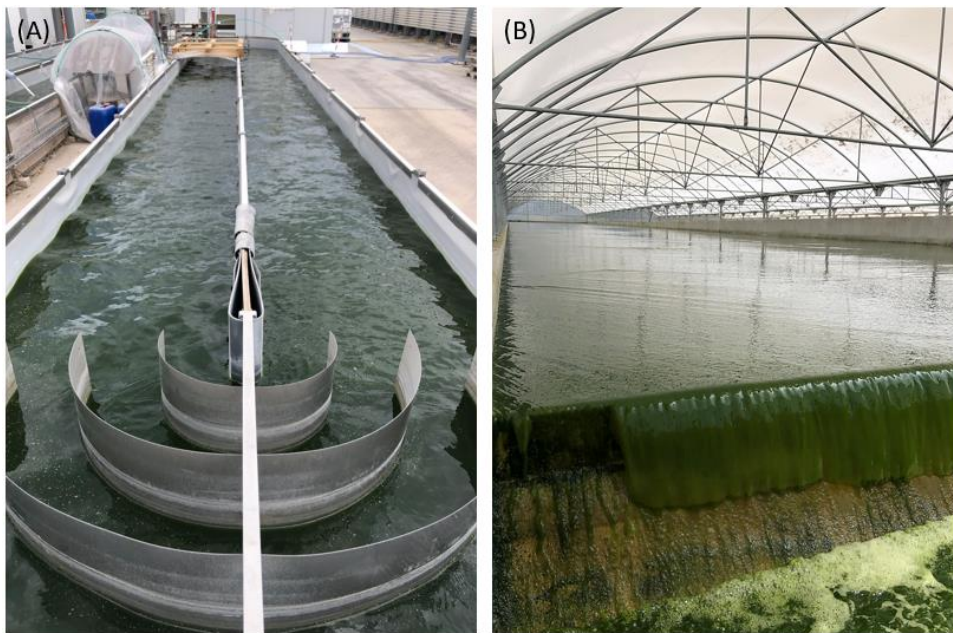


Figura 1 – Raceway (A) e thin layer cascade (B) da Allmicroalgae.

Os fotobiorreatores (FBR) de sistemas fechados são categorizados de acordo com a sua geometria em colunas verticais, tubulares ou *flat panels* (Figura 2). Os fotobiorreatores apresentam um maior controlo dos parâmetros de cultivo, alta produtividade, menor risco de contaminação, menos perdas de CO₂, quando comparados com os sistemas abertos, e podem ser utilizados para espécies de microalgas mais sensíveis. No entanto, os custos de construção e operação são maiores, requerem refrigeração na maioria dos casos e o aumento de escala é difícil [1], [11].

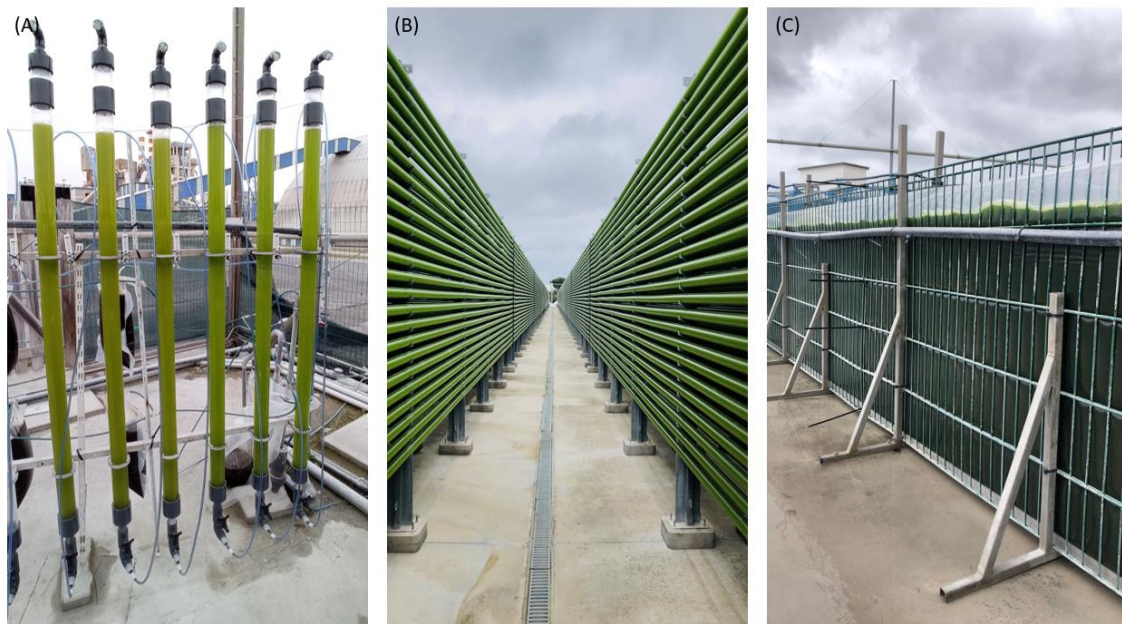


Figura 2 - Fotobiorreatores em coluna vertical (A), tubular (B) e *flat panel* (C) da Allmicroalgae.

Do metabolismo primário das microalgas podem ser obtidos compostos bioativos, como proteínas, ácidos gordos, vitaminas e pigmentos. A partir do metabolismo secundário poderão ser sintetizados compostos bioativos como aminoácidos do tipo micosporina, esteróis, cetonas e lectinas. Estes compostos podem apresentar atividades antifúngicas, antivirais, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais, entre outras. Na maioria das microalgas, os compostos bioativos são acumulados na biomassa. Contudo, em alguns casos, esses metabolitos são excretados para o meio. [12], [13].

As microalgas podem assumir a forma de agregados polimicrobianos, em vez de culturas puras de células únicas e dispersas. Os materiais que mantêm essas células juntas para formar uma matriz homogénea são excretados pelas próprias microalgas para o seu ambiente. Estas substâncias são extracelulares e poliméricas constituídas maioritariamente por polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, que afetam as propriedades físico-químicas dos agregados de microalgas. Estas EPS podem

proteger as células contra substâncias tóxicas, desidratação e *stress* e, ainda possuem propriedades antivirais e antitumorais, com aplicação clínica, e outras que permitem o seu uso em tratamento de águas residuais [14].

1.1.1. Microalgas Vermelhas

As microalgas vermelhas integram um grande grupo taxonómico de microalgas marinhas bentónicas, pertencentes aos subfilos *Cyanidiophytina* e *Rhodophytina* e são uni e pluricelulares, apresentando uma forma celular esférica ou oval [8].

Estas microalgas não possuem flagelo e duas das suas principais características são a ausência de parede celular e a presença de uma matriz de gel de espessura variável exterior à membrana citoplasmática. Esta matriz é constituída por polissacáridos (mucilagem polisacarídica), sendo uma parte desses polissacáridos excretada para o meio na forma de EPS solúveis (também conhecidos por polissacáridos libertados, RPS) e permanecendo os restantes EPS ligados à membrana citoplasmática (também designados por polissacáridos ligados, BPS). Dependendo das condições de cultura, a quantidade de EPS excretados e solubilizados no meio de cultura pode aumentar significativamente a sua viscosidade [8].

Outra característica importante deste grupo de microalgas é a presença de pigmentos, designados por ficobiliproteínas (PBPs). Estas ficobiliproteínas incluem 4 tipos de proteínas: ficoeritrina (PE) (responsável pela cor rosa/vermelha das microalgas), ficocianina (PC), aloficocianina (APC) e ficoeritrocianinas (PEC), que absorvem num intervalo de comprimentos de onda entre 490 e 650 nm, gama em que a clorofila a e os carotenoides apresentam baixos valores de absorvância. Estas ficobiliproteínas permitem a adaptação das microalgas vermelhas até a uma profundidade de 250 metros, onde apenas os fotões azuis de baixo comprimento de onda e alta energia conseguem penetrar. Uma vez que as PBPs capturam e transmitem eficientemente a energia, em particular a da luz verde-azulada presente em altas profundidades, ocorre absorção e otimização da luz para a fotossíntese. [8], [15].

Entre as microalgas exploradas à escala industrial, as microalgas vermelhas têm atraído um crescente interesse como fonte de compostos valiosos, como os polissacáridos extracelulares (EPS), ficobiliproteínas e ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) [8].

A seguir são analisadas as características da microalga vermelha *Porphyridium cruentum*, que foi objeto de estudo deste trabalho.

1.1.2. *Porphyridium cruentum*

Taxonomicamente, a microalga *Porphyridium cruentum* pertence à divisão *Rhodophyta*, classe *Bangiophyceae*, ordem *Bangiales*, família *Porphyridiaceae* e género *Porphyridium* [16].

P. cruentum é uma microalga unicelular com células esféricas de diâmetro entre 6 e 10 µm (Figura 3). Esta microalga cresce em água salina e não possui parede celular. A fonte da sua cor vermelha é a ficoeritrina, que desempenha um papel importante juntamente com outras ficobiliproteínas presentes. A *P. cruentum* também apresenta clorofila a e clorofila d, mas o pigmento vermelho sobrepõe-se à cor dos restantes pigmentos e torna-se o principal na receção da luz no processo da fotossíntese [17]–[19].

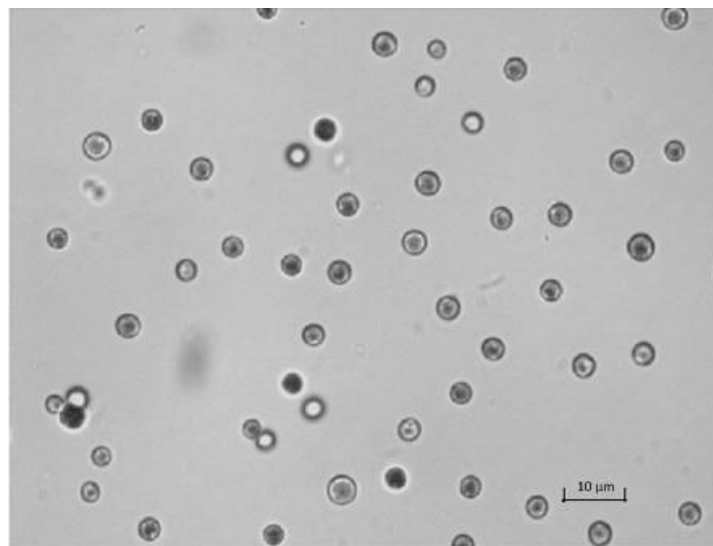


Figura 3 - Cultura de células de *Porphyridium cruentum* ao microscópio óptico (adaptado) [20].

Esta microalga vermelha apresenta uma gama interessante de constituintes de alto valor, como pigmentos carotenoides (principalmente zeaxantina), lípidos (em particular ácidos gordos polinsaturados), ficobiliproteínas (maioritariamente B-ficoeritrina), proteínas e exopolissacáridos que encapsulam as células, substituindo a parede celular, e conferindo viscosidade às culturas. A maioria desses EPS são polissacáridos sulfatados (sPS) aniónicos, compostos por ácido glucurónico e vários monossacáridos neutros importantes, como xilose, galactose e glucose. Os EPS de *P. cruentum* são dos compostos com maior interesse, devido ao facto de apresentarem atividades antioxidante, antibacteriana, antiviral, antitumoral e anti-hiperglicémica [5], [17]–[19].

Face à sua tolerância a mudanças ambientais dinâmicas, ao seu ciclo de produção relativamente curto e ao alto rendimento por unidade de área cultivada, *P. cruentum*

apresenta uma forte vantagem competitiva do ponto de vista económico e torna-se atraente para a produção sustentável de biomassa em larga escala [16], [21].

1.2. Compostos Bioativos

A diversidade evolutiva e filogenética das microalgas resultou numa grande variedade, no que respeita à sua composição química, o que faz com que sejam extremamente atrativas para a exploração de uma ampla gama de biomoléculas. Estas biomoléculas são metabolitos sintetizados por diferentes vias complexas dentro das células e a sua produção e acumulação depende de vários fatores, como condições ambientais bióticas e abióticas [22], [23].

Tal como mencionado anteriormente, os compostos bioativos produzidos pelas microalgas apresentam alto valor e são aplicáveis numa vasta gama de áreas. Inicialmente, pensava-se que as microalgas produziam três produtos, lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Contudo, nas últimas décadas, vários estudos mostraram que as microalgas são fontes de outros produtos de alto valor, tais como ácidos gordos polinsaturados, pigmentos, entre os quais ficobiliproteínas, e vitaminas, que podem ser isolados e usados em diversas indústrias [22], [24].

1.2.1. Polissacáridos

Os polissacáridos são hidratos de carbono e sendo poliméricos, consistem em cadeias longas lineares ou ramificadas de resíduos de monossacáridos ligados entre si por ligações glicosídicas. Estas macromoléculas podem ser homopolissacáridos, apresentando apenas um tipo de monossacárido, ou heteropolissacáridos, apresentando mais do que um tipo [25].

Diferentes organismos podem sintetizar polissacáridos, como bactérias, fungos, plantas terrestres, macroalgas, microalgas, entre outros. No caso das microalgas, os polissacáridos podem ser intra ou extracelulares. Relativamente aos intracelulares, acumulam-se no interior das células e são conhecidos como polissacáridos de armazenamento. Em relação aos extracelulares, estes podem permanecer ligados diretamente à membrana da célula ou podem ser libertados no meio como exopolissacáridos [25].

A espécie e as condições em que a microalga é cultivada influenciam a composição dos polissacáridos, bem como a carga (associada à presença de grupos sulfato ou de monossacáridos ácidos) e a conformação da cadeia no espaço. Por sua vez, estas propriedades afetam as funções biológicas intrínsecas, tais como, antioxidantes,

anticancerígenas, antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias ou antiparasitárias, e que potenciam a sua aplicação nos setores nutracêutico e farmacêutico [25].

Os polissacáridos intracelulares da microalga *Porphyridium cruentum* são essencialmente polissacáridos sulfatados e amido florideano. O amido florideano é um polissacárido de armazenamento encontrado no citosol e formado por resíduos de D-glucopirranose com ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4), Figura 4 [21].

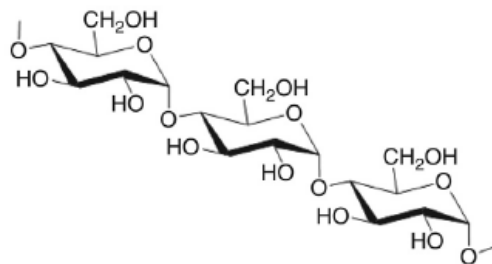


Figura 4 - Estrutura química do amido florideano [26].

Os polissacáridos extracelulares de *P. cruentum* são sintetizados no complexo de Golgi e os seus principais resíduos são de xilose, galactose, glucose, e ácido glucurónico (Figura 5). Os EPS não são tóxicos, são, geralmente, solúveis em água e uma das suas principais características é o comportamento fluidodinâmico, produzindo soluções altamente viscosas em concentrações relativamente baixas de polímero, em amplas gamas de pH e temperatura [21], [27].

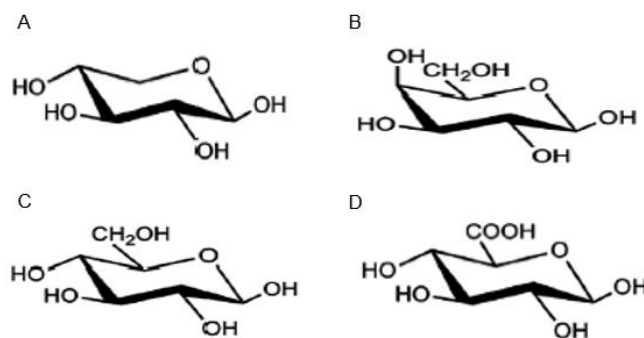


Figura 5 - Estruturas químicas da xilose (A), galactose (B), glucose (C) e do ácido glucurónico (D) (adaptado) [28].

1.2.1.1. Polissacáridos sulfatados

Os polissacáridos com alta funcionalização de sulfato são conhecidos como polissacáridos sulfatados (Figura 6). A maioria são aniônicos, devido à ligação de grupos funcionais carregados negativamente ao esqueleto central dos polímeros lineares ou ramificados [29].

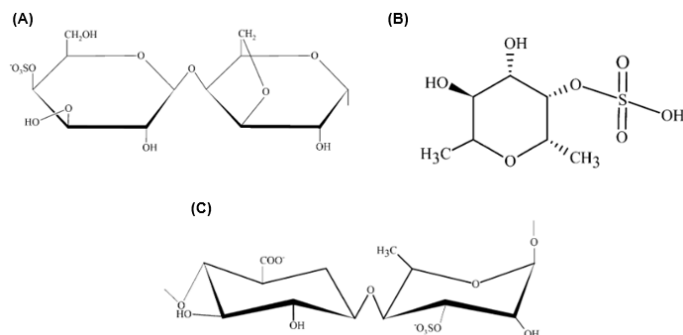


Figura 6 - Estruturas químicas de polissacáridos sulfatados: carragenano **(A)**, fucano **(B)** e ulvano **(C)** [30].

Este tipo de polissacáridos tem sido amplamente estudado devido às suas bioatividades, como por exemplo, efeitos antiviral, antitumoral, anticoagulante, anti-inflamatório, antioxidante, antiangiogênico, entre outros. A bioatividade destes compostos depende do peso molecular, do grau de sulfatação, posição do grupo sulfato, e solubilidade em água [29].

Os polissacáridos sulfatados de *P. cruentum* são muitas vezes encontrados como EPS, apresentando elevado peso molecular e carregados negativamente. A presença de uma proteína ligada covalentemente ou uma glicoproteína ligada não covalentemente é também característica dessas biomoléculas [29], [31].

Os grupos sulfatados e a presença de açúcares funcionalizados, como ácido urônico e outros ligandos (oligoelementos e proteínas), é responsável pela atividade dos EPS. Além disso, a elevada estabilidade dos EPS a mudanças ambientais e à ação de algumas enzimas, permite a sua utilização, por exemplo, como biolubrificantes, tonificantes vasculares e intensificadores de melanina [21].

1.2.2. Ficobiliproteínas (PBPs)

As ficobiliproteínas são um grupo de proteínas coloridas, que estão envolvidas na captação da luz em cianobactérias e algas vermelhas, e que possuem várias aplicações. Estas proteínas são organizadas em complexos supramoleculares, designados por ficobilissomas (PBSs), que se encontram dispostos em arranjos regulares na superfície externa dos tilacóides [15], [32].

As PBPs são moléculas estáveis, solúveis em água, constituídas por cadeias polipeptídicas conjugadas com crómoforos tetrapirróis não cíclicos e ligados covalentemente por cisteína. Nos últimos anos, as ficobiliproteínas têm atraído muitos interesses devido às suas propriedades espectrais e corantes, e em ciências terapêuticas são também exploradas as suas atividades antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, imunomoduladora, antitumoral, antioxidante, entre outras [21].

Com base no espectro de absorção de luz, existem quatro classes de ficobiliproteínas, que são: ficoeritrina (vermelho rosa, $\lambda_{\max} = 490\text{-}570$ nm), ficocianina (azul, $\lambda_{\max} = 610\text{-}625$ nm), aloficocianina (azul-verde, $\lambda_{\max} = 650\text{-}660$ nm) e ficoeritrocianina (azul-rosa, $\lambda_{\max} = 560\text{-}600$ nm). As ficoeritrinas ainda são divididas em três sub-classes principais, dependendo do seu espectro de absorção, B-ficoeritrina (B-PE), R-ficoeritrina (R-PE) e C-ficoeritrina (C-PE). Por sua vez, as ficocianinas dividem-se em C-ficocianina (C-PC), R-ficocianina (R-PC) e R-ficocianina II (R-PCII). Os prefixos B-, R- e C- caracterizaram, no início, a origem dos pigmentos, *Bangiales*, *Rhodophyceae* e *Cyanophyceae*, respetivamente. No entanto, atualmente, os prefixos não se referem à origem do pigmento, mas indicam as suas características espectrais específicas [8], [21], [33]–[35].

Em *Porphyridium cruentum*, as ficobiliproteínas são maioritariamente ficoeritrina (70%), ficocianina (20%) e aloficocianina (10%), sendo a ficoeritrina o principal produto de valor isolado desta microalga [21], [36].

1.2.3. Ácidos gordos polinsaturados (PUFAs)

Os ácidos gordos são o principal constituinte dos lípidos e podem classificar-se em saturados ou insaturados, dependendo da existência de ligações duplas. Os ácidos gordos insaturados são ainda classificados em mono e polinsaturados com base no número de insaturações. Os PUFAs são os principais constituintes estruturais da membrana celular. Entre os PUFAs, os ácidos gordos $\omega\text{-}3$ e $\omega\text{-}6$ são reconhecidos como essenciais, pois como não são produzidos pelo Homem, são requeridos pela dieta [37].

As microalgas podem acumular até 30-70% de lípidos no seu peso seco, sob certas condições. Na maioria das microalgas, os lípidos são constituídos principalmente por ácidos gordos saturados e monoinsaturados. Contudo, algumas espécies de microalgas têm a capacidade de sintetizar ácidos gordos polinsaturados [38].

Comparando com outros géneros de microalgas, *Porphyridium* tem um teor em lípidos relativamente baixo. No entanto, os seus lípidos são bastante interessantes porque compreendem ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs) [21], [39].

No caso de *Porphyridium cruentum*, o ácido araquidónico (ARA) compreende cerca de 33% e o ácido eicosapentaenóico (EPA) 17% do total de ácidos gordos [21]. O ARA pertence à família dos ω -6 e pode atuar como agente imunossupressor e anticoagulante natural, enquanto o EPA pertence à família dos ω -3 e pode ser utilizado na prevenção e tratamento da hipercolesterolemia e em casos clínicos de diabetes, distúrbios cerebrais, cancro, artrite, psoríase, Alzheimer, bem como na cicatrização de feridas [21], [39].

O teor de LC-PUFA em *P. cruentum* é altamente dependente das condições ambientais. Algumas das condições que podem aumentar a produção destes lípidos são a intensidade da luz, salinidade, temperatura, pH, concentração de oxigénio, taxa de arejamento, aditivos e níveis de azoto. Deste modo, é crucial otimizar as condições de crescimento desta microalga vermelha, para que seja possível a maximização da produção de LC-PUFAs [40].

1.3. Extração e Purificação de Compostos Bioativos

Atualmente, não há dúvida da importância da extração e caracterização de compostos bioativos de fontes naturais, devido à sua capacidade de proporcionarem vários benefícios em diversas áreas.

Representando as microalgas uma dessas novas fontes ricas em compostos bioativos, são essenciais o estudo e a caracterização das diferentes espécies de microalgas para confirmar o potencial de produção de um determinado componente bioativo. Para tal, após produção da microalga é necessária a separação da biomassa do meio de cultura, processo este que apresenta desafios, devido ao pequeno tamanho, densidade (quase semelhante à da água) e baixa concentração das microalgas no meio de cultura e a posterior purificação dos metabolitos produzidos [4], [41], [42].

A separação por centrifugação é normalmente aplicada neste contexto e para a produção em grande escala, principalmente de produtos de alto valor. Contudo, a separação em pequena escala requer uma técnica economicamente atraente. Neste sentido, a tecnologia de membranas tem-se tornado uma opção viável, uma vez que a separação celular pode ser realizada em modo descontínuo ou em sistemas contínuos com o acoplamento de membranas a reatores biológicos, dependendo da aplicação. [41]–[44].

Relativamente aos EPS solubilizados no meio existem vários métodos para a sua separação e purificação, como por exemplo a precipitação usando álcoois e a ultrafiltração. Na precipitação com álcoois, podem ser utilizados metanol, etanol e

isopropanol, tendo a polaridade do álcool e a temperatura de precipitação impacto no rendimento de polissacáridos e também na co-precipitação de impurezas. Este método tem como vantagens a possibilidade de se poder reciclar os álcoois por destilação e de poder ser utilizado também em soluções altamente viscosas. No entanto, não é muito apropriado para purificar polissacáridos de microalgas marinhas, uma vez que estes são contaminados por sais que co-precipitam com os EPS [45].

A ultrafiltração (UF) como técnica de isolamento e purificação de exopolissacáridos tem sido pouco investigada, contudo é uma tecnologia que se apresenta promissora. Este processo de separação é baseado em membranas, utilizando um gradiente de pressão transmembranar e atuando como um crivo molecular, conduzindo a uma separação de alto rendimento e ecologicamente inócua. No entanto, os EPS estão associados ao aparecimento de *fouling* das membranas devido às suas características reológicas, o que resulta numa diminuição do fluxo e aumento do custo operacional [44].

1.3.1. Processos de Separação por Membranas

A separação por membranas envolve o uso de uma barreira permeável e seletiva (membrana) entre duas fases, que restringe de forma específica a transferência de massa entre estas. Para que haja o transporte através da membrana, é necessária a aplicação de uma força motriz (gradientes de pressão, concentração, temperatura e potencial elétrico) aos componentes existentes no fluxo de alimentação. Durante o processo, a alimentação é dividida num retentado (rejeitado pela membrana) e num permeado (passa através da membrana) [41], [46].

O processo de separação por membranas apresenta baixos consumos energéticos, não requer a utilização de produtos químicos, possibilitando a recirculação do permeado, permite a seleção de membranas de forma a otimizar os fluxos de permeação e adequa-se a suspensões muito sensíveis ao cisalhamento. Contudo, é necessário controlar as condições hidrodinâmicas para limitar a colmatação e os danos celulares. O *fouling* é atribuído à acumulação e deposição de solutos ou partículas na superfície e nos poros da membrana. Com o objetivo de reduzir este fenómeno, deve ter-se em atenção ao modo de operação do processo de permeação, ou seja, operação em modo frontal ou em modo tangencial. No processo de filtração frontal, a alimentação é perpendicular à superfície da membrana, acumulando partículas à superfície da membrana e formando uma camada (bolo). No processo de filtração tangencial, a alimentação circula tangencialmente à superfície da membrana, reduzindo a acumulação de solutos, uma vez que estes são “arrastados” pelo caudal de alimentação [41]–[44], [46]–[48].

Dependendo do tamanho do poro, da pressão aplicada e, conseqüentemente, do potencial de aplicação, os processos de filtração por membranas são classificados em microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa [49].

Os processos de microfiltração e de ultrafiltração são frequentemente usados no isolamento de produtos a partir de microalgas, principalmente para separação da biomassa do meio de cultura, devido à sua alta eficiência e facilidade de uso. Neste trabalho, foi utilizado o processo de ultrafiltração para separação da biomassa do meio de cultura e para isolamento e purificação de exopolissacáridos. A ultrafiltração é caracterizada pela utilização de membranas com diâmetro de poros entre 1 e 100 nm, permitindo a separação de solutos com peso molecular entre 1 e 500 kDa [41], [42], [50].

Para a obtenção dos componentes bioativos das microalgas são necessárias várias etapas de *downstream* que incluem ruptura celular (para compostos intracelulares), extração, fracionamento, purificação e/ou conversão bioquímica e formulação final [51].

Após a separação da biomassa do meio de cultura, o passo mais crítico para aceder às biomoléculas armazenadas internamente é a lise celular. Os processos atuais consomem muita energia, são caros, envolvem etapas de extração longas e utilizam solventes orgânicos, o que pode ter implicações ambientais significativas. Além disso, existe o risco de desnaturação das biomoléculas de interesse [51], [52].

Portanto, de modo a melhorar a viabilidade econômica do processo e promover a comercialização do produto, os processos devem ser robustos, energeticamente eficientes, minimizar o impacto ambiental e manter a qualidade do produto. Assim, têm sido exploradas técnicas alternativas sustentáveis, como por exemplo extracções assistidas por micro-ondas e por ultrassons, e com fluidos supercríticos, que podem ser utilizadas para a ruptura celular [51]–[53].

1.3.2. Extração por Métodos Convencionais

Os métodos de ruptura celular podem ser classificados em mecânicos, como a moagem com esferas, ultrassons e a homogeneização de alta pressão, e não mecânicos, que podem ser divididos em térmicos, químicos ou biológicos. A maioria dos métodos para a extração das biomoléculas abrange métodos convencionais que, apesar de apresentarem vantagens, exigem longos tempos de extração, custos de energia elevados e uso de solventes tóxicos, tornando-os caros e prejudiciais para a saúde humana e para o meio ambiente [51], [53].

O método de extração convencional por multi-etapas (ME) é um método químico, através do qual são obtidas várias frações de polissacáridos, usando água fria e quente,

e condições ácidas e alcalinas, de modo a maximizar a concentração de polissacáridos. Os polissacáridos são moléculas polares e, geralmente, solúveis em água, podendo ser extraídos com o auxílio de técnicas como o aquecimento. A extração de polissacáridos insolúveis requer períodos de extração mais longos, temperaturas mais altas ou mesmo uso de soluções alcalinas e ácidas. O método ME apresenta baixo custo de operação e requer equipamentos simples. No entanto, os tempos de extração são longos, há um gasto grande de energia, poderá haver desnaturação térmica de alguns compostos e transformação de algumas moléculas de interesse [54], [55].

1.3.3. Extração por Métodos Não Convencionais

Como referido anteriormente, a extração por métodos convencionais apresenta várias desvantagens, que podem comprometer a qualidade do produto final e ter implicações ambientais. Deste modo, as técnicas de extração por métodos não convencionais permitem cumprir critérios de química verde e de sustentabilidade, obtenção de maior rendimento, tempo de tratamento reduzido e menor custo [51], [56].

A extração assistida por micro-ondas (MAE) é um exemplo de uma tecnologia alternativa inovadora, usada para extrair lípidos, pigmentos e outras biomoléculas de plantas, algas marinhas, e microalgas. Este método baseia-se no aquecimento uniforme e sem contacto de suspensões celulares, que resulta na evaporação de humidade e bolhas de alta pressão que rompem as células. A MAE também pode ser realizada a baixa temperatura sob vácuo ou sem adição de solvente externo. As principais vantagens da MAE são a redução significativa do tempo de extração, consumo baixo de solvente e elevados rendimentos de extração. Além disso, este método não se limita apenas a moléculas termorresistentes, uma vez que o tempo de extração reduzido permite a extração de constituintes termolábeis na sua forma ativa. Contudo, a MAE apresenta elevados custos de manutenção, quando aplicada à escala industrial e necessidade de arrefecimento antes de continuar o processamento [36], [51].

1.3.4. Purificação de Compostos Bioativos

Após os processos de extração, as amostras apresentam uma variedade de biomoléculas que incluem entre outras, polissacáridos, proteínas e lípidos.

De modo a obter uma amostra pura, podem ser aplicadas várias técnicas de purificação, incluindo precipitação com etanol, separação por membranas, cromatografias de troca iónica, de exclusão molecular e de afinidade. A precipitação com etanol é frequentemente utilizada nas primeiras etapas de purificação, permitindo remover impurezas de baixo peso molecular [57].

A cromatografia em coluna, em particular a cromatografia de troca iônica, é o método mais aplicado na purificação de polissacáridos. Este método é adequado para separação de polissacáridos ácidos ou polissacáridos neutros de alto peso molecular [58].

1.4. Doseamento de Compostos Bioativos

De acordo com o exposto, as microalgas são ricas em compostos que contêm inúmeras atividades biológicas. Deste modo, é necessário recorrer a ferramentas eficazes, que permitam a identificação e quantificação dos compostos intra e extracelulares produzidos por cada espécie de microalga [59], [60].

Portanto, para detetar os vários compostos bioativos podem ser utilizados, por exemplo, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), métodos cromatográficos, imunoquímicos, fluorimétricos, e colorimétricos. A escolha do método depende do tipo de informação que se pretende obter, da quantificação absoluta ou relativa e do componente a quantificar [61]–[63].

Os espectros obtidos na gama UV-Vis permitem adquirir informações sobre a estrutura de vários compostos. Quando esses compostos absorvem luz ultravioleta ou visível, ocorrem transições eletrônicas para estados de maior energia ou excitados da molécula. O estudo qualitativo e quantitativo dos compostos pode ser realizado por análise da forma, da altura e da área da banda espectral de absorção. A espectrofotometria de UV-Vis é um método com elevada sensibilidade, rápido, fácil de manusear e exige baixo volume de amostra. Contudo, apresenta algumas limitações como desvios químicos e espalhamento de radiação [64]–[67].

Os métodos cromatográficos baseiam-se nas diferenças das propriedades das moléculas presentes numa mistura, tais como de adsorção, partição, afinidade e peso molecular. Deste modo, é possível detetar e quantificar biocompostos. Existem vários tipos de cromatografia e a eficácia de cada uma depende da natureza da molécula a ser separada. No caso das microalgas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia de troca iônica de alta eficiência (HPAEC) têm sido utilizadas para detetar a composição de monossacáridos presentes nos polissacáridos excretados. Para a quantificação de lípidos, a cromatografia gasosa tem sido amplamente utilizada. Os pigmentos, tais como as clorofilas, podem ser quantificados com recurso à cromatografia em camada fina (TLC) e HPLC [25], [68]–[70].

Os métodos imunoquímicos baseiam-se na interação específica anticorpo-antigénio. Existem vários tipos de métodos imunoquímicos, que envolvem por exemplo,

deteção por fluorescência, imunodeteção e deteção enzimática. As técnicas imunoquímicas são ferramentas poderosas com alta sensibilidade e seletividade. Contudo, são técnicas dispendiosas, a obtenção de anticorpos específicos é complexa e estes são sensíveis a fatores físicos. Além disso, os anticorpos policlonais, por serem menos específicos, reconhecem vários epítopos e apresentam reatividade cruzada [71], [72].

A fluorescência é um método de fotoluminescência que possibilita a identificação de compostos fluorescentes a partir dos espectros de excitação e de emissão obtidos. A deteção de fluorescência é uma tecnologia não invasiva, com alta sensibilidade e reprodutibilidade. Contudo, apresenta complexidade, depende do procedimento de marcação, da espécie de microalga e pode requer reagentes de marcação, quando os compostos não são emissivos. No caso de *P. cruentum*, as propriedades fotofísicas das ficobiliproteínas podem ser avaliadas por fluorescência. [60], [73], [74].

Os métodos colorimétricos também são uma ferramenta útil para identificação e quantificação de biocompostos. Estes métodos espectrofotométricos envolvem a reação do composto em estudo com outro composto, para produzir uma alteração colorimétrica, que é detetada por registo da absorvância, de forma rápida, simples e com baixo custo [60], [63].

O método do fenol-ácido sulfúrico foi descrito pela primeira vez em 1956, por Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers e Smith [75] e foi posteriormente adaptado para ser utilizado em microplacas de 96 poços. Este método representa o procedimento comum para a determinação rápida do teor de hidratos de carbono neutros, em mono-, di-, oligo- e polissacáridos, proteoglicanos, glicoproteínas, e glicolípidos [76]–[78].

Os hidratos de carbono são desidratados a furfurais ou hidroximetilfurfurais na presença de ácido sulfúrico concentrado a alta temperatura. Posteriormente, os furfurais e derivados reagem com o fenol, produzindo complexos coloridos que absorvem radiação na gama de 480-490 nm, sendo a absorvância obtida proporcional ao teor de hidratos de carbono na amostra. A reação do método de fenol-ácido sulfúrico com a glucose apresenta-se na Figura 7 [76], [77].

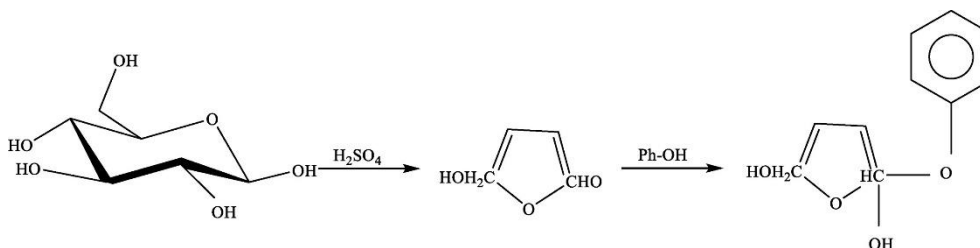


Figura 7 – Reação química da glucose no método fenol-ácido sulfúrico [77].

As vantagens deste método são o facto de ser um método fácil, rápido, simples e sensível. Contudo, apresenta várias desvantagens, como o facto de o fenol ser um reagente cancerígeno, o ácido sulfúrico ser muito corrosivo e cáustico, a necessidade de incubação em banho-maria e o facto de o método poder não distinguir entre monossacáridos e polissacáridos ou entre monossacáridos livres e combinados [76]–[78].

O método do carbazol-ácido sulfúrico foi descrito por Dische [79] e modificado por este, posteriormente, em 1947, para a análise de ácido urónico [80].

O método consiste na adição de ácido sulfúrico concentrado à amostra de teste, resultando em reações de desidratação e hidrólise, formando-se assim o ácido 5-formil-2-furanocarboxílico. Este furano na presença de carbazol e aquecimento forma uma solução vermelha com intensidade relacionada com o teor de ácido urónico na amostra e com uma absorvância máxima a 550 nm [81], [82].

Este método colorimétrico é simples, reprodutível, permite uma rápida análise de várias amostras, requer pouco volume de amostra, a cor permanece estável durante bastante tempo e não necessita de equipamentos especiais. No entanto, depende das condições de operação, pode ser afetado pela presença de açúcares neutros e por NaCl nas amostras [79], [81], [83].

Em 2015, foi desenvolvido por Hahn *et al.* [84], um método metacromático específico para a determinação de polissacáridos sulfatados usando azul de toluidina [(7-amino-8-metil-fenotiazin-3-ilideno)-dimetil amónia] (Figura 8). O azul de toluidina é um corante de tiazina básico carregado positivamente que cora os polissacáridos sulfatados, estabelecendo uma relação linear entre o decréscimo da absorvância a 632 nm e a concentração destes polissacáridos. [84], [85].

O método do azul de toluidina não é corrosivo, é simples, rápido, apresenta baixa toxicidade e ampla especificidade para polissacáridos ácidos. Contudo, certos

compostos como alginatos, podem interferir nos ensaios de polissacáridos sulfatados [84].

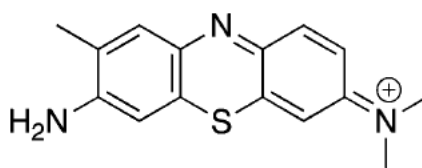


Figura 8 - Estrutura química do azul de toluidina [85].

O método do corante do Congo red (Figura 9) é usado para a caracterização de estruturas terciárias de glucanos, devido às suas interações com a hélice tripla de β -(1,3)-(1,6)-glucanos, o que leva a um desvio batocrômico de 488 para 516 nm detetado em espectrofotometria de UV-Vis [62], [86].

Este método é rápido, utiliza pequenos volumes de amostra, apresenta elevada sensibilidade, baixo limite de detecção, baixo custo, várias amostras podem ser analisadas ao mesmo tempo e não reage com outros polissacáridos.

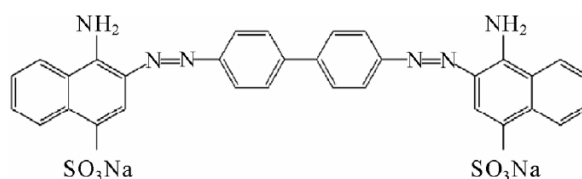


Figura 9 - Estrutura química do corante Congo red [87].

Para a detecção e quantificação de proteínas existem vários métodos como o método de Lowry e a reação de Biureto. Contudo, estes métodos estão sujeitos a interferências, são insensíveis e podem ser complexos [88].

Em 1976, Bradford [88] descreveu um método para determinar proteínas que envolve a ligação de um corante trifenílmetano, o Azul Brilhante de Coomassie G-250, Figura 10. A ligação do corante à proteína é devido a interações eletrostáticas com aminoácidos básicos protonados (lisina, arginina e histidina) e por associações hidrofóbicas com resíduos aromáticos de proteínas separadas. Esta ligação forma um complexo corante-proteína, resultando numa mudança da absorção máxima do corante de 465 nm para 595 nm [89].

Este método é rápido, sensível, reprodutível e apresenta pouca interferência de cátions e de hidratos de carbono. Contudo, as interações do corante são principalmente com a arginina e não tanto com outros resíduos básicos (histidina e lisina) e aromáticos (tirosina e fenilalanina). Além disso, há substâncias que interferem neste método, como o glicerol, detergentes, sulfato de amônio, alguns tampões alcalinos, entre outros [88], [90], [91].

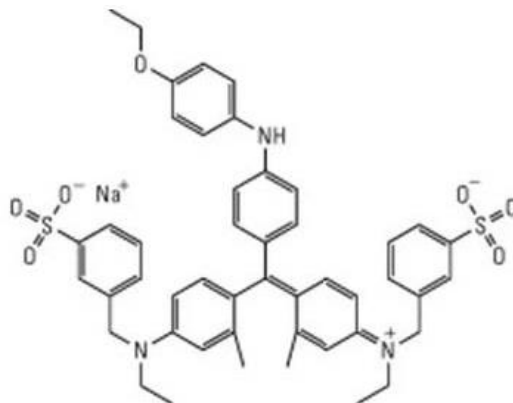


Figura 10 - Estrutura do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 [90].

O método de Sulfofosfovanilina (SPV) foi desenvolvido em 1937 por Chabrol e Charonnat [92] para a quantificação de lípidos.

A reação SPV é realizada em três etapas, começando pela reação entre o ácido fosfórico com a vanilina para formar ésteres de fosfato com maior reatividade do grupo carbonilo (reagente SPV). Seguidamente, os lípidos insaturados reagem com ácido sulfúrico concentrado a altas temperaturas para formar um ião carbônio. Por fim, os produtos lipídicos resultantes reagem com o reagente SPV, pelo que o ião carbônio reage com o grupo carbonilo da fosfovanilina para formar um cromóforo rosa. A intensidade da cor pode ser quantificada medindo a absorvância a 530 nm [93], [94].

Este método é simples, requer apenas uma pequena quantidade de amostra, demora menos tempo que a análise gravimétrica e a sua precisão pode ser comparada a análises gravimétricas e de cromatografia gasosa. No entanto, é necessário a presença de ligações duplas ou grupos hidroxilo livres para que se dê a reação e a reação é afetada pelo grau de saturação [69], [93], [95].

1.5. Atividade Antioxidante

A oxidação é essencial para muitos organismos para a produção de energia para alimentar os processos biológicos. Portanto, os radicais livres são produzidos no metabolismo natural das células aeróbias, principalmente na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS). Depois de produzidas, a maioria destas espécies é neutralizada pelas defesas antioxidantes celulares (enzimas e moléculas não enzimáticas). A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é a condição essencial para o funcionamento normal do organismo. No entanto, quando há um *stress* oxidativo, ou seja, um desequilíbrio e uma produção descontrolada de radicais livres de oxigênio, poderão surgir doenças como cancro, artrite reumatoide, aterosclerose e outros processos degenerativos associados ao envelhecimento [96]–[98].

A fim de reduzir os danos dos radicais livres no corpo humano, são usados antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Contudo, estes são suspeitos de apresentarem efeitos carcinogénicos, danos no fígado, e de serem tóxicos. Deste modo, a procura por antioxidantes naturais tem aumentado. Embora a maioria dos antioxidantes naturais disponíveis no mercado sejam derivados de plantas terrestres, as microalgas estão a ser cada vez mais consideradas pela indústria alimentar, cosmecêutica e nutracêutica como uma potencial fonte de compostos antioxidantes naturais [96], [99].

As principais moléculas antioxidantes produzidas por microalgas são o ácido ascórbico, Figura 11 (1), glutationa, Figura 11 (2), tocoferóis Figura 11 (3, 4), compostos fenólicos, Figura 11 (5, 6, 7), carotenoides, entre outros antioxidantes diversos como aminoácidos do tipo micosporina [99].

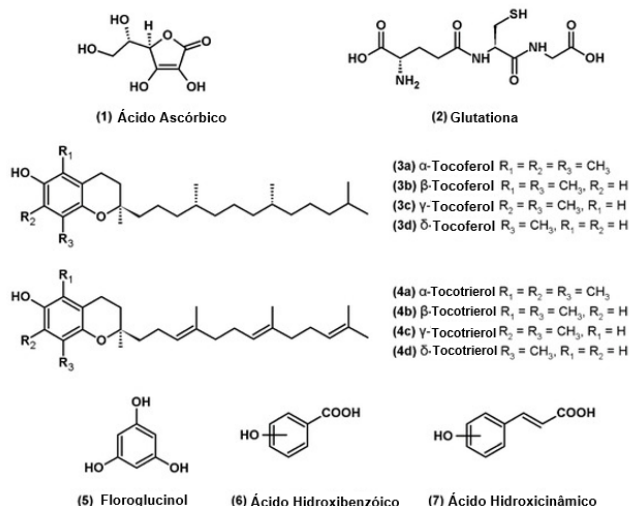


Figura 11 - Estruturas moleculares do ácido ascórbico, glutaciona, tocoferóis e compostos fenólicos (adaptado) [99].

Os antioxidantes podem desativar os radicais por dois mecanismos principais, HAT (Hydrogen Atom Transfer) e SET (Single Electron Transfer). O resultado final é o mesmo, independentemente do mecanismo, mas a cinética e o potencial para reações colaterais diferem. Os métodos HAT medem a capacidade de um antioxidante para extinguir os radicais livres por doação de hidrogênio. Os métodos baseados SET detetam a capacidade de um potencial antioxidante transferir um elétron para reduzir qualquer composto, incluindo metais, carbonilos e radicais [100].

Para a determinação de compostos fenólicos podem ser utilizadas cromatografias, espectrometria de massa e ensaios espectrofotométricos como o método de Folin-Ciocalteu [101].

O método colorimétrico de Folin-Ciocalteu é um método SET que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu que apresenta na sua constituição fosfomolibdato e fosfotungstato. Este método é baseado na transferência de elétrons em meio alcalino de compostos fenólicos e outras espécies redutoras para o molibdênio, formando complexos azuis que podem ser detetados espectrofotometricamente entre 750 e 765 nm. Este método é simples, sensível e preciso. Contudo a reação é lenta a pH ácido e carece de especificidade, uma vez que poderá sofrer interferências com algumas substâncias [97], [100], [101].

Dentro dos compostos fenólicos, existem os flavonóides que também podem ser detetados por cromatografias, espectrometria de massa e métodos espectrofotométricos. Dentro dos métodos espectrofotométricos, pode ser utilizado o ensaio colorimétrico de cloreto de alumínio, onde a reação de complexação é realizada na presença de nitrito de sódio em meio alcalino. O método baseia-se na nitração de um anel aromático

contendo um grupo catecol com três ou quatro posições não substituídas ou não bloqueadas estericamente e a absorvância é medida a 510 nm [102], [103].

Os ensaios mais usados para avaliar a atividade antioxidante das microalgas são os ensaios com ABTS (2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) e o método da determinação da capacidade quelante de iões Fe^{2+} [99].

O método do radical ABTS, também conhecido como TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox), é um método colorimétrico normalmente classificado como SET ou HAT. Este método baseia-se numa molécula incolor, ABTS reduzido, que é oxidada a uma molécula azul-verde, $ABTS^{*+}$. Quando este radical interage com um antioxidante, Figura 12, apresenta máximos de absorvância a 645 nm, 734 nm e 815 nm, sendo reduzido novamente à sua forma incolor, ABTS. O método do radical ABTS é um método rápido, pode ser usado numa ampla faixa de valores de pH, apresenta boa repetibilidade e é simples de executar. Além disso, o radical $ABTS^{*+}$ é estável e solúvel em água e solventes orgânicos, o que permite a determinação da capacidade antioxidante em amostras hidrofílicas ou lipofílicas, respetivamente. Contudo, compostos com potencial redox inferior ao do ABTS podem reduzir o radical $ABTS^{*+}$, o ensaio é demorado devido à formação dos radicais, os radicais não são muito estáveis e os resultados não são reprodutíveis [100], [104], [105].

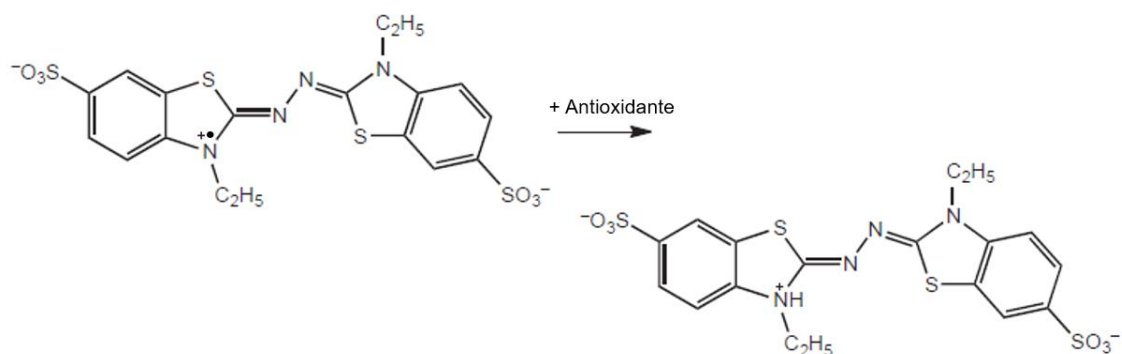


Figura 12 - Reação química do radical ABTS com um composto antioxidante (adaptado) [106].

O método do radical DPPH também é um método colorimétrico classificado como SET ou HAT. O DPPH é um radical livre estável que tem uma cor roxa e um comprimento máximo de absorção na faixa de 515-520 nm. Este método baseia-se na interação do radical DPPH com um antioxidante, Figura 13, ocorrendo uma mudança de cor para amarelo, correspondente ao DPPH reduzido. Deste modo, é possível determinar a atividade antioxidante por espectrofotometria. O método do radical DPPH é simples, rápido e apenas requer um espectrofotómetro UV-Vis. No entanto, a

interpretação pode ser complicada quando os compostos apresentam espectros que se sobrepõe ao DPPH a 515 nm. Além disso, os carotenoides poderão interferir no ensaio, a cor do DPPH pode ser perdida devido às reações HAT ou SET e a acessibilidade estérica é determinante na reação, sendo que as moléculas pequenas que têm melhor acesso ao local do radical, apresentam maior atividade antioxidante [100], [106].

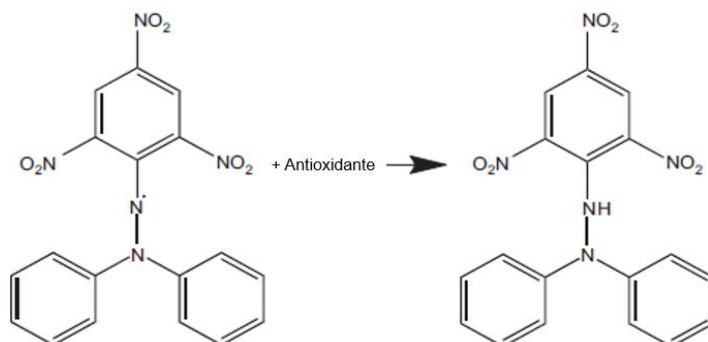


Figura 13 - Reação química do radical DPPH com um composto antioxidante (adaptado) [106].

1.6. Técnicas de Caracterização Estrutural de Compostos Bioativos

A atividade biológica de polissacáridos é influenciada pelas suas características estruturais, como peso molecular e distribuição do mesmo, tipos e proporções de monossacáridos constituintes, localizações de ligações glicosídicas e conformação de cadeia. Deste modo, é importante realizar uma caracterização estrutural dos polissacáridos e das respectivas ligações [107].

Atualmente, existe uma ampla gama de técnicas de caracterização disponíveis para obter detalhes estruturais de polissacáridos. Os métodos químicos envolvem o uso de reações para obter mais informações sobre a estrutura química e o arranjo. Em contraste, as técnicas analíticas estão a ganhar mais importância, uma vez que a preparação da amostra é direta e fornece informações precisas [108].

A composição da cadeia de monossacáridos é geralmente estudada pela hidrólise ácida dos polissacáridos e pela análise subsequente dos monossacáridos resultantes. O perfil de monossacáridos pode ser determinado por cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC), análise de polissacáridos por eletroforese em gel (PACE), HPLC ou, após derivatização, por cromatografia gasosa (GC) [108], [109].

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) fornece informações úteis sobre a posição da ligação glicosídica, a ocorrência de ramificações

e a composição de monossacáridos em hidratos de carbono complexos. No entanto, a análise de espectrometria de massa (MS) em si não fornece informações completas sobre configuração anomérica, forma de anel e isômeros conformacionais [108].

Para a análise estrutural dos polissacáridos, pode realizar-se espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN). FTIR permite identificar a forma do anel piranosil ou furanosil e configuração anomérica α ou β em resíduos de monossacáridos. RMN é usada para determinar as proporções de monossacáridos presentes e as proporções das suas ligações anoméricas [108], [109].

A espectroscopia de emissão de fluorescência permite medir a interação da radiação eletromagnética com a matéria em níveis de energia específicos. Nesta técnica, a amostra absorve a radiação eletromagnética e depois emite a luz de comprimento de onda específico [110].

1.6.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR é uma técnica espectral rápida, não destrutiva e acessível, que tem sido amplamente aplicada na análise da estrutura de polissacáridos. Através das vibrações moleculares, os grupos funcionais podem ser associados a bandas de absorção infravermelhas características, que correspondem às vibrações fundamentais dos grupos funcionais [111], [112].

Geralmente, deve prestar-se atenção a cinco regiões espectrais no espectro de infravermelho de polissacáridos. A região I ($4000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$) apresenta, normalmente, uma banda forte e larga a $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ correspondente à vibração de estiramento do OH. Além disso, a banda a $3000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída às vibrações de alongamento simétricas e assimétricas dos grupos CH e CH_2 . As bandas na região II ($1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) podem ser atribuídas a vibrações de alongamento de ligações duplas C=O e carboxilatos COO^- . A região III ($1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) inclui vibrações de deformação de grupos com simetria local, como CH_2 e inúmeras deformações C-OH. Esta região apresenta sobreposição de várias bandas de diferentes vibrações, tornando mais difícil a atribuição de bandas. A região IV ($1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) pode ser chamada de *fingerprint*. O aparecimento de novas bandas a $1175\text{-}1140\text{ cm}^{-1}$ pode ser o resultado da formação de ligações glicosídicas. Além disso, a $900\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ encontra-se a região anomérica e pode ser usada para diferenciar a configuração α e β do carbono anomérico. A região V (inferior a 800 cm^{-1}) é conhecida como “região esqueleto”, estando as bandas nesta região relacionadas às vibrações esqueléticas de hidratos de carbono [111].

Consoante os grupos substituintes, poderão existir mais bandas. Por exemplo, os polissacáridos sulfatados apresentam três bandas características a $1200-1270\text{ cm}^{-1}$, $1010-1060\text{ cm}^{-1}$ e $900-800\text{ cm}^{-1}$, correspondendo a estiramento simétrico, assimétrico de S=O e estiramento de C-O-S, respetivamente [111].

A presença de proteínas é possível ser verificada através da banda da amida I a $1680-1620\text{ cm}^{-1}$, correspondente à vibração de alongamento da ligação C=O, e da banda da Amida II a $1560-1520\text{ cm}^{-1}$, correspondente à ligação NH e CN [112].

Para verificar a presença de lípidos em microalgas, poderão identificar-se duas regiões importantes, a banda $3050-2800\text{ cm}^{-1}$ correspondente a vibrações de estiramento simétricas e assimétricas de CH e CH₂ de lípidos e a banda em 1745 cm^{-1} correspondente vibração de estiramento da ligação C=O dos ésteres de triglicéridos [113].

1.6.2. Espectroscopia de Fluorescência

A fluorescência ocorre quando uma molécula absorve energia, passando ao estado excitado e, quando retorna ao estado fundamental, a energia é perdida como luz ou fluorescência. Os comprimentos de onda de excitação e emissão nos quais ocorre a fluorescência são característicos de estruturas moleculares específicas. Os compostos orgânicos que absorvem e reemitem luz são referidos como fluoróforos. Estes compostos normalmente apresentam vários anéis aromáticos e/ou ligações duplas conjugadas [114], [115].

A fluorescência de uma molécula biológica é caracterizada pelo seu rendimento quântico e tempo de vida. O rendimento quântico é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, sendo que quando maior o rendimento quântico, maior a fluorescência. O tempo de vida é definido como o tempo médio que uma molécula biológica passa no estado excitado antes de retornar ao seu estado fundamental [115], [116].

A espectroscopia de fluorescência é um método rápido e sensível para caracterizar estruturas moleculares e o ambiente em que se encontram. Pode ser usado como uma técnica analítica não destrutiva para fornecer informações sobre a presença de moléculas fluorescentes em todos os tipos de amostras biológicas. Deste modo, é possível caracterizar certas estruturas químicas de moléculas, permitindo que sejam aplicadas, por exemplo, como sondas fluorescentes em aplicações biotecnológicas, citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência, entre diversas aplicações [117], [118].

Capítulo 2

Enquadramento

2. Enquadramento

Este trabalho final de mestrado teve como objetivo a produção, isolamento e caracterização de compostos bioativos da microalga vermelha *Porphyridium cruentum*.

Este trabalho iniciou-se com um estágio de 7 de março de 2022 a 14 de abril de 2022, tendo uma duração de 6 semanas na Unidade de Investigação e Desenvolvimento (UID) da Allmicroalgae – Natural Products S.A., uma empresa de produção industrial de microalgas localizada em Pataias, Leiria. A Allmicroalgae produz microalgas para integração na alimentação humana, formulação de suplementos dietéticos, rações animais e aplicações agrícolas, através da integração do processo desde a escala laboratorial, passando pelo *scale-up* para produção industrial finalizando com o embalamento. Esta produção é realizada em condições auto e heterotróficas, em sistemas fechados, fotobiorreatores tubulares e fermentadores, e em sistemas abertos, *raceways*, permitindo uma produção em larga escala.

Durante a realização do estágio, foi possível acompanhar o controlo e manutenção de várias culturas de diferentes espécies através de microalgas, através da monitorização diária de diversos parâmetros, de modo a acompanhar o crescimento celular e verificar as necessidades nutricionais das culturas. Foi ainda possível assistir e prestar auxílio à equipa de produção em vários momentos de *scale-up* de diferentes culturas.

No decorrer do estágio foi produzida biomassa de *Porphyridium cruentum* em condições autotróficas, em balões à escala laboratorial em balões de 2 litros, sob duas concentrações de NO_3^- no meio de cultura: 6 mM (MN: médio fornecimento de nitratos) e 18 mM (HN: alto fornecimento de nitratos). Adicionalmente, a biomassa desta microalga foi ainda produzida sob as mesmas condições de meio em fotobiorreatores *flat panel* (FBR FP) de 90 L através de um *scale down* de um fotobiorreator tubular.

Esta produção teve como objetivo verificar o efeito da concentração da fonte de azoto na produção de biomassa de *Porphyridium cruentum* e identificar qual das condições estudadas potenciam uma maior produção de compostos intracelulares e extracelulares, nomeadamente polissacáridos, proteínas, B-ficoeritrina e ácidos gordos polinsaturados. O controlo e manutenção destas culturas foi feito através da monitorização diária de pH, temperatura, salinidade, densidade ótica, conteúdo de nitratos e pesos secos. Também foram realizadas observações ao microscópio para verificar o estado das células, ou seja, tamanho, cor, agregação, e identificar possíveis contaminações.

Concluído o estágio, o restante trabalho foi realizado nas instalações do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, nomeadamente no Laboratório de Biotecnologia, no Laboratório de Ambiente, no Laboratório de Química Orgânica e no Laboratório do Centro de Investigação de Engenharia Química e Biológica.

A biomassa produzida à escala laboratorial foi separada do meio de cultura pelo método convencional de centrifugação. Os compostos bioativos excretados durante o crescimento da microalga para o meio de cultura, foram obtidos por precipitação com álcoois. A biomassa produzida em FBR FP foi separada do meio de cultura por ultrafiltração, e o fracionamento dos extrapolissacáridos presentes no meio de cultura foi também efetuado através desta tecnologia.

De modo a obter as biomoléculas intracelulares foram realizados vários métodos de extração convencionais, bem como procedimentos alternativos sustentáveis. Os polissacáridos intracelulares foram fracionados por cromatografia de troca iónica.

Foram detetados e quantificados diversos biocompostos intra e extracelulares através dos vários métodos descritos no Capítulo 3, e o seu potencial biológico foi avaliado por determinação das suas atividades antioxidantes *in vitro*, bem como através da avaliação das suas propriedades fotofísicas.

A técnica de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para avaliar os extratos obtidos e polissacáridos purificados, de forma a identificar diferenças estruturais nos extratos e caracterizar parcialmente biomoléculas detetadas, uma vez que a atividade biológica destes compostos está relacionada com a sua composição química e estrutural.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Reagentes	33
3.2. Material Biológico	33
3.3. Métodos.....	33

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Ácido gálico ($C_7H_6O_5$) da Acros organic. Acetato de celulose ($C_2H_4O_2$) da Aldrich. Ácido poligalacturónico ($C_6H_{10}O_7$) da Alfa Aesar. Fenol (C_6H_6O) da BDH. Azul de Coomassie G-250 ($C_{47}H_{50}N_3O_7S_2^+$) da Bio-Rad. Ácido ortofosfórico 85% (H_3PO_4), etanol 99,8% (C_2H_6O) e propan-1-ol 99,5% da Fisher Chemical. Ácido sulfúrico 95-97% (H_2SO_4), ácido D-galacturónico ($C_6H_{10}O_7$), albumina de soro bovino (BSA) e azul de toluidina ($C_{15}H_{16}N_3S^+$) da Fluka. Cloreto de alumínio ($AlCl_3$), Dextrano 100000, 200000 e 400000 Da, nitrito de sódio ($NaNO_2$), polietilenoglicol 3000, 6000, 10000 e 20000 Da e tetraborato dissódico ($Na_2B_4O_7$) da Merck. Carbonato de sódio (Na_2CO_3) da Riedel-de-Haën. Formamida (CH_3NO) da Scharlau. 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), β -(1,3)-D-glucano de cevada a 95%, carbazol ($C_{12}H_9N$), catequina hidratada 98% ($C_{15}H_{14}O_6$), congo red 40%, persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), reagente de Folin-Ciocalteu, sulfato de dextrano 200000 Da e trolox 97 % da Sigma. Vanilina 99% ($C_8H_8O_3$) da Thermo Fisher Scientific. Óleo de colza biológico da Vitaquell. Metanol 100% (CH_4O) da VWR. Resina DEAE-52 de troca aniónica da Whatman.

Os restantes reagentes foram fornecidos pela Sigma e pela Merck, tendo sido selecionados em qualidade e pureza de acordo com a sua aplicabilidade. Estes produtos foram usados diretamente como recebidos, sem tratamento prévio.

3.2. Material Biológico

Neste trabalho final de mestrado foi utilizada a microalga vermelha *Porphyridium cruentum* pertencente à da Allmicroalgae – Natural Products S.A..

3.3. Métodos

3.3.1. Cultivo e Manutenção das Culturas

Como referido anteriormente, o crescimento e acompanhamento das culturas de *Porphyridium cruentum* foram realizados nas instalações da UID da Allmicroalgae.

A produção da biomassa de *P. cruentum* em condições autotróficas à escala laboratorial foi realizada em modo descontínuo, em triplicado em balões de 2 L, durante 22 dias até atingir o início da fase estacionária. A inoculação foi feita com duas concentrações diferentes de meio nutritivo salgado (MNS) (este meio já contém a solução de micronutrientes e $FeCl_3$ 2% (m/V)), de forma a se obter duas concentrações diferentes de NO_3^- . Para a inoculação os meios de cultivo foram preparados com MN

(médio fornecimento de nitratos), e HN (alto fornecimento de nitratos), obtendo-se 6 mM e 18 mM de nitratos, respetivamente. A salinidade foi mantida a 30g/L. A inoculação dos meios foi realizada de forma a obter uma concentração inicial de 0,4 g/L. Todos os materiais e soluções foram previamente esterilizados em autoclave. As culturas foram sujeitas a uma temperatura entre 20 a 21 °C com arejamento de CO₂ e ar constante de 1 L/min, fotoperíodo 24h:0h (luz/escuro) com uma iluminação produzindo 700 μmol fotões.m²/s e pH entre 7 e 8.

A produção da biomassa de *P. cruentum* em FBR FP foi realizada também em modo descontínuo e em triplicados em *flat panels* de 90 L, durante 13 dias até atingir o início da fase estacionária. A inoculação foi feita com duas concentrações diferentes de meio nutritivo base (MNB), de forma a obter também duas concentrações diferentes de nitratos. Obtiveram-se 6 mM e 18 mM de nitratos nas condições MN e HN, respetivamente. A inoculação dos meios foi realizada de forma a obter uma concentração inicial de 0,4 g/L. As culturas foram submetidas a condições ambientais com temperaturas entre 10 e 16 °C, salinidade 30g/L, irradiação solar entre 32 e 149 W/m², arejamento de CO₂ e ar constante e pH entre 6 e 8.

O controlo e manutenção das culturas, tanto à escala laboratorial como em FBR FP, foi realizado através do registo diário do pH, temperatura, salinidade, densidade ótica a 600 nm, conteúdo de nitratos, pesos secos e observações ao microscópio.

Do estágio realizado na Allmicroalgae resultaram 6 amostras de cultura produzidas à escala laboratorial e 6 amostras de cultura produzidas em FBR FP. As amostras foram conservadas a -20°C.

3.3.2. Separação da Biomassa do Meio de Cultura por Centrifugação

A biomassa produzida à escala laboratorial foi separada do meio de cultura por centrifugação (centrífuga HERMLE Z383K) a 4500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. A biomassa e o meio de cultura foram reservados a -20 °C até serem utilizados.

3.3.3. Preparação e Caracterização da Membrana de Ultrafiltração

Com o objetivo de utilizar tecnologias alternativas, nomeadamente ultrafiltração, na separação da biomassa do meio de cultura e no fracionamento dos exopolissacáridos excretados pela *Porphyridium cruentum* para o meio de cultura, foram desenvolvidas membranas polimérica de acetato de celulose com diferentes limites de exclusão molecular (MWCO).

3.3.3.1. Preparação da Membrana de 139 kDa

Inicialmente, foi preparada a solução polimérica pesando-se para um recipiente rolhado 17,03 g de acetato de celulose, 39,99 g de formamida e 43,12 g de acetona. O recipiente foi fechado e selado com parafilme para evitar a evaporação de solventes e colocou-se num agitador mecânico (IKA Labortechnik, KS 125 basic) devidamente equilibrado, a 800 rpm, durante 24 h e à temperatura ambiente, de modo a obter uma solução homogénea.

A preparação da membrana foi feita através do método de inversão de fases, em que a solução polimérica foi espalhada numa superfície de vidro com a ajuda de um objeto com uma ranhura devidamente calibrada (faca) seguindo-se a imersão num banho de água gelada. Para tal, após garantir que todo o material se encontrava limpo e seco, limpou-se o vidro e a faca com acetona e colocou-se a faca na extremidade superior do vidro com a ranhura calibrada virada para baixo e para o exterior. Introduziu-se a solução polimérica na faca e iniciou-se o varrimento sobre o vidro. Após o varrimento, iniciou-se a contagem de 30 segundos de evaporação e, de seguida, colocou-se o vidro com o filme polimérico num banho de coagulação constituído por água desionizada e gelo com temperatura entre 0 e 3 °C, Figura 14. Alguns minutos depois, quando o filme se começou a soltar do vidro, procedeu-se à identificação da camada ativa da membrana, que esteve em contato com o ar, retirou-se o filme do vidro e guardou-se num recipiente com água desionizada a 4 °C.



Figura 14 - Banho de coagulação para formação das membranas.

3.3.3.2. Montagem e Operação na Instalação de Ultrafiltração

Das diversas membranas preparadas, selecionaram-se duas para colocar no porta-membranas do módulo de UF (148,8 cm²). As membranas foram colocadas no porta-membranas sobre uma folha de papel de filtro que serviu de suporte às membranas. As membranas foram colocadas de forma a ficar com a camada ativa em contato com a alimentação.

A instalação de UF de fluxo tangencial é constituída por um tanque de alimentação, uma bomba peristáltica (FLUID-O-TECH, Rotoflow), dois manómetros, um medidor de caudal e duas células de permeação, Figura 15. O caudal e a pressão são controlados por uma válvula à saída da instalação e pela válvula que controla a velocidade da bomba. O caudal é lido no medidor de caudal e a pressão é monitorizada pelos manómetros, sendo o valor real a média da pressão dos dois manómetros, correspondendo à pressão de entrada e saída.

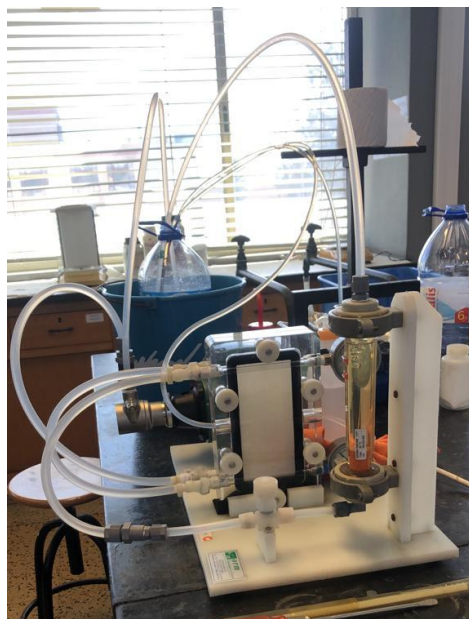


Figura 15 - Instalação de membranas de ultrafiltração.

Previamente à utilização das membranas, estas foram compactadas através da permeação de água desionizada durante 2 horas a uma pressão de 3 bar e a um caudal de 180 L/h.

3.3.3.3. Permeabilidade Hidráulica

A permeabilidade hidráulica, L_p , representa a quantidade de água permeada por unidade de tempo, por unidade de área superficial de membrana e por unidade de

pressão transmembranar. A determinação experimental da permeabilidade hidráulica é feita representando o fluxo de permeação à água pura, J_p , em função da pressão transmembranar aplicada, ΔP . O declive da representação linear obtida, com ordenada nula na origem, dá-nos a permeabilidade hidráulica, como se pode verificar pela equação 1.

$$J_p = L_p \times \Delta P \quad (1)$$

Para o cálculo do J_p , os ensaios foram realizados com um caudal de 180 L/h, a 0,6, 1, 1,5, 2 e 2,5 bar, pesando-se o permeado gerado em cada ensaio, medindo o tempo de recolha e a temperatura das amostras, equação 2.

$$J_p = \frac{M_p}{t \times A} \quad (2)$$

Os fluxos foram posteriormente corrigidos para uma temperatura de 25 °C, através da equação 3.

$$J_p (25 \text{ } ^\circ \text{C}) = \frac{J_p(T_{\text{ensaio}})}{0,901} e^{(-6,96 + \frac{2044}{273,15 + T_{\text{ensaio}}})} \quad (3)$$

3.3.3.4. Rejeição a Solutos Orgânicos

Os ensaios de rejeição a solutos orgânicos de referência têm como finalidade a determinação do limite de exclusão molecular (MWCO) da membrana. Este parâmetro está relacionado com o peso molecular de um soluto de referência cuja rejeição é superior a 91%.

Para tal, foram realizados ensaios de permeação a soluções aquosas (600 ppm) de polietilenoglicol (PEG) (3000, 6000, 10000 e 20000 Da) e dextrano (40000, 100000 e 200000 Da). Os ensaios foram realizados com um caudal de 180 L/h e à pressão de 1 bar tendo-se registado a temperatura, o tempo de permeação e a massa de permeado.

A concentração dos solutos na alimentação e no permeado foi determinada através da medição do carbono orgânico total (TOC), utilizando um analisador de TOC (Aurora 1030) e através da medição do índice de refração, utilizando um sistema de HPLC-IR (LC-2000 Plus series HPLC, RI-2031 Plus, Jasco). Para cada soluto orgânico foi, previamente, feita uma reta de calibração que permitiu converter o carbono orgânico total, no caso da utilização do analisador de TOC, e as áreas medidas pelo HPLC-IR, em concentração de solutos.

Uma vez conhecidas as concentrações dos solutos no seio da alimentação (C_F) e no permeado (C_P), foram calculados os coeficientes de rejeição aparente, definidos pela equação 4.

$$f = \frac{C_F - C_P}{C_F} \times 100 \quad (4)$$

3.3.4. Separação da Biomassa do Meio de Cultura por Ultrafiltração

Para a separação da biomassa do meio de cultura dos FBR FP, a biomassa foi previamente passada por um passador para retirar pedaços maiores que pudessem obstruir a membrana.

Após essa etapa, a biomassa, que se encontrava num banho termostatizado, foi alimentada à instalação de ultrafiltração com um caudal de 180 L/h e 1 bar.

O permeado (meio de cultura) dos FBR FP MN1, MN2 e HN3 foi recolhido para o mesmo recipiente, sendo retirada amostra de 30 em 30 minutos para cálculo do fluxo, medição da turbidimetria do permeado e retentado a 450 nm utilizando um espectrofotómetro (Hach DR/2000), cálculo da rejeição à turbidimetria e fator de concentração, equação 5 e 6, respetivamente. No FBR FP MN1 e MN2 foi possível recuperar a camada gel formada na membrana ao longo da permeação [119], [120].

O permeado dos FBR FP MN3, HN1 e HN2 foi recolhido para 20 recipientes diferentes de 10 em 10 minutos, calculando-se também o fluxo, medindo-se a turbidimetria do permeado e retentado a 450 nm utilizando um espectrofotómetro (Hach DR/2000) cálculo da rejeição à turbidimetria e fator de concentração, equação 5 e 6, respetivamente.

$$\text{Rejeição à turbidimetria (\%)} = \frac{\text{Turbidimetria}_{\text{concentrado}} - \text{Turbidimetria}_{\text{permeado}}}{\text{Turbidimetria}_{\text{concentrado}}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Fator de concentração} = \frac{\text{Turbidimetria}_{\text{concentrado final}}}{\text{Turbidimetria}_{\text{concentrado inicial}}} \quad (6)$$

O retentado foi, posteriormente, submetido a centrifugação (centrífuga HERMLE Z383K) a 11000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. A biomassa e o meio de cultura foram reservados a -20 °C até serem utilizados.

3.3.5. Fracionamento dos Exopolissacáridos por Ultrafiltração

O permeado resultante da separação da biomassa do meio de cultura dos FBR FP MN1, MN2 e HN3 foi alimentado na unidade de ultrafiltração (180L/h, 1 bar), trabalhando em paralelo com duas membranas polimérica de acetato de celulose, previamente preparadas e caracterizadas, com MWCOs de 10 e 4 kDa. De 30 em 30 minutos, foi retirada amostra do permeado resultante da membrana de 10 e 4 kDa (permeado 2 e permeado 3, respetivamente) e do retentado para cálculo do fluxo, medição da turbidimetria do permeado e retentado a 450 nm utilizando um espectrofotómetro (Hach DR/2000), cálculo da rejeição à turbidimetria e fator de concentração, através das equações 5 e 6, respetivamente.

O permeado recolhido aos 10, 50, 100, 150 e 200 minutos resultante da separação da biomassa do meio de cultura dos FBR FP MN3, HN1 e HN2 foi submetido a uma ultrafiltração (1 bar) numa instalação com alimentação frontal (Amicon Stirred Cell Model 8050), usando uma membrana polimérica de acetato de celulose, previamente preparada e caracterizada, com MWCO de 10 kDa. No final, foi calculado o fluxo, medido a turbidimetria do permeado e retentado a 450 nm utilizando um espectrofotómetro (Hach DR/2000) e cálculo da rejeição à turbidimetria, através da equação 5. Deste processo resultaram 5 permeados e 5 retentados para cada FBR FP, correspondente a cada fração (P2, F1 e R2, F1; P2, F5 e R2, F5; P2, F10 e R2, F10; P2, F15 e R2, F15; P2, F20 e R2, F20).

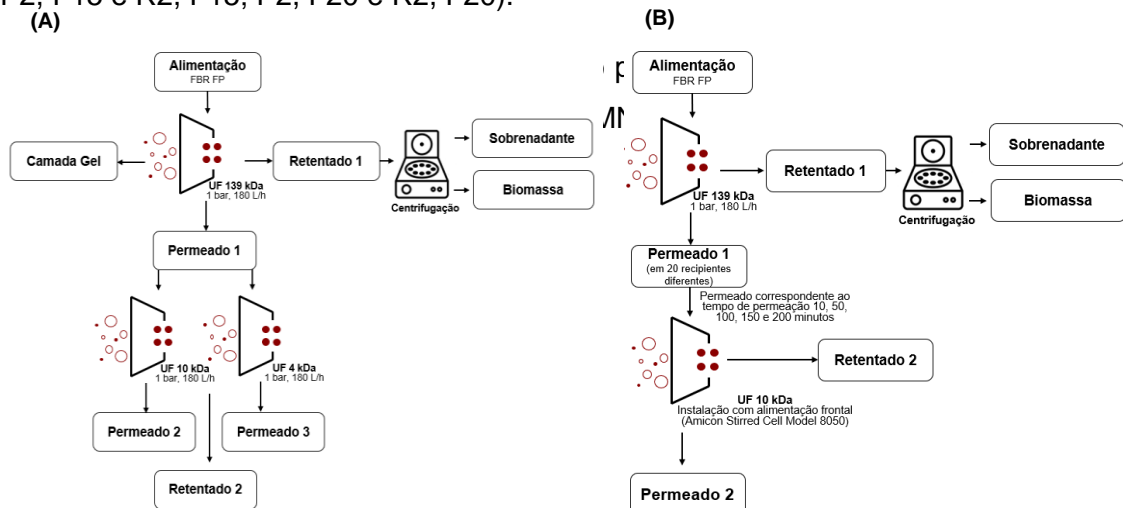


Figura 16 - Diagrama do processo de ultrafiltração aplicado aos FBR FP MN1, MN2 e HN3 (A) e aos FBR FP MN3, HN1 e HN2 (B).

3.3.6. Isolamento de Compostos Bioativos Extracelulares

Para o isolamento de compostos bioativos excretados para o meio de cultura da produção à escala laboratorial, recorreu-se ao método convencional por precipitação alcoólica, descrita por Patel *et al.* [119], tendo sido testados etanol e 1-propanol.

Assim, os compostos bioativos extracelulares, presentes no meio de cultura, foram precipitados por adição de 2 volumes de 1-propanol 95% (V/V) e 3 volumes de etanol 90% (V/V). As precipitações foram realizadas sem incubação, com incubação *overnight* a -20 °C e durante 48 horas a 4 °C (Tabela 1). Após estes períodos, recolheram-se os precipitados por centrifugação a 5000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Os precipitados foram secos em estufa a 50 °C *overnight* para posterior pesagem.

Tabela 1 - Condições de precipitação dos compostos bioativos extracelulares.

Solvente (vol)	Pureza do solvente (%)	Tempo de extração	Temperatura (°C)
PrOH 2 vol	95	Imediato	ambiente
PrOH 2 vol	95	overnight	-20
PrOH 2 vol	95	48h	4
EtOH 3 vol	90	Imediato	ambiente
EtOH 3 vol	90	overnight	-20
EtOH 3 vol	90	48h	4

Os EPS foram dissolvidos em água, respeitando a razão 5 mg de amostra em 1 mL de água destilada. Cada amostra esteve 1 hora numa placa de aquecimento a 50 °C com agitação.

Devido à dificuldade de dissolução e conseqüente quantificação dos compostos obtidos, foram testadas várias condições para o efeito. Primeiro utilizou-se NaOH 1 M como solvente, respeitando a razão 5 mg de amostra em 1 mL solvente, durante 1 hora com aquecimento em placa e agitação a 50 °C.

Uma vez que a dificuldade de dissolução e quantificação se manteve, substitui-se o aquecimento em placa pela utilização de um banho de ultrassons a 50 °C durante 20 minutos.

Por fim, com o mesmo solvente e mesma razão massa:solvente, utilizou-se aquecimento a refluxo *overnight* a 86 °C.

3.3.7. Extração de Compostos Bioativos Intracelulares

Para a extração de compostos bioativos intracelulares, as diversas amostras de biomassa foram previamente congeladas a -20°C e posteriormente liofilizadas (UNICRYO MC 2L).

3.3.7.1. Extração Convencional em Multi-etapas

A extração convencional em multi-etapas foi efetuada à biomassa produzida à escala laboratorial com base no método descrito previamente por Semedo, Karmali e Fonseca [62] com algumas modificações. Neste método ocorre a extração fracionada em 5 etapas de compostos bioativos intracelulares, utilizando água fria seguida de água em ebulição, e posteriormente em condições ácidas e alcalinas (Figura 17).

Foram adicionados 2 volumes de água destilada à biomassa, seguida de agitação à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugação a 11000 rpm durante 30 minutos a 4°C . Desta centrifugação não foi possível recolher sobrenadante, uma vez que não houve separação de fases. Deste modo, adicionou-se novamente água destilada, agitou-se por mais 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 11000 rpm durante 30 minutos a 4°C . Recolheu-se o sobrenadante e identificou-se como FW1.

Ao *pellet* foi adicionado 1 volume de água destilada e a mistura foi aquecida a 100°C durante 3 horas, seguida de centrifugação a 11000 rpm durante 20 minutos a 4°C . Desta centrifugação, mais uma vez, não resultou separação de fases, tendo-se adicionado água destilada à mistura, para fazer uma lavagem e após segunda centrifugação, o sobrenadante recolhido designou-se como FW2.

Ao *pellet* resultante desta extração adicionaram-se 3 volumes de KOH 1 M e a mistura foi aquecida durante 20 minutos a 60°C com agitação, seguida de centrifugação a 11000 rpm durante 20 minutos e a 4°C , onde se recolheu o sobrenadante, identificado como FKOH. O *pellet* foi lavado com água destilada, centrifugado e o sobrenadante foi adicionado à fração FKOH. Esta fração foi neutralizada com HCl 6 M.

O *pellet* foi ressuspendido com 2 volumes de HCl 0,6 M e a mistura foi aquecida a 100°C durante uma hora, seguida de centrifugação a 11000 rpm durante 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e identificado como FHCl. O *pellet* foi lavado com água destilada, centrifugado e o sobrenadante foi adicionado à fração FHCl. Esta fração foi neutralizada com NaOH 6 M.

Por último, o *pellet* resultante foi ressuspensionado com NaOH 1 M e a mistura foi aquecida durante 20 minutos a 60 °C com agitação, seguida de centrifugação a 11000 rpm durante 20 minutos e a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante e identificou-se como FNaOH. O *pellet* foi lavado com água destilada, centrifugado e o sobrenadante foi adicionado à fração FNaOH. Esta fração foi neutralizada com HCl 6 M.

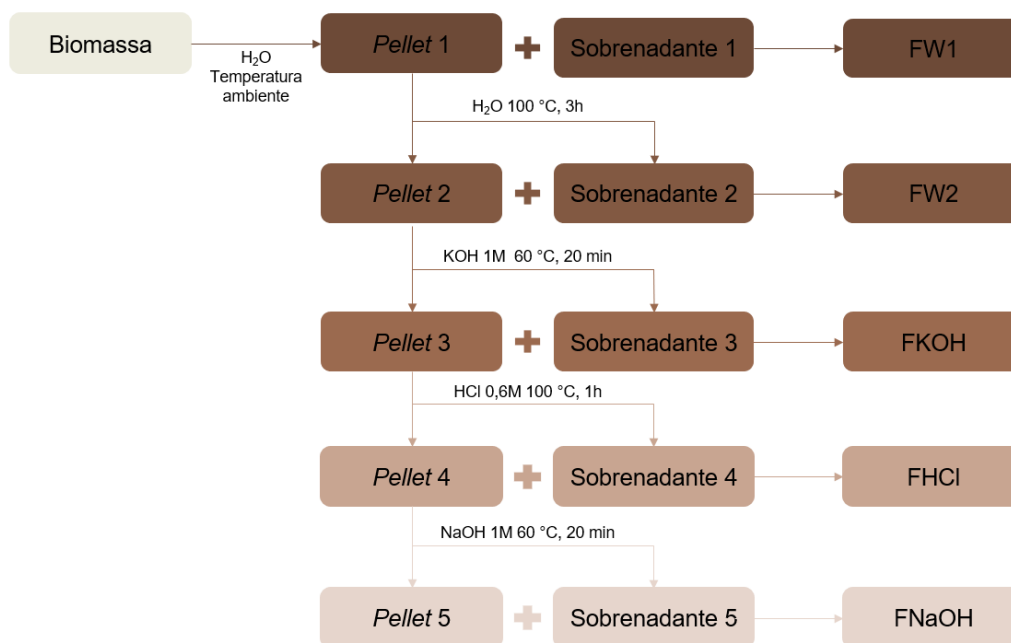


Figura 17 - Esquema ilustrativo do método de extração convencional multi-etapas, fracionado em 5 etapas, com água fria e em ebulição, seguido de condições ácidas e alcalinas.

3.3.7.2. Extração Assistida por Micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas foi realizada num reator micro-ondas monomodo (Anton Paar Monowave 300) e foi efetuada com base no método descrito por Yuan e Macquarrie [121] com algumas modificações. As condições de extração selecionadas tiveram por base estudos anteriormente desenvolvidos por Gil [122] e Hussien [123].

Assim, com base em trabalhos anteriormente desenvolvidos para microalgas, as extrações foram realizadas sob condições diferentes, mantendo sempre a razão biomassa: solvente (1:10) constante, como descrito na Tabela 2. Os extratos foram obtidos após centrifugação a 13500 rpm na centrífuga FastGene High Speed e as frações foram identificadas como MAE.

Tabela 2 - Parâmetros da extração assistida por micro-ondas.

Solvente	Temperatura de Extração (° C)	Tempo de irradiação (min)	Amostra
Etanol absoluto	150	15	Biomassa produzida à escala laboratorial
KOH 0,1 M	120	30	Biomassa produzida à escala laboratorial e em FBR FP
HCl 0,1 M	120	30	Biomassa produzida em FBR FP

3.3.8. Doseamento de Biomoléculas

Os extratos obtidos foram avaliados quanto aos seus conteúdos nos diversos compostos, através dos métodos colorimétricos descritos em seguida.

3.3.8.1. Método do Fenol-Ácido Sulfúrico

Para a quantificação de polissacáridos neutros foi utilizado o método do Fenol-Ácido Sulfúrico descrito por Masuko *et al.* [78], com adaptações.

Numa placa NUNC de 96 poços adicionaram-se 50 µL de amostra a analisar, 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e 30 µL de uma solução aquosa de fenol 5% (m/V). A mistura reacional foi incubada num banho termostatizado a 90 °C durante 5 minutos. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, fez-se a leitura da absorvância num leitor de microplacas (Bio-Rad 680) a 490 nm. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio do branco foi efetuado com água.

O padrão utilizado foi o ácido poligalacturónico numa gama de concentrações entre 0 e 10 µg/µ, preparado em tampão citratos 0,05 M pH 4,5. A quantificação foi expressa em mg/mL para compostos extracelulares e em mg/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.8.2. Método do Carbazol-Ácido Sulfúrico

Para a quantificação de polissacáridos ácidos foi utilizado o Método do Carbazol-Ácido Sulfúrico, descrito por Cesaretti, Luppi, Maccari e Volpe [82], Monsalve-Bustamante, Rincón-Valencia, Mejía-Giraldo e Moereno-Tirado [124] e Taylor [125], com adaptações.

A mistura reacional composta por 40 µL de amostra a analisar, 400 µL de água desionizada, 2 mL de tetraborato de sódio 0,95 g/L H₂SO₄ e 40 µL de carbazol 0,2%

(m/V) em etanol, foi agitada e incubada em tubos num banho termostatizado a 90 °C durante 12 minutos. Após esta etapa, 300 µL da mistura reacional foram colocados numa placa NUNC de 96 poços e a absorvância foi lida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec) a 528 nm. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio do branco foi efetuado com água.

O padrão utilizado foi o ácido D-galacturónico numa gama de 0 a 2,5 µg/µL. A quantificação foi expressa em mg/mL para compostos extracelulares e em mg/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.8.3. Método do Azul de Toluidina

A quantificação de polissacáridos sulfatados foi realizada pelo Método do Azul de Toluidina, descrito por Hahn *et al.* [84] e Hussien [123], com adaptações.

Colocou-se numa placa NUNC de 96 poços 50 µL de amostra a analisar e 250 µL de azul de toluidina 0,05 mg/mL, preparado em PBS 0,15 M pH 7,2 1:10. A mistura reacional repousou 5 minutos no escuro e de seguida leu-se a absorvância num leitor de microplacas (Bio-Rad 680) a 655 nm.

Utilizou-se como branco, água destilada e como padrão uma solução de sulfato de dextrano com peso molecular médio de 200000 Da, numa gama de concentrações entre 0 e 0,125 µg/µL. As absorvâncias das amostras foram subtraídas às absorvâncias dos respetivos ensaios em branco, e todos os ensaios foram realizados em triplicado. A quantificação foi expressa em mg/mL para compostos extracelulares e em mg/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.8.4. Método do Corante Congo Red

Os β-(1,3)-D-glucanos com estrutura em tripla hélice foram quantificados pelo Método do Corante Congo Red otimizado por Semedo, Karmali e Fonseca [62].

Numa placa NUNC de 96 poços colocou-se 140 µL de amostra a analisar e 140 µL da solução de Congo red 0,017% (m/V) em tampão PBS 0,15 M pH 7,2 1:10. A absorvância da mistura reacional foi lida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec) a 510 nm. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio do branco foi efetuado com água.

O padrão utilizado foi o β-(1,3)-D-glucano de cevada numa gama de 0 a 0,050 µg/µL, preparado em NaOH 1M e posteriormente neutralizado. A quantificação foi expressa em mg/mL para compostos extracelulares e em mg/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.8.5. Método de ligação do Azul de Coomassie

Para a quantificação de proteína total foi utilizado o Método de ligação do Azul de Coomassie, também conhecido por Método de Bradford [88].

A mistura reacional composta por 100 µL de amostra a analisar e 100 µL da solução de Azul de Coomassie G-250 0,06% (m/V) foi colocada numa placa NUNC de 96 poços, e após 5 minutos a absorvância foi lida num leitor de microplacas (Bio-Rad 680) a 655 nm. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio do branco foi efetuado com água.

O padrão utilizado foi albumina de soro bovino (BSA) numa gama de 0 a 0,025 µg/µL. A quantificação foi expressa em mg/mL para compostos extracelulares e em mg/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.8.6. Método de Sulfofosfovanilina

A quantificação dos lípidos foi realizada pelo Método de Sulfofosfovanilina, descrito por Anschau, Caruso, Kuhn e Franco [126], com modificações.

Em tubos de ensaio, colocou-se 20 µL da amostra a analisar e incubou-se a 90 °C num banho termostaticado, durante 10 minutos para evaporação do solvente. De seguida, após arrefecimento até à temperatura ambiente, adicionou-se 180 µL de ácido sulfúrico concentrado. Incubou-se novamente durante 10 minutos a 100 °C num banho termostaticado e, arrefeceu-se até à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 500 µL do reagente de fosfovanilina (PV) (0,0012% (m/V) de vanilina 99% numa solução de ácido ortofosfórico 70,83%) e incubou-se a 37 °C num banho termostaticado durante 15 minutos. Após esta etapa, 150 µL da mistura reacional foram colocados numa placa NUNC de 96 poços. Incubou-se 30 minutos no escuro e a absorvância foi lida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec) a 528 nm. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio do branco foi efetuado com água.

O padrão utilizado foi o óleo de colza biológico, preparado em etanol 99,8% numa gama de 0 a 2,544 µg/µL. A quantificação foi expressa em mg/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.8.7. Método de Quantificação de Pigmentos

O teor de ficobiliproteínas presente nos extratos de *P. cruentum* foi calculado usando um método espectrofotométrico de acordo com Bennett e Bogorad [127], Bryant, Guglielmi, de Marsac, Castets e Cohen-Bazire [128] e Román, Álvarez-Pez, Fernández e Grima [129], através das equações 7, 8 e 9.

$$Ficocianina [PC] = \frac{Abs_{620} - \left(\frac{\epsilon_{APC620}}{\epsilon_{APC650}}\right) \times Abs_{650}}{\epsilon_{PC620} - (\epsilon_{APC620} * \epsilon_{PC650})/\epsilon_{APC650}} \quad (7)$$

$$Aloficocianina [APC] = \frac{Abs_{650} - \left(\frac{\epsilon_{PC650}}{\epsilon_{PC620}}\right) \times Abs_{620}}{\epsilon_{APC650} - (\epsilon_{APC620} * \epsilon_{PC650})/\epsilon_{PC620}} \quad (8)$$

$$Ficoerotrina [PE] = \frac{Abs_{545} - [PC] * \epsilon_{PC545} - [APC] * \epsilon_{APC545}}{\epsilon_{PE545}} \quad (9)$$

A absorvância foi medida a 565, 620 e 650 nm, num espectrofotômetro UV-6300PC VWR e os coeficientes de extinção mássicos utilizados foram os determinados por Juin *et al.* [36] utilizando soluções padrão e usados para simplificar as equações 7, 8 e 9 em 10, 11 e 12, permitindo calcular a concentração dos pigmentos em mg/mL.

$$Ficocianina [PC] = \frac{Abs_{620} - 0,62 \times Abs_{650}}{3,22} \quad (10)$$

$$Aloficocianina [APC] = \frac{Abs_{650} - 0,20 \times Abs_{620}}{5,73} \quad (11)$$

$$Ficoeritrina [PE] = \frac{Abs_{565} - 1,26 \times [PC] - 0,615 \times [APC]}{5,53} \quad (12)$$

3.3.9. Determinação da Atividade Antioxidante

3.3.9.1. Método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo Método de Folin-Ciocalteu, descrito por Reis, Martins, Barros e Ferreira [97], com algumas modificações.

Numa placa NUNC de 96 poços colocaram-se 30 µL de amostra a analisar, 150 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v) preparado em água destilada e 120 µL de uma solução de Na₂CO₃ 75 g/L. A mistura reacional foi incubada durante 30 minutos num banho termostatizado a 40 °C e de seguida leu-se a absorvância a 655 nm num leitor de microplacas (Bio-Rad 680). Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio do branco foi efetuado com água.

O padrão utilizado foi o ácido gálico numa gama de 0 a 0,25 mg/mL. A quantificação foi expressa em mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/mL para compostos extracelulares e em mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.9.2. Método de Cloreto de Alumínio

Para a determinação do conteúdo de flavonóides totais foi utilizado o Método de Cloreto de Alumínio descrito por Yeh, Hsieh, Wu e Tsai [96] introduzindo alterações.

Numa placa NUNC de 96 poços colocaram-se 25 µL de amostra a analisar, 100 µL de água destilada e 7,5 µL de NaNO₂ 5% (m/V). Após 5 minutos de repouso à temperatura ambiente, adicionaram-se 7,5 µL de AlCl₃ 10% (m/V). Deixou-se repousar durante mais 5 minutos e adicionou-se 100 µL de NaOH 4% (m/V). Após 10 minutos leu-se a absorvância num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec) a 510 nm. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio do branco foi efetuado com água.

O padrão utilizado foi a catequina preparada em etanol 50% (m/V) numa gama de 0 a 1 µg/µL. A quantificação foi expressa em mg equivalentes de catequina (CE)/mL para compostos extracelulares e em mg equivalentes de catequina (CE)/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.9.3. Método do Radical ABTS

A atividade antioxidante total foi determinada pelo método do radical ABTS, segundo Erel [104] e Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos e Byrne [130].

Inicialmente preparou-se uma solução de ABTS 7 mM contendo K₂S₂O₈ 2,5 mM em água. Esta solução foi reservada ao abrigo da luz durante cerca de 16 h, à temperatura ambiente. Posteriormente diluiu-se esta solução em PBS 0,15 M pH 7,2 1:10, até se obter uma absorvância a 655 nm próxima da unidade (solução ABTS[•]).

Numa placa NUNC de 96 poços adicionou-se 290 µL da solução de ABTS[•] e 10 µL da amostra a analisar e leu-se a absorvância num leitor de microplacas (Bio-Rad 680) a 655 nm. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio do branco foi efetuado com água.

O padrão utilizado foi o Trolox em metanol 80% (V/V) numa gama de 0 a 1,00 µg/µL. A quantificação foi expressa em mg equivalentes de Trolox (TE)/mL para compostos extracelulares e em mg equivalentes de Trolox (TE)/g de biomassa para compostos intracelulares.

3.3.10. Fracionamento de Biomoléculas Intracelulares por Cromatografia de Troca Iónica

O fracionamento de polissacáridos por cromatografia de troca iónica foi realizado com base no descrito por Li *et al.* [131] e Liu *et al.* [132]. O extrato selecionado para fracionamento por cromatografia de troca aniónica foi o extrato proveniente da extração multi-etapas com HCl 0,6 M, da biomassa produzida à escala laboratorial MN1 (ME FHCl MN1).

Para este efeito, a resina DEAE-52 da Whatman foi previamente preparada ficando em agitação com 2 volumes de água Milli-Q *overnight*. Após esta etapa, verificou-se o pH da resina (6,3) e empacotou-se a coluna cromatográfica (1,5 x 10 cm) por gravidade. A coluna foi equilibrada com água Milli-Q a um caudal de 20 mL/h com o auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3).

Aplicou-se 1,5 mL do extrato ME FHCl MN1 à coluna, ao caudal pré-estabelecido e a recolha das frações cromatográficas (1,5 mL) foi iniciada de imediato.

A eluição foi efectuada com um gradiente de NaCl de 0 a 1 M, utilizando um sistema de vasos comunicantes. No final, recolheram-se ainda 3 frações com NaCl 1 M e 3 frações com NaCl 2 M.

As 60 frações recolhidas foram, posteriormente, quantificadas em termos de polissacáridos neutros, polissacáridos sulfatados, proteína total e compostos fenólicos [5].

3.3.11. Técnicas Espectroscópicas para Caracterização Estrutural

Neste trabalho foram aplicadas duas técnicas espectroscópicas com o objectivo de caracterizar parcialmente alguns dos compostos produzidos pela *Porphyridium cruentum*, nomeadamente espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e espectroscopia de emissão de fluorescência.

3.3.11.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Com a finalidade de caracterizar parcialmente a estrutura de algumas biomoléculas intracelulares presentes nos extratos obtidos por ME e MAE, e biomoléculas extracelulares obtidos por ultrafiltração, bem como em frações cromatográficas, foi realizada a análise FTIR. Para tal, as amostras foram liofilizadas (UNICRYO MC 2L) e secas em linha de vácuo. Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro Bruker Vertex 70 (com *software* OPUS 5.5) num total de 32

varrimentos com uma resolução de 2 cm^{-1} , em pastilhas de KBr, numa gama de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$.

3.3.11.2. Espectroscopia de Fluorescência

Perspetivando o estudo das potenciais aplicações da B-ficoeritrina produzida pela *Porphyridium cruentum*, foram avaliadas as suas propriedades fotofísicas, utilizando a fração ME FW1, proveniente da biomassa produzida à escala laboratorial, recorrendo a técnicas de espectroscopia de absorção de estado fundamental (UV-Vis) e de fluorescência de estado estacionário (emissão e excitação).

Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente utilizando células de quartzo de 1 cm. Os espectros de estado fundamental foram traçados com um varrimento de 250 a 850 nm num espectrofotómetro de feixe simples JASCO (UV-6300PC) e os espectros de fluorescência (espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-45) foram realizados a um comprimento de onda de excitação de 380 nm, na janela espectral de 300 a 700 nm.

Os espectros de emissão/excitação foram realizados a partir de soluções aquosas e recolhidos com geometria a 90° (right angle). As soluções preparadas foram sempre recém-preparadas em água ultrapura Millipore®.

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados em água Millipore® recorrendo ao método do declive, utilizando como padrão rodamina B ($\phi_F = 0,65$ em etanol com geometria a 90°) [133].

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Controlo e Manutenção das Culturas de <i>Porphyridium cruentum</i>	53
4.2. Processo de Separação por Membranas.....	55
4.3. Quantificação de Biomoléculas Extracelulares	63
4.4. Quantificação de Biomoléculas Intracelulares.....	73
4.5. Propriedades Antioxidantes	87
4.6. Fracionamento de Biomoléculas Intracelulares por Cromatografia de Troca Iónica.....	95
4.7. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	97
4.9. Espectroscopia de Fluorescência.....	100

4. Resultados e Discussão

4.1. Controlo e Manutenção das Culturas de *Porphyridium cruentum*

A inoculação das culturas de *P. cruentum* em fotobiorreatores *flat panel* e na sala de inóculo, descritas no ponto 3.3.1., foi iniciada nos dias 11 de março de 2022 e 23 de março de 2022, respetivamente, e a biomassa produzida foi recolhida no início da fase estacionária de crescimento. Através da Figura 18 pode observar-se o crescimento das culturas de *P. cruentum* em autotrofia em modo descontínuo, à escala laboratorial, e em FBR FP, em triplicado.

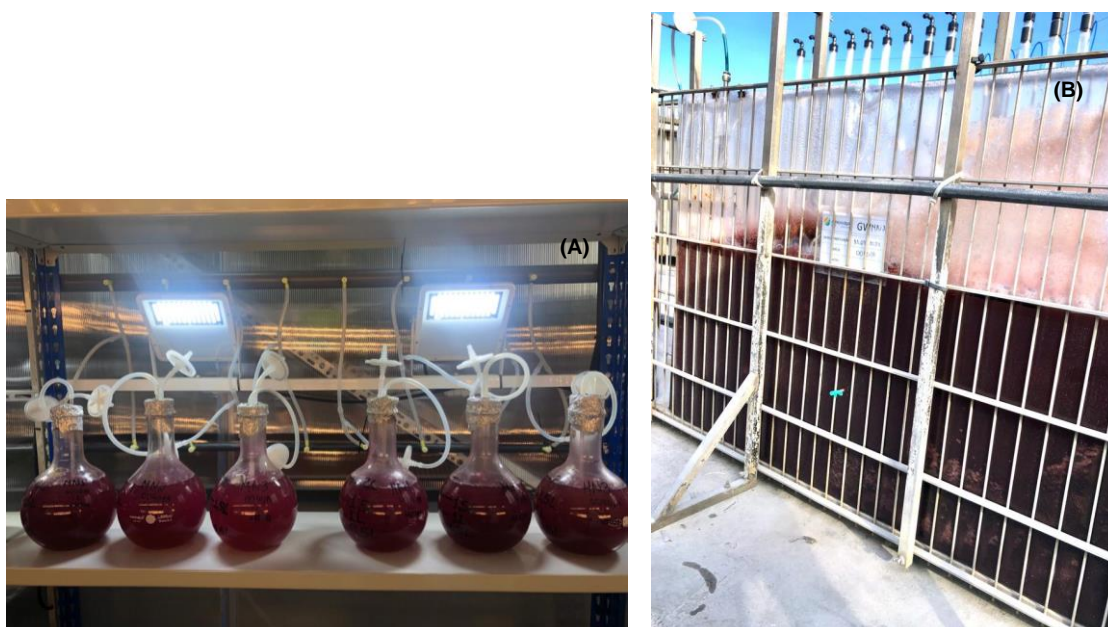


Figura 18 - Crescimento das culturas de *P. cruentum* em autotrofia em modo descontínuo, à escala laboratorial **(A)** e em FBR FP **(B)**.

O controlo e a manutenção das culturas foram realizados através da medição diária de vários parâmetros, como referido anteriormente. Através da medição da DO a 600 nm e da determinação de peso seco, foi possível construir as curvas de crescimento de *P. cruentum* (Figura 19), para as culturas desenvolvidas em meios contendo 6 mM de concentração de nitratos (MN) e 18 mM de concentração de nitratos (HN). A determinação da concentração de nitratos presente no meio de cultura, durante o tempo de cultura, foi também efetuada como se pode observar na Figura 19.

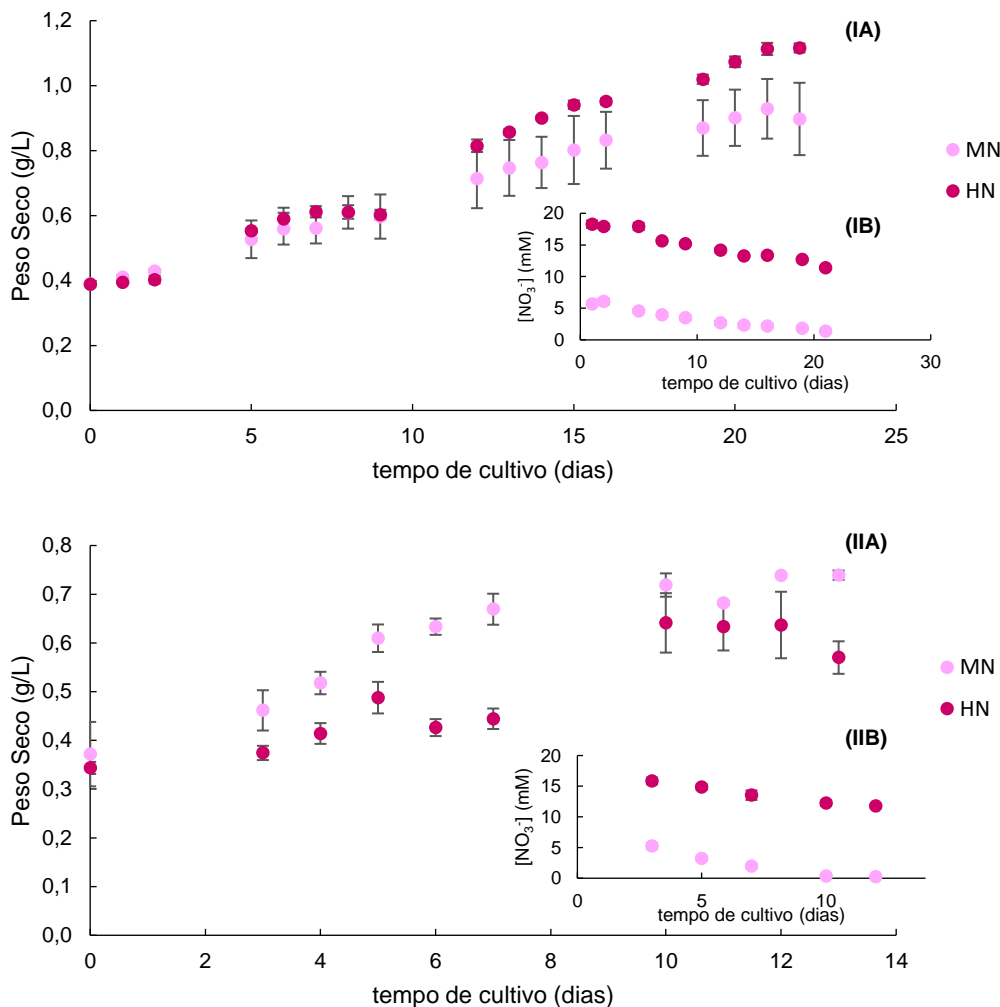


Figura 19 - Curvas de crescimento das culturas de *P. cruentum* à escala laboratorial (IA) e em fotobiorreatores *flat panel* (IIA) sob as diferentes concentrações de nitratos (IB e IIB).

A concentração de *P. cruentum* à escala laboratorial não apresentou diferenças significativas sob as diferentes condições de crescimento até ao 10^o dia. A partir do 12^o dia, o crescimento da biomassa sob a condição HN superou o da condição MN. No último dia de cultivo, a concentração de biomassa crescida na condição HN foi de $1,550 \pm 0,033$ g/L, ou seja, 24% superior à concentração da biomassa desenvolvida na condição MN. Ao longo do cultivo, observou-se que a cor da cultura foi ficando cada vez mais escura, verificando-se também que a cultura sob condições HN apresentou-se sempre mais escura quando comparada com a referida anteriormente. Estas culturas, e como já referido, atingiram o início da fase estacionária, no entanto, não se verificou privação da fonte de azoto.

Em fotobiorreatores *flat panel*, o crescimento da biomassa sob a condição MN foi sempre superior ao da condição HN, sendo que no último dia de crescimento (13º dia), a concentração de biomassa da condição MN obtida foi de $1,031 \pm 0,018$ g/L, sendo 29% superior à concentração da biomassa obtida na condição HN. No entanto, ao longo do crescimento, observou-se que a cor da cultura sob a condição HN foi sempre mais escura do que a cultura sob a condição MN. Ao fim de 13 dias, como já descrito, as culturas iniciaram a fase estacionária de crescimento, verificando-se privação de nitratos na cultura sob a condição MN, ao fim do 10º dia. No entanto, não foram alcançadas concentrações muito elevadas, à partida devido às condições ambientais durante o cultivo, onde a temperatura exterior variou entre 10 e 16 °C e a irradiação solar entre 32 e 149 W/m². Verificou-se também que, a biomassa produzida nos FBR FP MN3 e HN2 começou a decrescer, antes de atingir a fase estacionária de crescimento, este facto pode ser justificado através das observações ao microscópio onde foi possível verificar contaminações nestas culturas, Figura 20.

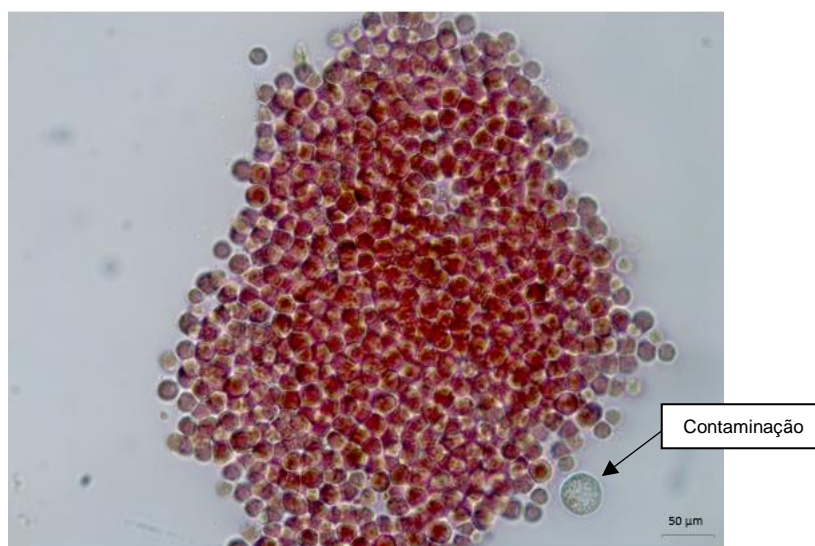


Figura 20 - Observação ao microscópio óptico de uma cultura de *Porphyridium cruentum* (630x).

4.2. Processo de Separação por Membranas

4.2.1. Caracterização da Membrana de 139 kDa

A caracterização da membrana foi feita através da determinação dos parâmetros característicos de permeação da membrana em relação à água pura através da permeabilidade hidráulica, e em relação a solutos orgânicos modelo de pesos moleculares diferentes, como exemplo os PEGs ou Dextran. através do limite de exclusão molecular (MWCO).

4.2.1.1. Permeabilidade Hidráulica

A determinação experimental da permeabilidade hidráulica foi feita representando o fluxo de permeado à água pura, J_p , em função da pressão transmembranar aplicada, ΔP . O declive da representação linear obtida, com ordenada nula na origem, dá-nos a permeabilidade hidráulica, $80,192 \text{ kg}/(\text{h} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{bar}^{-1})$, representada na Figura 21.

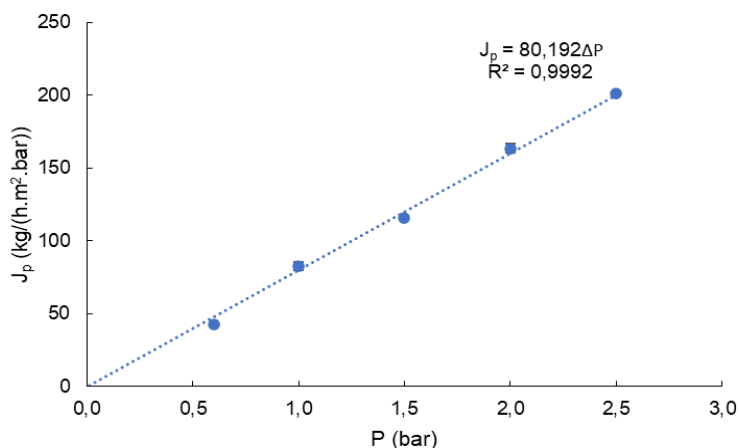


Figura 21 - Representação linear do fluxo de permeação à água pura em função da pressão transmembranar aplicada.

4.2.1.2. Limite de Exclusão Molecular

A interseção da reta $\log(f/(1-f))$ em função do peso molecular dos diversos solutos orgânicos de referência com a reta $y=1$ ($f=91\%$), permite a determinação do limite de exclusão molecular, neste caso, 139 kDa , determinada através da Figura 22.

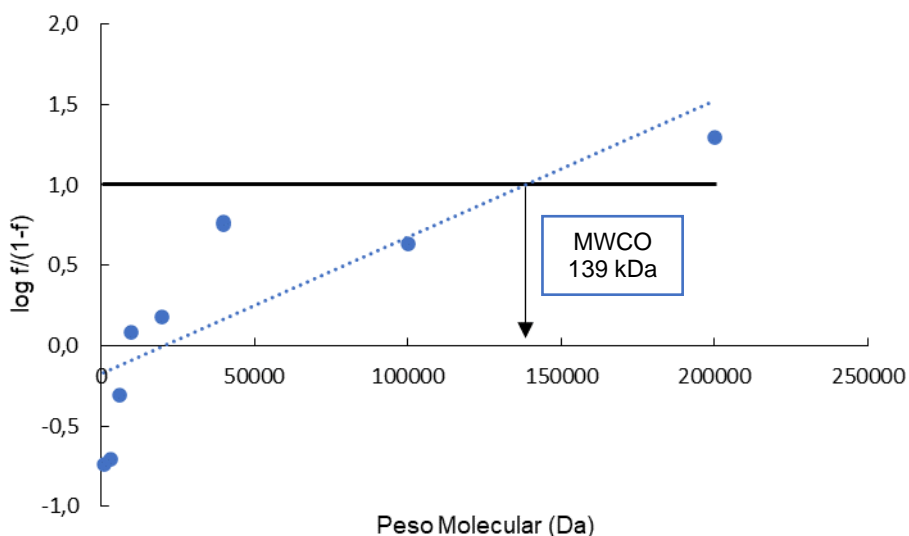


Figura 22 - Determinação do MWCO da membrana de acetato de celulose, 139 kDa .

4.2.2. Separação da Biomassa do Meio de Cultura

A biomassa das culturas produzidas nos FBR FP foi separada do meio de cultura recorrendo a uma ultrafiltração utilizando a membrana de acetato de celulose de 139 kDa, previamente preparada e caracterizada, como descrito nos pontos anteriores. Na Figura 23, está identificada uma fotografia da instalação de membranas de ultrafiltração utilizada aquando da separação da biomassa de *P. cruentum*, e o retentado e permeado após o processo de ultrafiltração.

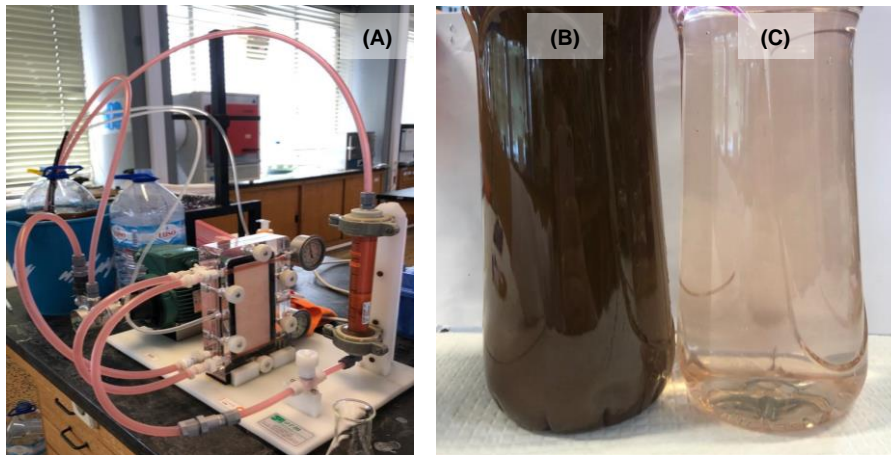


Figura 23 - Separação da biomassa do meio de cultura proveniente dos fotobiorreatores *flat panel* (A); retentado (B) e permeado (C) após o processo de ultrafiltração.

Nas Figuras 24-29 apresenta-se o fluxo de permeado (A) e a turbidimetria do permeado e do retentado (B), em função do tempo para cada cultura.

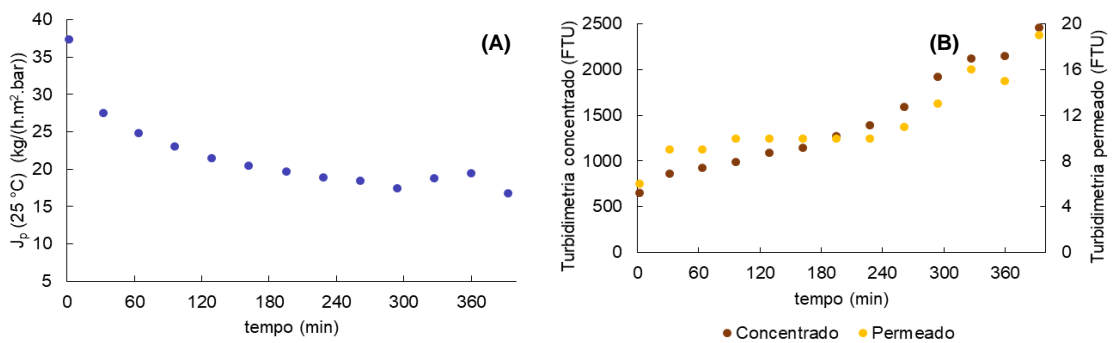


Figura 24 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado e do retentado (B) para a cultura MN1.

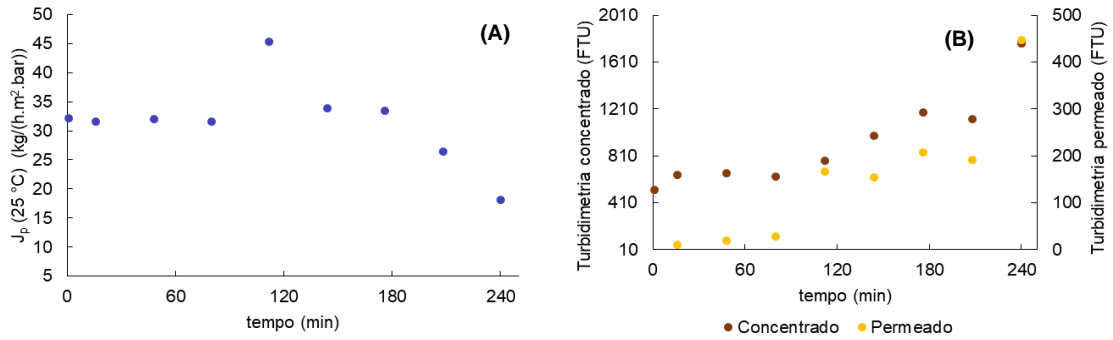


Figura 25 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado e do retentado (B) para a cultura MN2.

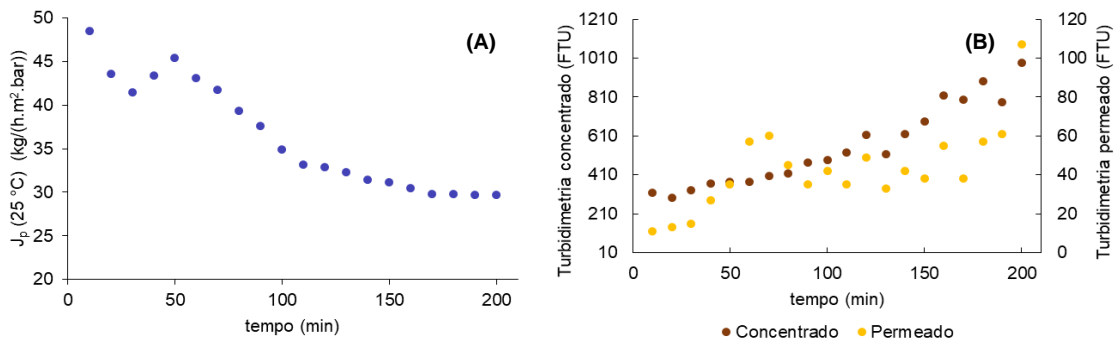


Figura 26 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado e do retentado (B) para a cultura MN3.

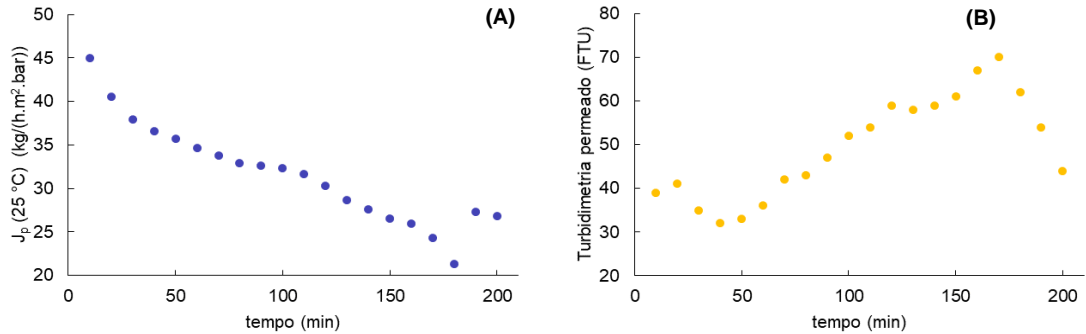


Figura 27 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado (B) para a cultura HN1.

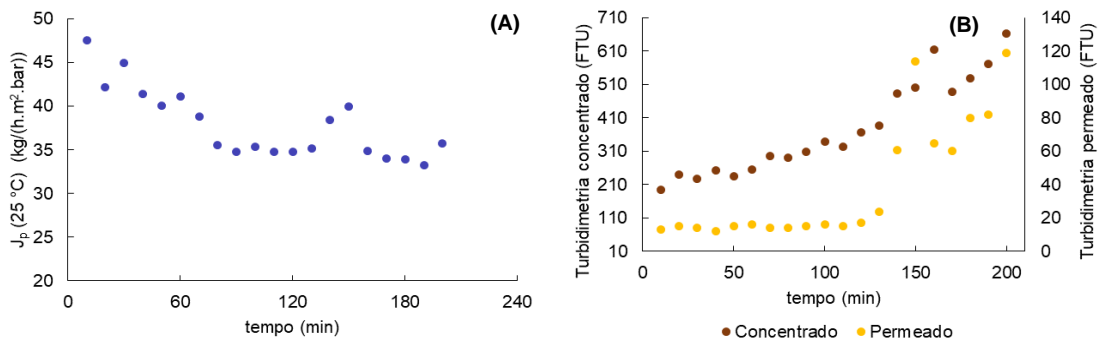


Figura 28 - Fluxo de permeado (A) e turbidimetria do permeado e do retentado (B) para a cultura HN2.

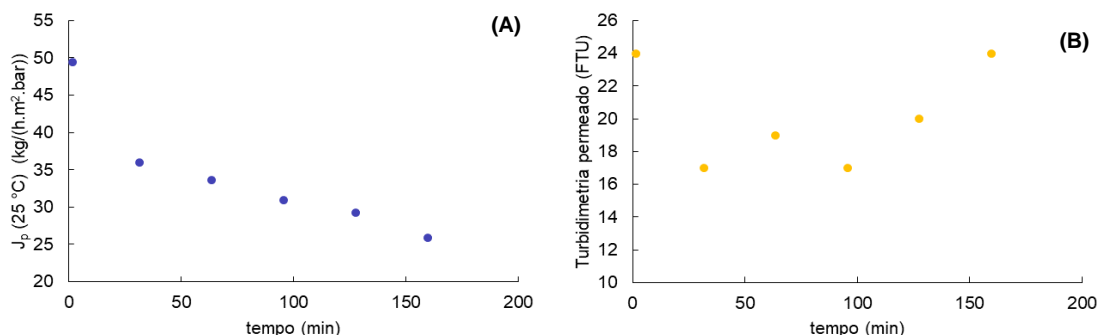


Figura 29 - Fluxo de permeado **(A)** e turbidimetria do permeado **(B)** para a cultura HN3.

Como se pode verificar pela análise do fluxo de permeado, em geral, este vai diminuindo ao longo do tempo, devido à acumulação de solutos à superfície da membrana e formação de uma camada com elevada viscosidade, devido à presença de uma concentração elevada de EPSs produzidos pela *P. cruentum*.

Relativamente à turbidimetria do retentado, esta vai aumentando ao longo do tempo, uma vez que a concentração da biomassa também aumentou. A turbidimetria do retentado da cultura HN1 e HN3 não foi medida ao longo do tempo.

A turbidimetria do permeado apresentou valores substancialmente mais baixos do que a do retentado, como seria de esperar. No entanto, foi observado um aumento ao longo do tempo, devido ao facto das culturas em estudo terem sido armazenadas a -20°C após a sua produção, o que tornou as células mais frágeis e, ao descongelarem e ao contactarem com a membrana ao longo do tempo, ocorreu lise celular.

A turbidimetria do permeado da biomassa do FBR FP MN2 aumentou muito ao longo do tempo, uma vez que a membrana ficou danificada, enquanto ocorria o processo de permeação. No final do processo, a membrana teve de ser substituída e recolheu-se a camada viscosa que se formou-sobre a membrana, designada camada gel.

A biomassa do FBR FP MN1 foi a última a ser separada do seu meio de cultura. Após o processo, removeu-se a membrana da instalação e recolheu-se também a camada gel formada.

Na Tabela 3, encontram-se os fatores de concentração e a rejeição à turbidimetria no final do processo de separação da biomassa do meio de cultura, para cada cultura produzida em FBR FP.

Tabela 3 - Fator de concentração e rejeição à turbidimetria no final do processo de separação da biomassa do meio de cultura, para cada FBR FP.

FBR FP	Fator de Concentração	Rejeição à Turbidimetria (%)
MN1	3,750	99,2
MN2	3,400	74,7
MN3	3,514	89,1
HN1	-	-
HN2	3,388	82,1
HN3	3,556	98,4

Pela análise da tabela anterior, é possível verificar que o fator de concentração foi superior a 3 em todos os FBR FP, com exceção do FBR FP HN1, uma vez que não houve medição da turbidimetria do Retentado, para esta amostra. A rejeição à turbidimetria foi inferior no FBR FP MN2, uma vez que foi durante a permeação deste que ocorreu a danificação da membrana. No FBR FP MN1 foi possível alcançar o maior fator de concentração (3,750) e a maior rejeição à turbidimetria (99,2 %).

4.2.3. Fracionamento dos Exopolissacáridos

O retentado (biomassa) foi submetido a centrifugação e o permeado (meio de cultura) das culturas MN1, MN2 e HN3 foi alimentado na unidade de ultrafiltração trabalhando em paralelo, com duas membranas poliméricas de acetato de celulose de 10 e 4 kDa, como descrito na Figura 16 (Capítulo 3), previamente preparadas e caracterizadas. Na Figura 30 apresenta-se o fluxo dos permeados, J_p , das membranas de 10 kDa e 4 kDa, em função do tempo para cada cultura.

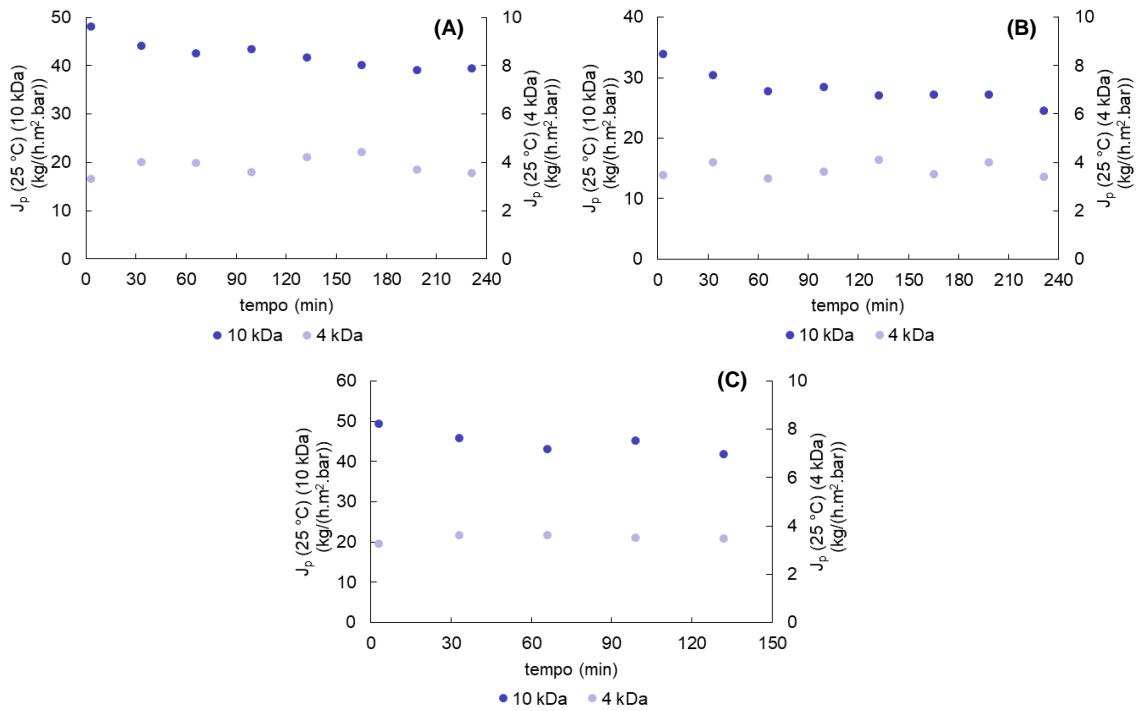


Figura 30 - Fluxo dos permeados das membranas de 10 kDa e 4 kDa para a cultura MN1 **(A)**, MN2 **(B)** e HN3 **(C)**.

Pela análise da Figura 30, o fluxo dos permeados das membranas de 10 e 4 kDa, mantém-se praticamente constante ao longo do tempo. No entanto, o fluxo volumétrico da membrana de 10 kDa, diminui ligeiramente ao longo do tempo de permeação, devido à acumulação de solutos à superfície da membrana (polarização por concentração).

Na Tabela 4, estão indicados o fator de concentração e a rejeição à turbidimetria no final do processo de fracionamento dos exopolissacáridos.

Tabela 4 - Fator de concentração e rejeição à turbidimetria no final de fracionamento dos exopolissacáridos.

FBR FP	Fator de Concentração	Rejeição à Turbidimetria (%)	
		10 kDa	4 kDa
MN1	2,782	96,3	92,6
MN2	2,378	95,7	93,4
HN3	2,000	72,6	48,4

Através dos resultados presentes na Tabela 4, é possível verificar que o FBR FP MN1 foi o que alcançou valores mais elevados de fator de concentração (2,782) e rejeição à turbidimetria (96,3 % e 92,6 %). O FBR FP HN3 foi o que alcançou os valores mais baixos nos dois parâmetros. Seria de esperar, para cada FBR FP, que a rejeição à turbidimetria fosse superior na membrana de 4 kDa do que na membrana de 10 kDa. Contudo, esse resultado não se verificou em nenhum dos FBR FP, o que pode dever-se ao facto de a membrana de 4 kDa ser mais densa, tornando-se mais visível a polarização por concentração, acumulando mais solutos à superfície e, deste modo, formar-se uma barreira à permeação.

Os permeados das culturas MN3, HN1 e HN2, na separação da biomassa do meio de cultura, foram recolhidos de 10 em 10 minutos, de modo a tentar identificar diferenças na concentração de polissacáridos neutros e proteína total. No permeado da cultura MN3, foram recolhidas amostra de 2,5 em 2,5 minutos, durante os primeiros 20 minutos, com o objetivo de se tentar identificar também diferenças na concentração de polissacáridos neutros e proteína total. As frações 1, 5, 10, 15 e 20, correspondentes aos tempos de permeação 10, 50, 100, 150 e 200 minutos, respetivamente, foram submetidas a uma ultrafiltração numa instalação com alimentação frontal, utilizando uma membrana de acetato de celulose de 10 kDa, previamente caracterizada. Na Tabela 5 apresenta-se o fluxo dos permeados de cada fração para cada cultura.

Tabela 5 - Fluxo volumétrico dos permeados de cada fração para cada cultura.

J_p (25 °C) (kg/(h.m².bar)			
Fração	MN3	HN1	HN2
1	20,908	12,241	10,178
5	11,365	11,712	14,714
10	10,195	9,921	13,597
15	14,272	9,364	8,102
20	10,510	9,927	7,241

Como se pode verificar, o fluxo dos permeados não varia muito ao longo das frações. Os fluxos dos permeados obtidos nesta instalação de alimentação frontal foram bastante inferiores aos obtidos com a membrana de 10 kDa na unidade de ultrafiltração trabalhando em modo tangencial à membrana.

Na Tabela 6, encontra-se a rejeição à turbidimetria no final do processo de fracionamento dos exopolissacáridos.

Tabela 6 - Rejeição à turbidimetria no final de fracionamento dos exopolissacáridos.

Rejeição à Turbidimetria (%)			
Fração	MN3	HN1	HN2
1	94,4	88,8	80,6
5	96,1	87,6	83,7
10	93,7	88,3	90,1
15	90,7	88,5	83,6
20	94,6	79,1	83,8

Analisando a Tabela 6, verifica-se que as rejeições à turbidimetria são elevadas e praticamente constantes ao longo do tempo de permeação. Além disso, fluxos de permeado mais elevados, correspondem rejeições à turbidimetria maiores (FBR FP MN3).

O modo de permeação frontal leva à formação de uma camada de solutos à superfície da membrana que se vai manter ou mesmo acumular ao longo do ensaio de permeação. Essa camada formada funcionará como uma barreira extra à permeação de solutos. Já no caso da permeação tangencial à membrana, a camada de solutos é minimizada devido ao facto de a alimentação fluir tangencialmente à membrana, deslocando parte dos solutos acumulados à superfície.

4.3. Quantificação de Biomoléculas Extracelulares

4.3.1. Biomoléculas Extracelulares Produzidas à Escala Laboratorial

Tal como descrito em 3.3.4., os compostos bioativos excretados para o meio de cultura e produzidos à escala laboratorial, foram precipitados com álcoois e, após várias tentativas de dissolução e quantificação, foi possível quantificar apenas as biomoléculas após precipitação imediata com 3 volumes de etanol a 90% (V/V) e dissolução com NaOH 1M em refluxo a 86 °C.

A quantificação foi realizada às biomoléculas precipitadas e dissolvidas, bem como, no meio de cultura direto, de forma a identificar se foi possível concentrar estes compostos bioativos, Figura 31.

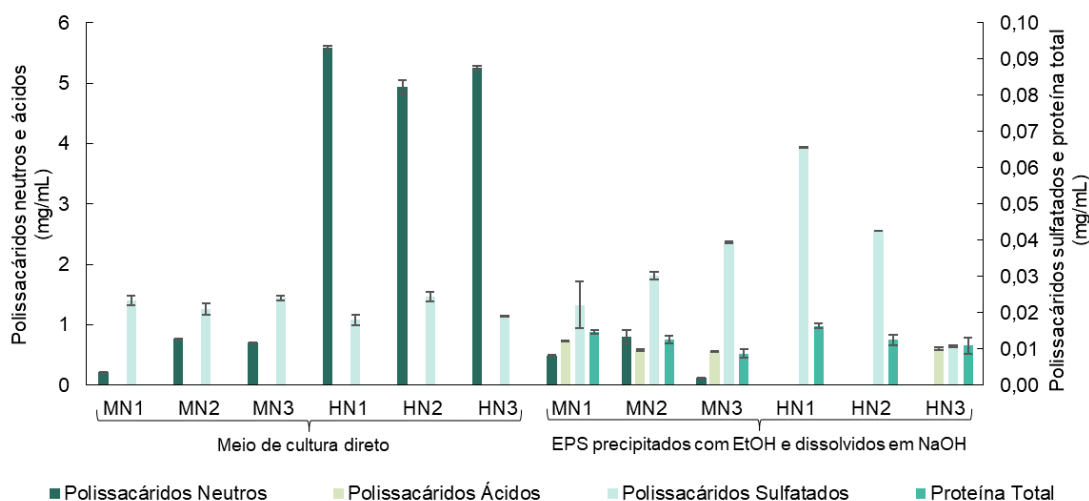


Figura 31 - Efeito das condições de crescimento de *P. cruentum*, 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO_3^- , na produção de polissacáridos extracelulares neutros, ácidos, sulfatados e proteína extracelular total, quantificados diretamente no meio de cultura e após precipitação com etanol a 90% (V/V) e dissolução em NaOH 1M.

Pela análise da Figura 31, verifica-se que relativamente aos polissacáridos neutros, aparentemente não foi possível concentrar estes compostos, uma vez que foi detetada uma maior concentração de polissacáridos neutros no meio de cultura direto do que nos EPS que foram precipitados, com exceção dos meios de cultura MN1 e MN2. Além disso, para os meios de cultura HN1, HN2 e HN3 precipitados, não foram detetados polissacáridos neutros.

Em relação aos polissacáridos ácidos, não foi possível quantificar este composto bioativo no meio de cultura direto devido a uma interferência no método de doseamento que resultou na formação de uma cor azul, impossibilitando fazer a leitura da absorvância correta.

Nos EPS precipitados foram detetados polissacáridos neutros e ácidos, com uma concentração superior na condição de crescimento MN do que na condição de crescimento HN, alcançando a concentração máxima de $0,800 \pm 0,154$ mg/mL de polissacáridos neutros em MN2 e $0,737 \pm 0,007$ mg/mL de polissacáridos ácidos em MN1.

Os polissacáridos sulfatados foram concentrados com este método de precipitação, à exceção de MN1 e HN3. Esta biomolécula apresenta maiores concentrações na condição de crescimento HN do que na condição de crescimento de MN (exceto MN1),

alcançando um teor máximo de $0,066 \pm 0,000$ mg/mL em HN1. No que diz respeito à proteína total, também foi possível concentrar este composto bioativo, uma vez que não foi detetado no meio de cultura direto.

O conteúdo em proteína total também alcançou maiores teores na condição de crescimento HN, relativamente à condição de crescimento MN, atingindo o máximo de $0,016 \pm 0,001$ mg/mL em HN1.

De ressaltar que a dissolução dos EPS em NaOH 1 M com refluxo a 86°C *overnight*, não foi completa, o que poderá indicar que a concentração dos compostos quantificados não corresponde à totalidade de biomoléculas precipitadas e o facto de ter havido necessidade de se utilizar uma temperatura elevada durante várias horas, pode ter provocado a degradação dos mesmos, justificando também estes resultados.

Outro aspeto a salientar, é que poderá ter também ocorrido lise celular durante o descongelamento das amostras que estavam conservadas a -20°C , tendo-se eventualmente identificado e quantificado biomoléculas intracelulares no meio de cultura.

Através da quantificação destas biomoléculas diretamente no sobrenadante, não é possível identificar diferenças significativas entre a produção de compostos extracelulares da condição MN e HN. No entanto, após precipitação dos EPS, as maiores concentrações de polissacáridos neutros e ácidos encontram-se na condição de crescimento MN (entre $0,117 \pm 0,005$ mg/mL e $0,800 \pm 0,154$ mg/mL de polissacáridos neutros e entre $0,558 \pm 0,007$ mg/mL e $0,737 \pm 0,007$ mg/mL de polissacáridos ácidos), tal como seria de esperar [134].

Segundo Li *et al.* [134], para a *P. cruentum* crescida em frascos de 250 mL. a concentração máxima de EPS neutros, após diálise de 100-500 Da, determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico, foi de 0,342 mg/mL ao dia 16 de cultivo. Coward *et al.* [135] demonstrou que esta microalga, desenvolvida em fotobiorreatores de coluna vertical em modo descontínuo e, após precipitação do meio de cultura com etanol, excretou 2,05 mg/mL de EPS ao 10º dia de crescimento, quantificados por FTIR. Sun, Wang, Ma e Shi [136] demonstraram que a concentração de *P. cruentum*, cultivada em modo semi-contínuo em FBR FP, atingiu uma concentração de EPS neutros de 1,25 mg/mL ao 16º dia de crescimento (determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico).

Verifica-se assim, que para se obter um alto rendimento de EPS, é necessário determinar a concentração ótima da fonte de azoto a introduzir no meio de cultura, de

modo a manter, não só a eficiência fotossintética, mas também a indução de *stress* por limitação da fonte de azoto [134].

Verificou-se que para os meios de cultura HN1, HN2 e HN3 que foram doseados diretamente sem sofrerem precipitação alcoólica, se obtiveram teores de polissacáridos neutros superiores aos reportados por Li *et al.*, Coward *et al.* e Sun, Wang, Ma e Shi [134]–[136]. Os meios de crescimento MN1 e MN2, após precipitação com etanol, apresentaram concentrações de polissacáridos neutros superiores aos descritos por Li *et al.* [134]. No entanto, Coward *et al.* [135] e Sun, Wang, Ma e Shi [136], obtiveram concentrações superiores de polissacáridos neutros, relativamente às concentrações obtidas neste estudo, após precipitação alcoólica dos meios de crescimento.

4.3.2. Biomoléculas Extracelulares Produzidas em Fotobiorreatores *Flat Panel*

Os teores de polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados resultantes da separação, numa unidade de ultrafiltração, da biomassa do meio de crescimento provenientes dos FBR FP MN1, MN2 e HN3, foram determinados por métodos colorimétricos. Para o efeito, estas biomoléculas foram doseadas na alimentação da unidade de ultrafiltração, nos permeados, no retentado, e na camada viscosa retida na membrana (designada por camada de gel) e no sobrenadante (Figura 32).

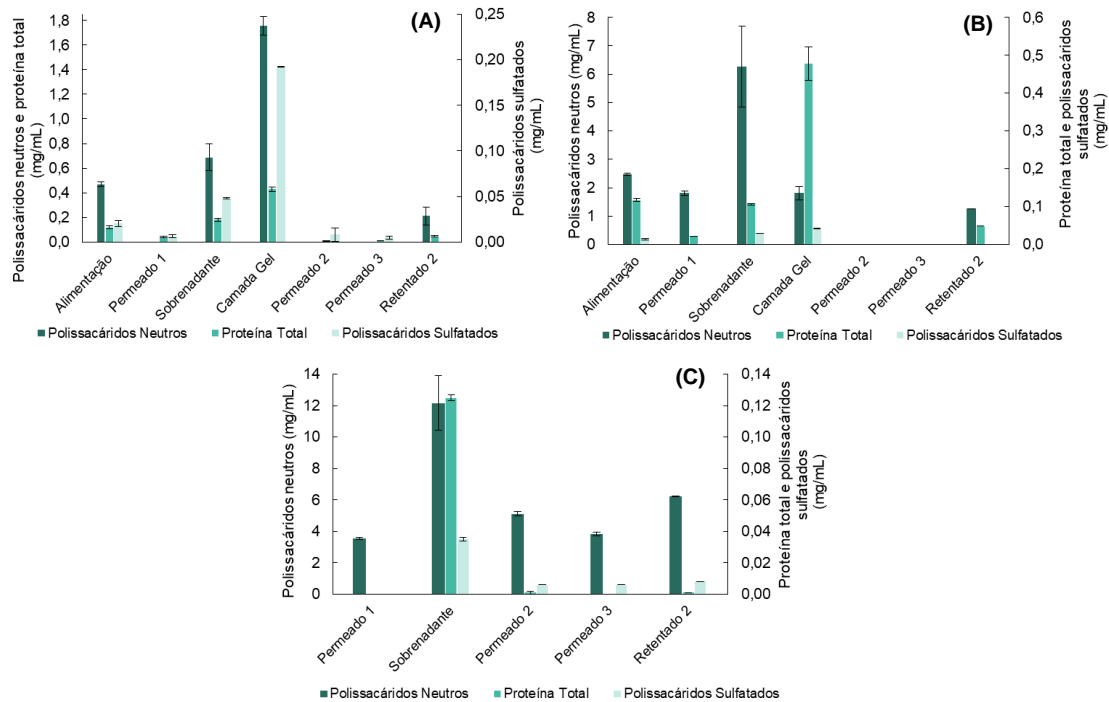


Figura 32 - Polissacarídeos neutros, proteína total e polissacarídeos sulfatados separados por ultrafiltração e quantificados na alimentação, nos permeados, no sobrenadante, no retentado e na camada de gel, provenientes dos meios de crescimento FBR FP MN1 (A), MN2 (B) e HN3 (C).

Relativamente ao meio de crescimento FBR FP MN1, Figura 32 (A), foi possível quantificar proteínas ($0,040 \pm 0,007$ mg/mL) e polissacarídeos sulfatados ($0,006 \pm 0,002$ mg/mL) no permeado 1, o que leva a concluir que os compostos quantificados têm um peso molecular inferior a 139 kDa. No sobrenadante obtido, foram quantificados polissacarídeos neutros ($0,687 \pm 0,154$ mg/mL), polissacarídeos sulfatados ($0,048 \pm 0,001$ mg/mL) e proteínas ($0,180 \pm 0,014$ mg/mL). A camada gel retida à superfície da membrana foi a amostra que apresentou as maiores concentrações destas biomoléculas com $1,756 \pm 0,1033$ mg/mL de polissacarídeos neutros, $0,428$ mg/mL $\pm 0,027$ de proteína total e $0,192 \pm 0,000$ mg/mL de polissacarídeos sulfatados. A partir dos permeados 2 e 3 foi possível concentrar polissacarídeos neutros com peso molecular entre 139 e 10 kDa e foi possível concentrar e separar proteínas e polissacarídeos neutros com peso molecular entre 139 e 10 kDa e entre 10 e 4 kDa.

Em relação ao meio de crescimento FBR FP MN2, Figura 32 (B), foram quantificados polissacarídeos neutros ($1,811 \pm 0,103$ mg/mL) e proteínas ($0,022 \pm 0,000$ mg/mL) com peso molecular inferior a 139 kDa, uma vez que foram determinados no permeado 1. O sobrenadante obtido apresentou proteínas ($0,106 \pm 0,003$ mg/mL), polissacarídeos sulfatados ($0,030 \pm 0,000$ mg/mL) e apresentou a maior concentração de polissacarídeos neutros ($6,261 \pm 2,014$ mg/mL). Na camada gel foram também quantificados

polissacáridos neutros em elevada concentração ($1,811 \pm 0,334$ mg/mL) e a maior concentração de proteínas ($0,478 \pm 0,044$ mg/mL) e de polissacáridos sulfatados ($0,042 \pm 0,002$ mg/mL). No permeado 2 e 3 não foram identificadas estas biomoléculas, o que leva a concluir que os compostos produzidos têm peso molecular superior a 10 kDa. Foi ainda possível concentrar polissacáridos neutros ($1,256 \pm 0,000$ mg/mL) e proteínas ($0,048 \pm 0,000$ mg/mL) com um peso molecular entre 139 e 10 kDa.

No que diz respeito ao meio de crescimento FBR FP HN3, Figura 32 (C), foram quantificados apenas polissacáridos neutros ($3,545 \pm 0,111$ mg/mL) com peso molecular inferior a 139 kDa, no permeado 1. O sobrenadante obtido apresentou a maior concentração de biomoléculas com $12,170 \pm 1,757$ mg/mL de polissacáridos neutros, $0,125 \pm 0,003$ mg/mL de proteína total e $0,035 \pm 0,003$ mg/mL de polissacáridos sulfatados. Os polissacáridos neutros e sulfatados foram identificados no permeado 2 e 3 com um peso molecular inferior a 10 e 4 kDa, respetivamente, e no retentado 2 com peso molecular entre 139 e 10 kDa. Foram detetadas proteínas no permeado 2, mas não no permeado 3, o que leva a concluir que estas têm um peso molecular entre 4 e 10 kDa.

Para o meio de crescimento FBR FP MN3 foram quantificados os teores de polissacáridos neutros e proteína total no permeado 1 ao longo do tempo de permeação, Figura 32, bem como os teores de polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados presentes na alimentação, permeado 2, retentado 2 e sobrenadante, Figura 33.

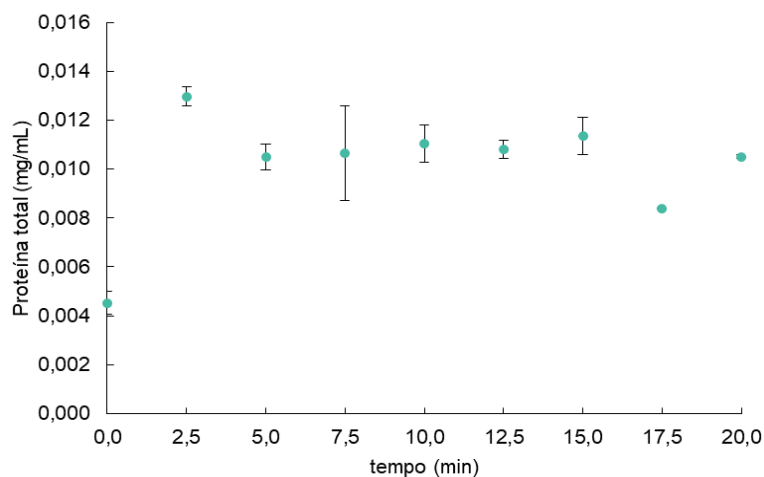


Figura 33 - Proteína total doseada nas frações recolhidas, durante 20 minutos do permeado 1, provenientes do meio de crescimento FBR FP MN3.

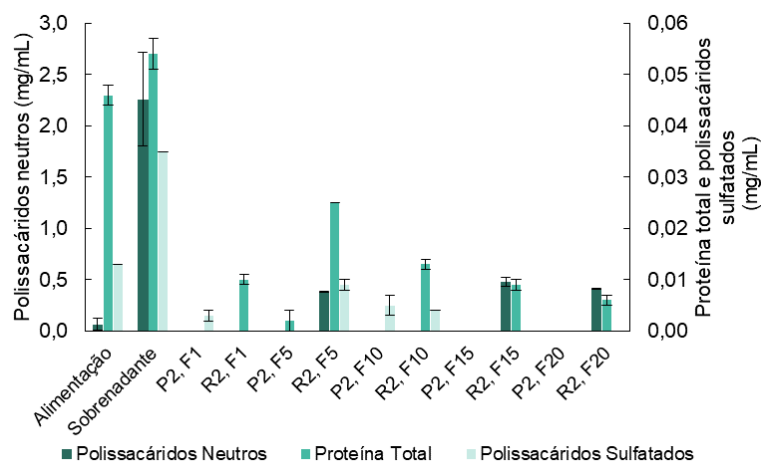


Figura 34 - Polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados quantificados na alimentação, permeados 2, sobrenadante e retentados 2, provenientes do meio de crescimento FBR FP MN3.

Para o FBR FP MN3 não foram identificados polissacáridos neutros no permeado 1. Pela análise da Figura 33, verifica-se a presença de proteínas no permeado 1, mas não foi possível identificar um padrão de comportamento ao longo das frações recolhidas. Analisando a Figura 34, é possível verificar que o sobrenadante apresenta as maiores concentrações de polissacáridos neutros ($2,261 \pm 0,643$ mg/mL), de proteína ($0,054 \pm 0,004$ mg/mL) e de polissacáridos sulfatados ($0,035 \pm 0,000$ mg/mL). Não foram detetados polissacáridos neutros nem proteínas nos permeados 2, mas estas biomoléculas foram quantificadas nos retentados (com exceção dos polissacáridos neutros em R2, F1 e R2, F10), permitindo concluir que estas têm um peso molecular entre 139 e 10 kDa. Os polissacáridos sulfatados foram quantificados no sobrenadante nas frações P2, F1; R2, F5; P2, F10 e R2, F10, permitindo concluir que algumas destas biomoléculas têm peso molecular inferior a 10 kDa (presentes em P2) e entre 139 e 10 kDa (presentes em R2).

No meio de crescimento FBR FP HN1 foram determinados os teores de polissacáridos neutros e proteína total no permeado 1, ao longo do tempo de permeação, Figura 35, e quantificados os teores de polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados presentes na alimentação, permeado 2, retentado 2 e sobrenadante, Figura 36.

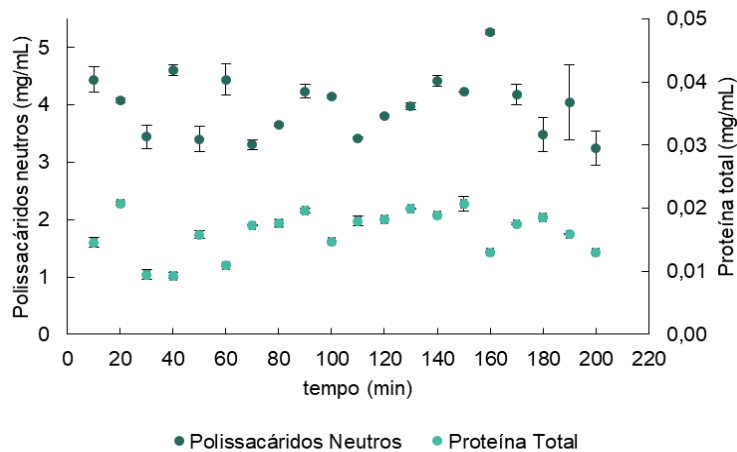


Figura 35 – Polissacáridos neutros e proteína total presentes no permeado 1, ao longo do tempo de permeação, para o meio de crescimento FBR FP HN1.

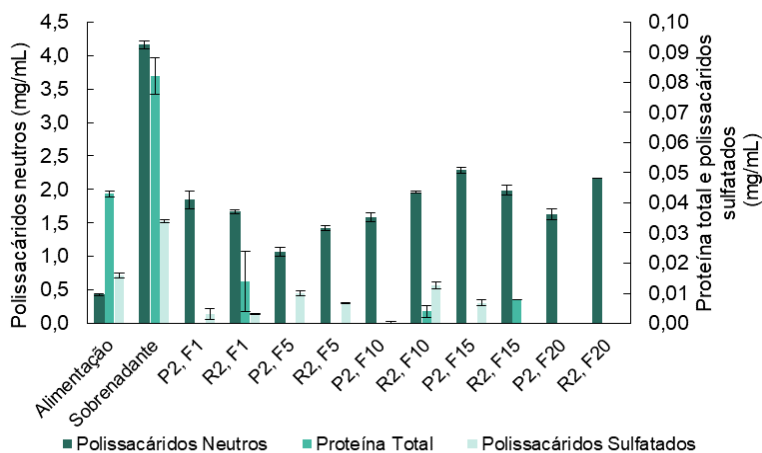


Figura 36 - Polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados quantificados na alimentação, permeados 2, sobrenadante e retentados 2 no FBR FP HN1.

Pela análise da Figura 35, verifica-se a presença de polissacáridos neutros e de proteína total no permeado 1, mas mais uma vez não foi possível identificar um padrão de comportamento ao longo das frações recolhidas. Observando a Figura 36, verifica-se que o sobrenadante apresenta as maiores concentrações destas biomoléculas, com $4,160 \pm 0,086$ mg/mL de polissacáridos neutros, $0,082 \pm 0,009$ mg/mL de proteína total e $0,034 \pm 0,001$ mg/mL de polissacáridos sulfatados. A partir dos permeados 2 foi possível concentrar e separar polissacáridos neutros com peso molecular entre 139 e 10 kDa e inferior a 10 kDa. Foram identificadas proteínas foram identificadas em R2, F1;

P2, F5; R2, F5; R2, F10; R2, F15 e R2, F20 e os polissacáridos sulfatados em P2, F1; R2, F5; P2, F10 e R2, F10, levando a deduzir que algumas destas biomoléculas têm peso molecular inferior a 10 kDa (presentes em P2) e entre 139 e 10 kDa (presentes em R2).

Para o meio de crescimento FBR FP HN2 foram também identificados os teores de polissacáridos neutros e proteína total no permeado 1 obtido, ao longo do tempo de permeação, Figura 37, e foram determinados os teores de polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados presentes na alimentação, permeado 2, retentado 2 e sobrenadante, Figura 38.

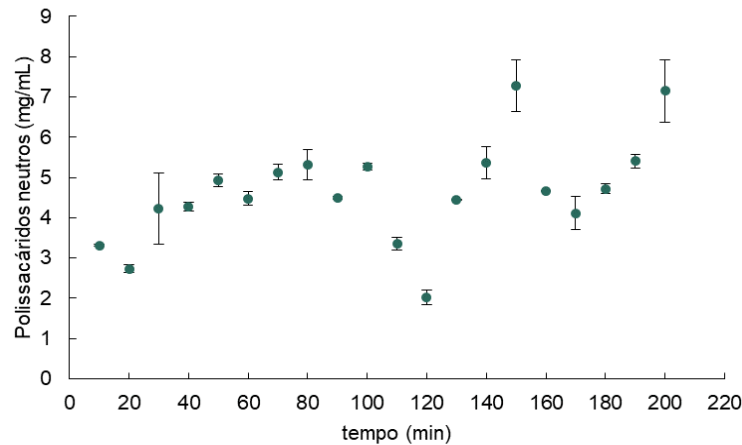


Figura 37 - Polissacáridos neutros no permeado 1, ao longo do tempo de permeação, para o FBR FP HN2.

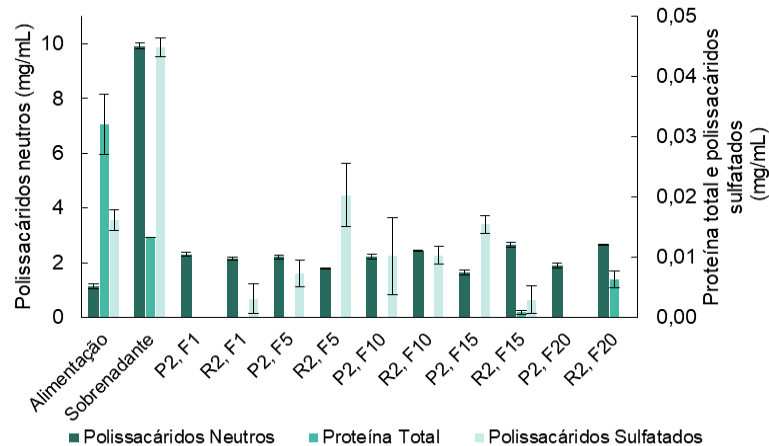


Figura 38 - Polissacáridos neutros, proteína total e polissacáridos sulfatados quantificados na alimentação, permeados 2, sobrenadante e retentados 2 no FBR FP HN2.

Para o FBR FP HN2 não foram identificadas proteínas no permeado 1. Pela análise da Figura 37, verifica-se a presença de polissacáridos neutros no permeado 1, mas novamente, não foi possível identificar um padrão de comportamento ao longo das frações recolhidas. Através da Figura 38, verifica-se que é no sobrenadante que se encontram as maiores concentrações de polissacáridos neutros ($9,917 \pm 0,171$ mg/mL)

e de polissacáridos sulfatados ($0,045 \pm 0,002$ mg/mL). O sobrenadante apresenta ainda apresenta $0,013 \pm 0,000$ mg/mL de proteína total. Verificou-se ainda a presença de polissacáridos neutros em todos os retentados 2 e permeados 2, apresentando um peso molecular entre 139 e 10 kDa e inferior a 10 kDa. As proteínas foram apenas identificadas em R2, F15 e R2, F20, apresentando um peso molecular entre 139 e 10 kDa. Quanto aos polissacáridos sulfatados detetados à partida possuem peso molecular inferior a 10 kDa (presentes em P2) e entre 139 e 10 kDa (presentes em R2), uma vez que estas biomoléculas não foram identificadas em P2, F1; P2, F20 e R2, F20.

Através da análise do conteúdo em biomoléculas, produzidas nas diferentes condições de crescimento, verificou-se uma menor produção de EPS nas condições MN, ao contrário do esperado. Nestas condições de crescimento, seria expetável a indução de *stress* durante o crescimento da biomassa de *P. cruentum* com privação de nitratos, que levasse a uma maior produção de EPS, mas que não se confirmou [134].

Através da quantificação destas biomoléculas diretamente no sobrenadante, sem qualquer tratamento prévio, não foi possível identificar diferenças significativas entre a produção de compostos extracelulares da nas condições MN e HN.

O facto da quantidade de biomassa do FBR FP MN3 e HN2 ter começado a decrescer antes de atingir a fase estacionária, não revelou diferenças na produção de biomoléculas extracelulares.

Para comparação do teor de EPS obtidos nos FBR FP com resultados publicados anteriormente na literatura, foi efetuado o somatório do teor de polissacáridos neutros presentes nos permeados, retentados e camada gel para cada uma das culturas, Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de EPS presente em cada FBR FP.

FBR FP	EPS (mg/mL)
MN1	$1,967 \pm 0,145$
MN2	$4,878 \pm 0,309$
MN3	$1,273 \pm 0,054$
HN1	$97,473 \pm 3,490$
HN2	$114,588 \pm 5,613$
HN3	$18,693 \pm 0,382$

Comparando a concentração de EPS apresentada na Tabela 7 e a literatura reportada em 4.3.1 [134]–[136], verifica-se que para os FBR FP MN1, MN2 e MN3, foi obtido um intervalo de valores próximo ao descrito na literatura. No entanto, a concentração de EPS obtida para os FBR FP HN1, HN2 e HN3 foi bastante discrepante. De ressaltar ainda que poderá ter ocorrido lise celular na descongelação das culturas, após o armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, na permeação para separar a biomassa do meio de cultura, podendo ter ocorrido mistura de compostos intracelulares com extracelulares, ou seja, algumas das biomoléculas quantificadas no meio de cultura podem ser na realidade compostos intracelulares, levando a um sobredoseamento dos compostos extracelulares.

4.4. Quantificação de Biomoléculas Intracelulares

As biomoléculas intracelulares foram obtidas através de vários métodos de extração. Como referido anteriormente em 3.3.5, para a biomassa de *P. cruentum* produzida à escala laboratorial, foi utilizada a extração multi-etapas (Figura 17) e a extração assistida por micro-ondas utilizando como solvente o etanol absoluto ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min) e KOH 0,1 M ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) (Tabela 2). Para a biomassa de *P. cruentum* produzida em FBR FP, foi utilizada a extração assistida por micro-ondas utilizando como solvente KOH 0,1 M ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) e HCl 0,1 M ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) (Tabela 2).

A extração em multi-etapas (ME) foi um dos métodos selecionados, uma vez que permite obter biomoléculas, usando água fria e quente, e condições ácidas e alcalinas, de modo a maximizar a concentração destas biomoléculas, consoante a sua solubilidade, inclusive polissacáridos que estão localizados à superfície da parede celular, através da primeira etapa de extração com água fria (FW1) [54].

A extração assistida por micro-ondas (MAE) foi o outro método selecionado, uma vez que é uma técnica alternativa sustentável e, em estudos desenvolvidos anteriormente por Gil [122] e Hussen [123] revelou ser o melhor método para a extração de biomoléculas, a partir de microalgas, nomeadamente polissacáridos. Deste modo, foram aplicados os parâmetros que conduziram a rendimentos de extração mais elevados obtidos por Gil (KOH 0,1 M, $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) [122] e Hussen (etanol absoluto, $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min) [123] à biomassa produzida à escala laboratorial. Para a biomassa produzida em FBR FP utilizou-se KOH 0,1 M como solvente na extração assistida por micro-ondas, uma vez que revelou a extração de um elevado teor de biomoléculas na biomassa produzida à escala laboratorial. Assim, para a biomassa produzida em FBR FP utilizou-se KOH 0,1 M como solvente de extração, bem como HCl 0,1 M, uma vez que a fração

ácida da ME (FHCl) revelou extrair elevadas concentrações de biomoléculas na biomassa produzida à escala laboratorial.[53].

4.4.1. Biomassa de *P. cruentum* Produzida à Escala Laboratorial

4.4.1.1. Extração Convencional em Multi-Etapas

De forma a avaliar o conteúdo em compostos bioativos intracelulares das frações de ME (FW1, FW2, FKOH, FHCl e FNaOH), obtidos a partir de biomassa produzida à escala laboratorial sob duas condições de crescimento, MN (6 mM em NO_3^-) e HN (18 mM em NO_3^-), tendo sido quantificados os teores de polissacáridos neutros, sulfatados e ácidos, β -(1,3)-D-glucanos e proteína total, representados na Figura 39. É de salientar que nas frações de extração obtidas por ME não foram identificados β -(1,3)-D-glucanos,

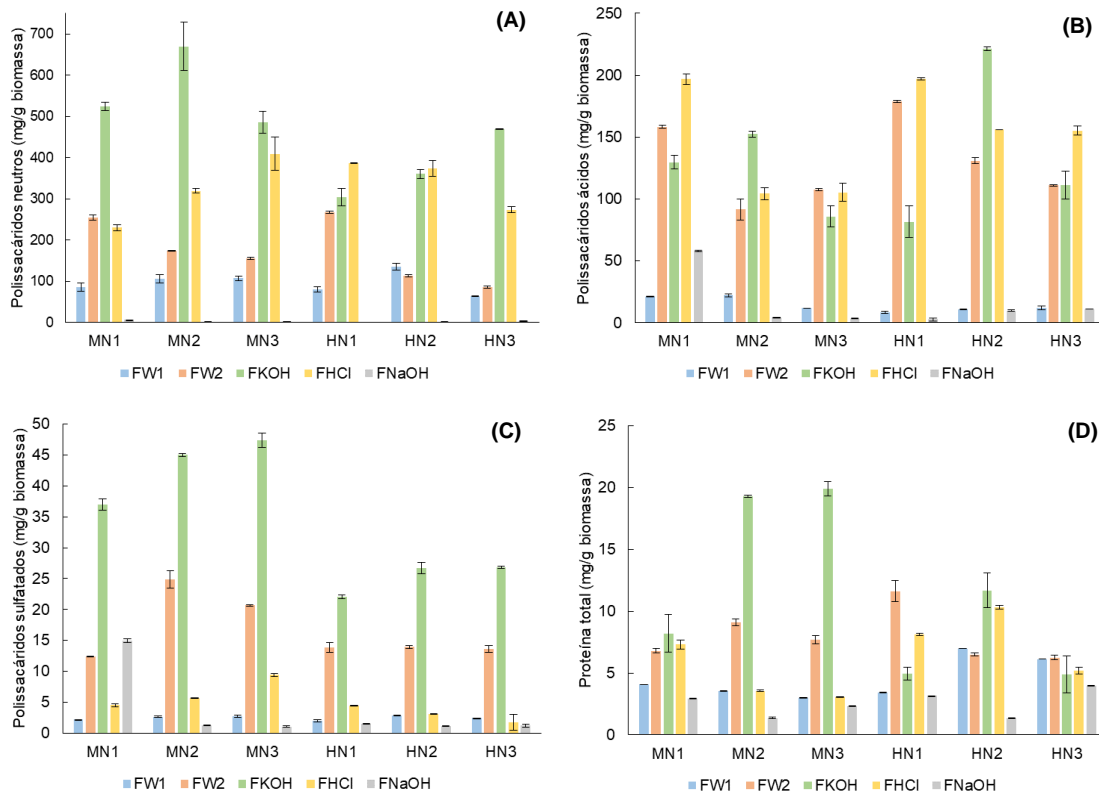


Figura 39 - Efeito das condições de crescimento de *P. cruentum*, 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO_3^- , na produção de polissacáridos neutros (A), polissacáridos ácidos (B), polissacáridos sulfatados (C) e proteína total (D), extraídos por ME.

Analisando a Figura 39A, relativamente ao teor de polissacáridos neutros, a fração alcalina FKOH permitiu, de um modo geral, obter um maior teor destas biomoléculas, alcançando uma concentração máxima de $669,994 \pm 83,066$ mg/g biomassa em MN2. No entanto, a fração ácida FHCl, apresentou valores elevados, nomeadamente para a biomassa HN1 e HN2. No que diz respeito aos polissacáridos ácidos (Figura 39B), identificam-se 3 frações que permitiram a quantificação de altos teores desta biomolécula, FW2, FKOH e FHCl, tendo sido atingida a maior concentração na fração FKOH da biomassa HN2, com $221,353 \pm 2,159$ mg/g biomassa. Em relação ao teor de polissacáridos sulfatados (Figura 39C), verifica-se também que as frações alcalinas de FKOH são as que exibem teores mais elevados destes biocompostos, atingindo um máximo de $47,405 \pm 1,668$ mg/g biomassa em MN3, seguidas das frações aquosas FW2. Pode-se ainda verificar que a condição de crescimento MN permitiu a produção de um teor mais elevado de polissacáridos sulfatados relativamente à condição de crescimento HN.

Relativamente ao conteúdo em proteína total (Figura 39D), as frações obtidas com KOH permitiram extrair a maior concentração desta biomolécula na condição de crescimento MN, tendo sido obtida uma maior concentração de $19,896 \pm 0,811$ mg/g biomassa em MN3.

Após quantificação destas biomoléculas, nas frações de ME, não foi possível identificar diferenças significativas entre a produção da biomassa da condição MN e HN. Era expectável que, a condição HN levasse a uma maior produção de compostos intracelulares, nomeadamente proteínas [134].

Para além do teor em proteína total, foram ainda quantificadas as ficobiliproteínas: ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina presentes nas frações de ME (FW1, FW2, FKOH, FHCl e FNaOH), conforme representado na Figura 40.

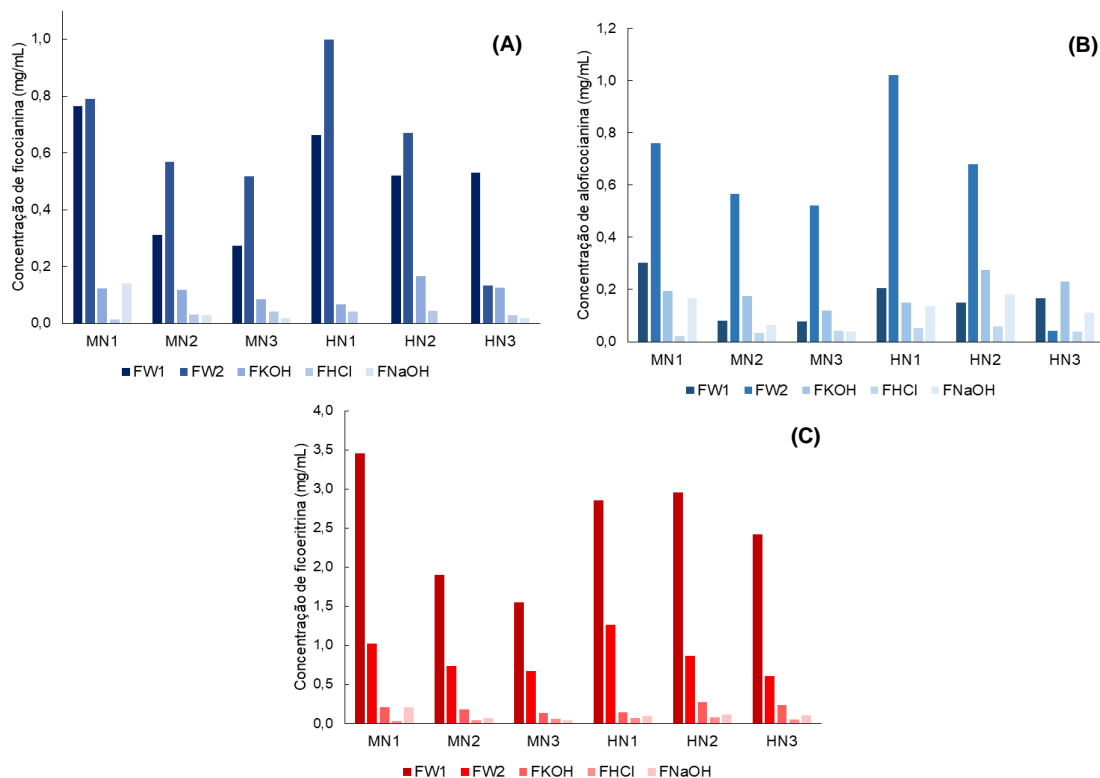


Figura 40 - Efeito das condições de crescimento de *P. cruentum*, 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO_3^- , na produção das ficobiliproteínas: ficocianina (A), aloficocianina (B) e ficoeritrina (C), extraídas por ME.

Observando a Figura 40, verifica-se que a ficocianina (A) e a aloficocianina (B) apresentam maiores concentrações, de um modo geral, nas frações aquosas FW2, seguidas das frações FKOH, alcançando a maior concentração na biomassa HN1 na fração FW2 com 15,266 mg/g de ficocianina e 15,596 mg/g de aloficocianina. A ficoeritrina (C) é a ficobiliproteína extraída em maior concentração, destacando-se as frações aquosas FW1 e FW2, verificando-se uma concentração máxima de 19,331 mg/g biomassa no extrato aquoso FW2 da biomassa HN1.

Seria de esperar que FW1 apresentasse maiores concentrações de ficobiliproteínas, uma vez que estas proteínas coloridas são termossensíveis, e à medida que são sujeitas a temperaturas elevadas durante um certo tempo, como acontece com FW2, podem desnaturar. Além disso, a ficoeritrina apresenta boa estabilidade a pH entre 4 e 10, mas fora deste intervalo, como é o caso das frações FKOH (pH 14), FHCl (pH 0,22) e FNaOH (pH 13), as concentrações detetadas são bastante reduzidas, ou até mesmo nulas [36], [137].

No entanto, o espectro de UV-Vis de FW1 assemelha-se mais com os espectros de ficoeretrina publicados por Munier *et al.* [137], quando comparados com os obtidos para as restantes frações da ME, como se pode observar através da Figura 41, fomentando a ideia que estas proteínas foram desnaturadas quando sujeitas à temperatura de 100 °C (FW2) e à presença dos solventes KOH, HCl e NaOH.

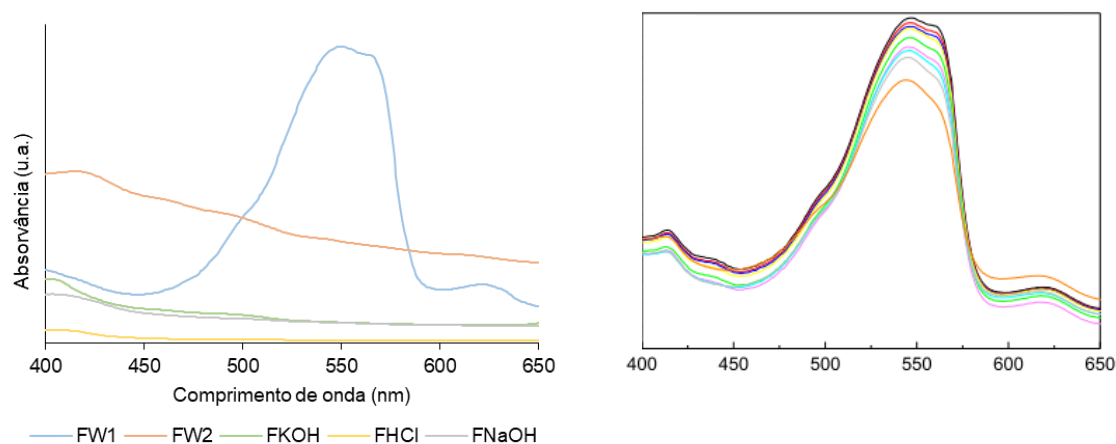


Figura 41 - Espectro de UV-Vis dos extratos obtidos por multi-etapas (MN1 como exemplo) **(A)** e publicado na literatura **(B)** [137].

Segundo Li *et al.* [134], seria de esperar uma maior concentração de ficoeretrina na biomassa produzida sob as condições de crescimento HN. Para a extração aquosa FW1, é possível observar que a condição HN levou à produção de maiores concentrações desta proteína do que na condição de crescimento MN, com exceção da biomassa HN1.

4.4.1.2. Extração Assistida por Micro-ondas

De forma a quantificar os extratos obtidos por MAE, utilizando como solvente de extração etanol absoluto e KOH 0,1 M, a partir da biomassa produzida nas condições de crescimento MN e HN, foram determinados os teores em polissacáridos neutros, sulfatados e acídicos, β -(1,3)-D-glucanos e proteína total, conforme representado na Figura 42. Mais uma vez, é de referir que nos extratos obtidos por MAE não foram identificados β -(1,3)-D-glucanos.

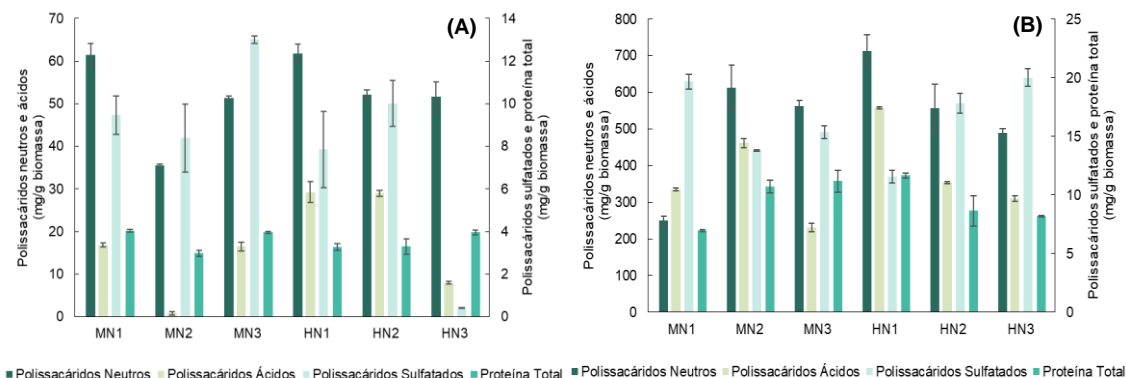


Figura 42 - Efeito das condições de crescimento de *P. cruentum*, 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO_3^- , na produção de polissacáridos neutros, ácidos, sulfatados e proteínas extraídos por MAE EtOH, 150 °C, 15 min **(A)** e MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min **(B)**.

Através da Figura 42, é possível verificar que as condições de extração, temperatura de 120 °C, 30 minutos de irradiação e KOH 0,1 M como solvente, permitiu um maior conteúdo de biocompostos. O maior teor de polissacáridos neutros, ácidos e de proteína total foi alcançado em HN1 com $713,626 \pm 62,840$ mg/g biomassa, $558,349 \pm 4,484$ mg/g biomassa e $11,654 \pm 0,325$ mg/g biomassa, respetivamente. Já a maior concentração de polissacáridos sulfatados foi alcançada em HN3 com $20,014 \pm 1,327$ mg/g biomassa.

Apesar do maior conteúdo em biocompostos produzidos ter sido alcançada na condição de crescimento HN, não existem diferenças significativas entre a produção da biomassa da condição MN e HN. Tal como para o método de extração ME, seria de esperar um teor mais elevado em compostos intracelulares, principalmente proteínas, na condição de produção HN [134].

As ficobiliproteínas, ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foram também quantificadas nos extratos obtidos por MAE utilizando como solvente etanol absoluto e KOH 0,1 M, Figura 43.

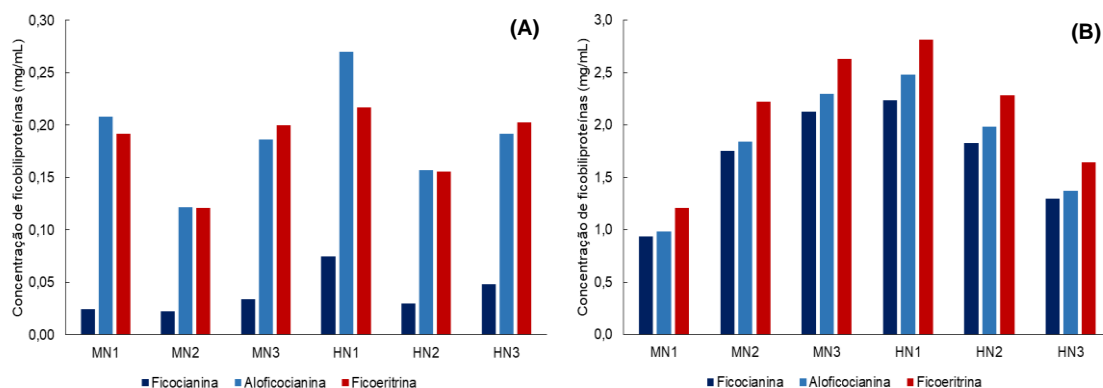


Figura 43 - Efeito das condições de crescimento de *P. cruentum*, 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO_3^- , na produção de ficobiliproteínas, extraídas por MAE: EtOH, 150 °C, 15 min **(A)** e KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min **(B)**.

Analisando a Figura 43, verifica-se que o extrato MAE KOH, 120 °C, 30 min (B), contém uma concentração mais elevada de ficobiliproteínas do que o extrato MAE EtOH, 150 °C, 15 min (A). As condições de extração utilizando EtOH, 150 °C, 15 min (A), permitiu que a aloficocianina fosse a ficobiliproteína com teores mais elevados extraídos das biomassas MN1, MN2, HN1 e HN2. Nas condições de extração KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min (B), a ficoeritrina foi a ficobiliproteína obtida com concentrações mais elevadas, seguida da aloficocianina. Os máximos destas proteínas coloridas foram alcançados para a biomassa HN1 com 55,590 mg/g biomassa de ficoeritrina, 49,027 mg/g biomassa de aloficocianina e 44,223 mg/g biomassa de ficocianina.

Segundo Rodrigues, de Castro, Santiago-Aguiar e Rocha [138], o pH é um dos fatores mais importantes na extração de ficobiliproteínas. Ao aumentar o pH do meio, as ficobiliproteínas ficam carregadas negativamente, o que favorece a interação com o solvente, facilitando o processo de extração. Este facto poderá explicar as maiores concentrações de ficobiliproteínas nos extratos obtido por MAE utilizando KOH 0,1 M como solvente, relativamente ao extrato de MAE utilizando EtOH como solvente.

Por último, foram ainda quantificados os teores em lípidos nos extratos obtidos por MAE, utilizando etanol como solvente, pelo método colorimétrico da Sulfosfovanilina, uma vez que, geralmente, os lípidos são solúveis em solventes orgânicos, como é o caso do etanol, Figura 44.

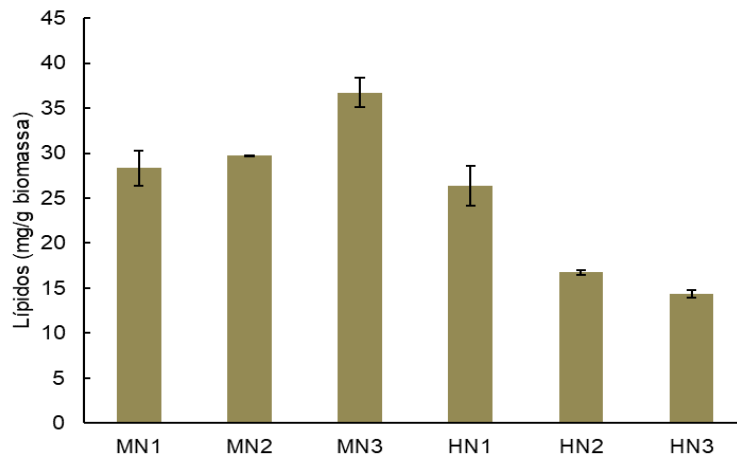


Figura 44 - Efeito das condições de crescimento de *P. cruentum*, 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO_3^- , na produção de lípidos, extraídos por MAE EtOH, 150 °C, 15 min.

Observando a Figura 44, verifica-se que, em geral, a condição de produção MN permitiu alcançar uma maior concentração de lípidos, com valores entre $28,359 \pm 2,744$ e $36,748 \pm 2,264$ mg/g biomassa. No entanto, Li *et al.* [134] não obteve uma grande diferença de concentração no teor de lípidos totais variando a concentração da fonte de azoto.

Durmaz, Monteiro, Bandarra, Gökpınar e Işık [39], após crescimento de *P. cruentum* em cultura batch de 10 L, quantificou o teor de lípidos por cromatografia gasosa, após esterificação e obteve 2,5 mg/g biomassa de ácidos gordos monoinsaturados e 59,1 mg/g biomassa de ácidos gordos polinsaturados. Huang *et al.* [139], após produção de *P. cruentum* em fotobiorreatores em coluna, quantificou o conteúdo de lípidos por cromatografia gasosa após metilação, obtendo $48,21 \pm 1,34$ mg/g biomassa de ácidos gordos polinsaturados. No presente estudo não se obtiveram concentrações tão elevadas de lípidos como na literatura, no entanto, a produção, o método utilizado na lise celular e os métodos de quantificação são fatores que afetam esta determinação.

4.4.1.3. Comparação dos Métodos de Extração

De forma a comparar os resultados obtidos pelos métodos de extração utilizados, ou seja, ME E MAE, considerou-se o somatório dos conteúdos determinados para as 5 frações obtidas na ME (FW1, FW2, FKOH, FHCl e FNaOH) e representou-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparação dos métodos de extração, ME, MAE EtOH (150 °C, 15 min) e MAE KOH 0,1 M (120 °C, 30 min).

	Condição de Crescimento	ME (mg/g biomassa)	MAE EtOH (mg/g biomassa)	MAE KOH 0,1 M (mg/g biomassa)
* Polissacáridos Neutros	MN1	1099,852 ± 50,694	61,433 ± 3,694	250,988 ± 16,575
	MN2	1270,230 ± 105,960	35,527 ± 0,308	612,662 ± 87,818
	MN3	1158,781 ± 105,757	51,355 ± 0,615	563,290 ± 20,246
	HN1	1038,388 ± 43,212	61,806 ± 3,076	713,626 ± 62,840
	HN2	983,988 ± 59,253	52,124 ± 1,541	556,602 ± 92,015
	HN3	894,761 ± 15,346	51,560 ± 4,939	489,633 ± 16,933
* Polissacáridos Ácidos	MN1	563,808 ± 17,177	16,828 ± 0,711	334,6111 ± 6,837
	MN2	374,507 ± 24,230	0,830 ± 0,503	461,645 ± 20,812
	MN3	314,240 ± 24,480	16,452 ± 1,506	230,721 ± 18,944
	HN1	468,317 ± 23,578	29,242 ± 3,516	558,349 ± 4,484
	HN2	529,318 ± 7,103	28,945 ± 1,007	353,488 ± 5,348
	HN3	400,544 ± 24,427	7,962 ± 0,504	309,868 ± 12,427
* Polissacáridos Sulfatados	MN1	71,153 ± 2,207	9,458 ± 1,259	19,670 ± 0,904
	MN2	79,432 ± 2,772	8,390 ± 2,266	13,773 ± 0,088
	MN3	81,263 ± 2,656	13,002 ± 0,251	15,346 ± 0,784
	HN1	43,914 ± 2,040	7,848 ± 2,515	11,540 ± 0,748
	HN2	47,739 ± 2,147	10,002 ± 1,512	17,834 ± 1,465
	HN3	45,852 ± 3,153	0,413 ± 0,008	20,014 ± 1,327
* Proteína Total	MN1	29,268 ± 3,056	4,033 ± 0,109	6,945 ± 0,109
	MN2	36,858 ± 0,702	2,976 ± 0,232	10,720 ± 0,921
	MN3	35,914 ± 1,386	3,966 ± 0,066	11,181 ± 1,325
	HN1	31,235 ± 2,157	3,282 ± 0,280	11,654 ± 0,325
	HN2	36,818 ± 2,501	3,294 ± 0,504	8,636 ± 1,853
	HN3	26,367 ± 2,774	3,967 ± 0,189	8,187 ± 0,116
Ficocianina	MN1	17,167	0,242	18,628
	MN2	18,944	0,225	30,573
	MN3	17,873	0,342	36,729
	HN1	19,359	0,744	44,223
	HN2	17,473	0,299	36,280
	HN3	7,848	0,483	27,415
Aloficocianina	MN1	18,561	2,073	19,566
	MN2	20,440	1,215	32,136
	MN3	19,165	1,856	39,689
	HN1	21,982	2,690	49,027
	HN2	20,219	1,571	39,469
	HN3	9,056	1,915	28,912
Ficoeritrina	MN1	30,988	1,915	24,076
	MN2	33,450	1,206	38,807
	MN3	29,570	1,989	45,444
	HN1	31,142	2,165	55,590
	HN2	34,098	1,552	45,406
	HN3	24,433	2,029	34,680

* Os valores apresentados são a média de duas ou três réplicas técnicas ± desvio padrão.

O método de extração convencional ME permitiu a obtenção de valores superiores de polissacáridos neutros, polissacáridos sulfatados e proteína total. Este resultado pode ser explicado pelo facto da ME ser fracionada em 5 etapas utilizando diferentes condições de extração, permitindo maximizar o rendimento de extração das biomoléculas. No entanto, para os polissacáridos ácidos, a extração MAE com KOH 0,1

M como solvente, permitiu obter conteúdos próximos, ou até mesmo superiores, aos obtidos por ME. Esta extração, MAE KOH 0,1 M, também favoreceu a obtenção de uma maior concentração das ficobiliproteínas

Além dos extratos obtidos por ME apresentarem valores superiores em algumas biomoléculas, este método ainda apresenta a vantagem de dar origem a 5 frações de extração com características diferentes, indicando o fracionamento de biomoléculas com características diferentes [55]. No entanto, na extração por ME, o facto de se considerar o somatório dos conteúdos dos compostos doseados, pode acarretar erros e sobrevalorizar os conteúdos determinados, como se pode verificar para o teor em polissacáridos neutros (Tabela 8).

Contudo, para a obtenção de polissacáridos ácidos e de ficobiliproteínas, uma vez que o extrato obtido por MAE KOH 0,1 M, apresentou valores próximos ou mesmo superiores, aos obtidos por ME, esta técnica poderá ser vantajosa, uma vez que há redução significativa no tempo de extração, menor consumo de solvente e regendo-se pelos princípios da química verde [51].

Em MAE existem vários parâmetros que podem ser otimizados de modo a maximizar a extração das várias biomoléculas, nomeadamente o tempo de irradiação, o solvente, o rácio biomassa:solvente e a temperatura (ou potência). Estes parâmetros já foram avaliados e otimizados, para biomassa de microalgas, por Hussien [123]. As condições utilizadas (KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min) permitiram a extração de um maior teor em polissacáridos ácidos e de ficobiliproteínas. Outras condições de extração poderiam levar a uma extração superior de outras biomoléculas [36], [53].

4.4.2. Biomassa de *P. cruentum* Produzida em Fotobiorreatores *Flat Panel*

4.4.2.1. Extração Assistida por Micro-ondas

De forma a monitorizar os extratos obtidos por MAE utilizando como solvente KOH 0,1 M e HCl 0,1 M, foram quantificados os teores em polissacáridos neutros, sulfatados e acídicos, β -(1,3)-D-glucanos e proteína total, representados na Figura 45.

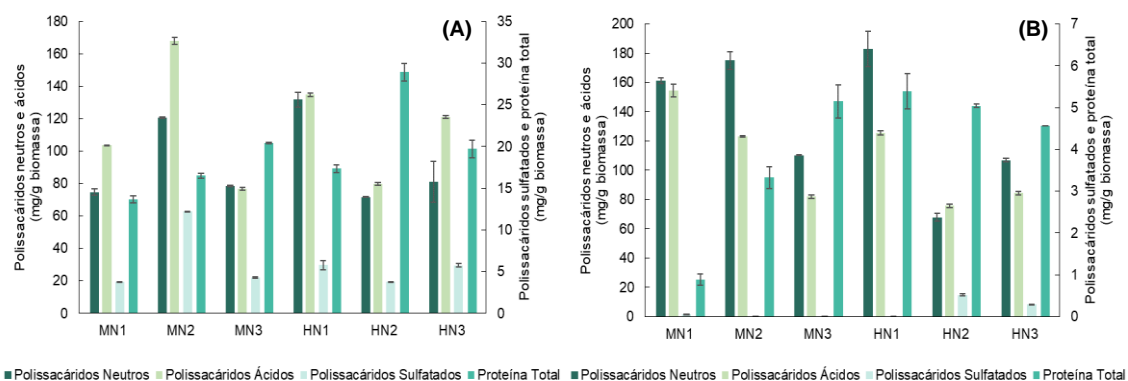


Figura 45 - Efeito das condições de crescimento de *P. cruentum*, 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO_3^- , na produção de polissacáridos neutros, ácidos, sulfatados e proteínas extraídos por MAE a 120°C durante 30 min, utilizando como solvente KOH 0,1 M (A) e HCl 0,1 M (B).

Analisando a Figura 45, não é possível identificar qual o solvente que permite a extração do maior teor de polissacáridos neutros e ácidos. Em condições alcalinas de extração (KOH 0,1 M) foram obtidos valores máximos de teor de polissacáridos ácidos extraídos da biomassa produzida no FBR FP MN2 com $167,971 \pm 2,929$ mg/g biomassa. Já em condições ácidas (HCl 0,1 M) verificaram-se valores mais elevados nos extratos obtidos a partir da biomassa cultivada no FBR FP HN1 com $182,851 \pm 17,082$ mg/g biomassa. Em relação aos polissacáridos sulfatados, os extratos alcalinos apresentaram maiores conteúdos, verificando-se valores mais elevados para a biomassa produzida no FBR FP MN2 com $12,205 \pm 0,044$ mg/g biomassa. Na biomassa desenvolvida dos FBR FP MN2, MN3 e HN1, não foram detetados polissacáridos sulfatados, extraídos com HCl 0,1 M. Relativamente aos conteúdos em proteína total, o KOH 0,1 M permitiu obter maiores teores, sendo a maior concentração atingida na biomassa produzida no FBR FP HN2 com $28,897 \pm 1,510$ mg/g biomassa.

Ao comparar os biocompostos extraídos através de MAE utilizando condições alcalinas e ácidas, não se encontram diferenças significativas entre a condição de produção MN e HN. Como já referido anteriormente, seria de esperar uma maior produção de compostos intracelulares, principalmente proteínas, na condição de produção HN [134].

Como descrito em 4.1, constatou-se que a biomassa da cultura do FBR FP MN3 e HN2 começou a decrescer antes de atingir a fase estacionária de crescimento. Nestas culturas o teor em polissacáridos ácidos também foi o menor, tanto nas extrações com KOH 0,1 M como com HCl 0,1 M, bem como para os polissacáridos neutros. Relativamente ao teor de proteína total, nestas culturas foi atingida a maior concentração destas biomoléculas, utilizando KOH como solvente de extração, com

20,383 ± 0,126 mg/g biomassa no FBR FP MN3 e 28,897 ± 1,510 mg/g biomassa no FBR FP HN2.

As ficobiliproteínas, ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina foram também quantificadas nos extratos obtidos por MAE, como se pode observar na Figura 46. No extrato ácido da biomassa produzida em FBR FP HN1 e HN2 não foi possível quantificar o teor destas proteínas devido à falta de extrato.

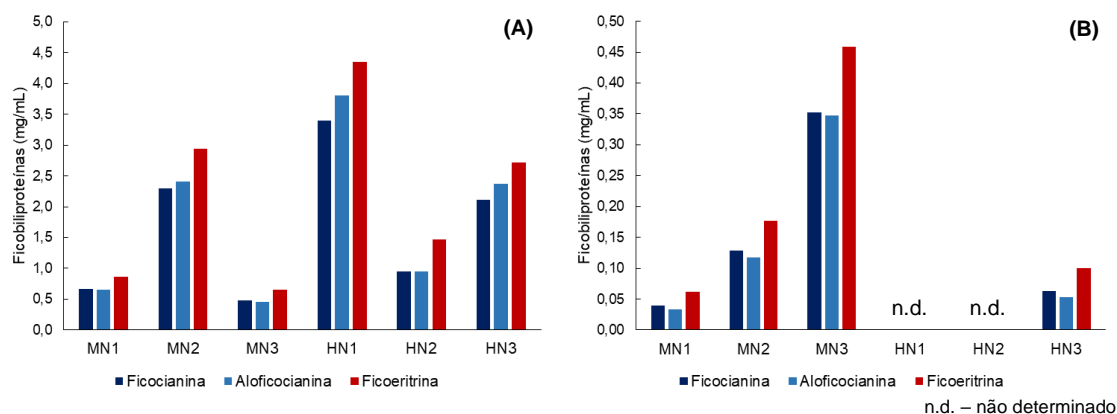


Figura 46 - Efeito das condições de crescimento de *P. cruentum*, 6 mM (MN) e 18 mM (HN) de NO_3^- , na produção de ficobiliproteínas extraídos por MAE a 120°C durante 30 min, utilizando como solvente KOH 0,1 M (A) e HCl 0,1 M (B).

Analisando a Figura 46, verifica-se que os extratos alcalinos apresentam ficobiliproteínas em concentrações superiores, sendo a ficoeritrina a ficobiliproteína extraída em maiores concentrações, alcançando 4,352 mg/mL no FBR FP HN1, seguida da aloficocianina, com uma concentração de 3,811 mg/mL, e de ficocianina 3,403 mg/mL. A ficoeritrina foi igualmente a ficobiliproteína obtida em maiores concentrações, nos extratos ácidos, seguida da ficocianina. As maiores concentrações destas proteínas coloridas foram alcançadas nos extratos obtidos a partir da biomassa FBR FP MN3, com 0,459 mg/mL de ficoeritrina, 0,347 mg/mL de ficocianina e 0,352 mg/mL de aloficocianina.

Como já foi descrito anteriormente, segundo Rodrigues, de Castro, Santiago-Aguiar e Rocha [138], ao aumentar o pH do meio, as ficobiliproteínas ficam carregadas negativamente, o que favorece a interação com o solvente, facilitando o processo de extração. Este facto poderá explicar as maiores concentrações de ficobiliproteínas em MAE utilizando KOH 0,1 M como solvente, relativamente a MAE utilizando HCl 0,1 M como solvente.

Uma vez que a concentração celular da cultura do FBR FP MN3 e HN2 começou a decrescer antes de atingir a fase estacionária de crescimento, as ficobiliproteínas apresentaram concentrações baixas na biomassa produzida nestes FBR FP.

4.4.3. Comparação dos Teores de Biomoléculas Intracelulares Produzidas à Escala Laboratorial com as Produzidas em Fotobiorreatores *Flat Panel*

Uma vez que o método de extração convencional em multi-etapas não foi aplicado à biomassa produzida em fotobiorreatores *flat panel*, a comparação dos teores em biomoléculas intracelulares foi avaliada apenas para o método de extração MAE, a uma temperatura de 120 °C durante 30 min, utilizando KOH 0,1M e HCl 0,1 M como solventes. O resumo dos resultados obtidos encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Comparação dos teores em biomoléculas intracelulares produzidas à escala laboratorial (MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min) e em FBR FP, após extração MAE.
(Continua na página seguinte)

	Condições de Crescimento	Escala Laboratorial	FBR FP	
		MAE KOH 0,1 M (mg/g biomassa)	MAE KOH 0,1 M (mg/g biomassa)	MAE HCl 0,1 M (mg/g biomassa)
* Polissacáridos Neutros	MN1	250,988 ± 16,575	74,625 ± 2,776	161,280 ± 2,777
	MN2	612,662 ± 87,818	120,599 ± 0,536	175,025 ± 8,640
	MN3	563,290 ± 20,246	78,271 ± 0,616	110,225 ± 0,309
	HN1	713,626 ± 62,840	131,747 ± 6,477	182,851 ± 17,082
	HN2	556,602 ± 92,015	71,607 ± 0,309	67,819 ± 3,687
	HN3	489,633 ± 16,933	80,875 ± 17,787	106,953 ± 1,851
* Polissacáridos Ácidos	MN1	334,6111 ± 6,837	103,501 ± 0,421	154,523 ± 6,323
	MN2	461,645 ± 20,812	167,971 ± 2,929	123,225 ± 0,843
	MN3	230,721 ± 18,944	76,628 ± 1,263	82,090 ± 1,686
	HN1	558,349 ± 4,484	134,733 ± 1,475	125,476 ± 1,795
	HN2	353,488 ± 5,348	79,706 ± 1,265	75,797 ± 1,679
	HN3	309,868 ± 12,427	121,008 ± 1,473	84,475 ± 1,686
* Polissacáridos Sulfatados	MN1	19,670 ± 0,904	3,763 ± 0,030	0,051 ± 0,015
	MN2	13,773 ± 0,088	12,205 ± 0,044	n.d.
	MN3	15,346 ± 0,784	4,258 ± 0,098	n.d.
	HN1	11,540 ± 0,748	5,767 ± 0,794	n.d.
	HN2	17,834 ± 1,465	3,738 ± 0,068	0,515 ± 0,033
	HN3	20,014 ± 1,327	5,728 ± 0,309	0,290 ± 0,010
* Proteína Total	MN1	6,945 ± 0,109	13,641 ± 0,629	0,878 ± 0,189
	MN2	10,720 ± 0,921	16,490 ± 0,437	3,324 ± 0,377
	MN3	11,181 ± 1,325	20,383 ± 0,126	5,148 ± 0,566
	HN1	11,654 ± 0,325	17,337 ± 0,660	5,386 ± 0,603
	HN2	8,636 ± 1,853	28,897 ± 1,510	5,037 ± 0,063
	HN3	8,187 ± 0,116	19,691 ± 1,538	4,570 ± 0,000

* Os valores apresentados são a média de duas ou três réplicas técnicas ± desvio padrão.

Tabela 9 - Comparação das biomoléculas intracelulares produzidas à escala laboratorial (MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min) e em FBR FP (MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min e MAE HCl 0,1 M, 120 °C, 30 min).

(Continuação)

	Condições de Crescimento	Escala Laboratorial		FBR FP
		MAE KOH 0,1 M (mg/g biomassa)	MAE KOH 0,1 M (mg/g biomassa)	MAE HCl 0,1 M (mg/g biomassa)
Ficocianina	MN1	18,628	6,590	0,390
	MN2	30,573	39,965	1,291
	MN3	36,729	4,758	3,523
	HN1	44,223	59,530	-
	HN2	36,280	9,542	-
	HN3	27,415	36,884	0,625
Aloficocianina	MN1	19,566	6,480	0,331
	MN2	32,136	41,933	1,177
	MN3	39,689	4,546	3,470
	HN1	49,027	66,663	-
	HN2	39,469	9,472	-
	HN3	28,912	41,419	0,526
Ficoeritrina	MN1	24,076	8,614	0,615
	MN2	38,807	51,091	1,765
	MN3	45,444	6,557	4,588
	HN1	55,590	76,131	-
	HN2	45,406	14,689	-
	HN3	34,680	47,534	0,998

Analisando a Tabela 9, verifica-se que, apesar da biomassa produzida em FBR FP apresentar maior teor de proteína total, em termos de polissacáridos neutros, ácidos e sulfatados, a biomassa produzida à escala laboratorial exibiu um maior conteúdo destas biomoléculas. Estes resultados podem ter origem no facto da biomassa produzida à escala laboratorial ter parâmetros de crescimento mais controlado, nomeadamente arejamento e luminosidade, e sem contaminações, permitindo alcançar maior concentração de biomassa e, conseqüentemente, maior produção de biomoléculas intracelulares.

Relativamente às ficobiliproteínas, a produção da biomassa à escala laboratorial levou a uma maior concentração destas biomoléculas, de um modo geral.

Segundo Fuentes, Fernández, Pérez e Guerrero [17], em *P. cruentum* produzida sob várias condições diferentes de crescimento num fotobiorreator tubular, o maior conteúdo em polissacáridos totais atingido foi de 393 mg/g biomassa, determinado pelo método

da antrona e de proteína foi de 408 mg/g biomassa. Relativamente aos polissacáridos neutros, estes foram da mesma ordem de grandeza dos obtidos neste estudo. No entanto, na biomassa produzida à escala laboratorial foi possível atingir maiores concentrações desta biomolécula. Em relação à proteína total, neste estudo foi obtido uma concentração muito menor à registada na literatura. A discrepância de concentrações de proteína total poderá estar relacionada com as condições de produção e extração [18].

Li *et al.* [134] obteve 2,14 mg/mL de polissacáridos neutros, pelo método do fenol-ácido sulfúrico, e 1,01 mg/mL de proteína total, quantificada pelo método de Lowry. Comparando com os resultados obtidos, o teor em proteína total é da mesma ordem de grandeza, enquanto a concentração de polissacáridos neutros obtida foi muito superior à descrita na literatura.

Com o objetivo de quantificar ficobiliproteínas, Juin *et al.* [36], produziu *P. cruentum* à escala laboratorial em fotobiorreatores de coluna de 50 L. Após a otimização de vários parâmetros, obteve a máxima concentração de ficoeritrina ($73,7 \pm 2,3$ mg/g biomassa) por MAE utilizando água como solvente a 40 °C, durante 10 segundos. A temperaturas superiores a 40 °C, a ficoeritrina foi danificada termicamente. Já a ficocianina ($34,8 \pm 6,4$ mg/g biomassa) e a aloficocianina ($32,3 \pm 1,1$ mg/g biomassa) foram obtidas em maior concentração, pelo mesmo método de extração, mas utilizando uma temperatura de 100 °C. Esta combinação de temperatura elevada e tempo curto de irradiação permitiu obter a ficocianina e a aloficocianina da membrana tilacóide sem desnaturação térmica. Comparando estes resultados com os obtidos neste estudo, verifica-se que para a biomassa do FBR FP HN1 extraída por MAE utilizando como solvente KOH 0,1 M, foram obtidos maiores conteúdos destas ficobiliproteínas.

4.5. Propriedades Antioxidantes

As microalgas têm sido cada vez mais procuradas como antioxidantes naturais, em alternativa aos antioxidantes sintéticos. Esta atividade antioxidante poderá ter origem em compostos antioxidantes como compostos fenólicos, flavonóides ou polissacáridos, produzidos por estes organismos [99].

4.5.1. Biomoléculas Extracelulares

Aos compostos extracelulares, excretados durante o crescimento celular à escala laboratorial, foi avaliado o teor em compostos fenólicos totais, flavonóides totais e foi avaliada a atividade antioxidante, pelo método do radical ABTS.

As propriedades antioxidantes foram avaliadas nas biomoléculas extracelulares produzidas à escala laboratorial. Esta avaliação foi realizada às biomoléculas sujeitas a precipitação alcoólica bem como ao meio de crescimento sem qualquer tratamento, como se pode observar na Figura 47.

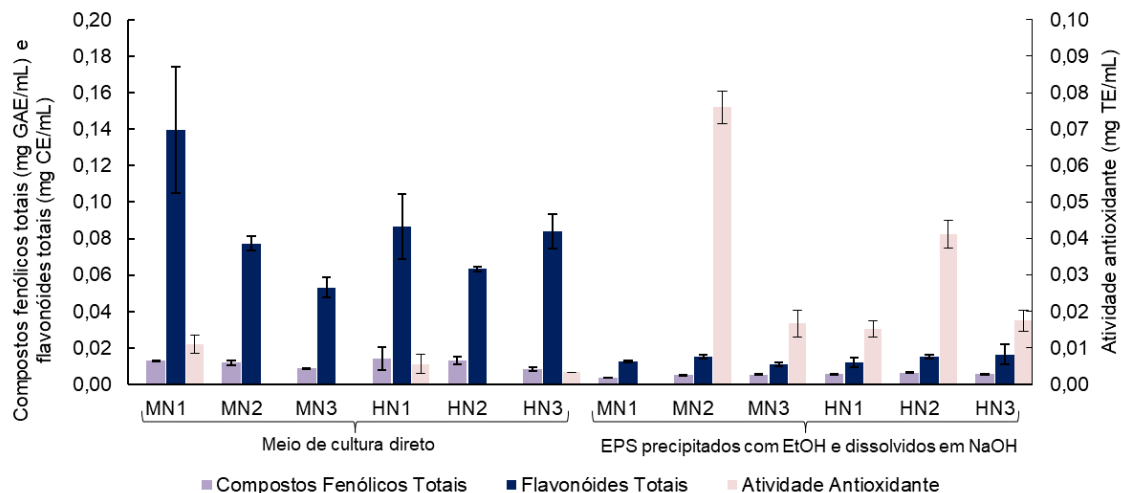


Figura 47 - Compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante, quantificados diretamente no meio de crescimento após precipitação com álcool e dissolução em NaOH 1M.

Pela análise da Figura 47, verifica-se que relativamente aos compostos fenólicos totais e flavonóides totais, não foi possível concentrar estas biomoléculas, uma vez que foi detetado uma maior concentração no meio de crescimento sem qualquer tratamento do que após precipitação alcoólica. Estas biomoléculas apresentaram uma concentração máxima de $0,014 \pm 0,009$ mg/mL de compostos fenólicos totais no meio de cultura direto HN1 e $0,140 \pm 0,049$ mg/mL de flavonóides totais no meio de cultura direto MN1. No entanto, a atividade antioxidante detetada, foi superior no meio de crescimento sujeito a precipitação, com exceção do MN1. A atividade máxima atingida foi no meio de crescimento precipitado MN2 com $0,076 \pm 0,006$ mg TE/mL.

De ressaltar novamente que a dissolução dos EPS em NaOH 1 M com refluxo a 86 °C não foi completa, o que poderá indicar que a concentração das biomoléculas quantificadas não corresponde à totalidade de biomoléculas precipitadas. Além disso, como já foi referido anteriormente, poderá ter ocorrido lise celular, durante o descongelamento das culturas celulares após armazenamento a -20 °C, o que poderá indicar que algumas das biomoléculas identificadas sejam intracelulares.

4.5.2. Biomoléculas Intracelulares

Os extratos obtidos por ME e MAE a partir da biomassa produzida à escala laboratorial e em FBR FP foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante e ao teor

em compostos fenólicos e flavonóides totais, de modo a permitir a análise da possível influência das condições de crescimento nestas propriedades.

4.5.2.1. Biomassa de *P. cruentum* Produzida à Escala Laboratorial

As 5 frações de extração ME e os extratos obtidos por MAE utilizando EtOH e KOH 0,1 M como solventes, obtidos a partir da biomassa produzida à escala laboratorial foram doseados pelos métodos anteriormente descritos, para a quantificação de compostos fenólicos e flavonóides totais, e os resultados obtidos estão representados nas Figuras 48 e 49.

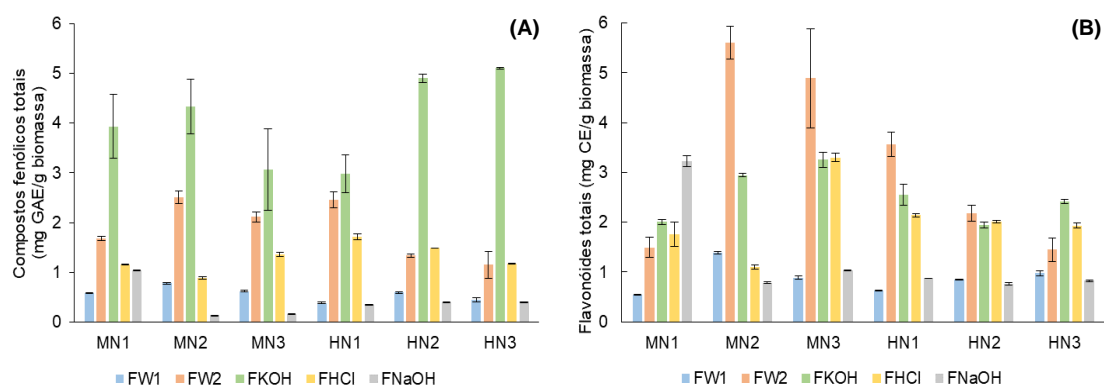


Figura 48 - Influência dos parâmetros de crescimento na produção de compostos fenólicos totais (A) e flavonóides totais (B) extraídos por ME.

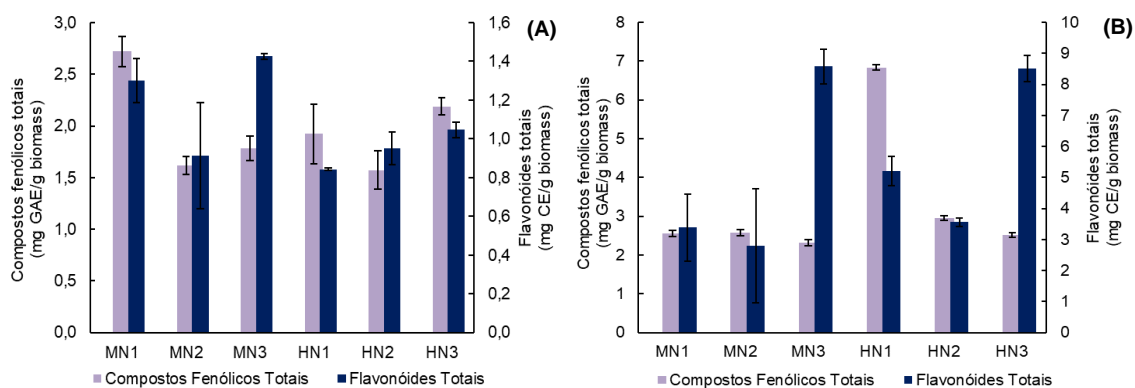


Figura 49 - Influência dos parâmetros de crescimento na produção de compostos fenólicos totais e flavonóides totais extraídos por MAE (A) EtOH, 150 °C, 15 min (B) KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min.

Pela análise da Figura 48, é notório que todas as frações alcalinas FKOH obtidas pelo método ME demonstram ter o maior teor em compostos fenólicos totais, atingindo um máximo de $5,105 \pm 0,027$ mg GAE/g biomassa na condição de crescimento HN3. Relativamente aos flavonóides totais, verifica-se, de um modo geral, um maior conteúdo

nas frações aquosas FW2 detetando-se um valor máximo de $5,603 \pm 0,458$ mg CE/g biomassa em produzida na condição de crescimento MN2.

Quanto aos extratos obtidos por MAE (Figura 49 A) observou-se que a utilização de KOH 0,1 M como solvente permitiu extrair maiores teores quer de compostos fenólicos quer de flavonóides totais, quando comparados com os extratos etanólicos. (Figura 49 B).

A atividade antioxidante dos extratos obtidos foi determinada através do método do radical ABTS, e encontra-se representada na Figura 50. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de Trolox (TE) por g de biomassa.

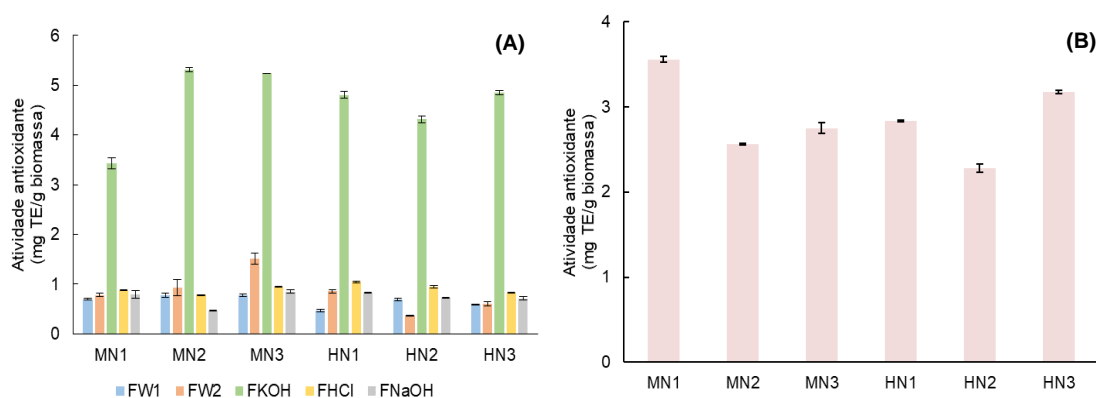


Figura 50 - Atividade antioxidante determinada pelo método do radical ABTS nos extratos obtidos por ME (A) e MAE EtOH, 15 min, 150 °C (B).

É de salientar que ao contrário do expectável, para os extratos de MAE (KOH 0,1 M, 30 min, 120 °C), não foi detetada atividade antioxidante. Estes resultados não concordantes com os obtidos através de ME, onde se verificou que as frações alcalinas FKOH (Figura 50 A) apresentam maior capacidade antioxidante, alcançando um máximo de $5,306 \pm 0,061$ mg TE/g biomassa nas condições de crescimento MN2. Uma vez que, estas frações são, de um modo geral, as que apresentam maior teor em polissacáridos neutros, polissacáridos sulfatados e compostos fenólicos, Figuras 39 e 48, a atividade antioxidante demonstrada, poderá estar relacionada com a presença destas biomoléculas [99].

Para MAE EtOH, 15 min, 150 °C (B), o máximo da atividade antioxidante foi em MN1 com $3,556 \pm 0,052$ mg/g biomassa. A biomassa MN1 apresentou uma das maiores concentrações de polissacáridos neutros, compostos fenólicos totais e flavonóides totais, Figuras 42 e 49. Novamente, a atividade antioxidante demonstrada poderá derivar destas biomoléculas, descritas como apresentando atividade antioxidante [99].

De forma semelhante, o extrato derivado da biomassa MN1, obtido por MAE EtOH, 15 min, 150 °C (Figura 50 B), demonstrou o máximo de atividade antioxidante com $3,556 \pm 0,052$ mg TE/g biomassa.

No entanto, na análise da influência dos parâmetros de crescimento na atividade antioxidante, nomeadamente a variação da concentração de NO_3^- no meio de cultura, este estudo não foi conclusivo.

De forma a comparar os resultados obtidos pelos dois métodos de extração aplicados à biomassa de *P. cruentum* produzida em diferentes condições, construiu-se a Tabela 10. Estes resultados representam o somatório dos conteúdos determinados para as 5 frações obtidas em ME (FW1, FW2, FKOH, FHCl e FNaCl).

Tabela 10 - Doseamento dos compostos fenólicos e flavonóides totais e actividade antioxidante, nos extratos obtidos por ME, MAE (EtOH; 150 °C, 15 min) e MAE (KOH 0,1 M; 120 °C, 30 min).

	Condição de Crescimento	ME (mg/g biomassa)	MAE EtOH (mg/g biomassa)	MAE KOH 0,1 M (mg/g biomassa)
* Compostos Fenólicos Totais	MN1	$8,398 \pm 0,991$	$2,720 \pm 0,129$	$2,552 \pm 0,206$
	MN2	$8,651 \pm 1,012$	$1,617 \pm 0,134$	$2,582 \pm 0,155$
	MN3	$7,325 \pm 1,370$	$1,785 \pm 0,145$	$2,315 \pm 0,169$
	HN1	$7,893 \pm 0,840$	$1,923 \pm 0,118$	$6,835 \pm 0,409$
	HN2	$8,727 \pm 0,206$	$1,574 \pm 0,094$	$2,956 \pm 0,327$
	HN3	$8,294 \pm 0,488$	$2,190 \pm 0,102$	$2,521 \pm 0,149$
* Flavonóides Totais	MN1	$9,023 \pm 0,870$	$3,556 \pm 0,052$	$3,382 \pm 1,529$
	MN2	$11,807 \pm 0,617$	$2,556 \pm 0,014$	$2,795 \pm 2,597$
	MN3	$13,352 \pm 1,793$	$2,750 \pm 0,093$	$8,578 \pm 0,793$
	HN1	$9,754 \pm 0,719$	$2,833 \pm 0,010$	$5,214 \pm 0,671$
	HN2	$7,744 \pm 0,373$	$2,281 \pm 0,069$	$3,559 \pm 0,198$
	HN3	$7,590 \pm 0,559$	$3,178 \pm 0,028$	$8,517 \pm 0,590$
* Atividade Antioxidante	MN1	$6,573 \pm 0,344$	$3,556 \pm 0,052$	n.d.
	MN2	$8,261 \pm 0,368$	$2,556 \pm 0,014$	n.d.
	MN3	$9,320 \pm 0,261$	$2,750 \pm 0,093$	n.d.
	HN1	$8,005 \pm 0,226$	$2,833 \pm 0,010$	n.d.
	HN2	$7,025 \pm 0,174$	$2,281 \pm 0,069$	n.d.
	HN3	$7,585 \pm 0,190$	$3,178 \pm 0,028$	n.d.

* Os valores apresentados são a média de duas ou três réplicas técnicas \pm desvio padrão.

Como já foi referido anteriormente, a extração por MAE usando KOH 0,1 M como solvente, permitiu obter maiores teores de compostos fenólicos totais e flavonóides totais, relativamente à utilização de EtOH como solvente. No entanto, através de ME foram obtidos conteúdos mais elevados destas moléculas.

Da mesma forma, os extratos de ME, demonstraram no total, atividade antioxidante mais elevada. Este resultado seria o esperado, uma vez que, esta extração também obteve o maior teor de polissacáridos totais, ácidos, sulfatados, compostos fenólicos totais e flavonóides totais, Figuras 39 e 48 [99].

4.6.2.2. Biomassa de *P. cruentum* Produzida em Fotobiorreatores *Flat Panel*

Para os extratos obtidos por MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min e MAE HCl 0,1 M, 120 °C, 30 min, a partir da biomassa produzida em FBR FP, foi determinado o teor de compostos fenólicos e flavonóides, cujos resultados estão representados na Figura 51.

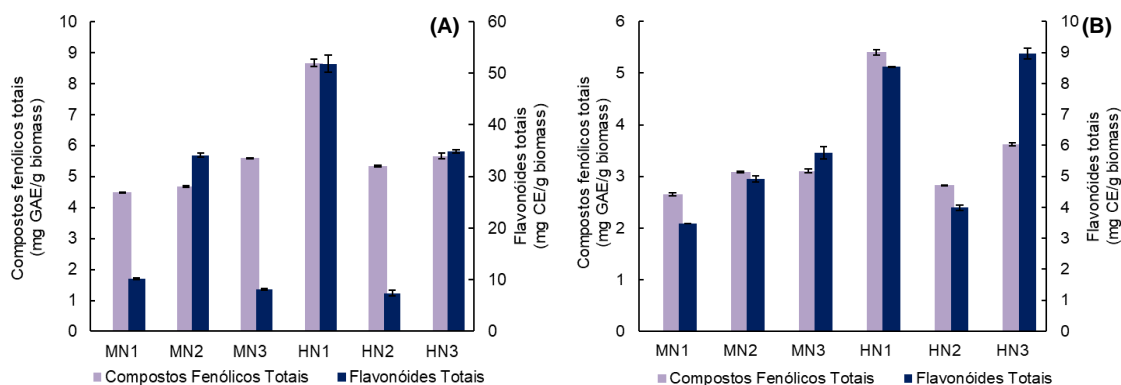


Figura 51 - Compostos fenólicos totais e flavonóides totais extraídos por MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min (A) e MAE HCl 0,1 M, 120 °C, 30 min (B).

Mais uma vez, a utilização de KOH 0.1M como solvente (Figura 51A) permitiu obter um teor maior destes compostos alcançando o máximo no FBR FP HN1 com $8,665 \pm 0,181$ mg GAE/g biomassa de compostos fenólicos e $51,782 \pm 2,315$ mg GAE/g biomassa de flavonóides totais.

A concentração celular da biomassa desenvolvida em FBR FP nas condições de crescimento MN3 e HN2, que começou a decrescer antes de chegar à fase estacionária, apresentando um teor muito baixo de flavonóides totais extraídos por MAE com KOH 0,1 M. No entanto, a concentração dos compostos fenólicos nos extratos alcalinos e a concentração das duas biomoléculas nos extratos ácidos não revelaram diferenças significativas, relativamente à biomassa produzida nos FBR FP onde o crescimento celular teve um comportamento dentro do esperado.

A atividade antioxidante também foi determinada para os extratos obtidos por MAE nas duas condições de extração, e está representada na Figura 52.

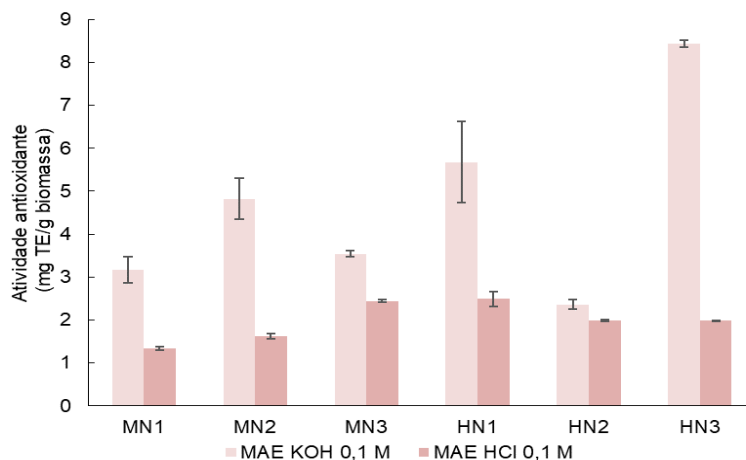


Figura 52 - Atividade antioxidante dos extratos obtidos por MAE a 120 °C durante 30 min, em KOH 0,1 M e em HCl 0,1 M.

Observando a Figura 52, verifica-se que os extratos alcalinos apresentam maior atividade antioxidante do que os extratos ácidos. Uma vez que os teores em polissacáridos neutros e ácidos não apresentam diferenças entre os dois tipos de extrato, a atividade antioxidante poderá ter origem nos compostos fenólicos totais e nos flavonóides totais presentes em maior concentração nos extratos alcalinos [99].

4.5.3. Comparação das Propriedades Antioxidantes da Biomassa Produzidas à Escala Laboratorial e em Fotobiorreatores *Flat Panel*

Uma vez que, os extratos obtidos por MAE (KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min) a partir da biomassa produzida em fotobiorreatores *flat panel*, apresentaram maiores conteúdos em compostos fenólicos totais e flavonóides totais, bem como maior atividade antioxidante, estes extratos foram comparados com os obtidos por MAE aplicados à biomassa produzida à escala laboratorial. Estes resultados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação das propriedades antioxidantes dos extratos obtidos por MAE (EtOH, 150 °C, 15 min e KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min) a partir da biomassa produzida à escala laboratorial; e por MAE (KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min e HCl 0,1 M, 120 °C, 30 min) a partir da biomassa produzida em FBR FP.

		Escala Laboratorial		FBR FP
		* MAE EtOH (mg/g biomassa)	* MAE KOH 0,1 M (mg/g biomassa)	* MAE KOH 0,1 M (mg/g biomassa)
Compostos Fenólicos Totais	MN1	2,720 ± 0,129	2,552 ± 0,206	4,490 ± 0,016
	MN2	1,617 ± 0,134	2,582 ± 0,155	4,675 ± 0,028
	MN3	1,785 ± 0,145	2,315 ± 0,169	5,597 ± 0,011
	HN1	1,923 ± 0,118	6,835 ± 0,409	8,665 ± 0,181
	HN2	1,574 ± 0,094	2,956 ± 0,327	5,334 ± 0,044
	HN3	2,190 ± 0,102	2,521 ± 0,149	5,662 ± 0,114
Flavonóides Totais	MN1	3,556 ± 0,052	3,382 ± 1,529	10,177 ± 0,189
	MN2	2,556 ± 0,014	2,795 ± 2,597	34,119 ± 0,575
	MN3	2,750 ± 0,093	8,578 ± 0,793	8,166 ± 0,283
	HN1	2,833 ± 0,010	5,214 ± 0,671	51,782 ± 2,315
	HN2	2,281 ± 0,069	3,559 ± 0,198	7,407 ± 0,709
	HN3	3,178 ± 0,028	8,517 ± 0,590	34,835 ± 0,495
Atividade Antioxidante	MN1	3,556 ± 0,052	n.d.	3,162 ± 0,428
	MN2	2,556 ± 0,014	n.d.	4,824 ± 0,684
	MN3	2,750 ± 0,093	n.d.	3,540 ± 0,097
	HN1	2,833 ± 0,010	n.d.	5,678 ± 1,342
	HN2	2,281 ± 0,069	n.d.	2,363 ± 0,153
	HN3	3,178 ± 0,028	n.d.	8,435 ± 0,109

* Os valores apresentados são a média de duas ou três réplicas técnicas ± desvio padrão.

Pela análise da Tabela 11, verifica-se que, ao contrário do apresentado na Tabela 9 (teor em polissacáridos e proteínas), a concentração de compostos fenólicos totais e de flavonóides totais, e a atividade antioxidante foi superior nos extratos obtidos a partir da biomassa produzida em FBR FP. Uma vez que as condições de extração foram as mesmas (MAE KOH 0,1 M, 120 °C, 30 min), as condições de cultivo nos FBR FB poderão ter influenciado a maior produção de compostos fenólicos totais e flavonóides [140].

Yilmaz, Demirel, Karabay-Yavasoglu, Ozdemir e Conk-Dalay [141], após crescimento à escala laboratorial de biomassa de *P. cruentum* e posterior extração continua em Soxhlet usando etanol, metanol e n-hexano, obteve um teor em compostos fenólicos totais de 9,81 ± 0,4 mg GAE/g biomassa, 34,22 ± 5,4 mg GAE/g biomassa e 46,08 ± 4,2 mg GAE/g biomassa, respetivamente, obtido pelo método de Folin-Ciocalteu. Aisah [142], após otimização das condições de extração assistida por micro-ondas, obteve 74,49 ± 14,99 mg GAE/g biomassa de compostos fenólicos totais, utilizando também o método de Folin-Ciocalteu e 27,48 ± 1,44 mg/g biomassa de flavonóides totais, pelo

método do cloreto de alumínio. Estes compostos antioxidantes foram obtidos por MAE usando como solvente acetato de etilo, na proporção biomassa:solvente 1:10, durante 10 minutos a 50 °C.

Comparando os valores dos compostos antioxidantes da Tabela 10 e 11 com os valores da literatura referidos anteriormente, verifica-se que se obtiveram teores muito baixos destas biomoléculas. Esta discrepância de valores poderá estar relacionada com os parâmetros de crescimento, uma vez que o pH, a qualidade da luz, temperatura, fotoperíodo e disponibilidade de nutrientes são fatores que influenciam a produção de compostos fenólicos nas microalgas. Outros dos fatores que poderão ter levado à obtenção de baixas concentrações de compostos fenólicos nos extratos, são os parâmetros de extração utilizados, nomeadamente a potência/temperatura de irradiação do reator de micro-ondas e a temperatura, uma vez que potências e temperaturas demasiado altas poderão levar à degradação destes compostos. Para além destes parâmetros, o solvente utilizado também tem bastante influência na extração de compostos fenólicos, sendo que a água, devido à capacidade de absorver eficazmente a energia fornecida pelo micro-ondas, leva ao aquecimento uniforme da amostra. Deste modo, vários autores notaram que a água tem sido o solvente verde mais adequado para a extração eficiente de compostos fenólicos. O etanol como solvente tem a capacidade de solubilizar compostos fenólicos presentes na amostra, no entanto a elevada concentração de etanol no meio de extração poderá levar à diminuição de extração destes compostos [140], [143].

Huang, Xu, Lin e Cheung [144], após o crescimento de *P. cruentum* à escala laboratorial em frascos de Erlenmeyer de 1L e posterior extração assistida por ultrassons com acetona 90% durante 5 minutos, obteve uma atividade oxidante inferior a 5 mg TE/g, quantificado pelo método do radical ABTS. Castro-Varela, Celis-Plá, Abdala-Díaz e Figueroa [145] obtiveram e um máximo de $4,0 \pm 0,4$ mg TE/g para a atividade antioxidante quantificada pelo método do radical DPPH em extratos obtidos a partir de *P. cruentum* à escala laboratorial em frascos de 500 mL.

4.6. Fracionamento de Biomoléculas Intracelulares por Cromatografia de Troca Iónica

Após a determinação dos conteúdos em polissacáridos neutros, ácidos, sulfatados, proteína total, compostos fenólicos totais e flavonóides totais, selecionou-se um extrato para fracionamento de polissacáridos.

A seleção do extrato teve por base a concentração em polissacáridos ácidos, selecionando-se a fração FHCl da ME, da biomassa MN1 produzida à escala laboratorial.

Após a seleção, realizou-se o fracionamento por cromatografia de troca iónica com resina DEAE-52 numa coluna (1,5 x 10 cm) com gradiente de NaCl 1 M. Foi aplicado 1,5 mL do extrato selecionado à coluna contendo 29,14 mg de polissacáridos neutros.

Após a recolha de 60 frações cromatográficas, foi determinado o conteúdo em polissacáridos neutros, polissacáridos sulfatados, proteína total e compostos fenólicos totais e foi representado o cromatograma da Figura 53.

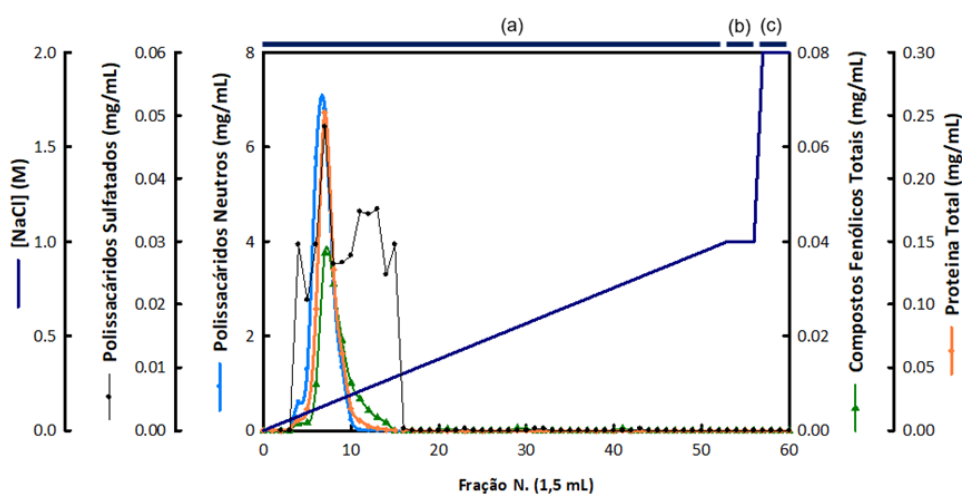


Figura 53 - Cromatograma da fração FHCl obtida por ME a partir da biomassa MN1 produzida à escala laboratorial, aplicado em coluna contendo a resina DEAE-52. Sistema eluente 0-53 (a): gradiente de NaCl 1M; 54-56 (b): NaCl 1 M; 57-60 (c): NaCl 2M.

Pela análise da Figura 53, verifica-se que não foi possível separar os compostos bioativos doseados e presentes na amostra, uma vez que a eluição destes compostos ocorreu praticamente nas mesmas frações.

Os polissacáridos neutros foram eluídos entre as frações 4 e 11, isto é, a uma concentração de NaCl entre 0,075 e 0,208 M, sendo a sétima fração a mais concentrada com $6,799 \pm 0,555$ mg/mL de polissacáridos neutros. Para estas biomoléculas, o rendimento dos polissacáridos recuperados, após eluição, relativamente ao que foi aplicado na coluna cromatográfica foi de 98,554%.

Os polissacáridos sulfatados foram fracionados entre as frações 2 e 13, correspondendo a uma eluição a uma concentração de NaCl entre 0,038 e 0,245 M. O perfil cromatográfico referente a estes polissacáridos não é conclusivo, uma vez que o

método utilizado para o seu doseamento não é suficientemente sensível para detetar baixas concentrações de polissacáridos sulfatados e é afetado por alguma interferências, e por esse motivo o rendimento de recuperação destas moléculas foi superior a 100%, [84].

As proteínas presentes na FHCl sujeita a fracionamento, foram eluídas entre as frações 3 e 14, a uma concentração de NaCl entre 0,057 e 0,264 M, sendo novamente a sétima fração a mais concentrada, contendo $0,252 \pm 0,006$ mg/mL de proteína total. O rendimento em proteína total eluída, relativamente ao que foi aplicado na coluna cromatográfica foi de 92,36 %.

Os compostos fenólicos totais também avaliados, verificando-se que foram eluídos entre a fração 4 e 14, correspondendo a uma concentração de NaCl entre 0,075 e 0,264 M, sendo, mais uma vez, a sétima fração a que apresentou um maior teor desta biomolécula, com $0,038 \pm 0,001$ mg GAE/mL de compostos fenólicos totais. A recuperação dos compostos fenólicos totais, foi relativamente baixa, verificando-se um rendimento de 43,56 %.

4.7. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

De modo a detetar características estruturais dos compostos presentes quer nas amostras de biomassa quer nos extratos obtidos, realizou-se espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier.

Esta técnica foi aplicada a várias amostras, Figura 54, nomeadamente à biomassa inicial produzida à escala laboratorial e em FBR FP (A), ao extrato de MAE utilizando KOH 0,1 M como solvente realizado à biomassa MN1 e HN1 produzida à escala laboratorial e em FBR FP (B), à camada gel obtida no processo de ultrafiltração (MWCO 139 kDa), permeado 2 e 3 e retentado 2 do FBR FP MN1 (C) e ao extrato selecionado para a troca iónica (ME FHCl MN1) e à mistura das frações 6, 7, 8 e 9, provenientes da cromatografia de troca iónica (D).

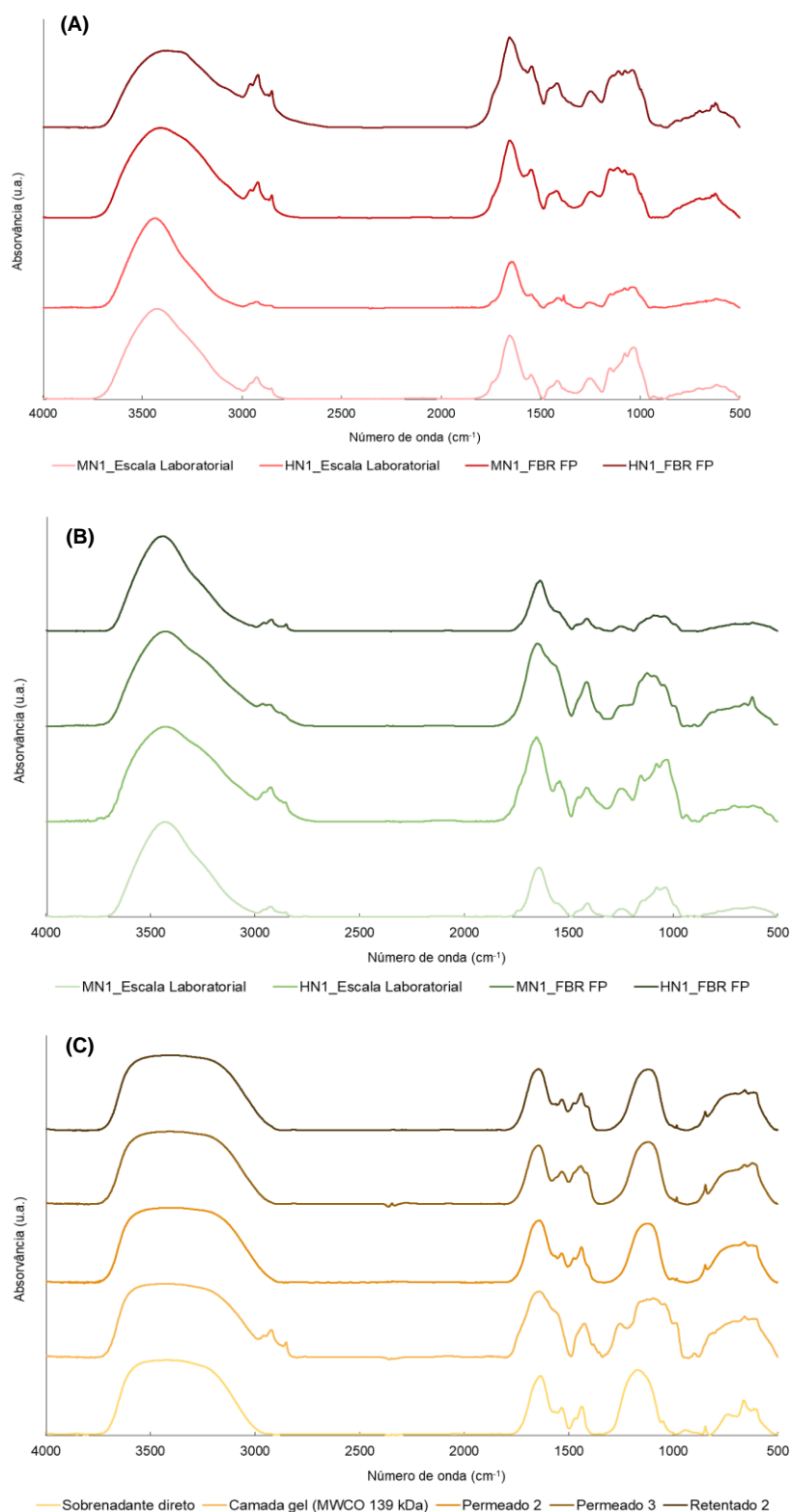


Figura 54 - Espectros de FTIR da biomassa inicial MN1 e HN1 produzida à escala laboratorial e em FBR FP, após liofilização **(A)**, ao extrato de MAE utilizando KOH 0,1 M como solvente realizado à biomassa MN1 e HN1 produzida à escala laboratorial e em FBR FP **(B)**, da camada gel obtida no processo de ultrafiltração (MWCO 139 kDa), permeado 2 e 3 e retentado 2 do FBR FP MN1 **(C)** e extrato selecionado para a cromatografia de troca iônica (ME FHCi MN1) e mistura das frações 6, 7, 8 e 9 **(D)**, em pastilhas de KBr. (Continua na página seguinte).

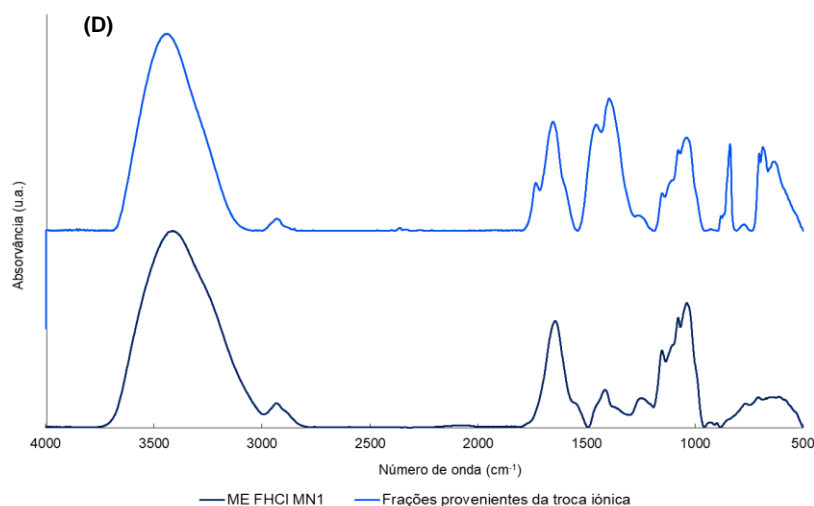


Figura 54 - Espectros de FTIR da biomassa inicial MN1 e HN1 produzida à escala laboratorial e em FBR FP, após liofilização **(A)**, ao extrato de MAE utilizando KOH 0,1 M como solvente realizado à biomassa MN1 e HN1 produzida à escala laboratorial e em FBR FP **(B)**, da camada gel obtida no processo de ultrafiltração (MWCO 139 kDa), permeado 2 e 3 e retentado 2 do FBR FP MN1 **(C)** e extrato selecionado para a cromatografia de troca iônica (ME FHCl MN1) e mistura das frações 6, 7, 8 e 9 **(D)**, em pastilhas de KBr. (Continuação).

Através da análise da Figura 54 (A), verifica-se que os espectros de FTIR obtidos para as duas condições de crescimento, MN e HN, e produzidos à escala laboratorial e em FBR FP apresentam-se muito semelhantes.

Observando a Figura 54, verifica-se que em todos os espectros se identificam algumas bandas características de polissacáridos, como é o caso da banda em $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, correspondente à vibração de estiramento do grupo OH, e a banda no intervalo de $2970\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ das vibrações de estiramento simétricas e assimétricas de CH e CH_2 (com exceção do sobrenadante direto, permeados e Retentado, Figura 54 (C)). A $1450\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$ verifica-se uma banda característica de vibrações deformacionais de CH_3 e CH_2 . A banda em $1060\text{-}1010\text{ cm}^{-1}$ poderá corresponder ao estiramento assimétrico e simétrico de C-O-C. Abaixo de 700 cm^{-1} , existe uma banda que indica a conformação α e β de polissacáridos. Além disso, nos espectros correspondentes à biomassa inicial produzida à escala laboratorial, Figura 54 (A), e no espectro do extrato selecionado para a troca iônica (ME FHCl MN1), Figura 54 (D), ainda se identifica uma banda a $1750\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ que poderá corresponder ao ião carboxilato. Esta banda nesta região é característica de polissacáridos pécicos. [111], [146].

A presença de uma banda a $1270\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, poderá corresponder ao estiramento simétrico e assimétrico de O- SO_3 . Além disso, a banda $1060\text{-}1010\text{ cm}^{-1}$ poderá corresponder ao estiramento de C-O-S. Estas bandas podem confirmar a existência de polissacáridos sulfatados na biomassa, já que confirmam a ligação de grupos sulfonilos

aos polissacáridos. Esta banda está presente em todos os espectros à exceção dos espectros do sobrenadante direto, permeados e retentado 2 da Figura 54 (C) [45], [111].

Ainda se verifica a presença da Amida I a $1680-1620\text{ cm}^{-1}$, devido à vibração de estiramento da ligação C=O e a presença da Amida II a $1560-1520\text{ cm}^{-1}$, devido à deformação da ligação N-H em conjunto com o estiramento da ligação C-N. Estas duas bandas revelam a presença de proteína [112].

Ainda existem duas regiões importantes para verificar a presença de lípidos em microalgas, a banda $3050-2800\text{ cm}^{-1}$ correspondente a vibrações de estiramento simétricas e assimétricas de CH e CH₂ de lípidos e a banda em 1745 cm^{-1} correspondente vibração de estiramento da ligação C=O dos ésteres de triglicéridos. Uma vez que na Figura 54 (A) se verifica a presença destas duas regiões, a presença de lípidos poderá ocorrer na biomassa produzida à escala laboratorial. Além disso, na Figura 54 (D), no extrato selecionado para a troca iónica (ME FHCl MN1) também poderá haver presença de lípidos, uma vez que também ocorrem estas duas bandas [113].

4.9. Espectroscopia de Fluorescência

Para avaliar as propriedades fotofísicas dos extratos provenientes da fração aquosa FW1 de ME obtida a partir da biomassa MN1 produzida à escala laboratorial, foram realizados espectros de absorção, excitação e emissão, uma vez que foi nesta fração de extração onde foram detetadas concentrações mais elevadas de ficoeritrina.

Na Figura 55 apresentam-se os espectros de absorção, excitação e emissão da B-ficoeritrina avaliada.

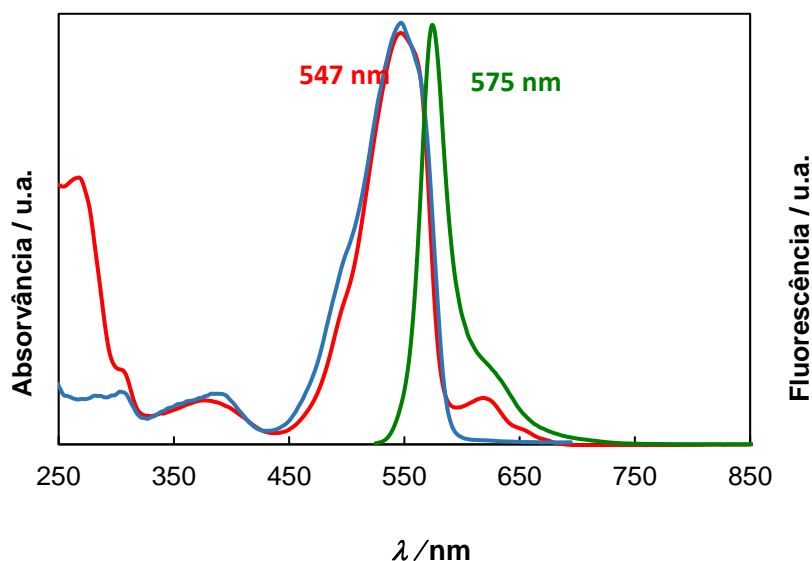


Figura 55 - Espectro de UV-Vis (vermelho), excitação (azul, monitorizado a 575 nm) e emissão (verde, $\lambda_{exc} = 550$ nm), em água.

Para a obtenção dos espectros, as amostras foram excitadas a $\lambda_{exc} = 550$ nm, apresentando o seu máximo de emissão centrado a 575 nm. Os respectivos espectros de excitação monitorizados ao comprimento de onda de emissão máximo, indicam que a transição eletrônica dos cromóforos que contribuem para a emissão da B-ficoeritrina ocorre a ca. 547 nm, corroborando o perfil observado no seu espectro de UV-Vis.

Ainda foi possível determinar o rendimento quântico pelo método relativo, tendo sido obtido um valor de 0,60, utilizando como padrão Rodamina B.

Grabowski e Gantt [147], após produção de *P. cruentum* em meio artificial salgado sob iluminação contínua, isolamento dos ficobilissomas e purificação das ficobiliproteínas, representaram o espectro de absorção da B-ficoeritrina (545 nm) e determinaram o rendimento quântico, usando como padrão Rodamina B. Deste modo, obtiveram um rendimento quântico de $0,98 \pm 0,05$, demonstrando ser superior ao obtido neste estudo. A diferença nos rendimentos quânticos poderá estar relacionada com a extração e purificação da B-ficoeritrina.

Capítulo 5

Conclusões e Perspetivas Futuras

Conclusões e Perspetivas Futuras

Este trabalho final de mestrado teve como objetivo a produção, isolamento e caracterização de biomoléculas intra e extracelulares da microalga vermelha *Porphyridium cruentum*.

A produção de *P. cruentum* foi efetuada à escala laboratorial em balões de 2 litros e à escala industrial em fotobiorreatores *flat panel*, testando duas concentrações de meio de cultura comercial. O objetivo foi obter duas concentrações da fonte de azoto que levassem a uma maior produção de compostos extracelulares (MN, 6 mM de NO_3^-) e intracelulares (HN, 18 mM de NO_3^-). Ao longo da produção de *P. cruentum* verificou-se que esta teve um crescimento muito mais controlado e alcançou uma concentração de biomassa superior quando produzida à escala laboratorial, o que pode dever-se às condições de cultivo mais controladas e sem contaminações, comparativamente à biomassa produzida em fotobiorreatores *flat panel*.

Para a separação da biomassa produzida à escala laboratorial do meio de cultura foi utilizada a centrifugação. No entanto, devido à necessidade de otimização desta etapa, de forma a poder tornar-se rentável do ponto de vista produtivo e económico, foi utilizado um processo de ultrafiltração com uma membrana polimérica de acetato de celulose de 139 kDa para a separação da biomassa do meio de cultura dos FBR FP. Além disso, ainda se utilizou a ultrafiltração com membranas poliméricas de acetato de celulose de 10 e 4 kDa para fracionar as biomoléculas extracelulares, nomeadamente, os polissacáridos, presentes no meio de cultura dos FBR FP.

Relativamente às biomoléculas extracelulares produzidas à escala laboratorial, apesar de se conseguir valores próximos aos reportados na literatura, a dissolução dos EPS após precipitação não foi completa, o que poderá indicar que não foi possível quantificar a concentração total de cada biomolécula presente. Posto esta dificuldade, sugere-se uma filtração a vácuo seguida de diálise com água desionizada, após a precipitação com álcoois, de forma a remover sais orgânicos e reduzir o resíduo insolúvel.

Já para as biomoléculas extracelulares produzidas em FBR FP, foi possível fracionar e concentrar, através do processo de ultrafiltração, polissacáridos neutros, sulfatados e proteína total (MN1, MN2 e HN3). Quando foi possível obter a camada gel, os compostos bioativos quantificados apresentaram concentrações altas, uma vez que esta camada gel poderá ter origem na mucilagem polisacarídica existente em *P. cruentum*, que substitui a parede celular e é conhecida por ser rica em polissacáridos,

nomeadamente sulfatados. Quando foram recolhidas frações ao longo do tempo de permeação (MN3, HN1 e HN2), não se identificou um padrão de comportamento das biomoléculas ao longo das frações recolhidas. No entanto, foi novamente possível fracionar e concentrar biomoléculas. O sobrenadante apresentou sempre elevadas concentrações das biomoléculas, o que poderá ser resultado da lise celular devido ao armazenamento a -20 °C após produção, permeação para separar a biomassa do meio de cultura e centrifugação. Deste modo, algumas biomoléculas quantificadas poderão ser intracelulares.

A extração dos compostos bioativos intracelulares foi realizada utilizando métodos convencionais, como a extração convencional em multi-etapas (ME) e métodos não convencionais, como a extração assistida por micro-ondas (MAE), uma vez que estes métodos se revelaram eficazes na extração de várias biomoléculas a partir de microalgas.

Para a biomassa produzida à escala laboratorial, a extração convencional em multi-etapas permitiu obter concentrações superiores de polissacáridos neutros, sulfatados e proteína total, obtendo-se valores entre $894,761 \pm 15,346$ e $1270,230 \pm 105,960$ mg de polissacáridos neutros/g biomassa, $43,914 \pm 2,040$ e $81,263 \pm 2,656$ mg de polissacáridos sulfatados/g biomassa e $26,367 \pm 2,774$ e $36,858 \pm 0,702$ mg de proteína total/g biomassa. A extração assistida por micro-ondas utilizando como solvente KOH 0,1 M, permitiu obter valores próximos, ou até mesmo superiores, à ME relativamente aos polissacáridos ácidos, permitindo alcançar concentrações entre $230,721 \pm 18,944$ e $558,349 \pm 4,484$ mg polissacáridos ácidos/g biomassa. Além disso, permitiu uma maior concentração de todas as ficobiliproteínas, nomeadamente a ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina. À extração assistida por micro-ondas utilizando EtOH como solvente, ainda foi avaliado o teor em lípidos, sendo possível alcançar um máximo de $36,748 \pm 2,264$ mg/g biomassa.

Para a biomassa produzida em FBR FP, a extração assistida por micro-ondas utilizando KOH 0,1 M e HCl 0,1 M como solvente permitiu obter concentrações de polissacáridos neutros e polissacáridos ácidos próximos, com valores entre $67,819 \pm 3,687$ e $182,851 \pm 17,082$ mg de polissacáridos neutros/g biomassa e $75,797 \pm 1,679$ e $167,971 \pm 2,929$ mg de polissacáridos ácidos/g biomassa. Já para o conteúdo de polissacáridos sulfatados, proteína total e ficobiliproteínas, o solvente KOH 0,1 M permitiu alcançar concentrações superiores destas biomoléculas.

A biomassa produzida à escala laboratorial, apresentou maiores concentrações de compostos bioativos comparativamente à biomassa produzida em FBR FP, com exceção da proteína total. Este resultado poderá ser devido ao facto de a biomassa produzida à escala laboratorial ter um crescimento mais controlado e sem contaminações, o que permitiu alcançar maior concentração de biomassa e, conseqüentemente, maior produção de biomoléculas intracelulares.

A partir destes resultados e conclusões sugere-se que no futuro para a avaliação e quantificação de cada composto sejam utilizadas diferentes condições e métodos de extração específicos para cada um destes, já que, por exemplo para as ficobiliproteínas é mais comum realizar-se uma extração com água usando temperaturas moderadas devido à termosensibilidade e ao facto de se apresentarem com boa estabilidade a pH entre 4 e 10.

Não foi possível identificar diferenças significativas nos compostos bioativos produzidos sob a condição MN e HN.

Uma vez que as microalgas têm sido cada vez mais procuradas como antioxidantes naturais, a capacidade antioxidante *in vitro* também foi avaliada através da quantificação de moléculas descritas como apresentando atividade antioxidante, nomeadamente compostos fenólicos totais e flavonóides totais. Novamente para a biomassa produzida à escala laboratorial, a extração convencional em multi-etapas foi a que apresentou maiores concentrações destes compostos com valores entre $7,325 \pm 1,370$ e $8,727 \pm 0,206$ mg de compostos fenólicos totais/g biomassa e $7,590 \pm 0,559$ e $13,352 \pm 1,793$ mg de flavonóides totais/g biomassa. Para a biomassa produzida em FBR FP, o solvente KOH 0,1 M permitiu a maior concentração de compostos fenólicos totais com valores entre $4,490 \pm 0,016$ e $8,665 \pm 0,181$ mg/g biomassa e de flavonóides totais com valores entre $7,407 \pm 0,709$ e $51,782 \pm 2,315$ mg/g biomassa. Comparando a extração comum à biomassa produzida à escala laboratorial e em FBR FP (MAE utilizando KOH 0,1 M como solvente), verifica-se que, ao contrário das biomoléculas, a concentração de compostos fenólicos totais e flavonóides totais foi superior na biomassa produzida em FBR FP.

A atividade antioxidante dos extratos foi também avaliada pelo método do radical ABTS. A biomassa produzida à escala laboratorial apresentou a maior concentração, em equivalente trolox, após a extração convencional em multi-etapas. Já na biomassa produzida em FBR FP, a extração assistida por micro-ondas utilizando KOH 0,1 M como solvente permitiu a maior atividade antioxidante.

O extrato FHCl da extração convencional em multi-etapas, da biomassa MN1 produzida à escala laboratorial foi também sujeito a um fracionamento de biomoléculas por cromatografia de troca iónica, em coluna, contendo a resina catiónica DEAE-52. Não foi possível separar estes compostos bioativos, visto que a eluição de polissacáridos neutros, proteína total e compostos fenólicos totais ocorreu praticamente nas mesmas frações. Seria de grande interesse, futuramente, testar-se uma nova eluição, por exemplo, com um gradiente de NaCl 2M, de forma a obter-se polissacáridos purificados, já que são dos compostos bioativos de maior interesse.

A identificação e caracterização parcial dos compostos foi avaliada em diferentes extratos através de FTIR, onde foi possível identificar regiões correspondentes a proteínas e lípidos. Além disso, identificou-se em todos os extratos as regiões de *footprint* dos polissacáridos e verificou-se que, independentemente dos processos de extração, do solvente utilizado, da temperatura e do tempo de extração, os polissacáridos não apresentaram diferenças estruturais significativas. Propõe-se a utilização de outros métodos, como por exemplo, a análise elementar, técnicas de espectroscopia ^1H e ^{13}C RMN e GC-MS para identificar diferenças nos extratos e identificar novos polissacáridos com propriedades potenciais para diversas aplicações industriais e medicinais.

As propriedades fotofísicas dos extratos provenientes da fração aquosa FW1 da extração convencional em multi-etapas também foram avaliadas através de espectros de absorção, excitação e emissão. Verificou-se que a transição eletrónica dos cromóforos que contribuem para a emissão da B-ficoeritrina ocorre a cerca de 547 nm corroborando o perfil observado no seu espectro de UV-Vis. Futuramente, e atendendo às propriedades luminescentes da B-ficoeritrina presente no extrato da biomassa, será de explorar a sua fotoestabilidade e potencial fotoluminescência ajustável, perspetivando a sua aplicação como sondas fluorescentes na área da bioimagem e diagnóstico clínico.

Propõe-se também que, futuramente, se teste a atividade bacteriostática de *P. cruentum*, já que é conhecido que os polissacáridos podem ter atividade biológica como anti-inflamatória, antibacteriana e antiviral.

Uma vez que a indústria de produção de microalgas está cada vez mais ligada a outros ramos industriais, como a indústria farmacêutica, cosmética, agrícola e alimentar, deverá haver um estudo contínuo no desenvolvimento da produção e investigação de forma a ir ao encontro das necessidades.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- [1] V. Balasubramaniam, R. D. N. Gunasegavan, S. Mustar, J. C. Lee, and M. F. M. Noh, "Isolation of Industrial Important Bioactive Compounds from Microalgae," *Molecules*, vol. 26, no. 4, pp. 943–987, 2021, doi: 10.3390/molecules26040943.
- [2] M. I. Khan, J. H. Shin, and J. D. Kim, "The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products," *Microb. Cell Fact.*, vol. 17, no. 1, pp. 36–56, 2018, doi: 10.1186/s12934-018-0879-x.
- [3] V. Dolganyuk *et al.*, "Microalgae: A promising Source of Valuable Bioproducts," *Biomolecules*, vol. 10, no. 8, pp. 1–24, 2020, doi: 10.3390/biom10081153.
- [4] R. Gallego, L. Montero, A. Cifuentes, E. Ibáñez, and M. Herrero, "Green Extraction of Bioactive Compounds from Microalgae," *J. Anal. Test.*, vol. 2, no. 2, pp. 109–123, 2018, doi: 10.1007/s41664-018-0061-9.
- [5] R. Gallego, M. Martínez, A. Cifuentes, E. Ibáñez, and M. Herrero, "Development of a Green Downstream Process for the Valorization of *Porphyridium cruentum* Biomass," *Molecules*, vol. 24, no. 8, pp. 1564–1576, 2019, doi: 10.3390/molecules24081564.
- [6] O. Pignolet, S. Jubeau, C. Vaca-Garcia, and P. Michaud, "Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 8, pp. 781–796, 2013, doi: 10.1007/s10295-013-1281-7.
- [7] S. Leu and S. Boussiba, "Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae," *Ind. Biotechnol.*, vol. 10, no. 3, pp. 169–183, 2014, doi: 10.1089/ind.2013.0039.
- [8] C. Gaignard *et al.*, "New horizons in culture and valorization of red microalgae," *Biotechnol. Adv.*, vol. 37, no. 1, pp. 193–222, 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.014.
- [9] M. Rizwan, G. Mujtaba, S. A. Memon, K. Lee, and N. Rashid, "Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 92, pp. 394–404, 2018, doi: 10.1016/j.rser.2018.04.034.
- [10] F. G. Acien *et al.*, "Photobioreactors for the production of microalgae," *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology*, vol. 12, no. 2, pp. 1–44, 2013, doi: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7.

- [11] J. Jerney and K. Spilling, "Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1980, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1007/7651_2018_130.
- [12] M. G. De Morais, B. D. S. Vaz, E. G. De Morais, and J. A. V. Costa, "Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–15, 2015, doi: 10.1155/2015/835761.
- [13] A. Vuppaladadiyam, P. Prinsen, A. Raheem, R. Luque, and M. Zhao, "Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review," *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 12, no. 2, pp. 304–324, 2018, doi: 10.1002/bbb.
- [14] R. Xiao and Y. Zheng, "Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 7, pp. 1225–1244, 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.004.
- [15] W. Li *et al.*, "Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects," *Biotechnol. Adv.*, vol. 37, no. 2, pp. 340–353, 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.008.
- [16] S. Li, L. Ji, Q. Shi, H. Wu, and J. Fan, "Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp.," *Bioresour. Technol.*, vol. 292, pp. 122048–122063, 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.122048.
- [17] M. M. Reboloso Fuentes, G. G. Acién Fernández, J. A. Sánchez Pérez, and J. L. Guil Guerrero, "Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*," *Food Chem.*, vol. 70, no. 3, pp. 345–353, 2000, doi: 10.1016/S0308-8146(00)00101-1.
- [18] C. Safi, M. Charton, O. Pignolet, P. Y. Pontalier, and C. Vaca-Garcia, "Evaluation of the protein quality of *Porphyridium cruentum*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, no. 2, pp. 497–501, 2013, doi: 10.1007/s10811-012-9883-4.
- [19] N. Mutmainnah, Y. Risjani, A. Maizar, and S. Hertika, "Growth Rate and Chemical Composition of Secondary Metabolite Extracellular Polysaccharide (EPS) in Microalga *Porphyridium cruentum*," *J. Exp. Life Sci.*, vol. 8, no. 2, pp. 97–102, 2018.
- [20] N. A. Aizdaicher, I. V. Stonik, and A. V. Boroda, "The development of *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) Drew et Ross, 1965 (Rhodophyta) from Amursky Bay, Sea of Japan, in a laboratory culture," *Russ. J. Mar. Biol.*, vol. 40, no. 4, pp. 279–285, 2014, doi: 10.1134/S1063074014040038.

- [21] A. Bayu, D. Radini, N. Siti, I. Rahmawati, and M. Yunovilsa, “Biological and technical aspects on valorization of red microalgae genera *Porphyridium*,” *Biomass Convers. Biorefinery*, pp. 1–17, 2021.
- [22] M. A. Borowitzka, “High-value products from microalgae — their development and commercialisation,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, pp. 743–756, 2013, doi: 10.1007/s10811-013-9983-9.
- [23] S. Abu-ghosh, Z. Dubinsky, V. Verdelho, and D. Iluz, “Unconventional high-value products from microalgae: A review,” *Bioresour. Technol.*, vol. 329, pp. 124895–124906, 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.124895.
- [24] C. Russell, C. Rodriguez, and M. Yaseen, “High-value biochemical products & applications of freshwater eukaryotic microalgae,” *Sci. Total Environ.*, vol. 809, pp. 151111–151124, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151111.
- [25] A. Decamp, O. Michelo, C. Rabbat, C. Laroche, D. Grizeau, and O. Gonçalves, “A New, Quick, and Simple Protocol to Evaluate Microalgae Polysaccharide Composition,” *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 2, pp. 1–18, 2021.
- [26] L. E. Rioux and S. L. Turgeon, *Seaweed carbohydrates*. Elsevier Inc., 2015.
- [27] H. Ben, S. Smaoui, M. Barkallah, K. Elhadeif, and L. Tounsi, “Sulfated exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*: A useful strategy to extend the shelf life of minced beef meat,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 193, pp. 1215–1225, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.161.
- [28] L. Li, J. S. Rowbotham, H. Christopher Greenwell, and P. W. Dyer, *An Introduction to Pyrolysis and Catalytic Pyrolysis: Versatile Techniques for Biomass Conversion*. 2013.
- [29] S. Raveendran, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, “Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, pp. 605–626, 2013, doi: 10.1016/j.nano.2012.12.006.
- [30] J. Muthukumar, R. Chidambaram, and S. Sukumaran, “Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries—A review,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 58, no. 7, pp. 2453–2466, 2021, doi: 10.1007/s13197-020-04837-0.
- [31] M. Filomena, D. J. Raposo, R. Manuel, S. Costa, A. Maria, and M. Bernardo, “Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae,” *Mar. Drugs*, vol. 11, no. 1, pp. 233–252, 2013, doi:

- 10.3390/md11010233.
- [32] S. Sekar, "Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization," *J. Appl. Phycol.*, vol. 20, pp. 113–136, 2008, doi: 10.1007/s10811-007-9188-1.
- [33] B. Fernández-Rojas, J. Hernández-Juárez, and J. Pedraza-Chaverri, "Nutraceutical properties of phycocyanin," *J. Funct. Foods*, vol. 11, pp. 375–392, 2014, doi: 10.1016/j.jff.2014.10.011.
- [34] L. Sun, S. Wang, L. Chen, and X. Gong, "Promising fluorescent probes from phycobiliproteins," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 9, no. 2, pp. 177–188, 2003, doi: 10.1109/JSTQE.2003.812499.
- [35] N. Tandeau De Marsac, "Phycobiliproteins and phycobilisomes: The early observations," *Photosynth. Res.*, vol. 76, no. 1–3, pp. 193–205, 2003, doi: 10.1007/1-4020-3324-9_43.
- [36] C. Juin *et al.*, "Microwave-Assisted Extraction of Phycobiliproteins from *Porphyridium purpureum*," *J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 175, no. 1, pp. 1–15, 2015, doi: 10.1007/s12010-014-1250-2.
- [37] B. Kapoor, D. Kapoor, R. Gautam, and S. Bhardwaj, "Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits," *Curr. Nutr. Rep.*, vol. 10, no. 3, pp. 232–242, 2021.
- [38] X. Sun and L. Ren, "Enhancement of lipid accumulation in microalgae by metabolic engineering," *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1864, no. 4, pp. 552–566, 2019, doi: 10.1016/j.bbalip.2018.10.004.
- [39] Y. Durmaz, M. Monteiro, N. Bandarra, Ş. Gökpınar, and O. Işık, "The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga, *Porphyridium cruentum*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 19, no. 3, pp. 223–227, 2007, doi: 10.1007/s10811-006-9127-6.
- [40] H. Hu, H. Wang, L. Ma, X. Shen, and R. J. Zeng, "Effects of nitrogen and phosphorous stress on the formation of high value LC-PUFAs in *Porphyridium cruentum*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 13, pp. 5763–5773, 2018.
- [41] M. R. Bilad, H. A. Arafat, and I. F. J. Vankelecom, "Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 7, pp. 1283–1300, 2014, doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.07.008.
- [42] N. Rossignol, L. Vandanjon, P. Jaouen, and F. Quéméneur, "Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared

- performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration,” *Aquac. Eng.*, vol. 20, no. 3, pp. 191–208, 1999, doi: 10.1016/S0144-8609(99)00018-7.
- [43] M. Frappart, A. Massé, M. Y. Jaffrin, J. Pruvost, and P. Jaouen, “Influence of hydrodynamics in tangential and dynamic ultrafiltration systems for microalgae separation,” *Desalination*, vol. 265, no. 1–3, pp. 279–283, 2011, doi: 10.1016/j.desal.2010.07.061.
- [44] H. Li *et al.*, “Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration,” *Process Biochem.*, vol. 46, no. 5, pp. 1104–1109, 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2011.01.028.
- [45] C. Delattre, G. Pierre, C. Laroche, and P. Michaud, “Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 7, pp. 1159–1179, 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.001.
- [46] S. P. Bera, M. Godhaniya, and C. Kothari, “Emerging and advanced membrane technology for wastewater treatment: A review,” *J. Basic Microbiol.*, vol. 62, no. 3–4, pp. 245–259, 2022, doi: 10.1002/jobm.202100259.
- [47] S. H. Shuit, Y. T. Ong, K. T. Lee, B. Subhash, and S. H. Tan, “Membrane technology as a promising alternative in biodiesel production: A review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 6, pp. 1364–1380, 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.02.009.
- [48] M. Mota, J. A. Teixeira, and A. Yelshin, “Influence of cell-shape on the cake resistance in dead-end and cross-flow filtrations,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 27, no. 2, pp. 137–144, 2002, doi: 10.1016/S1383-5866(01)00202-7.
- [49] B. Van der Bruggen, *Microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, reverse osmosis, and forward osmosis*. Elsevier Inc., 2018.
- [50] M. A. Hafiz, A. H. Hawari, P. Das, S. Khan, and A. Altaee, “Comparison of dual stage ultrafiltration and hybrid ultrafiltration-forward osmosis process for harvesting microalgae (*Tetraselmis* sp.) biomass,” *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.*, vol. 157, pp. 108112–108119, 2020, doi: 10.1016/j.cep.2020.108112.
- [51] C. Dixon and L. R. Wilken, “Green microalgae biomolecule separations and recovery,” *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 5, no. 1, pp. 14–37, 2018, doi: 10.1186/s40643-018-0199-3.
- [52] S. Khanra, M. Mondal, G. Halder, O. N. Tiwari, K. Gayen, and T. K. Bhowmick,

- “Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 110, pp. 60–84, 2018, doi: 10.1016/j.fbp.2018.02.002.
- [53] A. de S. e. Silva, W. T. de Magalhães, L. M. Moreira, M. V. P. Rocha, and A. K. P. Bastos, “Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Arthrospira (Spirulina) platensis* using the concept of green chemistry,” *Algal Res.*, vol. 35, pp. 178–184, 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.08.015.
- [54] M. C. Semedo, A. Karmali, and L. Fonseca, “A Novel Colorimetric Assay of β -D-Glucans in Basidiomycete Strains by Alcian Blue Dye in a 96-Well Microtiter Plate,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 31, no. 6, pp. 1526–1535, 2015, doi: 10.1002/btpr.2163.
- [55] Y. K. Leong, F. C. Yang, and J. S. Chang, “Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 251, pp. 117006–117021, 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117006.
- [56] F. J. Barba, N. Grimi, and E. Vorobiev, “New Approaches for the Use of Non-conventional Cell Disruption Technologies to Extract Potential Food Additives and Nutraceuticals from Microalgae,” *Food Eng. Rev.*, vol. 7, no. 1, pp. 45–62, 2015, doi: 10.1007/s12393-014-9095-6.
- [57] S. Y. Xu, X. Huang, and K. L. Cheong, “Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities,” *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 12, pp. 1–16, 2017, doi: 10.3390/md15120388.
- [58] L. Shi, “Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 92, pp. 37–48, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100.
- [59] A. A. Soares *et al.*, “Hepatoprotective Effects of Mushrooms,” *Molecules*, vol. 18, no. 7, pp. 7609–7630, 2013, doi: 10.3390/molecules18077609.
- [60] T. Lee, J. Chang, and H. Wang, “Current developments in high-throughput analysis for microalgae cellular contents,” *J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 11, pp. 1301–1314, 2013, doi: 10.1002/biot.201200391.
- [61] F. Zhu, B. Du, Z. Bian, and B. Xu, “Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 41, pp. 165–173, 2015.
- [62] M. C. Semedo, A. Karmali, and L. Fonseca, “A high throughput colorimetric assay of β -1,3-D-glucans by Congo red dye,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 109, pp. 140–

- 148, 2015, doi: 10.1016/j.mimet.2014.12.020.
- [63] J. P. Pérez, A. A. Muñoz, C. P. Figueroa, and C. Agurto-Muñoz, "Current analytical techniques for the characterization of lipophilic bioactive compounds from microalgae extracts," *Biomass and Bioenergy*, vol. 149, pp. 106078–106094, 2021, doi: 10.1016/j.biombioe.2021.106078.
- [64] V. Sant'Anna, P. D. Gurak, L. D. Ferreira Marczak, and I. C. Tessaro, "Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review," *Dye. Pigment.*, vol. 98, no. 3, pp. 601–608, 2013, doi: 10.1016/j.dyepig.2013.04.011.
- [65] A. J. Meléndez-Martínez, G. Britton, I. M. Vicario, and F. J. Heredia, "Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments," *Food Chem.*, vol. 101, no. 3, pp. 1145–1150, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.03.015.
- [66] A. M. Mohammed, "UV-Visible Spectrophotometric Method and Validation of Organic Compounds," *Eur. J. Eng. Res. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 8–11, 2018, doi: 10.24018/ejers.2018.3.3.622.
- [67] J. Chen, J. qing Li, T. Li, H. gao Liu, and Y. zhong Wang, "Application of UV-Vis and Infrared Spectroscopy on Wild Edible Bolete Mushrooms Discrimination and Evaluation: A Review," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1080/10408347.2021.1984870.
- [68] P. Corrêa, W. Júnior, A. Martins, N. Caetano, and T. Mata, "Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods," *Processes*, vol. 9, pp. 1–43, 2021.
- [69] Z. Chen, L. Wang, S. Qiu, and S. Ge, "Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production," *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, pp. 8–24, 2018, doi: 10.1155/2018/3642363.
- [70] A. Hosikian, S. Lim, R. Halim, and M. Danquah, "Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects," *Int. J. Chem. Eng.*, vol. 2010, pp. 1–12, 2010, doi: 10.1155/2010/391632.
- [71] D. G. Sar, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, and A. Sanz-Medel, "Quantitative methods for studying DNA interactions with chemotherapeutic cisplatin," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 29, no. 11, pp. 1390–1398, 2010, doi: 10.1016/j.trac.2010.07.019.
- [72] F. Liu, C. Zhang, Y. Wang, and G. Chen, "A review of the current and emerging detection methods of marine harmful microalgae," *Sci. Total Environ.*, vol. 815,

- pp. 152913–152925, 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.152913.
- [73] N. Li, W. Zhang, Y. Li, and J. Lin, “Analysis of cellular biomolecules and behaviors using micro fluidic chip and fluorescence method,” *Trends Anal. Chem.*, vol. 117, pp. 200–214, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.05.029.
- [74] J. Liu, L. Zeng, and Z. Ren, “Recent application of spectroscopy for the detection of microalgae life information: A review,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 55, no. 1, pp. 26–59, 2020, doi: 10.1080/05704928.2018.1509345.
- [75] M. DuBois, K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, and F. Smith, “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances,” *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- [76] B. Rühmann, J. Schmid, and V. Sieber, “Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. 565, pp. 1–8, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00565.
- [77] F. Boshagh, “Measurement methods of carbohydrates in dark fermentative hydrogen production- A review,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 46, no. 47, pp. 24028–24050, 2021, doi: 10.1016/j.ijhydene.2021.04.204.
- [78] T. Masuko, A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S. I. Nishimura, and Y. C. Lee, “Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format,” *Anal. Biochem.*, vol. 339, no. 1, pp. 69–72, 2005, doi: 10.1016/j.ab.2004.12.001.
- [79] Z. Dische, “A new specific color reaction of heuxuronic acids,” *J. Biol. Chem.*, vol. 167, pp. 189–198, 1947.
- [80] G. Holzman, R. Macallister, and C. Niemann, “The colorimetric determination of hexoses with carbazole,” *J. Biol. Chem.*, vol. 171, pp. 27–35, 1947.
- [81] J. Li, K. Kisara, S. Danielsson, M. E. Lindström, and G. Gellerstedt, “An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides,” *Carbohydr. Res.*, vol. 342, no. 11, pp. 1442–1449, 2007, doi: 10.1016/j.carres.2007.03.031.
- [82] M. Cesaretti, E. Luppi, F. Maccari, and N. Volpi, “A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 54, no. 1, pp. 59–61, 2003, doi: 10.1016/S0144-8617(03)00144-9.
- [83] S. Frazier, K. Roodhouse, D. Hourcade, and L. Zhang, “The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods,” *Open Glycosci.*, vol. 1, pp. 31–39, 2008, doi: 10.2174/1875398100801010031.The.

- [84] T. Hahn *et al.*, "Cationic Dye for the Specific Determination of Sulfated Polysaccharides," *Anal. Lett.*, vol. 49, no. 12, pp. 1948–1962, 2016, doi: 10.1080/00032719.2015.1126839.
- [85] H. E. Caputo, J. E. Straub, and M. W. Grinstaff, "Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 48, no. 8, pp. 2338–2365, 2019, doi: 10.1039/c7cs00593h.
- [86] J. Nitschke, H. Modick, E. Busch, R. W. Von Rekowski, H. J. Altenbach, and H. Mölleken, "A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms," *Food Chem.*, vol. 127, no. 2, pp. 791–796, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.149.
- [87] K. Yokoyama, A. D. Fisher, A. R. Amori, D. R. Welchons, and R. E. McKnight, "Spectroscopic and calorimetric studies of congo red dye-amyloid peptide complexes," *J. Biophys. Chem.*, vol. 1, no. 3, pp. 153–163, 2010, doi: 10.4236/jbpc.2010.13018.
- [88] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [89] R. Sundaram, N. Balasubramaniyan, and P. Sundaram, "Protein Stains and Applications," *Protein Electrophor. Methods Protoc.*, vol. 869, pp. 451–464, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-821-4.
- [90] F. Chevalier, "Standard Dyes for Total Protein Staining in Gel-Based Proteomic Analysis," *Materials (Basel)*, vol. 3, no. 10, pp. 4784–4792, 2010, doi: 10.3390/ma3104784.
- [91] M. H. Simonian and J. A. Smith, "Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 10, 2006.
- [92] E. Chabrol and R. Charonnat, "Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides l'oleidemie," *Press. méd.*, vol. 45, no. 17, p. 13, 1937.
- [93] A. Patel, I. Antonopoulou, J. Enman, U. Rova, P. Christakopoulos, and L. Matsakas, "Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: an overview of the current state of the art," *BMC Chem. Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 13–37, 2019, doi: 10.1186/s42480-019-0013-9.
- [94] J. Park, H. J. Jeong, E. Y. Yoon, and S. J. Moon, "Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin

- method,” *Algae*, vol. 31, no. 4, pp. 391–401, 2016, doi: 10.4490/algae.2016.31.12.7.
- [95] A. Byreddy, A. Gupta, C. Barrow, and M. Puri, “A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 125, pp. 28–32, 2016.
- [96] J. Y. Yeh, L. H. Hsieh, K. T. Wu, and C. F. Tsai, “Antioxidant Properties and Antioxidant Compounds of Various Extracts from the Edible Basidiomycete *Grifola Frondosa* (Maitake),” *Molecules*, vol. 16, no. 4, pp. 3197–3211, 2011, doi: 10.3390/molecules16043197.
- [97] F. S. Reis, A. Martins, L. Barros, and I. C. F. R. Ferreira, “Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1201–1207, 2012, doi: 10.1016/j.fct.2012.02.013.
- [98] R. Deng and T. J. Chow, “Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*,” *Cardiovasc. Ther.*, vol. 28, no. 4, pp. 33–45, 2010, doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x.
- [99] N. Coulombier, T. Jauffrais, and N. Lebouvier, “Antioxidant Compounds from Microalgae: A review,” *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 10, pp. 549–578, 2021, doi: 10.3390/md19100549.
- [100] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, 2005, doi: 10.1021/jf0502698.
- [101] A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts, “Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds,” *Molecules*, vol. 18, no. 2, pp. 2328–2375, 2013, doi: 10.3390/molecules18022328.
- [102] K. Goiris *et al.*, “Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages,” *J. Phycol.*, vol. 50, no. 3, pp. 483–492, 2014, doi: 10.1111/jpy.12180.
- [103] A. Pękal and K. Pyrzynska, “Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay,” *Food Anal. Methods*, vol. 7, no. 9, pp. 1776–1782, 2014, doi: 10.1007/s12161-014-9814-x.
- [104] O. Erel, “A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation,” *Clin. Biochem.*, vol. 37, no. 4, pp. 277–285, 2004, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.

- [105] A. A. Boligon, "Technical Evaluation of Antioxidant Activity," *Med. Chem. (Los Angeles)*, vol. 4, no. 7, pp. 517–522, 2014, doi: 10.4172/2161-0444.1000188.
- [106] P. Hernández-Rodríguez, L. P. Baquero, and H. R. Larrota, *Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity*. Elsevier Inc., 2018.
- [107] D. T. Wu *et al.*, "Review of the structural characterization, quality evaluation, and industrial application of *Lycium barbarum* polysaccharides," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 79, pp. 171–183, 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2018.07.016.
- [108] A. Villares, L. Mateo-Vivaracho, and E. Guillamón, "Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms," *Agriculture*, vol. 2, no. 4, pp. 452–471, 2012, doi: 10.3390/agriculture2040452.
- [109] X. Tian, T. Liang, Y. Liu, G. Ding, F. Zhang, and Z. Ma, "Extraction, Structural Characterization, and Biological Functions of *Lycium Barbarum* Polysaccharides: A review," *Biomolecules*, vol. 9, no. 9, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3390/biom9090389.
- [110] M. S. H. Akash and K. Rehman, *Essentials of pharmaceutical analysis*. 2019.
- [111] T. Hong, J. Y. Yin, S. P. Nie, and M. Y. Xie, "Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective," *Food Chem. X*, vol. 12, pp. 100168–100184, 2021, doi: 10.1016/j.fochx.2021.100168.
- [112] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy," *Photosynth. Res.*, vol. 101, no. 2, pp. 157–170, 2009, doi: 10.1007/s11120-009-9439-x.
- [113] C. Esther Elizabeth Grace, P. Kiruthika Lakshmi, S. Meenakshi, S. Vaidyanathan, S. Srisudha, and M. Briget Mary, "Biomolecular transitions and lipid accumulation in green microalgae monitored by FTIR and Raman analysis," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 224, pp. 117382–117393, 2020, doi: 10.1016/j.saa.2019.117382.
- [114] J. B. Fellman, E. Hood, and R. G. M. Spencer, "Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 55, no. 6, pp. 2452–2462, 2010, doi: 10.4319/lo.2010.55.6.2452.
- [115] D. E. Zacharioudaki, I. Fitis, and M. Kotti, "Review of Fluorescence Spectroscopy in Environmental Quality Applications," *Molecules*, vol. 27, no. 15, 2022, doi: 10.3390/molecules27154801.
- [116] N. Ramanujam, "Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues," *Neoplasia*, vol. 2, no. 1–2, pp. 89–117, 2000, doi:

- 10.1038/sj.neo.7900077.
- [117] J. Christensen, E. M. Becker, and C. S. Frederiksen, "Fluorescence spectroscopy and PARAFAC in the analysis of yogurt," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 75, no. 2, pp. 201–208, 2005, doi: 10.1016/j.chemolab.2004.07.007.
- [118] A. C. Leney, A. Tschanz, and A. J. R. Heck, "Connecting color with assembly in the fluorescent B-phycoerythrin protein complex," *FEBS J.*, vol. 285, no. 1, pp. 178–187, 2018, doi: 10.1111/febs.14331.
- [119] A. K. Patel *et al.*, "Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*," *Bioresour. Technol.*, vol. 145, pp. 345–350, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.038.
- [120] G. Singh and S. K. Patidar, "Microalgae harvesting techniques: A review," *J. Environ. Manage.*, vol. 217, pp. 499–508, 2018, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.04.010.
- [121] Y. Yuan and D. Macquarrie, "Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity," *Carbohydr. Polym.*, vol. 129, pp. 101–107, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.057.
- [122] S. Gil, "Extração e caracterização de componentes bioativos de *Phaeodactylum tricornutum*," 2020.
- [123] S. Hussen, "Produção, Extração e Caracterização Parcial de Compostos Bioativos de *Chlorella vulgaris* e de *Tetraselmis chuii*," 2021.
- [124] Y. Monsalve-Bustamante, S. Rincón-Valencia, J. Mejía-Giraldo, D. Moreno-Tirado, and M. Puertas-Mejía, "Screening of the UV absorption capacity, proximal and chemical characterization of extracts, and polysaccharide fractions of the *Gracilariopsis tenuifrons* cultivated in Colombia," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 10, pp. 103–109, 2019, doi: 10.7324/JAPS.2019.91014.
- [125] K. A. C. C. Taylor, "A colorimetric method for the quantitation of galacturonic acid," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 43, no. 1, pp. 51–54, 1993, doi: 10.1007/BF02916430.
- [126] A. Anschau, C. S. Caruso, R. C. Kuhn, and T. T. Franco, "Validation of the sulfo-phosphovanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 34, no. 1, pp. 19–27, 2017, doi: 10.1590/0104-6632.20170341s20140222.
- [127] A. Bennett and L. Bogorad, "Complementary chromatic adaptation in a

- filamentous blue-green alga,” *J. Cell Biol.*, vol. 58, no. 2, pp. 419–435, 1973, doi: 10.1016/S0022-3468(89)80710-9.
- [128] D. A. Bryant, G. Guglielmi, N. T. de Marsac, A. M. Castets, and G. Cohen-Bazire, “The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model,” *Arch. Microbiol.*, vol. 123, no. 2, pp. 113–127, 1979, doi: 10.1007/BF00446810.
- [129] R. B. Román, J. M. Álvarez-Pez, F. G. A. Fernández, and E. M. Grima, “Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*,” *J. Biotechnol.*, vol. 93, no. 1, pp. 73–85, 2002, doi: 10.1016/S0168-1656(01)00385-6.
- [130] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, and D. Hawkins Byrne, “Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 19, no. 6–7, pp. 669–675, 2006, doi: 10.1016/j.jfca.2006.01.003.
- [131] Y. Li *et al.*, “Production, isolation and bioactive estimation of extracellular polysaccharides of green microalga *Neochloris oleoabundans*,” *Algal Res.*, vol. 48, no. April, pp. 101883–101894, 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.101883.
- [132] X. Liu, M. Zhang, H. Liu, A. Zhou, Y. Cao, and X. Liu, “Preliminary characterization of the structure and immunostimulatory and anti-aging properties of the polysaccharide fraction of *Haematococcus pluvialis*,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 17, pp. 9243–9252, 2018, doi: 10.1039/c7ra11153c.
- [133] R. F. Kubin and A. N. Fletcher, “Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes,” *J. Lumin.*, vol. 27, no. 4, pp. 455–462, 1982, doi: 10.1016/0022-2313(82)90045-X.
- [134] T. Li, J. Xu, H. Wu, P. Jiang, Z. Chen, and W. Xiang, “Growth and Biochemical Composition of *Porphyridium purpureum* SCS-02 under Different Nitrogen Concentrations,” *Mar. Drugs*, vol. 17, no. 2, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/md17020124.
- [135] T. Coward, C. Fuentes-Grünwald, A. Silkina, D. L. Oatley-Radcliffe, G. Llewellyn, and R. W. Lovitt, “Utilising light-emitting diodes of specific narrow wavelengths for the optimization and co-production of multiple high-value compounds in *Porphyridium purpureum*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 221, pp. 607–615, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.093.
- [136] L. Sun, C. Wang, C. Ma, and L. Shi, “Optimization of renewal regime for improvement of polysaccharides production from *Porphyridium cruentum* by

- uniform design,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 33, no. 3, pp. 309–315, 2010, doi: 10.1007/s00449-009-0325-x.
- [137] M. Munier *et al.*, “Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*,” *Food Chem.*, vol. 150, pp. 400–407, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.113.
- [138] R. Rodrigues, F. de Castro, R. Santiago-Aguiar, and M. Rocha, “Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis* using protic ionic liquids as solvent,” *Algal Res.*, vol. 31, pp. 454–462, 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.02.021.
- [139] Z. Huang *et al.*, “Simultaneous enhancement on renewable bioactive compounds from *Porphyridium cruentum* via a novel two-stage cultivation,” *Algal Res.*, vol. 55, pp. 102270–102279, 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102270.
- [140] S. Kapoor, M. Singh, A. Srivastava, M. Chavali, K. Chandrasekhar, and P. Verma, “Extraction and characterization of microalgae-derived phenolics for pharmaceutical applications: A systematic review,” *J. Basic Microbiol.*, vol. 62, pp. 1044–1063, 2022, doi: 10.1002/jobm.202100458.
- [141] F. F. Yilmaz, Z. Demirel, N. U. Karabay-Yavasoglu, G. Ozdemir, and M. Conk-Dalay, “Antimicrobial and antioxidant activities of *Porphyridium cruentum*,” *Hacettepe Univ. J. Fac. Pharm.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [142] Z. Aisah, “Effect of Solvent Types and Microwave Assisted Extraction (MAE) Time on Antioxidant Activity of Microalgae *Porphyridium cruentum*,” 2018.
- [143] A. M. Ciko, S. Jokić, D. Šubarić, and I. Jerković, “Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae,” *Mar. Drugs*, vol. 16, no. 10, pp. 1–20, 2018, doi: 10.3390/md16100348.
- [144] J. J. H. Huang, W. W. Xu, S. L. Lin, and P. C. K. Cheung, “Phytochemical profiles of marine phytoplanktons: An evaluation of their *in vitro* antioxidant and anti-proliferative activities,” *Food Funct.*, vol. 7, no. 12, pp. 5002–5017, 2016, doi: 10.1039/c6fo01033d.
- [145] P. A. Castro-Varela, P. S. M. Celis-Plá, R. Abdala-Díaz, and F. L. Figueroa, “Photobiological Effects on Biochemical Composition in *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta) with a Biotechnological Application,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 97, no. 5, pp. 1032–1042, 2021, doi: 10.1111/php.13426.

- [146] Y. X. Wang *et al.*, “Revealing the architecture and solution properties of polysaccharide fractions from *Macrolepiota albuminosa* (Berk.) Pegler,” *Food Chem.*, vol. 368, pp. 130772–130780, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130772.
- [147] P. Properties, “PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF PHYCOBILIPROTEINS FROM PHYCOBILISOMES: FLUORESCENCE LIFETIMES, QUANTUM YIELDS, AND POLARIZATION SPECTRA,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 39–45, 1978.

Anexos

Anexo I: Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier	129
Anexo II: Amostra utilizada na Espectroscopia de Fluorescência	129

Anexos

Anexo I: Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier

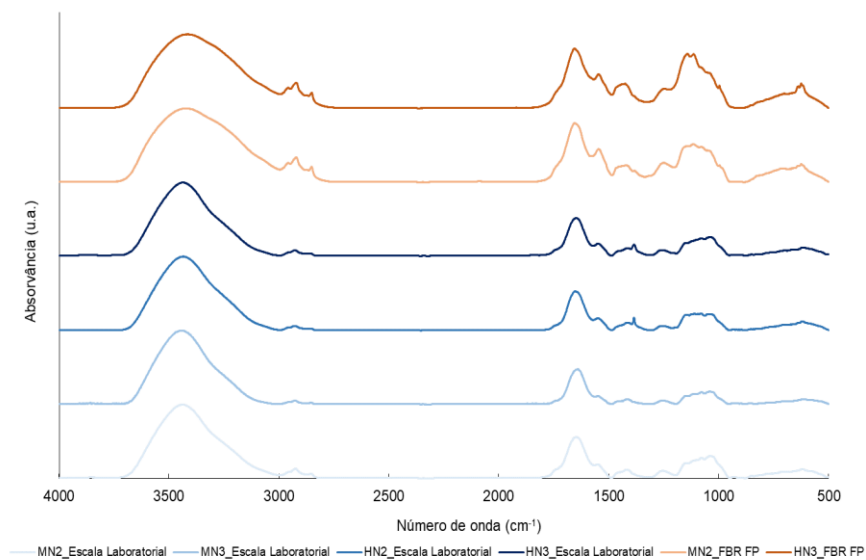


Figura 56 - Espectros de FTIR da biomassa inicial produzida à escala laboratorial, após liofilização, em pastilhas de KBr.

Anexo II: Amostra utilizada na Espectroscopia de Fluorescência

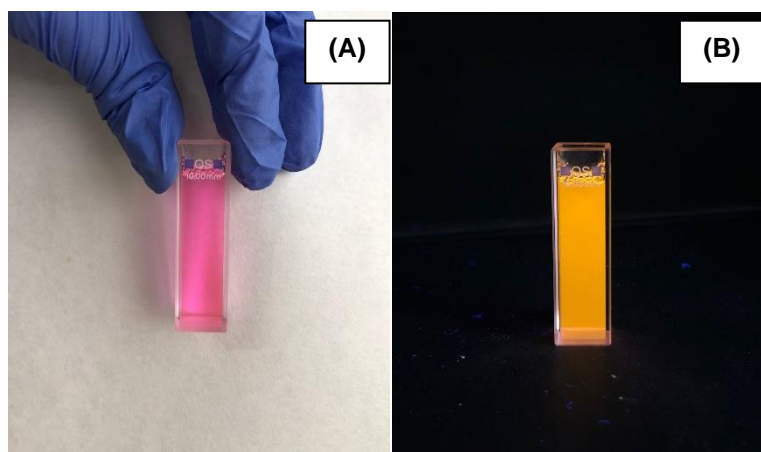


Figura 57 - Extrato proveniente da fração aquosa FW1 da extração convencional em multi-etapas com iluminação natural (A) e sob lâmpada UV (366 nm) (B).

