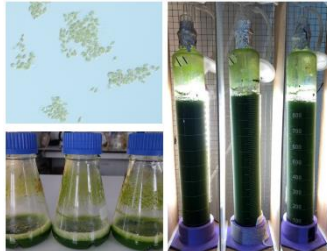




ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Avaliação e Caracterização de Bioprodutos de Valor Acrescentado Isolados de uma Microalga Produzida Industrialmente

Catarina Coelho Gabriel

Licenciada em Engenharia Química e Biológica

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

Orientadores:

Doutora Magda Sofia Soares de Carvalho Cardoso Nobre
Semedo

Doutora Patrícia David Barata

Doutora Maria Helena Cardoso

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho

Vogais:

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes

Doutora Ana Maria Barreiros

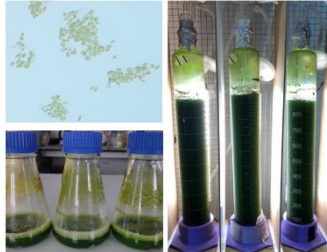
Doutora Magda Sofia Soares de Carvalho Cardoso Nobre
Semedo

Dezembro 2023



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Avaliação e Caracterização de Bioprodutos de Valor Acrescentado Isolados de uma Microalga Produzida Industrialmente

Catarina Coelho Gabriel

Licenciada em Engenharia Química e Biológica

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

Orientadores:

Doutora Magda Sofia Soares de Carvalho Cardoso Nobre
Semedo

Doutora Patrícia David Barata

Doutora Maria Helena Cardoso

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho

Vogais:

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes

Doutora Ana Maria Barreiros

Doutora Magda Sofia Soares de Carvalho Cardoso Nobre
Semedo

Dezembro 2023

Agradecimentos

O trabalho final de mestrado em seguida descrito, resultou de muito trabalho e dedicação, mas também do apoio incondicional de um leque de pessoas cujos nomes devem, sem dúvida, ser mencionados.

Gostaria, primeiramente, de agradecer às minhas orientadoras Prof. Doutora Magda Semedo e Prof. Doutora Patrícia Barata, cujo apoio, disponibilidade, paciência e excelente orientação foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Independentemente do dia ou da hora, as Professoras demonstraram sempre uma grande disponibilidade para receber todas as minhas dúvidas e sugestões. Concederam-me a liberdade de poder, ao seu lado, guiar a minha dissertação pelos caminhos que, a meu ver, também seriam interessantes de percorrer. Os seus bons exemplos ajudaram-me a crescer a todos os níveis querendo, desta forma, deixar-lhes um agradecimento muito especial. Por fim, mas não menos importante, gostaria ainda de agradecer à Doutora Maria Helena Cardoso, na qualidade de orientadora, por tão bem me ter recebido, pela disponibilidade demonstrada, pelo apoio prestado e pela liberdade com que me permitiu desenvolver o meu trabalho durante a minha estadia na Allmicroalgae.

À Doutora Joana Laranjeira Silva e a toda a equipa da UID da Allmicroalgae deixo, desde já, o meu agradecimento por tão bem me terem recebido e por me terem proporcionado uma estadia alegre, acolhedora e de muita aprendizagem. Gostaria ainda de deixar um agradecimento muito especial à Nádia Correia, cujo acompanhamento, bondade e paciência foram excecionais. Mostrou sempre grande disponibilidade, aliada a muita simpatia, para me ajudar durante e após a minha estadia na Allmicroalgae.

Ao Centro de Investigação de Engenharia Química e Biológica pela utilização dos seus equipamentos.

À Prof. Sónia Martins e Alexandra Costa pela simpatia e disponibilidade com que me ajudaram sempre que necessitei.

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

Aos meus colegas e amigos Gonçalo Viegas, Filipe Silva, Olímpia Camisão e Carolina Cintra pelo apoio e pelas palestras motivacionais de que tanto precisámos. Em especial, à Carolina Cintra pela grande amizade que surgiu, pelas horas infindáveis no laboratório, por tornar os meus dias mais divertidos e por ter estado presente em todas as etapas, desde o início até ao fim, e que assim continue. Ao Bruno Antunes, por me ter ajudado e ensinado diversas coisas e, acima de tudo, pela companhia.

Aos meus amigos acima mencionados e a tantos outros, como a Harshali Racitalal, Joana Costa, Madalena Barata, Catarina Costa, Daniela Carvalho, Pedro Afonso Luís e Nuno Moreira, por serem parte da minha família, pelo apoio, força, pelas gargalhadas e, acima de tudo, pela amizade que há tantos anos dura.

Por fim, um agradecimento à minha família, sobretudo à minha mãe, sem a qual tudo isto, e tantas outras coisas, seriam impossíveis. À mãe que sempre me deu a liberdade e a estabilidade para que pudesse ser o que eu quisesse e cujo apoio incondicional foi, é e sempre será imprescindível. Ainda, ao João Miguel Amaral, pela incrível paciência, dedicação e carinho com que me presenteou neste último ano.

Resumo

O trabalho desenvolvido teve como objetivo caracterizar biocompostos de valor acrescentado sintetizados pela microalga *Chlorococcum amblystomatis*. Para o efeito, foi realizado o seu crescimento em condições heterotróficas (**HTN**) e autotróficas (**AT**), sem (**1**) e com (**2**) indução de *stress* (privação de NO_3^-) em reator de coluna de bolhas (**C**) e em frascos (**F**).

A extração de biomoléculas intracelulares sintetizadas pela *C. amblystomatis* foi efetuada por extração assistida por micro-ondas e extração contínua em Soxhlet, enquanto as biomoléculas extracelulares foram obtidas por precipitações alcoólicas. Os extratos resultantes foram avaliados em relação ao seu teor em diversas biomoléculas, nomeadamente polissacáridos, proteína total, compostos fenólicos e flavonoides totais.

De um modo geral, os resultados obtidos sugerem que os meios de cultura resultantes da indução de *stress* exibiram maior teor em exopolissacáridos. O ensaio realizado em condições autotróficas em frascos sem indução de *stress* (**AT_F2**) apresentou os teores máximos em biocompostos intracelulares (polissacáridos ácidos, β -(1,3)-D-glucanos, proteína total, compostos fenólicos e flavonoides totais). Todos os extratos analisados apresentaram atividade antioxidante.

Um dos extratos que exibiu maior conteúdo em polissacáridos neutros (**MAE_AT_F1**) foi fracionado por cromatografia de troca iónica. A identificação de polissacáridos nesta amostra foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando diferentes métodos de coloração, tendo sido identificada a presença de ácido hialurónico e de polissacáridos de diversos tamanhos moleculares.

Uma fração cromatográfica (F8) proveniente de um extrato de *C. amblystomatis* apresentou atividade *in vitro* contra as bactérias *Echerichia coli* ATCC25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Os extratos/amostras selecionados foram caracterizados estruturalmente por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), validando a presença diversos tipos de polissacáridos, de proteínas e de lípidos.

A presença de diversas biomoléculas nos extratos estudados e a sua capacidade antioxidante revelam o potencial biotecnológico de *C. amblystomatis* para aplicações biomédicas ou alimentar.

Palavras-chave: Microalgas verdes; compostos bioativos; polissacárido; extração assistida por micro-ondas; atividade antioxidante; atividade antibacteriana.

Abstract

The aim of this work was to characterize value-added compounds biosynthesized by the microalga *Chlorococcum amblystomatis*. For this purpose, it was grown under heterotrophic (**HTN**) and autotrophic (**AT**) conditions, without (**1**) and with (**2**) stress induction (NO₃⁻ deprivation) in bubble column reactor (**C**) and flasks (**F**).

The extraction of intracellular biomolecules synthesized by *C. amblystomatis* was performed by microwave-assisted extraction and Soxhlet continuous extraction, while the extracellular biomolecules were obtained by alcoholic precipitation. The resulting extracts were evaluated for their content in various biomolecules, namely polysaccharides, total protein, phenolic and flavonoid compounds.

In general, the results obtained suggest that the media resulting from stress induction exhibited higher content in exopolysaccharides. The experiment carried out under autotrophic conditions in flasks without stress induction (**AT_F2**) showed the highest content in intracellular biocompounds (acidic polysaccharides, β -(1,3)-D-glucans, total protein, phenolic and flavonoid compounds). All the extracts analyzed showed antioxidant activity.

One of the extracts that showed higher content in neutral polysaccharides (**MAE_AT_F1**) was fractionated by ion exchange chromatography. The identification of polysaccharides present in this sample was carried by polyacrylamide gel electrophoresis using different staining techniques, and the identified the presence of hyaluronic acid and polysaccharides with several molecular sizes.

A chromatographic fraction (F8) from an extract of *C. amblystomatis* showed *in vitro* assay against the bacteria *Echerichia coli* ATCC25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC25923. The selected extracts/samples were structurally characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), validating the presence of different types of polysaccharides, proteins and lipids.

The presence of various biomolecules in the studied extracts and their antioxidant potential reveal the biotechnological potential of *C. amblystomatis* for biomedical or food applications.

Keywords: Green microalgae; bioactive compounds; polysaccharides; EPS; microwave assisted extraction; antioxidant activity; antibacterial activity; FTIR.

Divulgação Científica

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

Comunicação oral:

- C. Gabriel, S. Martins, M.H. Cardoso, P.D. Barata, M.C. Semedo, “Comparison of High-Value Bioproducts from *Chlorococcum amblystomatis* grown under autotrophic and heterotrophic conditions”, 6º Simpósio Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável, 25 Maio 2023, Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Portalegre, Elvas, Portugal.

Comunicações em painel:

- C. Gabriel, M.C. Semedo, S. Martins, P.D. Barata, M.H. Cardoso, J.L. Silva, “Evaluation and Characterization of High-Value Bioproducts Isolated from an Industrially Produced Microalgae”, 5th International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering (GreenCHEM-22), 20-22 July 2022, Università degli Studi Niccolò Cusano, Rome, Italy.
- C. Gabriel, M.C. Semedo, S. Martins, P.D. Barata, M.H. Cardoso, J.L. Silva, “Production and Evaluation of Extracellular Polymeric Substances from *Chlorococcum amblystomatis*”, 5th International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering (GreenCHEM-22), 20-22 July 2022, Università degli Studi Niccolò Cusano, Rome, Italy.
- Catarina Gabriel, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Maria Helena Cardoso, Joana L. Silva, “Avaliação e Caracterização de Bioprodutos de Valor Acrescentado Isolados de uma Microalga Produzida Industrialmente”, Encontro Ciência’22, 16-18 de Maio de 2022, Centro de Congressos de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Catarina Gabriel, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Maria Helena Cardoso, Joana L. Silva, “Avaliação e Caracterização de Bioprodutos de Valor Acrescentado Isolados de uma Microalga Produzida Industrialmente”, iFEQB2022 (8ª Edição), 10-12 de Maio de 2022, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Divulgação Científica	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xix
Abreviaturas	xx
1. Enquadramento	3
2. Introdução.....	7
2.1. Microalgas	7
2.2. Microalgas Verdes.....	11
2.2.1. <i>Chlorococcum amblystomatis</i>	12
2.3. Compostos Bioativos.....	13
2.3.1. Polissacáridos	13
2.3.2. Lípidos.....	16
2.3.3. Compostos Fenólicos	17
2.3.4. Pigmentos	18
2.4. Fatores que afetam o crescimento celular: indução de <i>stress</i>	19
2.5. Extração e Purificação de Compostos Bioativos.....	20
2.5.1. Métodos de Extração.....	21
2.5.2. Purificação de Compostos Bioativos.....	24
2.6. Doseamento de Compostos Bioativos.....	25
2.7. Atividade Antioxidante	27
2.8. Atividade Antibacteriana.....	28
2.9. Técnicas de Caracterização Estrutural: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	29
3. Materiais e Métodos.....	35
3.1. Reagentes	35
3.2. Material biológico	35
3.3. Métodos.....	36
3.3.1. Cultivo e Manutenção da Cultura.....	36
3.3.2. Extração de Biocompostos Intracelulares.....	39
3.3.3. Extração de Polissacáridos Extracelulares.....	41
3.3.4. Doseamento de Biomoléculas	43
3.3.5. Fracionamento de Biomoléculas por Cromatografia de Troca Iônica.....	47
3.3.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE).....	48

3.3.7. Determinação da Atividade Antioxidante	49
3.3.8. Atividade Antimicrobiana	50
3.3.9. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	50
4. Resultados e Discussão.....	53
4.1. Crescimento e Manutenção da Cultura de <i>C. amblystomatis</i>	53
4.2. Extração de Biocompostos Intracelulares	56
4.2.1. Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)	56
4.2.2. Extração de Lípidos	64
4.2.3. Extração de Pigmentos	66
4.2.4. Atividade Antioxidante	70
4.3. Extração de Biocompostos Extracelulares.....	71
4.3.1. Propriedades Antioxidantes	78
4.4. Fracionamento de Biomoléculas por Cromatografia de Troca Iônica.....	79
4.5. Análise de Biomoléculas por Eletroforese.....	81
4.6. Atividade Antibacteriana	84
4.7. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	85
5. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	95
6. Referências Bibliográficas.....	101
7. Anexos.....	114

Índice de Figuras

Figura 1 – Conversão do CO ₂ atmosférico pelas microalgas nos diferentes bioprodutos através da fotossíntese (adaptado) [5], [10].	8
Figura 2 – Sistemas de cultivo de microalgas: (a) – raceway; (b) – flat panel; (c) – fotobiorreator tubular em disposição horizontal [22].	10
Figura 3 – Observação ao microscópio ótico de <i>C. amblystomatis</i> [33].	12
Figura 4 – Estrutura química da celulose.	14
Figura 5 – Estrutura química de um β -(1,3)-glucano.	15
Figura 6 – Estrutura química de sPS: a) carregano, b) fucano, c) agar, d) ulvano [54].	16
Figura 7 – Estrutura química do ácido α -linoleico (ALA).	17
Figura 8 – Estrutura química base de um flavonoide.	17
Figura 9 – Estrutura química da clorofila a e clorofila b.	18
Figura 10 – Estrutura química do β -caroteno (a) e da astaxantina (b) [71].	19
Figura 11 – Vantagens e desvantagens dos métodos de extração convencionais e não convencionais. Adaptado de [82].	22
Figura 12 – Condições de cultura da microalga <i>Chlorococcum amblystomatis</i> estudadas.	38
Figura 13 – Etapas de processamento da biomassa e do meio de cultura obtidos a partir das culturas de <i>C. amblystomatis</i> .	39
Figura 14 – Montagem da extração contínua em Soxhlet.	41
Figura 15 – Observação ao microscópio ótico de <i>C. amblystomatis</i> (400x).	53
Figura 16 – Cultura de <i>C. amblystomatis</i> em condições autotróficas em reator de coluna de bolhas (AT_C1 e AT_C2) (a) e respetivas curvas de crescimento (b). Cada condição foi realizada em triplicado.	54
Figura 17 – Cultura de <i>C. amblystomatis</i> , em condições autotróficas em frascos de 1 L (AT_F1 e AT_F2) (a) e respetivas curvas de crescimento (b). Cada condição foi realizada em triplicado.	55
Figura 18 – Cultura de <i>C. amblystomatis</i> , em condições heterotróficas (HTN) (a) e respetiva curva de crescimento (b). O ensaio HTN foi realizado em triplicado.	56
Figura 19 – Teores de polissacáridos neutros, sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos extraídos por MAE em KOH 0,1 M (120 °C/30 min) e em EtOH (150 °C/15 min).	57
Figura 20 – Teores de polissacáridos neutros e proteína total (a), polissacáridos sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos (b), nos extratos M_ON , S_ON e S_i provenientes de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min).	58
Figura 21 – Teores de polissacáridos neutros, ácidos e proteína total para os extratos provenientes de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min), da biomassa produzida em condições autotróficas (AT_C e AT_F) e heterotróficas (HTN).	59
Figura 22 – Teores de β -(1,3)-D-glucanos e polissacáridos sulfatados para os extratos provenientes de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min), da biomassa produzida em condições autotróficas e heterotróficas.	61
Figura 23 – Teores de polissacáridos neutros e de proteína total para os ensaios de controlo autotróficos (AT_C1 e AT_F1) e para os ensaios heterotróficos HTN , HTA e HTU provenientes de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min).	62
Figura 24 – Teores de compostos fenólicos totais e flavonoides para os extratos obtidos a partir da biomassa produzida em condições autotróficas (AT_C e AT_F) e heterotróficas (HTN) por MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min).	63

Figura 25 – Coloração dos extratos SE_EtOH e SE_Hex , obtidos por extração contínua em Soxhlet (6h/ 80°C), realizada às amostras AT_C1 e AT_C2	69
Figura 26 – Atividade antioxidante (mg TEAC/g biomassa) para os extratos da biomassa produzida em condições autotróficas (AT_C e AT_F) e heterotróficas (HTN) obtidos por MAE (KOH 0,1M/150 °C/30 minutos).....	70
Figura 27 – Sobrenadantes dos ensaios autotróficos em reatores de coluna de bolhas (AT_C) e em frascos (AT_F), obtidos por precipitação alcoólica.	71
Figura 28 – Teores de polissacáridos neutros, ácidos e proteína total nos sobrenadantes diretos e nos sobrenadantes sujeitos a precipitações alcoólicas dos ensaios AT_C e AT_F	72
Figura 29 – Teores de polissacáridos sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos, nos sobrenadantes diretos e nos sobrenadantes sujeitos a precipitações alcoólicas, dos ensaios em autotrofia AT_C e AT_F	74
Figura 30 – Teores de polissacáridos neutros e proteína total nos sobrenadantes diretos e nos sobrenadantes sujeitos à condição de precipitação Eti (EtOH 90%, extração imediata), dos ensaios autotróficos de controlo (AT_C1 e AT_F1) e do ensaio heterotrófico com amónia como fonte de N (HTA)......	75
Figura 31 – Teores de polissacáridos neutros nos sobrenadantes autotróficos AT_C1 e AT_C2 diretos e sujeitos a precipitações alcoólicas, após aplicação dos métodos de desproteinização enzimático (E) e Seville (S).....	76
Figura 32 – Teores de compostos fenólicos e flavonoides totais nos sobrenadantes diretos e nos sobrenadantes sujeitos a precipitações alcoólicas, dos ensaios autotróficos.	77
Figura 33 – Atividade antioxidante total (mg TEAC/mL), determinada pelo método do radical ABTS, dos meios de cultura após separação da biomassa desenvolvida em condições autotróficas (AT_C e AT_F) com e sem aplicação de precipitação alcoólica.	78
Figura 34 – Cromatograma do extrato AT_F1 proveniente de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 minutos), obtido numa coluna de resina DEAE-52, com um gradiente de concentração de NaCl 0-2 M, acordo com os Materiais e Métodos.....	79
Figura 35 – Cromatograma do extrato AT_C2 proveniente de MAE (KOH 0,1 M /120 °C/ 30 min), obtido numa coluna de resina DEAE-52. Sistema eluente: (a) 0-50 gradiente de NaCl 1M; (b) 51-53 NaCl 1M; (c) 54-57 NaCl 2M de acordo com os Materiais e Métodos.....	80
Figura 36 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1 mM (pH 8,4), a 100 V/45 min/corado com azul de toluidina 0,1% (m/V): 1 – F4 (74,4 µg/poço), 2 – F6 (105,4 µg/poço), 3 – F7 (45 µg/poço), 4 – Pool_AT_F1 (75 µg/poço), 5 – F8 (35,2 µg/poço), 6 – extrato de MAE AT_F1 (799,4 µg/poço), 7 – dextrano 70 kDa (20 µg/poço), 8 – dextrano 100 kDa (20 µg/poço), 9 –sulfato de dextrano 40 kDa (20 µg/poço), 10 – heparina de mucosa intestinal suína 17 kDa (20 µg/poço).	81
Figura 37 – Electrofores em gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1 mM (pH 8,4), a 100 V/45 min/corado com stains all 0,5% (m/V): 1 – F4 (74,4 µg/poço), 2 – F6 (105,4 µg/poço), 3 – F7 (45 µg/poço), 4 – Pool_AT_F1 (75 µg/poço), 5 – F8 (35,2 µg/poço), 6 – extrato de MAE AT_F1 (799,4 µg/poço), 7 – dextrano 70 kDa (40 µg/poço), 8 – dextrano 100 kDa (40 µg/poço), 9 –sulfato de dextrano 40 kDa (10 µg/poço), 10 – heparina de mucosa intestinal suína 17 kDa (10 µg/poço). (a) 20 minutos após aplicação da solução de descoloração; (b) 48h após aplicação da solução de descoloração.	82

Figura 38 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1 mM (pH 8,4), a 100 V/45 min/corado com Azul de Alciano 0,125% (m/V)/Nitrato de Prata 0,4% (m/V): 1 – Pool_AT_F1 (75 µg/poço), 2 e 3 – extrato de MAE AT_F1 (799,4 µg/poço), 4 – F8 (35,2 µg/poço), 5 – dextrano 70 kDa (80 µg/poço), 6 – dextrano 100 kDa (80 µg/poço), 7 – sulfato de dextrano 40 kDa (10 µg/poço), 8 – heparina de mucosa intestinal suína 17 kDa (10 µg/poço).....	83
Figura 39 – Atividade antibacteriana contra as bactérias <i>Echerichia coli</i> ATCC25922 (a) e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 (b): 1 - H ₂ O, 2 - antibiótico gentamicina (10 mg/mL), 3 – F8 (1,76 mg nPS/mL) proveniente da MAE ao extrato AT_F1 de <i>C. amblystomatis</i>	84
Figura 40 – Espetros de FTIR da biomassa liofilizada antes (a) e após (b) extração por MAE com KOH 0,1 M (120 °C/30 min) referentes aos ensaios autotróficos em reatores de coluna de bolhas (AT_C) e em frascos (AT_F) (pastilha de KBr).....	86
Figura 41 – Espetro de FTIR dos extratos de SE (Hex e EtOH/180 °C/6h) referentes aos ensaios autotróficos em coluna de bolhas (AT_C1 e AT_C2) e do extrato de MAE (EtOH/150 °C/15 min) do extrato AT_C1 (pastilha de KBr).....	88
Figura 42 – Espetro de FTIR dos EPS precipitados (Eti ; EtOH 90%/extração imediata) dos ensaios autotrófico em coluna de bolhas (AT_C) e em frascos (AT_F) (pastilha de KBr).	89
Figura 43 – Espetros de FTIR do extrato de MAE (KOH 0,1 M/150 °C/30 min) do ensaio AT_F1 e do respetivo Pool_AT_F1 concentrado em polissacáridos, obtido por cromatografia de troca iónica (pastilha de KBr).....	90
Figura 44 – Espetros de FTIR do extrato de MAE (KOH 0,1 M/150 °C/30 min) do ensaio AT_C2 e do respetivo Pool concentrado em polissacáridos, obtido por cromatografia de troca iónica (pastilha de KBr).....	91
Figura i – Cultura de <i>C. amblystomatis</i> cultivada em condições autotróficas em frascos (AT_F), sedimentada devido a uma agitação deficiente.	115
Figura ii – Coloração das culturas autotróficas de <i>C. amblystomatis</i> cultivadas em (a) reator de coluna de bolhas (AT_C1 e AT_C2) e em (b) frascos (AT_F1 e AT_F2), recolhidas no início da fase estacionária.	115
Figura iii – Curvas de crescimento celular dos ensaios heterotróficos com ureia como fonte de nitrogénio (HTU) e sulfato de amónia (HTA).....	116
Figura iv – Coloração dos sobrenadantes e respetivos <i>pellets</i> após extração de pigmentos com acetona pura.	116
Figura v – Coloração dos EPS provenientes da precipitação etanólica (3 volumes de EtOH a 90%, extração imediata) dos sobrenadantes dos ensaios realizados em reator de coluna de bolhas (AT_C1 e AT_C2) e em frascos (AT_F1 e AT_F2), de <i>C. amblystomatis</i> , recolhidas no início da fase estacionária.	117

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de espécies de microalgas produtoras de produtos com interesse industrial e respetiva aplicação (adaptado) [15].	9
Tabela 2 – Condições de cultivo de <i>C. amblystomatis</i> .	37
Tabela 3 – Amostras resultantes do estágio na Allmicroalgae.	38
Tabela 4 – Parâmetros de MAE dos ensaios preliminares realizados com a cultura fornecida pela Allmicroalgae (condições autotróficas com meio de cultura MNS).	40
Tabela 5 – Precipitações alcoólicas de EPS e respetivas condições.	42
Tabela 6 – Condições do fracionamento por cromatografia de troca iónica, dos extratos AT_F1 e AT_C2 obtidos por MAE.	48
Tabela 7 – Métodos de coloração e massas de padrões aplicadas em PAGE.	49
Tabela 8 – Doseamento de lípidos por gravimetria e pelo método SPV dos extratos de SE realizados com etanol e n-hexano (80 °C/6h) para os ensaios AT_C1 e AT_C2 , e por MAE com etanol (150°C/ 15 min) para o ensaio AT_C1 .	65
Tabela 9 – Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg/g biomassa) obtidos por MAE com KOH e EtOH, e por extração com acetona (Ac) da biomassa liofilizada de <i>C. amblystomatis</i> cultivada em autotrofia com e sem indução de stress ao nível da fonte de N.	67
Tabela 10 – Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg/g biomassa) nos extratos obtidos por extração contínua em Soxhlet.	69
Tabela 12 – Atividade antibacteriana da fração cromatográfica F8 (1,76 mg nPS/mL), da água (H ₂ O) e do antibiótico gentamicina (10 mg/mL) contra as bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .	85

Abreviaturas

A

ABTS	2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
Ac	Extração/extratos de pigmentos com acetona pura
ALA	Ácido α -linoleico
aPS	Polissacáridos ácidos
AT	Ensaio autotrófico
AT_C	Ensaio autotrófico em reator de coluna de bolhas
AT_F	Ensaio autotrófico em frascos

B

BBM	Meio de cultura basal Bold
BSA	Albumina de soro bovino
BPS	Polissacáridos de ligação

C

ca.	quantidade aproximada
CE	Equivalentes de catequina
CGF	Fator de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i>

D

DEAE	Dietilaminoetil celulose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
DW	Peso seco

E

E_	Método de desproteínização enzimático, com papaína
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Eti	Extração imediata de EPS com 3 volumes de etanol 90% (V/V)
EPS	Polissacáridos extracelulares ou exopolissacáridos
et al.	<i>Et alia</i> (origem do Latim, referência a outros)
EtOH	Etanol

EtON Extração de EPS com incubação *overnight* em 2 volumes de etanol 96% (V/V)

F

F Fração cromatográfica

FAMES Éster metílico de ácidos gordos

FDA *Food and Drug Administration*

FTIR *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier)

H

Hex *n*-Hexano

HPLC *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

HTA Ensaio heterotrófico com sulfato de amónia como fonte de nitrogénio

HTN Ensaio heterotrófico com nitrato de sódio como fonte de nitrogénio

HTU Ensaio heterotrófico com ureia como fonte de nitrogénio

G

GAE Equivalentes de ácido gálico

GC *Gas Chromatography* (cromatografia gasosa)

GC-MS *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa)

GRAS *Generally recognized as safe*

L

LC *Liquid Chromatography* (cromatografia líquida)

M

M_ON Biomassa não liofilizada, incubada *overnight* no solvente KOH 0,1 M

MAE Extração assistida por micro-ondas

Mr Massa molecular relativa

N

nPS Polissacáridos neutros

P

PBR Fotobiorreator

PBS Tampão fosfato salino 15 mM, pH 7,2

<i>Pool</i>	Conjunto das frações cromatográficas com maior concentração em polissacáridos neutros
P_ON	Extração de EPS com incubação <i>overnight</i> em 2 volumes de propanol 95% (V/V)
PS	Polissacáridos
PUFAS	Ácidos gordos poli-insaturados
R	
<hr/>	
RMN	(Espectroscopia de) Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	
<hr/>	
S_	Método de desproteinização de Sevage
S_i	Biomassa liofilizada, extração imediata com o solvente KOH 0,1 M
S_ON	Biomassa liofilizada incubada <i>overnight</i> no solvente KOH 0,1 M
SE	Extração contínua em Soxhlet
SE_EtOH	Extrato obtido após extração contínua em Soxhlet utilizando como solvente etanol absoluto
SE_Hex	Extrato obtido após extração em contínua Soxhlet utilizando como solvente <i>n</i> -hexano
sp	<i>Species</i>
sPS	Polissacáridos sulfatados
SPV	Sulfo-fosfo-vanilina
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
T	
<hr/>	
TBE	Tampão tris-borato 100 mM, 1 mM EDTA (pH 8,3)
TEAC	Equivalentes de Trolox
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

1. Enquadramento

1. Enquadramento

O trabalho final de mestrado desenvolvido teve como objetivo a produção, extração, isolamento e caracterização de biomoléculas de valor acrescentado, provenientes da microalga de água doce *Chlorococcum amblystomatis*.

As microalgas consistem uma alternativa sustentável face a algumas das problemáticas atuais, nomeadamente a escassez de alimentos, alterações climáticas, em particular o aquecimento global, o desenvolvimento de superbactérias, etc. Estes organismos têm a capacidade de sintetizar metabolitos com diversas atividades biológicas. A síntese destas biomoléculas permite, por exemplo, aumentar o valor nutricional de alimentos e rações animais, ser integrados em formulações farmacêuticas, nutracêuticas ou cosméticas. As microalgas são, ainda, uma fonte alternativa para a produção de biocombustíveis e contribuem para a mitigação dos níveis de CO₂ presentes na atmosfera terrestre, participando na redução do aquecimento global. A microalga selecionada para o presente estudo, *Chlorococcum amblystomatis*, é uma espécie ainda pouco estudada pela comunidade científica, mas que pode constituir uma fonte alternativa de biomoléculas com diversas aplicabilidades, revelando-se fundamental aprofundar o seu conhecimento [1], [2].

Este trabalho final de mestrado teve início com um estágio de dois meses (01/02/2022 a 08/03/2022) realizado na Unidade de Investigação e Desenvolvimento (UID) da Allmicroalgae – Natural Products S.A. Esta empresa, situada em Pataias – Leiria, dedica-se à produção de microalgas, desde a escala laboratorial à escala industrial, terminando no empacotamento do produto final, para integração em alimentação humana e formulação de suplementos dietéticos, rações animais, aplicações agrícolas e produtos cosméticos. Para tal, são utilizados diferentes tipos de reatores, em sistema fechado, nomeadamente fotobiorreatores tubulares, *flat panels*/placas e fermentadores, e em sistema aberto, como *open ponds/raceway ponds*/lagoas.

Durante o estágio foi possível acompanhar o controlo e manutenção das diversas culturas existentes na UID da Allmicroalgae. De forma a monitorizar o seu crescimento e as suas necessidades nutricionais foram analisados, diariamente, parâmetros como densidade ótica, pH, salinidade (no caso de espécies de microalgas marinhas), temperatura, determinação dos teores de nitratos e amónia (quando aplicável) e pesos secos. Foram ainda realizadas observações ao microscópio ótico, permitindo não só a visualização das células das microalgas em crescimento, mas também a identificação de possíveis contaminações por outros microrganismos.

Enquadramento

Com base nos procedimentos aplicados na UID da empresa, procedeu-se à produção de *C. amblystomatis* à escala laboratorial. Neste sentido foram realizados três ensaios em diferentes condições nutricionais: dois em condições autotróficas e um ensaio em condições heterotróficas. Em condições de autotrofia, a microalga foi cultivada com e sem indução de *stress* ao nível de nutrientes (privação de nitratos), de forma a verificar a sua influência na produção de biocompostos, nomeadamente de polissacáridos (PS). Para este efeito foram utilizados dois tipos de reatores (coluna de bolhas e frascos) em modo de operação descontínuo. A microalga produzida foi recolhida no início da fase estacionária da curva de crescimento celular.

Neste trabalho foi ainda analisada biomassa fornecida pela empresa, proveniente de dois ensaios realizados em condições heterotróficas, cuja principal diferença residiu na fonte de nitrogénio utilizada (ureia e amónia) e, ainda, biomassa desenvolvida em condições autotróficas, utilizada em estudos preliminares.

As etapas de extração, isolamento e caracterização de biocompostos de valor acrescentado foram realizadas posteriormente no Instituto Superior de Engenharia de Lisboa nas instalações dos Laboratórios de Biotecnologia, de Química Orgânica e do Centro de Investigação de Engenharia Química e Biológica.

As biomoléculas intracelulares foram extraídas por um método não convencional, a extração assistida por micro-ondas (MAE), tendo sido estudadas diferentes condições experimentais, e por um método convencional, a extração contínua em Soxhlet (SE). As moléculas extracelulares foram obtidas por precipitação alcoólica em diferentes condições.

Os extratos obtidos foram alvo de quantificação de diversas biomoléculas através de métodos colorimétricos. Os extratos que exibiram maiores teores em biomoléculas de interesse, nomeadamente PS, foram sujeitos a fracionamento por cromatografia de troca iónica e analisados por eletroforese.

O potencial biológico dos compostos extraídos e isolados foi também avaliado por determinação *in vitro* das suas atividades antioxidantes e antibacterianas.

Por último, a caracterização estrutural parcial dos diferentes compostos presentes nos extratos obtidos e dos compostos purificados foi realizada através de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

2. Introdução

2. Introdução

O aumento da população mundial tem sido notório, esperando-se que, em 2030, se atinja os 8,5 mil milhões de habitantes. Como consequência, tem-se verificado um aumento na procura de produtos alimentares, combustíveis, moléculas terapêuticas, produtos cosméticos, nutracêuticos, entre outros. Paralelamente à fome e à sobre-exploração dos ecossistemas, as alterações climáticas são outra problemática emergente. O impacto negativo de inúmeros produtos químicos e materiais sintéticos na saúde humana e no meio ambiente levam à necessidade de implementar processos alternativos, menos poluentes, que gerem produtos sustentáveis, não tóxicos, biodegradáveis, recicláveis, reutilizáveis. Neste sentido, as microalgas mostram ser uma fonte alternativa bastante promissora. Estes microrganismos fotossintéticos, de reduzidas dimensões, apresentam um crescimento rápido, curtos ciclos de reprodução, grande adaptabilidade ambiental e a capacidade de capturar CO₂. Os seus bioprodutos sintetizados intra e extracelularmente, ou até a própria biomassa, podem ser integrados em formulações alimentares, farmacêuticas, nutracêuticas, na produção de biocombustíveis, entre muitos outros exemplos. As microalgas são produtoras de várias biomoléculas que podem exibir importantes atividades, podendo contribuir positivamente na saúde dos consumidores [1]–[4].

O mercado das microalgas encontra-se em expansão, sendo esperado que, em 2027, sejam atingidos os 4,6 mil milhões de dólares americanos [3].

2.1. Microalgas

As microalgas são, em geral, microrganismos unicelulares e fotossintéticos, que crescem em sistemas aquáticos de água doce ou salgada. Estas podem ser classificadas com base na sua composição de pigmentos em: diatomáceas (*Bacillariophyta*), algas verdes (*Chlorophyta*), algas douradas (*Chrysophyceae*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e em dinoflagelados (*Pyrrophyceae*). Este tipo de organismos apresenta uma elevada diversidade morfológica e fisiológica, bem como a capacidade de tolerar diversas condições ambientais, nomeadamente largas gamas de temperatura, salinidade, pH, intensidade luminosa, nas quais têm a capacidade de proliferarem de forma isolada ou de forma simbiótica com outros organismos [5]–[9].

O seu crescimento requer algumas condições, nomeadamente a presença de luz (fonte de energia), nutrientes e, ainda, dióxido de carbono (CO₂). Os principais nutrientes são o fósforo e o nitrogénio, mas também é necessário o fornecimento de outros macronutrientes, nomeadamente sódio, magnésio, cálcio e potássio, e micronutrientes,

Introdução

como molibdênio, manganês, boro, cobalto, ferro e zinco. Assim, a presença de um meio de cultura, luz, CO₂ e arejamento adequados permite o crescimento celular de forma eficaz. Contudo, apesar destes microrganismos serem, geralmente, considerados fotossintéticos, existem algumas espécies de microalgas com versatilidade metabólica, que lhes permite crescer em heterotrofia [5], [10].

As microalgas possuem a capacidade de capturar CO₂, sendo responsáveis, em parte, pela conversão desta molécula em matéria orgânica, tendo aplicações ao nível da mitigação do CO₂ atmosférico, e são ainda responsáveis pela produção de cerca de 50% de O₂ na biosfera. No entanto, existe toda uma panóplia de outras aplicações, nomeadamente o tratamento de águas residuais ou a produção de hidrogénio e biodiesel. Adicionalmente, são produtoras de uma vasta gama de metabolitos primários e secundários, intra e/ou extracelulares, tais como proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas e pigmentos, etc, cuja síntese é influenciada pelas condições de crescimento. Estes biocompostos podem exibir atividades biológicas diversas como, por exemplo, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiviral, com aplicabilidade nas indústrias farmacêutica, alimentar humana e animal, ou na indústria cosmética (Figura 1 e Tabela 1) [6], [7], [10]–[14].

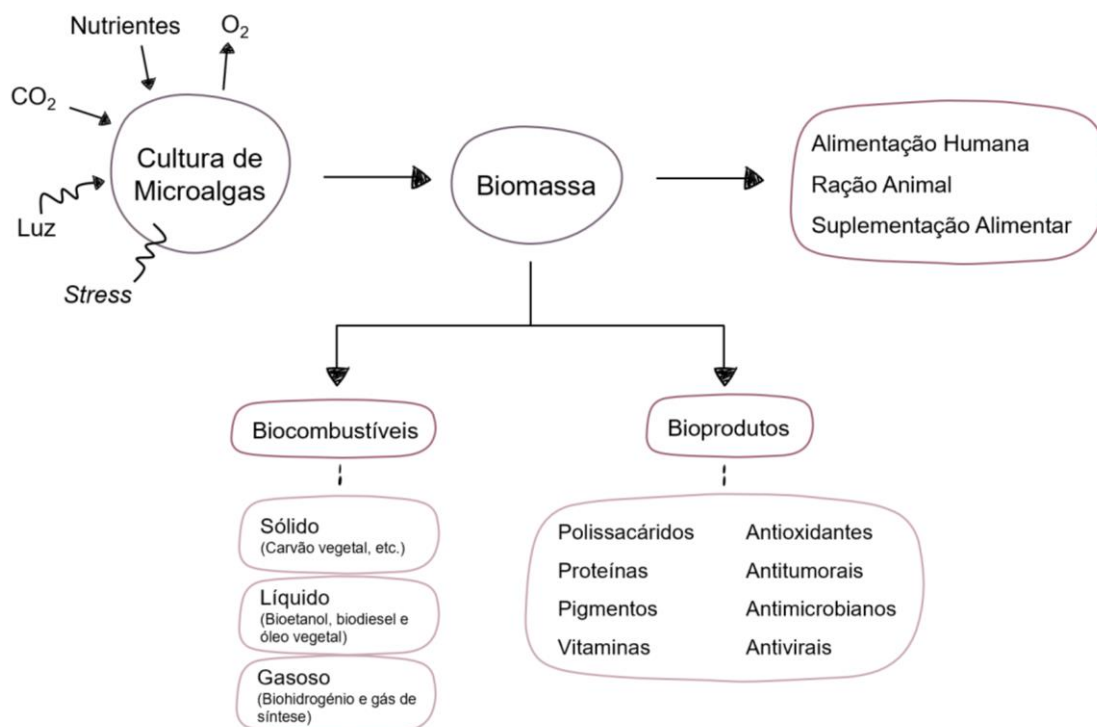


Figura 1 – Conversão do CO₂ atmosférico pelas microalgas nos diferentes bioprodutos através da fotossíntese (adaptado) [5], [10].

Tabela 1 – Exemplos de espécies de microalgas produtoras de produtos com interesse industrial e respetiva aplicação (adaptado) [15].

Espécie	Produto	Aplicações	Referência
<i>Gyrodinium impudicum</i> KG03	Exopolissacárido sulfatado p-KG03	Farmacêuticos	[16]
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polissacáridos, ácidos gordos (EPA e DHA), ficoeritrina	Farmacêuticos, cosméticos, nutrição, espessante	[15]
<i>Phaedactylum tricorutum</i>	Carotenoides (fucoxantina), ácidos gordos (DHA)	Farmacêuticos, cosméticos, alimentação animal	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Clorofila, fator de crescimento CGF, biomassa	Aditivos alimentares, suplementos dietéticos	
	Etanol	Bioetanol	[17]
<i>Ulkenia</i> sp.	Ácido gordo (DHA)	Aditivos alimentares, suplementos dietéticos, aditivo alimentar para aquacultura, tratamento para doenças crónicas	
<i>Tetrademus</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp.	Biomassa	Biorremediação de metais pesados de águas residuais	

A produção de microalgas acarreta uma série de etapas fundamentais, nomeadamente o crescimento celular e as etapas de *downstream*, que consistem no isolamento e purificação e que visam a obtenção de produtos com elevada pureza e rendimento. As condições mais comuns para produção de microalgas são condições fotoautotróficas (utilização de luz como fonte de energia e compostos inorgânicos, como o CO₂, como fonte de carbono), condições heterotróficas (utilização de compostos orgânicos como fonte de energia e fonte de carbono) e condições mixotróficas (utilização de compostos orgânicos e inorgânicos, na presença ou ausência de luz) [10], [17]–[19].

O crescimento destes organismos pode efetuar-se em sistemas abertos ou sistemas fechados. No caso dos sistemas abertos, os biorreatores comumente

Introdução

implementados são os *raceways* (Figura 2 – (a)) ou *open ponds* (lagoas abertas), que permitem um cultivo simples e mais barato, em condições semelhantes às condições dos seus habitats naturais. No entanto, por serem abertos, ficam expostos a contaminações e o controlo das condições de crescimento, nomeadamente a temperatura, arejamento, iluminação, entre outros, não é rigoroso, o que leva à obtenção de menor produtividade, face aos sistemas fechados [20]–[22].

O crescimento celular pode também ocorrer em fotobiorreatores fechados (PBR), cuja iluminação pode ter origem natural ou artificial. Os fotobiorreatores fechados mais utilizados são os tubulares e os *flat panels* (placas) (Figura 2 – (b)). Este tipo de sistema é o mais indicado para a produção de produtos de elevado valor, uma vez que as microalgas não ficam diretamente expostas a contaminantes. No entanto, a operação deste tipo de sistemas é mais complexa e os custos associados são mais elevados. De um modo geral, permitem a obtenção de maior produtividade, uma vez que nestes sistemas é possível controlar diversos parâmetros, nomeadamente o pH, a concentração de CO₂ e de nutrientes no meio de cultura [22]–[26].

Os fotobiorreatores tubulares (Figura 2 – (c)) são dos mais utilizados a nível industrial, sendo constituídos por um material transparente, como vidro ou acrílico. Permitem a circulação da cultura celular e, ainda, a sua exposição a luz solar ou artificial. Os *flat panels*, também comumente utilizados em contexto industrial, são constituídos por placas finas transparentes, compostas normalmente por vidro ou plástico, nas quais se desenvolve a cultura de microalgas. Analogamente, este tipo de reator possibilita uma boa exposição da cultura à radiação [22], [24], [27].

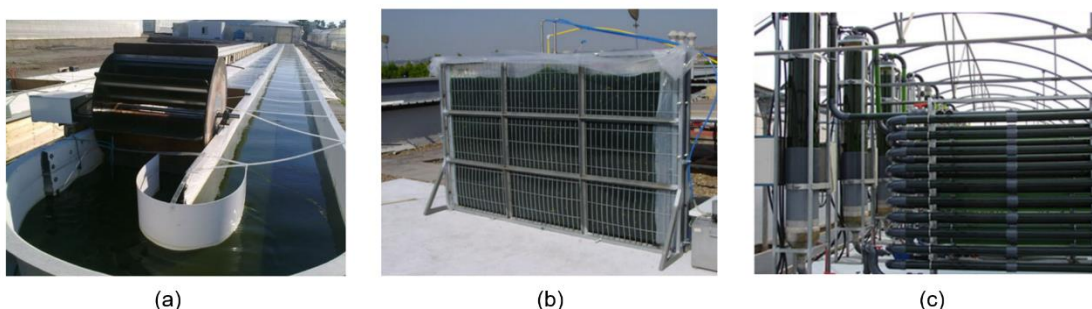


Figura 2 – Sistemas de cultivo de microalgas: (a) – *raceway*; (b) – *flat panel*; (c) – fotobiorreator tubular em disposição horizontal [22].

O crescimento em condições heterotróficas, geralmente realizado em fermentadores, permite o aumento da produtividade celular, e conseqüente aumento

das taxas de crescimento, e permite ainda um elevado controlo das condições de crescimento. No entanto, este processo acarreta custos adicionais e é condicionado a espécies de microalgas cujo metabolismo lhes permita crescer na ausência de luz e carbono orgânico. [18], [19], [23], [26].

As etapas de *downstream* são identificadas como as mais dispendiosas dos processos de fabrico. Estas etapas incluem processos de recolha da biomassa (como filtração, centrifugação, etc.), secagem da biomassa (liofilização, secagem solar, etc.) e disrupção celular (como técnicas de ultrassons, métodos enzimáticos, tratamentos químicos, etc.) a fim de extrair os compostos de interesse, quando aplicável [17].

2.2. Microalgas Verdes

As microalgas verdes (*Chlorophyta*) são um grupo de microrganismos fotossintéticos que habitam maioritariamente em sistemas aquáticos, sendo consideradas a base da cadeia alimentar destes sistemas [6], [28].

As algas pertencentes à divisão *Chlorophyta* possuem inúmeras características, sendo algumas delas comuns com as plantas terrestres como, por exemplo, o facto de possuírem cloroplastos revestidos por uma dupla membrana. Estes organelos possuem pigmentos fotossintético, como clorofilas *a* e *b*, bem como pigmentos acessórios tais como carotenos e xantofilas. A maior parte das microalgas verdes possui paredes celulares compostas por celulose [29].

Este tipo de microrganismos tem despertado cada vez mais interesse devido ao seu potencial biotecnológico, uma vez que possuem uma grande capacidade de se adaptarem a tecnologias de produção sustentável em larga escala. Um dos exemplos mais comuns de uma microalga verde é a *Chlorella* sp. Esta espécie é habitualmente utilizada na produção de lípidos, com aplicabilidade na produção de biocombustíveis, ração animal e antibióticos, bem como na produção de hidratos de carbono, pigmentos, vitaminas e minerais, que podem ser aplicados na indústria farmacêutica, entre outras. As espécies de microalgas verdes *Dunaliella* sp. e *Haematococcus pluvialis* têm sido utilizadas industrialmente para a produção de β -caroteno e de EPA (ácido eicosapentaenóico), respetivamente, bem como a microalga *Scenedesmus* sp. empregue na produção de luteína, com aplicabilidade nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética [6], [11], [30].

2.2.1. *Chlorococcum amblystomatis*

A *Chlorococcum* sp. (Figura 3) é uma microalga verde, unicelular, que pertence ao filo *Chlorophyta*, à classe *Chlorophyceae*, à ordem *Chlorococcaceae* e à família *Chlorococcaceae*. Este organismo pode viver sob a forma de células vegetativas individuais ou, temporariamente, em grupos sem forma definida. O tamanho das células pode oscilar entre 8 a 25 µm e a forma das suas células varia de elipsoidal a esférica. Consoante as condições de cultura a que estão sujeitas, a sua reprodução pode ser assexuada, através de zoósporos, ou sexuada, através de isogâmetas. A reprodução sexuada ocorre quando as condições ambientais são desfavoráveis, nomeadamente quando existem limitações de luz ou fonte de nitrogénio [31], [32].

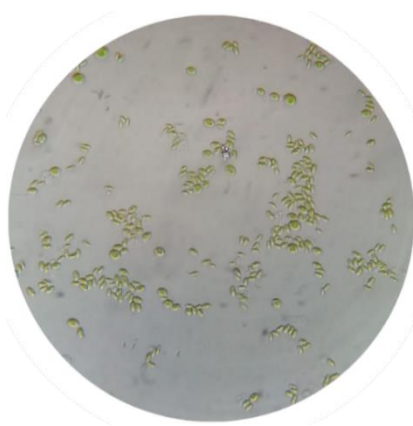


Figura 3 – Observação ao microscópio ótico de *C. amblystomatis* [33].

Foi reportado, na literatura, que a microalga *C. amblystomatis*, cultivada em PBR tubular, apresentou na sua constituição 48 a 56% peso seco (DW) de proteínas, 18 a 31% DW de lípidos e entre 6 a 18% DW de hidratos de carbono (9 a 16% DW de cinzas). Em termos de pigmentos, apresentou um máximo de 40,24 mg/g DW de clorofilas e 5,37 mg/g DW de luteína. Graças aos seus elevados teores de proteínas, lípidos, compostos fenólicos e pigmentos, esta espécie representa uma promissora alternativa sustentável para as indústrias alimentar, farmacêutica e nutracêutica [31], [32].

As potencialidades biotecnológicas da *C. amblystomatis*, até à data, foram pouco exploradas. No entanto, a literatura refere que a *Chlorococcum* sp. tem aplicabilidade ao nível da mitigação do CO₂, floculação lipídica de águas residuais, produção de carotenoides, produção de compostos fenólicos e polissacáridos, e apresenta elevada acumulação de lípidos, incluindo ómega-3. Por exemplo, a espécie *Chlorococcum littorale* apresenta elevada tolerância ao CO₂, superior a 65%, tornando-se uma boa candidata para a fixação deste gás. O óleo da *Chlorococcum humicola* apresenta cerca

de 95,4% de ácidos gordos C14-18, sendo uma promitente candidata para a produção de biodiesel. De um modo geral, as microalgas do género *Chlorococcum* têm a capacidade de acumular carotenoides, nomeadamente astaxantina, com interessantes aplicações nas indústrias farmacêutica e cosmética [32], [34], [35].

2.3. Compostos Bioativos

Como anteriormente referido, as microalgas possuem a capacidade de produzir diversas moléculas bioativas com aplicabilidade em biotecnologia, como pigmentos, ácidos gordos, péptidos e polissacáridos [36], [37].

Um dos principais objetivos governamentais a nível mundial é providenciar uma alimentação equilibrada que seja acessível a todos. Atualmente, inúmeras patologias como a obesidade, doenças cardiovasculares, a diabetes e o cancro continuam muito presentes na sociedade, com impacto negativo na saúde da população. Uma das microalgas mais utilizadas na alimentação humana e animal é a *Chlorella*, sendo “geralmente considerada segura” (*Generally Recognized As Safe* - GRAS) para consumo humano pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela EFSA (*European Food Safety Authority*). Estes microrganismos representam uma solução nutricionalmente rica para alimentação humana, permitindo colmatar algumas das problemáticas atuais, como a sobrepesca ou a fome, uma vez que, regra geral, são constituídas por, aproximadamente, 40 a 70% de proteínas, 12 a 30% de hidratos de carbono, 4 a 20% de lípidos, 8 a 14% de carotenos e vitamínicos (A, B1, B2, B6, B12, C, K e D) [2], [4], [38]–[41].

No entanto, as aplicações dos compostos bioativos extraídos de microalgas vão além da indústria alimentar. Por exemplo, a diatomácia *Phaeodactylum tricornutum* já foi utilizada na expressão de um anticorpo monoclonal humano IgG contra a hepatite B, uma vez que o seu codão é semelhante ao codão humano [42].

2.3.1. Polissacáridos

Os polissacáridos (PS) são estruturas poliméricas de hidratos de carbono, que consistem numa cadeia linear ou ramificada de monossacáridos, tais como galactose, glucose, xilose, etc., ligadas entre si através de ligações glicosídicas. Tais ligações podem resultar em diferentes conformações estruturais, nomeadamente em *sheets* (folhas), espirais, hélices simples ou hélices triplas. Tal diversidade estrutural resulta na formação de polissacáridos com diferentes atividades biológicas, como atividades

Introdução

imunomoduladora, antibacteriana, antiviral, anticoagulante, antioxidante, antitumoral, antimutagênica, entre outras [43]–[45].

As microalgas têm a capacidade de produzir polissacáridos que são acumulados no interior das células (intrapolissacáridos ou polissacáridos intracelulares), que são excretados para o meio de cultura (exopolissacáridos ou polissacáridos extracelulares, EPS) ou que permanecem ligados à membrana celular como polissacáridos de ligação (BPS). A composição destas biomoléculas depende não só da taxonomia da alga, mas também das respectivas condições de crescimento [43], [44], [46].

Os polissacáridos mais abundantes produzidos por microalgas verdes são a celulose, polissacárido estrutural presente na parede celular das microalgas (Figura 4) e o amido, presente nos cloroplastos, identificado como reserva energética das células [47], [48].

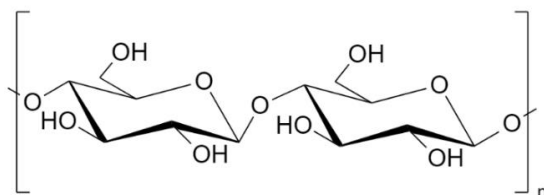


Figura 4 – Estrutura química da celulose.

Deste grande grupo de biocompostos podem destacar-se os polissacáridos sulfatados (sPS) e os β -glucanos, uma vez que têm demonstrado uma vasta gama de atividades biológicas. Os β -glucanos são polissacáridos que podem apresentar na sua constituição monómeros de glucose ligados entre si por ligações glicosídicas β -(1,3) e β -(1,6). Tais biomoléculas encontram-se presentes na parede celular de cereais, leveduras, cogumelos, algas e bactérias, e podem apresentar inúmeras atividades biológicas, nomeadamente atividade imunomodulatória, antitumoral e redutor de colesterol e de glucose no sangue. Decorrente destas características, os β -glucanos são biomoléculas suscetíveis de aplicação na indústria alimentar/nutracêutica, para conceção de ingredientes funcionais, mas também na indústria farmacêutica/cosmética, sendo, por exemplo, incorporados em produtos cosméticos graças à sua capacidade cicatrizante, antienvhecimento e hidratante. A sua diversidade em termos de peso molecular, solubilidade, grau de polimerização e ramificação possibilita a existência de moléculas com diferentes conformações estruturais, propriedades físico-químicas e bioatividades, tornando-as extremamente versáteis e com aplicações diferenciadas [13], [49]–[51].

As microalgas são consideradas como uma potencial fonte produtora de β -(1,3)-glucanos (Figura 5), nomeadamente as microalgas verdes. Estas moléculas adotam, geralmente, uma conformação em tripla hélice, são solúveis em soluções alcalinas e podem possuir ramificações através de ligações (1,6). Estes polissacáridos demonstram efeitos imunomodulatórios, uma vez que podem ativar componentes celulares/humorais do sistema imunológico dos hospedeiros. Mostram-se, também, promissores no combate de metástases tumorais e na prevenção de infeções bacterianas, fúngicas e virais. Já foram isolados β -(1,3)-glucanos de *Chlorella vulgaris* com atividades anti-inflamatórias e efeitos imunomodulatórios [13], [45], [52], [57].

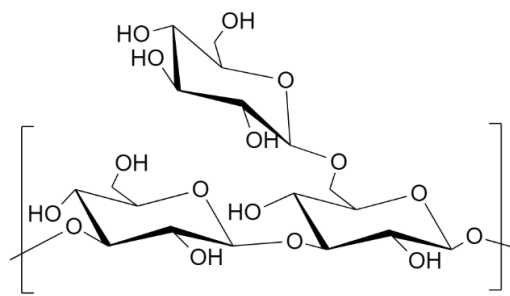


Figura 5 – Estrutura química de um β -(1,3)-glucano.

Os polissacáridos sulfatados são um grupo de polímeros presente na parede celular de plantas, animais e algas. Possuem ligações cruzadas a grupos éster-sulfato, o que lhes confere carga negativa. No caso dos sPS presentes em organismos marinhos, a presença de grupos sulfato nos polissacáridos é responsável por alterar a estrutura polimérica dos hidratos de carbono, permitindo uma adaptação fisiológica às drásticas condições ambientais, tal como a força iónica do meio. Tais compostos podem exibir atividades biológicas, nomeadamente atividades antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatória, entre outras. Esta família de polissacáridos destaca-se pela elevada atividade antiviral, apresentando a capacidade de se ligar a glicoproteínas presentes no envelope de vírus, cujos domínios são carregados positivamente, formando um complexo não reversível. Para além da sua aplicabilidade na indústria alimentar como agentes emulsionantes e estabilizadores, os sPS são ainda utilizados na biotecnologia vermelha [53]–[55].

Estas moléculas são geralmente encontradas em espécies marinhas, como resposta a condições extremas (elevada salinidade). Contudo, já foram identificados polissacáridos sulfatados produzidos por macro e microalgas de água doce,

Introdução

nomeadamente pela microalga vermelha *Porphyridium aeruginosum* e pela microalga verde *Chlorella vulgaris* [56], [57].

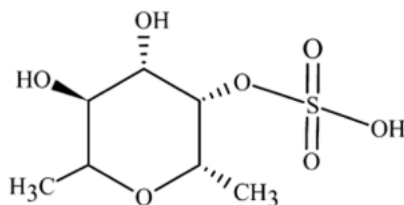


Figura 6 – Estrutura química de um monossacárido sulfatado [54].

2.3.2. Lípidos

Os lípidos são um grupo de biomoléculas estruturalmente diverso, compostos maioritariamente por cadeiras ou anéis de hidrocarbonetos, cuja principal característica é a sua insolubilidade em solventes polares, como a água. Estes podem ser divididos em ácidos gordos (FA) e esteróis. Vários organismos apresentam a capacidade de sintetizar tais biomoléculas, nomeadamente microalgas, fungos ou bactérias. No caso das microalgas, estas têm a capacidade de produzir diversos tipos de lípidos, tais como trigliceróis, fosfolípidos, glicolípidos, entre outros, com diversos graus de insaturação. Estas biomoléculas desempenham inúmeras funções ao nível celular, podendo atuar como fonte e armazenamento de energia, componentes da membrana celular ou participar em processos metabólicos [58]–[60].

Um dos principais produtos sintetizados pelas microalgas são os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), compostos por cadeias lineares de hidrocarbonetos com duas ou mais insaturações. Consoante a posição da primeira insaturação, estes podem ser classificados em ómeegas 3, 6, 7 e 9. Tais compostos apresentam benefícios na saúde humana e animal ao nível do metabolismo celular, flexibilidade membranar e são ainda responsáveis pela síntese de precursores de eicosanóides (mediadores inflamatórios). A sua aplicabilidade vai desde a produção de suplementos na indústria alimentar até à formulação de produtos farmacêuticos, bem como na produção de biocombustíveis [5], [36], [46], [58].

A microalga verde *C. amblystomatis* sintetiza maioritariamente PUFAs, nomeadamente ácido α -linoleico (ALA), representado na figura abaixo [31].

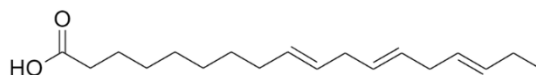


Figura 7 – Estrutura química do ácido α -linoleico (ALA).

2.3.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis são metabolitos secundários compostos por um anel aromático que possui um ou mais substituintes hidroxilo e cuja principal característica é a sua atividade antioxidante. Estes podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas. Os polifenóis provenientes de algas marinhas apresentam inúmeras atividades para além da atividade antioxidante, tais como atividade antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral e antidiabética. Quando são impostas condições de *stress* (nomeadamente a exposição a elevadas intensidades luminosas ou a carência de nutrientes) a uma cultura de microrganismos fotossintéticos, como as microalgas, a eficiência da fotossíntese diminui devido ao aumento da redução da cadeia de eletrões. Por conseguinte, a redução da cadeia de eletrões promove o *stress* foto-oxidativo e a acumulação de excesso de energia, reduzindo os seus mecanismos foto-protetores. No entanto, estes organismos desenvolveram uma resposta adaptativa contra este tipo de condições adversas, sendo capazes de sintetizar moléculas com atividade antioxidante, como os polifenóis e os carotenoides. Os polifenóis possuem propriedades redutoras, permitindo a neutralização e estabilização de espécies oxidativas, como espécies reativas de oxigénio (ROS) e iões metálicos [36], [61]–[63].

Os flavonoides, sintetizados a partir de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), são fundamentais na proteção das células face ao envelhecimento precoce e doenças, pois conferem proteção ao DNA, proteínas e lípidos contra danos oxidativos. Estas moléculas são compostas por 15 átomos de carbono organizados em 3 anéis, como ilustrado na Figura 8. Os flavonoides podem ser agrupados em diferentes classes, consoante o nível e o padrão de substituição do anel pirano, em: flavanóis, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, flavonas e antocianidinas [36], [64].

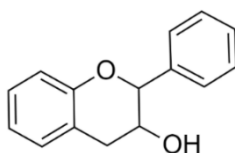


Figura 8 – Estrutura química base de um flavonoide.

2.3.4. Pigmentos

As plantas e as microalgas são organismos produtores de inúmeros pigmentos fotossintéticos de diferentes cores e biologicamente ativos, dos quais se destacam as classes das clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas. Tais biomoléculas têm sido aplicadas nas indústrias alimentar, nutracêutica, farmacêutica, cosmética e em aquacultura, não só por serem corantes naturais, mas também por exibirem atividades biológicas, tais como atividade antiinflamatória, antioxidante, antiobesidade, antitumoral, neuroprotetora, etc. [36], [46], [65].

As clorofilas são pigmentos fotossintéticos, lipossolúveis e são compostos característicos das microalgas verdes (*Chlorophyta*), estando presentes nos seus cloroplastos. Estas moléculas são constituídas por um anel de porfirina, contendo um íão magnésio no seu centro. As clorofilas *a* e *b* (Figura 9) são as mais abundantes nas microalgas verdes e plantas. A clorofila *a* é um recetor de energia luminosa, desempenhando um papel fundamental no processo fotossintético: conversão da luz solar em energia química. As restantes clorofilas, nomeadamente a clorofila *b*, são pigmentos acessórios à fotossíntese. Alguns dos benefícios para a saúde humana derivados da ingestão destes compostos são a estimulação do sistema imunitário no tratamento de problemas dermatológicos, entre outros [17], [65]–[68]. Os principais pigmentos, descritos na literatura, sintetizados pela *C. amblystomatis* são as clorofilas *a* e *b* [31].

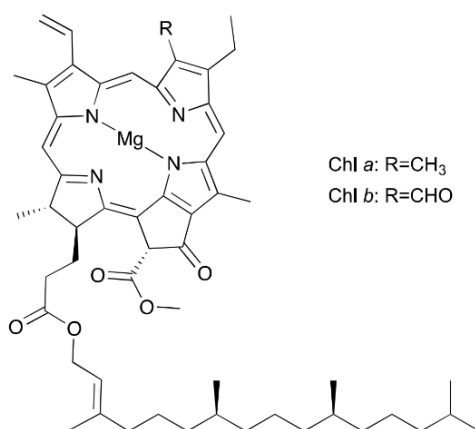


Figura 9 – Estrutura química da clorofila *a* e clorofila *b*.

Outra classe de pigmentos que se encontra presente nos cloroplastos são os carotenoides (ou tetraterpenos). Tais biomoléculas podem exibir propriedades antitumorais, anti-inflamatórias e antiobesidade, sendo também aplicáveis nas

indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. Os carotenoides podem ser divididos em duas classes: os carotenos e as xantofilas. Os carotenos, que são hidrocarbonetos, são moléculas lipofílicas sendo o β -caroteno o composto mais comum. Este tipo de caroteno pode exibir atividades biológicas diversas, nomeadamente atividade antioxidante, neutralizando vários radicais livres. As xantofilas, que incluem na sua estrutura átomos de oxigénio, são moléculas polares. A astaxantina e a luteína são as principais xantofilas encontradas em microalgas (Figura 10). A astaxantina pode exibir elevada atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-envelhecimento, antihipertensiva e antitumoral; a luteína, para além das suas propriedades antioxidantes, permite ainda prevenir doenças como a degenerescência macular da idade, Alzheimer e doenças cardiovasculares [65], [67], [69], [70].

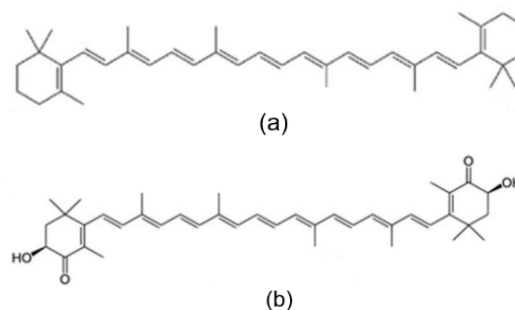


Figura 10 – Estrutura química do β -caroteno (a) e da astaxantina (b) [71].

2.4. Fatores que afetam o crescimento celular: indução de *stress*

A síntese de biocompostos está intimamente relacionada com as condições de crescimento. A manipulação destas condições, nomeadamente o crescimento em condições extremas, pode influenciar a produção/acumulação de determinados metabolitos em detrimento de outros, tais como polissacáridos, lípidos, pigmentos, polímeros extracelulares, entre outros. Uma das estratégias mais utilizadas é a indução de *stress* abiótico, que inclui a manipulação de parâmetros de cultura como, por exemplo, a temperatura, o pH, a salinidade, os nutrientes ou a luz. Regra geral, as microalgas têm demonstrado elevada adaptabilidade a condições extremas/inadequadas, bem como a capacidade de sintetizar metabolitos de valor acrescentado [72], [73].

O *stress* ao nível dos nutrientes é uma das estratégias que permite induzir o aumento da síntese de determinados compostos. A privação de macronutrientes como nitrogénio, fósforo ou enxofre, pode ter como resultado a acumulação de lípidos/hidratos

de carbono e de ROS, a síntese de antioxidantes, a degradação de proteínas e pigmentos ou a redução da atividade fotossintética.

A carência de nutrientes, nomeadamente de nitrogénio, fundamental para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e clorofilas, permite aumentar o teor de lípidos, como triglicéridos e PUFA's. No caso de polissacáridos, nomeadamente os EPS, é possível incrementar a sua síntese recorrendo a esta fonte de *stress*, bem como aumentar a acumulação de carotenoides secundários, como o β -caroteno. A acumulação de lípidos pode também resultar da privação de outras moléculas, como o enxofre ou o fósforo, mas também através da exposição a elevada intensidade luminosa. A temperatura é outro parâmetro fundamental, uma vez que influencia os processos metabólicos dos organismos vivos. Estudos com microalgas demonstraram que a síntese de lípidos polares aumentou com a diminuição da temperatura, enquanto o aumento da temperatura promoveu a acumulação de lípidos apolares [8], [60], [72], [74], [75].

2.5. Extração e Purificação de Compostos Bioativos

Grande parte das biomoléculas de interesse produzidas pelas microalgas encontra-se no interior das células, sendo necessário recorrer-se a processos de rotura ou permeabilização celular.

Um dos grandes desafios tem sido a aplicação de métodos de extração em escala industrial que se rejam pelos princípios da Química Verde. A Química Verde baseia-se em doze princípios e tem como objetivo a criação e adoção de produtos/processos químicos que não utilizem nem produzam substâncias nocivas para o Homem e para o meio ambiente. Os produtos concebidos devem integrar componentes inofensivos e que não permaneçam no meio ambiente após a sua utilização, devem ser sintetizados de forma eficiente, com recurso a solventes como a água e com baixos consumos energéticos [76].

Atualmente, as etapas de *downstream* envolvem processos energeticamente dispendiosos, morosos e que requerem a utilização de solventes orgânicos tóxicos, contaminando assim produto de interesse e tendo, conseqüentemente, implicações ambientais (métodos convencionais). Deste tipo de metodologias destacam-se a extração contínua em Soxhlet, a maceração, a percolação ou a decocção. Por conseguinte, têm sido realizados estudos com o objetivo de desenvolver métodos de extração económica e ambientalmente mais sustentáveis e eficientes, diminuindo o consumo energético e o tempo de extração (métodos não convencionais). Alguns exemplos deste tipo de tecnologias são as extrações assistidas por ultrassons e micro-

ondas, extração com fluidos supercríticos, extração com água pressurizada e extração por métodos enzimáticos [77]–[79].

No caso dos compostos extracelulares, como os EPS, que são excretados para o meio de cultura, o método de isolamento mais comum é por precipitação alcoólica. Tal metodologia permite não só a concentração dos EPS, mas também possibilita a reciclagem do solvente através de processos de destilação. No entanto, a polaridade e a temperatura do álcool utilizado afetam o rendimento em polissacáridos e a co-precipitação de impurezas, como proteínas. Para a remoção destas macromoléculas são utilizados métodos de desproteínização, como o método de Sevage, métodos enzimáticos, método de precipitação clorofórmio/metanol, método do cloreto de cálcio, entre outros. No entanto, a principal desvantagem associada à aplicação de métodos de desproteínização consiste na degradação de PS, afetando o rendimento de extração [44], [80], [81].

2.5.1. Métodos de Extração

A rotura celular pode ser realizada através de métodos mecânicos ou não mecânicos, nomeadamente métodos térmicos, químicos ou biológicos. À maioria destes métodos estão associadas inúmeras desvantagens, designadamente os elevados custos e impactes ambientais adversos. Conforme já mencionado, de forma a colmatar algumas das lacunas dos métodos convencionais, têm sido desenvolvidos e implementados métodos alternativos, que recorrem a menores tempos de extração e consumo de solventes, resultando num menor prejuízo para o ambiente. Na Figura 11 encontram-se as vantagens e desvantagens de cada uma das metodologias [6], [79].

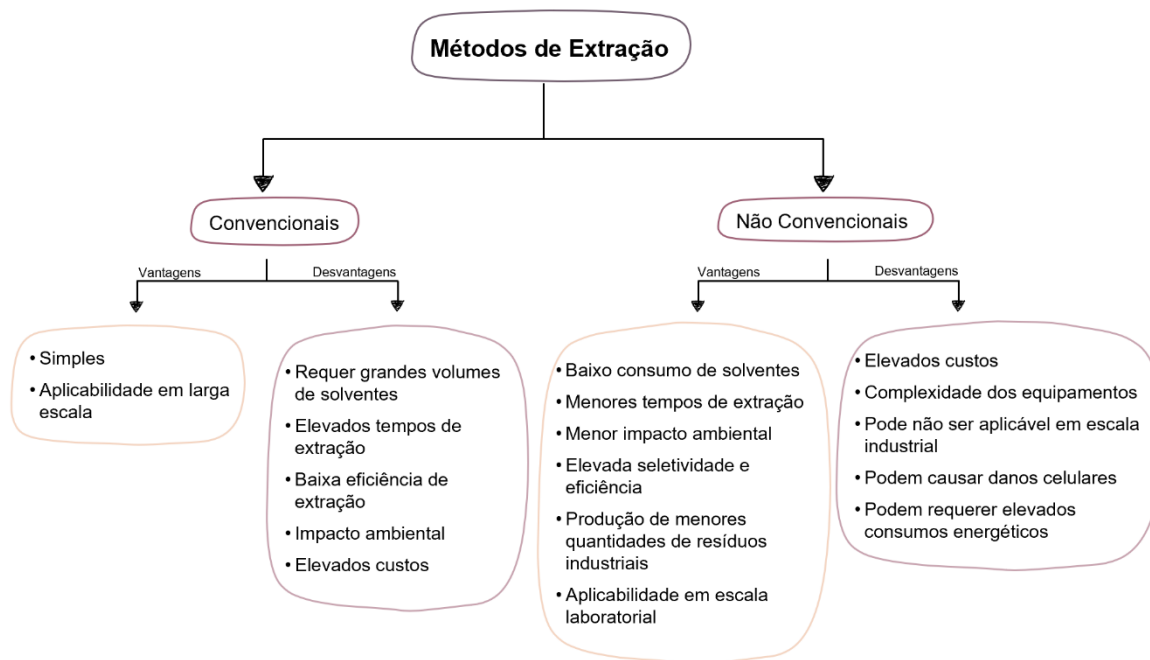


Figura 11 – Vantagens e desvantagens dos métodos de extração convencionais e não convencionais. Adaptado de [82].

2.5.1.1. Métodos Convencionais

Um exemplo clássico de um método de extração sólido-líquido convencional é a extração contínua em Soxhlet. Esta técnica consiste em sucessivos ciclos de condensação/refluxo de um solvente orgânico, ou combinação de solventes, graças ao fornecimento de temperatura, minimizando o volume de solvente utilizado, onde a biomassa se encontra em constante contacto com o solvente. É uma técnica simples e facilmente escalável, mas requer elevados tempos de extração e a utilização de grandes volumes de solventes orgânicos nocivos. Esta metodologia é comumente utilizada para extração de polissacáridos, lípidos, pigmentos, etc. Outro exemplo de um método de extração convencional é a maceração, que consiste na imersão da amostra num determinado solvente, de forma a torná-la mais “macia”, e posterior maceração da mesma para extração de biocompostos. Para além da utilização de um determinado solvente, na presença ou ausência de agitação, este processo normalmente opera a baixas temperaturas. A metodologia é relativamente simples e com baixo custo associado, mas tem como desvantagens os elevados tempos de extração e a obtenção de baixos rendimentos. Outro método comum é a percolação, que opera continuamente, e que consiste na utilização de um solvente até à sua saturação a uma temperatura igual ou superior à temperatura ambiente. Uma vez saturado o solvente de extração, este é substituído por solvente novo, tornando assim esta metodologia mais eficiente do que a maceração. Uma das principais desvantagens associadas a métodos que operam

a elevadas temperaturas e elevados tempos de extração é a possível degradação de compostos e consequente perda de bioatividade [77], [83]–[85].

2.5.1.2. Métodos Não Convencionais

A extração assistida por micro-ondas (MAE) é identificada como uma metodologia não convencional e baseia-se na utilização de radiação eletromagnética com o objetivo de aquecer, por condução, a amostra (biomassa e solvente), num sistema fechado, evitando a dissipação de energia. A agitação da mistura promove colisões entre as moléculas, levando a um aumento de energia térmica. Assim, é possível a obtenção de maiores rendimentos, redução dos tempos de extração e utilização de menores volumes de solvente, comparativamente aos métodos convencionais. Alguns estudos efetuados já demonstraram que este método é adequado e eficiente para a extração de biocompostos a partir de microalgas. No entanto, uma das limitações desta técnica é a elevada temperatura à qual a matriz está exposta, podendo afetar a bioatividade das moléculas extraídas. Através deste método é possível extrair diversas biomoléculas, nomeadamente polissacáridos, proteínas, lípidos, pigmentos, entre outras, mediante o solvente utilizado [57], [86]–[88]. Yirgu, Leta, Hussien, Khan e Aragaw [89] reportaram a extração de 26% de polissacáridos da microalga verde *Scenedesmus* sp., com recurso a MAE em condições ácidas (H_2SO_4 2,8 N/151 °C/1075 W). Zhou *et al.* [90] recorreu a esta técnica, em condições otimizadas (15 min./130 °C/3:2 de hex:isopropanol), para extrair lípidos e ésteres metílicos de ácidos gordos (FAMES) da microalga *Scenedesmus obliquus*, com elevados rendimentos (88 e 96%, respetivamente).

Outro exemplo de uma metodologia não convencional é a extração com fluido supercrítico, sendo o CO_2 (sc CO_2) um dos mais utilizados, uma vez que apresenta como principais características o facto de ser incolor, inodoro, não corrosivo e não tóxico, sendo ambientalmente menos nocivo quando comparado com outros solventes (nomeadamente, hexano, tolueno, óxido nítrico, etc.). Um fluido supercrítico é um fluido que se encontra numa dada região de pressão e temperatura, na qual apresenta simultaneamente características de líquido e gás. Este tipo de fluidos apresenta a capacidade de solubilizar uma vasta gama de compostos (como lípidos e polifenóis, entre outros) sem os degradar, permitindo ainda a sua fácil separação. No caso do sc CO_2 , este apresenta maior eficiência na extração de compostos apolares. Contudo, podem utilizar-se co-solventes que possuam afinidade para com moléculas polares, como o etanol. Uma grande desvantagem desta metodologia é o custo associado aquando aplicação a uma escala industrial [82], [87], [88]. Um estudo realizado por

Halim, Gladman, Danquah e Webley [91], utilizando *Chlorococcum* sp., teve como objetivo comparar a eficácia dos métodos de extração contínua em Soxhlet (SE), utilizando *n*-hexano como solvente, e de extração scCO₂ na obtenção de lípidos. Os resultados obtidos revelaram que a extração scCO₂ mostrou ser substancialmente mais eficiente quando comparada com SE, uma vez que foi possível a redução do tempo de extração em 5,6 vezes para a obtenção do mesmo teor de lípidos (ca. 0,058 g extrato lipídico/g biomassa).

2.5.2. Purificação de Compostos Bioativos

Os extratos obtidos após aplicação dos métodos de extração apresentam composição variada, contendo diversas biomoléculas, solventes extrativos e diversos contaminantes. Assim, após o procedimento de extração podem ser aplicadas técnicas que permitam a remoção de impurezas e, conseqüentemente, a purificação do produto. Existem diversos métodos para a purificação de biomoléculas que dependem, não só do produto que se pretende purificar, mas também da pureza pretendida. As técnicas mais comumente utilizadas são técnicas cromatográficas, precipitações alcoólicas, eletroforese e separação por membranas [77], [80], [92].

Geralmente, o primeiro passo do fracionamento de PS passa por uma precipitação com etanol, permitindo a remoção de moléculas com baixo peso molecular. Em seguida, podem ser aplicadas outras técnicas, nomeadamente técnicas de cromatografia líquida em coluna, sendo uma das mais utilizadas a de troca iónica. Esta técnica é usada na separação de polissacáridos ácidos (aPS)/neutros (nPS) e de polissacáridos com carga negativa recorrendo a um gradiente de concentração ou de pH, afim da sua eluição. Por norma, quando a fase móvel apresenta um pH de 6, ocorre a adsorção de aPS à matriz cromatográfica, sendo eluídos os nPS. Por conseguinte, a passagem, pelo sistema cromatográfico, de uma fase móvel com valor de pH semelhante, mas com força iónica diferente, permite a eluição de polissacáridos ácidos. Geralmente, a capacidade de adsorção de um polissacárido é tanto maior quanto maior for o número de grupos ácidos que este apresenta. Podem ainda ser utilizadas outras técnicas cromatográficas, como a cromatografia de exclusão molecular ou de afinidade. A cromatografia de exclusão molecular baseia-se na eluição das biomoléculas de acordo com o seu tamanho/massa molar, sendo as moléculas de tamanho/massa molar superior as primeiras a serem eluídas, ficando as restantes retidas nos poros da resina. A cromatografia de afinidade tem por base a afinidade das biomoléculas a separar para com ligandos imobilizados na superfície da resina (fase estacionária). Neste caso, todas as biomoléculas que se

liguem especificamente aos ligandos ficam adsorvidas, sendo as restantes eluídas. A eluição das moléculas adsorvidas resulta da manipulação da força iónica ou do pH da fase móvel [92]–[94].

A eletroforese é uma técnica muito utilizada na separação e análise de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. Contudo, ainda que menos explorada, esta metodologia pode ser aplicada para separar e analisar outras biomoléculas, como PS. Esta técnica baseia-se na migração diferencial de moléculas, tendo em conta a sua carga total e massa molar, através de um campo elétrico [77].

2.6. Doseamento de Compostos Bioativos

As microalgas, como referido anteriormente, são organismos produtores de diversos compostos biologicamente ativos, tornando-se fulcral o desenvolvimento de metodologias que permitam detetar e quantificar estas biomoléculas através de técnicas rápidas e fiáveis. Existem, atualmente, inúmeros métodos para a deteção destes compostos quer *in vivo*, quer *in vitro*, tais como métodos cromatográficos, imunoquímicos, enzimáticos, fluorimétricos e espectrofotométricos, nomeadamente métodos colorimétricos [95].

Os métodos colorimétricos são uma das abordagens mais utilizadas para quantificação de biomoléculas, uma vez que constituem uma alternativa simples, rápida, sensível e seletiva para o composto em estudo. Estes métodos permitem quantificar um determinado analito através da leitura da absorvância (ou transmitância), a um dado comprimento de onda de luz visível, resultante da interação entre o analito e um reagente adicionado à amostra em análise. Para o efeito, compara-se a absorvância da mistura reacional obtida para uma solução padrão e amostra, utilizando uma curva de calibração que permite a determinação da concentração do analito [59], [96].

De seguida, encontram-se descritos os métodos que foram utilizados durante o presente trabalho, adaptados para microplaca, de modo a rentabilizar os processos relativamente à quantidade de reagentes e amostras utilizadas e ao tempo necessário para a sua execução.

- **Método do Fenol-Ácido Sulfúrico:** as moléculas alvo deste método são hidratos de carbono (neutros e aniónicos), oligossacáridos, proteoglicanos, glicoproteínas e glicolípidos. O método baseia-se na desidratação de polissacáridos, na presença de ácido sulfúrico, gerando derivados de furfural que, por sua vez, reagem com o fenol para formar complexos de cor acastanhada que absorvem luz a 490 nm. A

técnica é simples e sensível, no entanto, para além de serem utilizados reagentes tóxicos, como o fenol (reagente colorimétrico), o método tem como principal limitação o facto dos polissacáridos catiónicos não reagirem com o ácido sulfúrico [97], [98];

- **Método do Corante Congo Red:** este método é específico para polissacáridos do tipo β -D-glucanos. O corante Congo red liga-se especificamente a β -1,3-D-glucanos cuja estrutura terciária se apresenta como conformação em tripla hélice, culminando num máximo de absorvância de 516 nm. O corante azo Congo red estabelece, através dos seus grupos amino, ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo dos β -glucanos e interage com a estrutura terciária dos mesmos por forças de Van der Waals [99];

- **Método do Azul de Toluidina:** esta técnica permite uma quantificação altamente específica de sPS, através da formação de um complexo com o corante catiónico azul de toluidina, e estabelece uma relação linear entre o decréscimo da absorvância a 632 nm e a concentração destes polissacáridos. O método é rápido e não requer a utilização de reagentes corrosivos [100];

- **Método do Carbazole-Ácido Sulfúrico:** as moléculas alvo deste método são os aPS, nomeadamente o ácido urónico. Inicialmente os polissacáridos sofrem desidratação e, em seguida, após adição do reagente carbazole e temperatura, surge o aparecimento de cor rosada/magenta. A metodologia mais utilizada está descrita para macroescala (tubos de ensaio), necessitando de elevado volume de reagentes. No entanto, o método é sensível e reproduzível. A leitura da absorvância é efetuada aos 525 nm [101], [102];

- **Método de Ligação do Azul de Coomassie:** este método, também designado por método de Bradford, permite quantificar proteínas através da formação de um complexo de cor azul, que se baseia na interação do corante azul brilhante de Coomassie G-250 com os grupos amino das proteínas (especialmente resíduos aminoácidos de arginina). O método é rápido, reproduzível, simples e preciso, sendo o mais utilizado universalmente para este efeito. A leitura da absorvância é realizada aos 595 nm [103], [104];

- **Método Sulfofosfovanilina (SPV):** as moléculas alvo deste método são os lípidos insaturados. A técnica baseia-se na formação inicial de iões carbónio (devido à reação entre os lípidos insaturados e o ácido sulfúrico), que em seguida reagem com os grupos carbonilo do reagente SPV, gerando um cromóforo rosado estabilizado por ressonância, com um máximo de absorvância a 530 nm. Este reagente resulta da reação entre a vanilina e o ácido *o*-fosfórico, formando um éster de fosfovanilina, cujos grupos carbonilo apresentam maior reatividade. O método é simples e o cromóforo formado apresenta elevada estabilidade. No entanto, é necessária a presença de

ligações duplas ou grupos hidroxilo livres para que ocorra a reação e a reatividade dos ácidos gordos polinsaturados diminui com o aumento da saturação. A escolha da solução padrão para execução da curva de calibração é fulcral para o sucesso do método [59], [73], [105];

- **Método do Folin-Ciocalteu:** este método é específico para polifenóis, sendo o reagente de Folin-Ciocalteu composto por fosfomolibdato e fosfotungstato. Esta técnica baseia-se na transferência de elétrões, em meio alcalino, entre a molécula alvo e uma espécie redutora para o molibdénio, formando um complexo de cor azul que apresenta um máximo de absorvância entre os 750 e os 765 nm. O método é simples e reprodutível. No entanto, o reagente é não específico para polifenóis, podendo ser reduzido por outras moléculas (aminas aromáticas, ácido ascórbico, Fe(II), entre outras) [106], [107];

- **Método do cloreto de alumínio:** este método colorimétrico tem como moléculas alvo os flavonoides. A técnica baseia-se na nitração de um anel aromático contendo um grupo catecol, com 3 ou 4 posições não substituídas ou estereoquimicamente livres. Com a adição do Al(III), forma-se um complexo amarelo em meio básico, sendo a leitura da absorvância efetuada a 510 nm. Esta metodologia não permite a quantificação de flavonoides totais. A presença de nitrato de sódio em meio básico pode tornar a reação específica para determinados tipos de flavonoides, como a catequina [108].

2.7. Atividade Antioxidante

Os compostos antioxidantes são fundamentais para a proteção do organismo pois são responsáveis por eliminar radicais livres, como ROS. Estes radicais provocam danos irreversíveis em moléculas como o DNA, proteínas e lípidos membranares, contribuindo para doenças como cancro, diabetes, Alzheimer, acidente vascular cerebral isquémico e doença arterial coronária. De forma a prevenir danos oxidativos, quer no organismo humano, quer em alimentos, as indústrias farmacêutica/alimentar têm incorporado nas suas formulações moléculas antioxidantes sintéticas ou de origem natural. Os antioxidantes sintéticos, para além de apresentarem menores custos, são eficazes e estáveis, mas têm demonstrado efeitos secundários decorrentes da sua ingestão a longo prazo, nomeadamente alergias, problemas gastrointestinais ou o aumento do risco do desenvolvimento de cancro. Uma possível solução para esta problemática é o recurso a moléculas naturais. Neste sentido, as microalgas mostraram ser uma fonte alternativa para a síntese de compostos com atividade antioxidante, como SPS, compostos fenólicos e pigmentos [5], [37], [109], [110].

Introdução

É possível dividir a análise da capacidade antioxidante em dois subtemas, de acordo com o mecanismo químico de atuação: espécies que envolvem a transferência de um único elétron (SET) e espécies que envolvem a transferência de um átomo de hidrogénio (HAT). Dentro das reações SET utilizam-se, habitualmente, para determinar a atividade antioxidante de inúmeras substâncias, os métodos dos radicais ABTS (2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico)), DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo), capacidade redutora de iões Fe^{3+} e capacidade quelante de Fe^{2+} [111].

Com objetivo de estudar *in vitro* a capacidade antioxidante dos compostos produzidos pela microalga *C. amblystomatis*, recorreu-se ao método do radical ABTS ou TEAC (Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox) que consiste na avaliação da capacidade que uma dada molécula tem de sequestrar o catião do radical ABTS ($ABTS^{+}$) ou por redução direta via doação de um elétron ou por transferência de um átomo de hidrogénio. A molécula de ABTS (incolor) é oxidada a $ABTS^{+}$ de coloração azul-verde, e quando o catião entra em contacto com uma substância passível de ser oxidada, este é reduzido, passando à sua forma incolor. O método encontra-se descrito para o formato de microplaca e apresenta os seguintes máximos de absorvância: 414, 645, 734 e 815 nm. A técnica é simples e passível de ser implementada numa larga gama de pH; o radical é solúvel não só em água, mas também em solventes orgânicos, permitindo a determinação da capacidade oxidante em amostras contendo compostos hidrofílicos ou lipofílicos. No entanto, existem algumas desvantagens, tais como o elevado tempo do ensaio, uma vez que a formação do radical ABTS demora entre 12 a 16 h, bem como o facto de qualquer composto cujo potencial redox seja inferior ao do catião reagir com o radical [107], [112]–[114].

2.8. Atividade Antibacteriana

As microalgas são produtoras de inúmeras moléculas que podem apresentar capacidade de modelar o microbioma com compostos anti- e pró-microbianos, com aplicações várias, nomeadamente no desenvolvimento de soluções aplicadas à saúde humana e animal, na conservação de alimentos, ou até na regeneração de solos agrícolas. A proliferação de alguns microrganismos, como bactérias e fungos, pode apresentar riscos para a saúde humana, o que leva à utilização de antibióticos sintéticos que são, regra geral, um produto caro e que pode ainda exibir efeitos secundários negativos. Outra desvantagem associada a estas moléculas sintéticas é o facto de cada vez mais os organismos patogénicos apresentarem resistência a tais compostos, tornando-os ineficazes [115].

Uma das metodologias mais utilizadas para a realização de ensaios de atividade antibacteriana é a técnica de difusão em discos de Kirby-Bauer. Esta metodologia permite a determinação da sensibilidade/resistência de patógenos face a compostos com atividade antibacteriana. O microrganismo patogénico é cultivado em agar Mueller-Hilton (MH) sendo, posteriormente, inseridos discos de papel de filtro no agar, impregnados com os extratos de concentração conhecida, de forma a avaliar a sua atividade antibacteriana. A presença/ausência de crescimento microbiano em redor dos discos permite, indiretamente, medir a capacidade antibacteriana dos extratos testados. A taxa de difusão dos agentes antibacterianos através do agar depende da sua solubilidade, mas também da sua massa molar [116].

Moléculas como EPS, carotenoides (luteína) ou ácidos gordos têm demonstrado capacidade antimicrobiana [37], [60]. Extratos da microalga verde de água doce *Chlorococcum humicola*, contendo compostos fenólicos e pigmentos, apresentaram atividade antibacteriana contra as espécies *Vibrio cholera*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* [5], [7]. Um estudo realizado por Sukhikh *et al.* [117] verificou que extratos purificados de lípidos e de hidratos de carbono de *C. vulgaris* apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2.9. Técnicas de Caracterização Estrutural: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Após purificação das biomoléculas de interesse é fundamental proceder à sua caracterização estrutural, uma vez que as suas estruturas e as suas atividades se encontram inevitavelmente relacionadas.

Algumas das técnicas mais utilizadas são a espectroscopia de infravermelho (IV), técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa (MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN) de protão (^1H) ou carbono-13 (^{13}C) [44], [118].

A espectroscopia de IV é uma técnica espectroscópica de absorção na qual a energia absorvida se encontra na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Este método vibracional baseia-se no facto das ligações químicas possuírem frequências de vibração específicas, que correspondem a níveis de energia da molécula, designados por níveis vibracionais. Um dos avanços tecnológicos mais importantes associados a

Introdução

este tipo de espectroscopia foi a introdução da técnica da transformada de Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR). As suas principais vantagens são o facto de ser uma técnica não destrutiva, aplicável a vários tipos de amostra, o processo de aquisição ser rápido e ser sensível mesmo com quantidades mínimas de amostra. Uma das principais desvantagens é a necessidade de se trabalhar em condições isentas de humidade e de CO₂, pois estes elementos podem afetar a qualidade do espetro, dificultando a sua interpretação.

Este método tem sido largamente aplicado na análise estrutural de polissacáridos, bem como de outras biomoléculas. Os espectros de IV de PS são geralmente complicados e difíceis de interpretar de forma direta. O espetro de FTIR apresenta zonas bem definidas correspondentes à absorção de grupos caraterísticos, o que permite simplificar o processo de interpretação e, simultaneamente, ser usado como um guia útil na identificação de hidratos de carbono. As principais regiões espectrais de polissacáridos são: a 3600-3000 cm⁻¹, região associada à vibração de extensão do grupo OH; a 3000-2500 cm⁻¹, região característica de vibrações de extensão simétrica/assimétrica de grupos CH e CH₂; a zona espectral 1800-1500 cm⁻¹, associada às vibrações de extensão das ligações duplas, nomeadamente dos grupos C=O e COO⁻; a região 1500-1200 cm⁻¹, referente a vibrações de deformação de grupos com simetria local CH₂ e deformações C-OH; a região de impressão digital (*fingerprint region*), a 1200-800 cm⁻¹, que corresponde à formação da ligação glicosídica nos polissacáridos (1175-1140 cm⁻¹) e à região anomérica (900-800 cm⁻¹); por fim, a zona espectral < 800 cm⁻¹ associada às vibrações do esqueleto carbonado e cuja análise resulta em informações limitadas para a elucidação da estrutura dos polissacáridos [119], [120].

Esta técnica permite também a identificação dos diferentes grupos substituintes existentes nas cadeias dos polissacáridos, dos quais são exemplos os grupos sulfonilo, acetilo, fosforilo, entre outros. No caso dos sPS, a identificação do grupo sulfonilo pode ser realizada através da presença de três bandas de absorção caraterísticas a 1270-1200 cm⁻¹ e 1060-1010 cm⁻¹, que correspondem às vibrações de extensão simétrica/assimétrica do grupo S=O, respetivamente, e a 900-800 cm⁻¹ correspondente à vibração de extensão da ligação C-O-S [120].

Muitas vezes o produto final pode conter proteínas, identificáveis graças à presença das vibração de extensão a 1700-1600 cm⁻¹ e 1600-1500 cm⁻¹ atribuídas às bandas da amida I e II, respetivamente [119].

Inúmeros compostos de valor acrescentado já se encontram identificados e, até, comercializados sendo, alguns deles, produzidos por microalgas. Segundo vários autores, as microalgas constituem uma alternativa sustentável passível de ser integrada na nossa dieta, sob a forma de aditivo alimentar ou alimento funcional.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram os seguintes: etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) 99,8%, propanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), ácido acético puro (CH_3COOH) e ácido *orto*-fosfórico 85% da Fisher Chemical. Dextrano de *Leuconostoc* spp. ($M_r \sim 100000$ g/mol), ácido sulfúrico 95-97% (H_2SO_4), ácido D-galacturónico ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$), albumina de soro bovino sem protease (BSA) e azul de toluidina ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{S}^+$) da Fluka. Ácido poligalacturónico ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$) da Alfa Aesar. Ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) da Acros Organics. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}$) da BDH. Solução comercial do corante de Bradford ($\text{C}_{47}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}^+$) da BioRad. 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), sulfato de dextrano ($M_r \sim 2000000$ g/mol), sulfato de dextrano ($M_r \sim 40000$ g/mol), heparina de mucosa intestinal suína ($M_r \sim 17000$ g/mol), catequina hidratada 98%, Congo Red 40%, Alcien Blue 8GX, β -(1,3)-D-glucano de Cevada a 95%, reagente Folin-Ciocalteu, Trolox 97%, acrilamida 99% ($\text{C}_3\text{H}_5\text{ON}$) e carbazole ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}$) da Sigma. Dextrano ($M_r \sim 70$ Da) da AppliChem. Resina DEAE-52 de troca iónica microgranular da Whatman. Sacarose da Mikrobiologie. Biscarilamida ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{ON}$), Titriplex III (EDTA) a 99%, ácido bórico (H_3BO_3), azul de bromofenol, persulfato de amónio ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), nitrato de prata (AgNO_3), nitrito de sódio (NaNO_2), tetraborato disódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), cloreto de alumínio (AlCl_3) da Merck. Vanilina 99% ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) da Thermo Fisher Scientific. Óleo de colza biológico da Vitaquell. Carbonato de sódio (Na_2CO_3) da Riedel-de-Haën. TRIS (tris-(hidroximetil-aminometano) da VWR.

Os restantes reagentes utilizados foram fornecidos pela Sigma e Merck, cuja pureza e qualidade foi selecionada de acordo com a aplicação. Tais reagentes não receberam qualquer tratamento prévio à sua utilização.

3.2. Material biológico

O microrganismo utilizado foi a microalga verde *Chlorococcum amblystomatis* proveniente da Algoteca da UID da Allmicroalgae.

Foram ainda utilizadas duas espécies de bactérias, nomeadamente a *Escherichia coli* ATCC25922 (Gram negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Gram positiva) para realização dos ensaios da atividade antibacteriana.

3.3. Métodos

3.3.1. Cultivo e Manutenção da Cultura

A produção à escala laboratorial de *C. amblystomatis* em condições autotróficas e heterotróficas, bem como o respetivo acompanhamento, foram efetuados nas instalações da UID da Allmicroalgae, conforme descrito anteriormente. O ensaio em autotrofia foi realizado em dois reatores diferentes (reator de coluna de bolhas e frascos) tendo sido, em cada reator, testada a indução de *stress* sob a forma de privação de nitratos. Todos os ensaios, auto e heterotróficos, foram realizados em triplicado.

Começou-se por preparar um balão de pré-inóculo com meio MNS (meio da empresa Allmicroalgae) e uma concentração celular inicial de 0,362 g/L (peso seco). O pH foi mantido entre 6 e 7 durante o tempo de cultivo, tendo sido utilizada esta cultura como pré-inóculo para os ensaios realizados em condições autotróficas. O crescimento da biomassa foi acompanhado através de análises diárias de densidade ótica a 600 nm, concentração de nitratos e pH.

O ensaio autotrófico em reatores de coluna de bolhas (**AT_C**) consistiu na inoculação 2 balões com pré-inóculo: um com uma concentração final de 10 mM de NO_3^- (**AT_C1**, condição de controlo) e outro a 4 mM de NO_3^- (**AT_C2**, condição de *stress*), e meio de cultura BBM (*Bold's Basal Medium*) previamente preparado, até se perfazer um volume total de 3 L. Cada balão foi utilizado para a inoculação de 3 reatores de coluna de bolhas de 1 L (**AT_C1** e **AT_C2**), suplementados com ferro e nitrato de sódio e com uma concentração celular inicial de ca. 0,448 g/L. O ensaio foi terminado quando as culturas atingiram a fase estacionária da curva de crescimento microbiano. A condição de *stress* **AT_C2** foi mantida à concentração de, aproximadamente, 4 mM de NO_3^- até atingir o início da fase estacionária de crescimento (13º dia), a partir do qual a cultura foi privada deste nutriente. A injeção de CO_2 foi ajustada mediante o pH apresentado pelas culturas. As restantes condições de cultivo encontram-se enunciadas na Tabela 2.

Para a realização do ensaio autotrófico em frascos (**AT_F**), procedeu-se de forma semelhante ao descrito para o ensaio **AT_C**, mas sem suplementação do meio de cultura com ferro e nitrato de sódio. Analogamente, foram inoculados 3 frascos de 1 L para cada condição (**AT_F1** – 10 mM de NO_3^- , condição de controlo; **AT_F2** – 4 mM de NO_3^- , condição de *stress*), com uma concentração celular inicial de ca. 0,430 g/L. A manutenção/controlo da cultura celular foi realizada de forma idêntica ao ensaio **AT_C**. O ensaio foi terminado quando as culturas atingiram a fase estacionária da curva de crescimento. À semelhança da condição de *stress* **AT_C2**, a condição **AT_F2** foi

mantida a uma concentração de, aproximadamente, 4 mM de NO_3^- até atingir o início da fase estacionária da curva de crescimento.

Relativamente ao ensaio em condições heterotróficas (**HTN**) foram inoculados 3 *Erlenmeyer* com 20 g/L de glucose, 40 mM de NaNO_3 e meio BBM concentrado (10x) até se perfazer um volume total de 150 mL, com uma concentração celular inicial de ca. 0,135 g/L. As culturas foram mantidas em agitação e temperatura ambiente constante, como indicado na Tabela 2. Por fim, foram analisadas culturas heterotróficas, fornecidas pela empresa, cultivadas em condições semelhantes ao ensaio **HTN**, mas na presença de amónia como fonte de nitrogénio (**HTA**) e na presença de ureia como fonte de nitrogénio (**HTU**).

Tabela 2 – Condições de cultivo de *C. amblystomatis*.

	Ensaio				
	AT_C		AT_F		HTN
	1	2	1	2	
Intensidade luminosa (lux)	1700		800		-
Fotoperíodo (luz:escuro)	12:12 h		24:0 h		-
Arejamento	65-80 mL/min		1000 mL/min		150 rpm
Meio de cultura	BBM modificado ¹		BBM		BBM 10x concentrado
T (°C)	20-21				28
pH	6-7				5-6

¹ Meio suplementado com ferro e nitrato de sódio.

O controlo da evolução do crescimento das culturas de *C. amblystomatis* nos diferentes ensaios foi efetuado através de análises diárias, que consistiram em medições da densidade ótica a 600 nm, do pH e do teor de NO_3^- . Os ensaios em condições autotróficas foram acompanhados de 2 em 2 dias, enquanto o ensaio em heterotrofia foi acompanhado entre 1 a 2 vezes por dia.

Na Figura 12 encontram-se esquematizadas as condições de cultura da microalga em estudo realizadas no decorrer do estágio na UID da empresa Allmicroalgae.

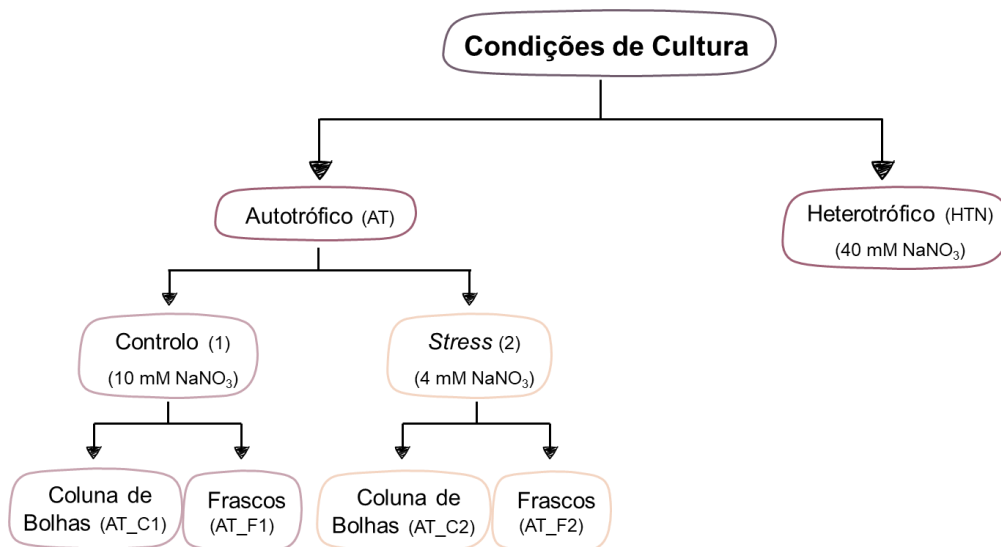


Figura 12 – Condições de cultura da microalga *Chlorococcum amblyostomatis* estudadas.

Após o término dos ensaios, efetuou-se a separação do meio de cultura da biomassa por centrifugação a 3500 rpm durante 5 minutos, a 4 °C, tendo sido armazenados a -4°C. As amostras biológicas resultantes encontram-se na tabela seguinte.

Tabela 3 – Amostras resultantes do estágio na Allmicroalgae.

Ensaio	Biomassa	Meio de cultura (sobrenadante)
AT_C1	X	X
AT_F2		
HTN		
HTA		-
HTU		

A biomassa e o respetivo meio de cultura produzidos durante o estágio, bem como a biomassa fornecida pela Allmicroalgae, foi sujeita a várias etapas de processamento, conforme esquematizado na Figura 13.

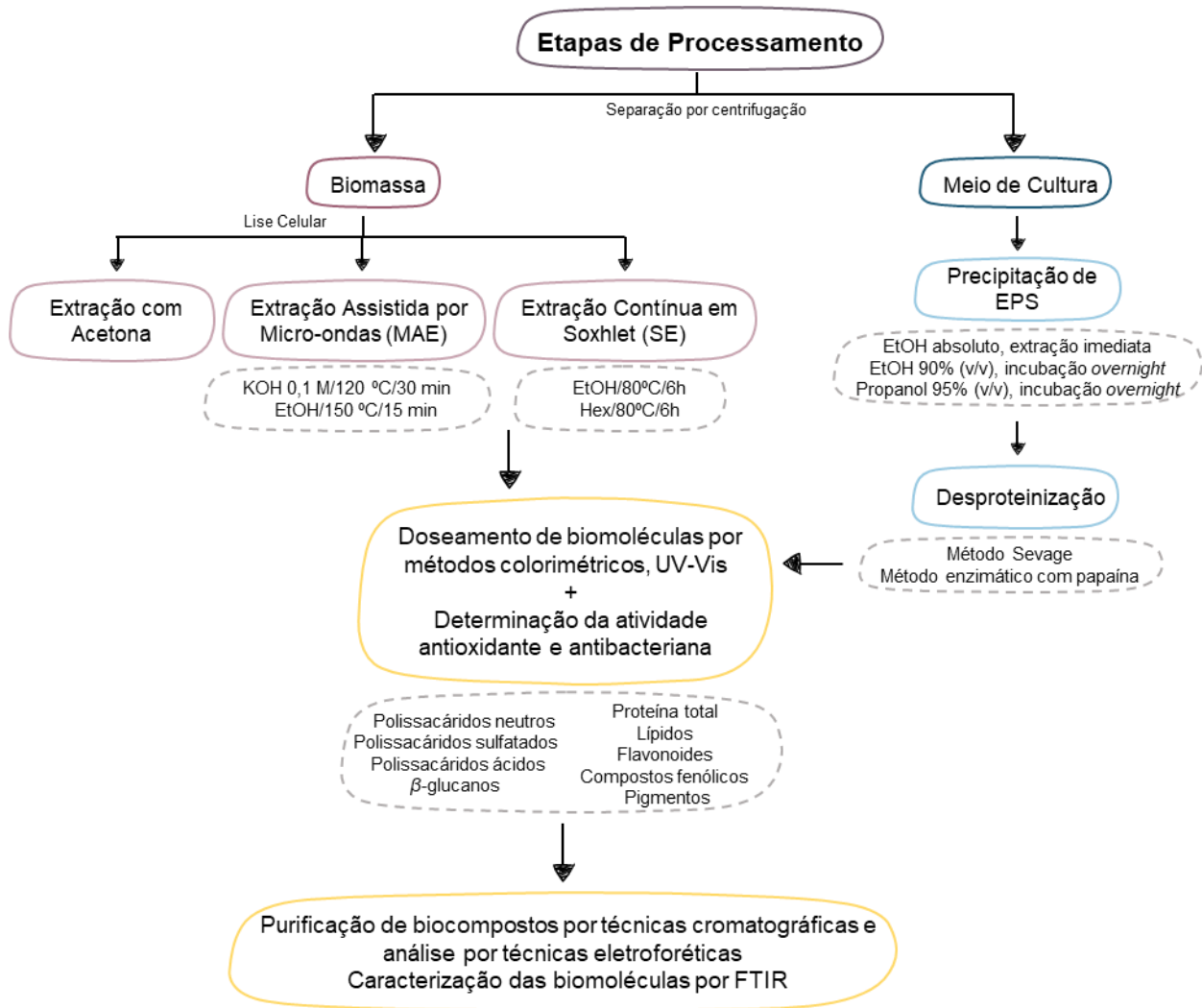


Figura 13 – Etapas de processamento da biomassa e do meio de cultura obtidos a partir das culturas de *C. amblystomatis*.

3.3.2. Extração de Biocompostos Intracelulares

A fim de proceder à extração de compostos intracelulares, nomeadamente de polissacáridos, liofilizou-se a biomassa no equipamento UNICRYO MC 2L.

3.3.2.1. Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)

A extração realizada por MAE tem por base o método descrito por Yuan e Macquarrie [121], com algumas modificações. Foram utilizados dois reatores de micro-ondas monomodo (CEM, Discover e Anton Paar, Monowave 300) para a realização dos ensaios.

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar, de forma a avaliar as condições de extração que conduziam à extração de um conteúdo mais elevado de nPS, utilizando

biomassa de *C. amblystomatis* obtida em crescimento autotrófico com meio MNS. As condições de extração foram selecionadas com base nos resultados obtidos por Hussien [57] e Gil [86], com uma razão biomassa:solvente de 1:10. Na tabela abaixo (Tabela 4) encontram-se descritos os parâmetros utilizados na extração.

Tabela 4 – Parâmetros de MAE dos ensaios preliminares realizados com a cultura fornecida pela Allmicroalgae (condições autotróficas com meio de cultura MNS).

Ensaio	Solvente	Temperatura de Extração (°C)	Tempo de irradiação (min)
MAE_EtOH	Etanol absoluto	150	15
MAE_KOH	KOH 0,1 M	120	30

Após selecionada a melhor condição de extração (**MAE_KOH**), foi testada a extração de biomoléculas a partir de biomassa: não liofilizada, com incubação *overnight* no solvente de extração (**M_ON**); liofilizada, com incubação *overnight* no solvente de extração (**S_ON**); liofilizada, extração imediata (**S_i**). As condições de extração que permitiram obter conteúdos mais elevados em PS foram então aplicadas aos restantes ensaios. A razão biomassa:solvente utilizada foi de 1:10 e, após a extração, os extratos foram centrifugados a 13500 rpm durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Os extratos obtidos após extração foram denominados pelo nome que caracteriza cada condição de cultivo (**AT_C1/AT_C2/AT_F1/AT_F2/HTN/HTA/HTU**).

3.3.2.2. Extração Contínua em Soxhlet (SE)

A extração contínua em Soxhlet baseou-se no procedimento descrito por Silva, Magalhães, Moreira, Rocha e Bastos [122] com algumas modificações. Este método de extração foi aplicado à biomassa obtida no ensaio autotrófico **AT_C1**, tendo sido testados dois solventes de extração, etanol absoluto e *n*-hexano, durante 6h, a 80 °C e uma razão biomassa solvente de 1:77. Foram obtidas 2 frações, uma para cada solvente, tendo-lhes sido retirado 1 mL de extrato. Os extratos obtidos foram secos a 100 °C numa estufa, e identificados como **SE_EtOH_C1** e **SE_Hex_C1**. Posteriormente repetiu-se este procedimento para o ensaio **AT_C2**, mantendo-se os parâmetros de extração e razão biomassa:solvente. Os extratos obtidos foram igualmente denominados por **SE_EtOH_C2** e **SE_Hex_C2**. Na Figura 14 encontra-se a montagem realizada para estas extrações.



Figura 14 – Montagem da extração contínua em Soxhlet.

3.3.2.3. Extração de Pigmentos

A extração de pigmentos fotossintéticos baseou-se no procedimento descrito por Correia *et al.* [31] e foi aplicada à biomassa proveniente dos ensaios **AT_C** e **AT_F**. A biomassa liofilizada foi macerada com acetona pura, numa razão biomassa:solvente de 1:6 durante 5 minutos. Após extração, centrifugou-se a 13,5 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente. O *pellet*, ainda com coloração verde intensa, foi incubado no solvente de extração *overnight*. Centrifugou-se novamente a solução e reservou-se o sobrenadante. Por fim, foram realizadas leituras de absorvância nos comprimentos de onda 470, 643, 648, 661 e 664 nm num espectrofotómetro (UV-3100PC VWR). Os extratos provenientes desta extração foram denominados por **Ac_AT_C** e **Ac_AT_F**.

3.3.3. Extração de Polissacáridos Extracelulares

3.3.3.1. Precipitação com Álcoois

Os compostos extracelulares, nomeadamente os EPS, foram isolados do restante meio de cultura através do método convencional de precipitação com álcoois [80]. Neste sentido, foram realizados ensaios com o objetivo de determinar o melhor solvente e respetivas condições de precipitação. As amostras utilizadas foram os sobrenadantes provenientes do ensaio autotrófico **AT_C**. Na tabela abaixo encontram-se indicadas todas as condições estudadas.

Tabela 5 – Precipitações alcoólicas de EPS e respetivas condições.

Ensaio	Solvente	Volumes de solvente	Incubação
Eti_AT_C1	Etanol 90%	3 vol	Sem incubação
Eti_AT_C2			
EtON_AT_C1	Etanol 96%	2 vol	<i>Overnight</i> – 4 °C
EtON_AT_C2			
PON_AT_C1	Propanol 95%		
PON_AT_C2			

Concluídas as precipitações, as soluções foram centrifugadas a 5000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Os precipitados foram recolhidos e secos a 50 °C numa estufa. Em seguida, os EPS foram dissolvidos num volume mínimo de NaOH 1 M, a 80 °C com agitação, durante o tempo necessário até que cada amostra estivesse solubilizada.

Por fim, com base nos resultados obtidos, selecionou-se e aplicou-se as condições de precipitação selecionadas aos sobrenadantes das amostras **AT_F1**, **AT_F2**, **HTN**, **HTA** e **HTU**, segundo o respetivo protocolo acima descrito.

3.3.3.2. Desproteínização

Foram utilizados dois métodos de desproteínização distintos: o método enzimático, com papaína, e o método Sevage, de forma a eliminar impurezas, como proteínas, precipitadas após precipitação alcoólica [81].

O método enzimático foi iniciado com a hidrólise de 3 mL de EPS dissolvidos em NaOH 1 M com papaína (em tampão pH 7). Em seguida, incubou-se a mistura a 50 °C durante 6h, com agitação. Deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e reservou-se durante 24h a 4 °C. Posteriormente, centrifugou-se a mistura durante 5 minutos a 13500 rpm à temperatura ambiente, e descartou-se a fase orgânica. Lavou-se a fase aquosa com etanol absoluto e éter dietílico; após cada lavagem, a amostra foi centrifugada, tendo sido descartada a fase orgânica. Por fim, secou-se a fase aquosa a baixa temperatura (~50 °C).

A aplicação do método Sevage consistiu na adição de 3 volumes de uma mistura 4:1 de clorofórmio:*n*-butanol a EPS dissolvidos em NaOH 1 M. Em seguida, agitou-se a mistura vigorosamente e deixou-se repousar por 40 minutos para separação de fases,

e descartou-se a fase orgânica. Este procedimento foi repetido uma vez. Em seguida, adicionaram-se 3 volumes de etanol a 90%. Centrifugou-se a mistura durante 5 minutos a 13500 rpm, à temperatura ambiente e descartou-se a fase orgânica. Por fim, procedeu-se à lavagem da fase aquosa tal qual descrito anteriormente.

Os EPS secos, resultantes de cada método de desproteinização, foram dissolvidos em NaOH 0,1 M, a 80 °C com agitação, num volume mínimo até dissolução total. As amostras resultantes dos 3 tipos de precipitações descritas em 3.3.3.1. (*vide* Tabela 5) foram sujeitas a ambos os métodos de desproteinização, bem como os respetivos sobrenadantes sem qualquer tratamento. As amostras resultantes do método de desproteinização enzimático foram identificadas com a letra **E** e, as amostras resultantes do método Seavage, identificadas com a letra **S**.

3.3.4. Doseamento de Biomoléculas

3.3.4.1. Método do Fenol-Ácido Sulfúrico

A fim de quantificar polissacáridos neutros, utilizou-se o método do Fenol-Ácido Sulfúrico, descrito por Masuko *et al.* [97].

Numa microplaca de 96 poços foram adicionados 50 µL de amostra, 150 µL de ácido sulfúrico e 30 µL de uma solução aquosa de fenol 5% (m/V). Em seguida, incubou-se a mistura reacional num banho a 90 °C durante 5 minutos e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Por fim, procedeu-se à leitura da absorvância num leitor de microplacas (BioRad 680) a 490 nm.

O padrão utilizado foi o ácido poligalacturónico, preparado em tampão citratos de sódio 0,05 M (pH 4,5) numa gama de concentrações de 0 a 10 mg/mL. Todos os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio em branco foi realizado com água. Os resultados obtidos foram expressos em mg/g de biomassa.

3.3.4.2. Método do Corante Congo Red

O método do Congo Red, descrito por Semedo, Karmali e Fonseca [99], foi utilizado para a quantificação de β -(1,3)-D-glucanos de tripla hélice.

Numa microplaca com 96 poços adicionou-se 140 µL de amostra e 140 µL de corante Congo red 0,017% (m/V) em tampão fosfatos salino (PBS) 0,15 mM pH 7,2. Em seguida, leu-se a absorvância da mistura reacional num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec) a 510 nm.

O padrão utilizado foi o β -(1,3)-D-glucano de cevada, cuja concentração variou entre 0 a 50 mg/mL, dissolvido numa solução aquosa de NaOH 1M e posteriormente neutralizada. Os doseamentos foram realizados em triplicado, tendo sido efetuados 3 tipos de ensaio em branco: água destilada com o corante, água destilada com o tampão PBS e a amostra com o tampão PBS. Os resultados obtidos foram expressos em mg/g de biomassa.

3.3.4.3. Método do Azul de Toluidina

O método do Azul de Toluidina permite a quantificação de polissacáridos sulfatados e encontra-se descrito por Hahn *et al.* [100] e modificado por Hussien [57].

Foram colocados, numa microplaca de 96 poços, 50 μ L de amostra e 250 μ L de azul de toluidina 0,05 mg/mL, preparado em PBS 1,5 mM. Em seguida, deixou-se a mistura reacional em repouso, no escuro, durante 5 minutos. Por fim, leu-se a absorvância num leitor de microplacas (Bio-Rad 680) a 655 nm.

O padrão utilizado foi sulfato de dextrano Mr~200000 Da numa gama de 0 a 0,125 mg/mL. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o branco foi realizado com água. Os resultados obtidos foram expressos em mg/g biomassa.

3.3.4.4. Método do Carbazole-Ácido Sulfúrico

Este método permite a quantificação de polissacáridos ácidos. O procedimento seguido baseou-se no descrito por Cesaretti, Luppi, Maccari e Volpi [101], Bustamante, Valencia, Giraldo, Tirado e Mejía [123] e Taylor [124].

Em tubos de ensaio colocaram-se 40 μ L de amostra, 400 μ L de água desionizada, 2 mL de tetraborato de sódio 0,95 g/L H₂SO₄ e 40 μ L carbazole 0,2% (m/V) em etanol. Em seguida, incubaram-se os tubos num banho a 90 °C durante 12 min, previamente agitados. Posteriormente, os tubos foram novamente agitados e arrefecidos até à temperatura ambiente. Por fim, colocaram-se 300 μ L da mistura reacional numa microplaca de 96 poços e leu-se a absorvância num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec) a 528 nm. Os doseamentos foram realizados em triplicado e os ensaios em branco com água.

Como padrão utilizou-se ácido D-galacturónico, numa gama de concentrações de 0 a 2,5 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg/g biomassa.

3.3.4.5. Método de Ligação do Azul de Coomassie

A quantificação da proteína total foi feita através do método de ligação do azul de Coomassie ou método de Bradford [103].

Numa microplaca de 96 poços colocaram-se 100 μ L de amostra e 100 μ L de solução comercial do corante Bradford. Após 10 minutos, leu-se a absorvância num leitor de microplacas (Bio-Rad 680) a 655 nm. Os ensaios em branco foram realizados com água. Os doseamentos foram realizados em triplicado e os resultados expressos em mg/g biomassa.

Como padrão foi utilizado Albumina de Soro Bovino (BSA) numa gama de concentrações de 0 a 0,025 mg/mL. Os resultados foram determinados em mg/g biomassa.

3.3.4.6. Método do Folin-Ciocalteu

Com o objetivo de quantificar os compostos fenólicos totais, utilizou-se o método do Folin-Ciocalteu descrito por Reis, Martins, Barros e Ferreira [125], com algumas modificações.

Numa microplaca de 96 poços colocaram-se 30 μ L de amostra, 150 μ L do reagente Folin-Ciocalteu, diluído de 1:10 (V/V) em água, e 120 μ L de uma solução de Na_2CO_3 a 75 g/L. De seguida, incubou-se a mistura reacional durante 30 min num banho a 40 °C. Por fim, leu-se a absorvância a 655 nm num leitor de microplacas (Bio-Rad 680). Os doseamentos foram realizados em triplicado e os ensaios em branco foram realizados com água.

Utilizou-se como padrão ácido gálico numa gama de concentração de 0 a 0,25 mg/mL. Os teores obtidos foram expressos em mg/g de biomassa.

3.3.4.7. Método do Cloreto de Alumínio

A determinação da concentração de flavonoides totais foi realizada tendo por base o método do cloreto de alumínio com algumas modificações [126].

Colocaram-se, numa microplaca de 96 poços, 25 μ L de amostra, 100 μ L de água desionizada e 7,5 μ L de NaNO_2 5% (m/V). Deixou-se a mistura reacional em repouso por 5 minutos e, de seguida, adicionaram-se 100 μ L de AlCl_3 10% (m/V). Deixou-se repousar por 10 minutos e, por fim, leu-se a absorvância a 510 nm num leitor de

microplacas (FLUOstar OPTIMA - BMG Labtec). Os doseamentos foram realizados em triplicado e os brancos efetuados com água.

O padrão utilizado foi a catequina, preparada em etanol a 50% (V/V), numa gama de 0 a 1 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg/g de amostra.

3.3.4.8. Método do Sulfofosfovanilina (SPV)

A quantificação do teor de lípidos foi realizada com recurso ao método colorimétrico SPV, descrito por Anschau, Caruso, Kunh e Franco [127], com alterações.

Inicialmente, colocaram-se 20 µL de amostra em tubos e incubou-se a 90 °C, durante 10 minutos, para evaporação do solvente. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, adicionaram-se 180 µL de H₂SO₄ concentrado e incubou-se a 100 °C durante 10 minutos; deixou-se arrefecer novamente até à temperatura ambiente. Em seguida, juntaram-se 500 µL do reagente PV (0,0012% (m/V) de vanilina numa solução de ácido o-fosfórico a 70,83% (V/V) e incubou-se durante 30 minutos a 37 °C. Por fim, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e colocaram-se 150 µL de cada tubo numa microplaca de 96 poços. A microplaca foi incubada durante 45 minutos no escuro, procedendo-se, de seguida, à leitura da absorvância num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec) a 528 nm.

Foi utilizado óleo de canola como padrão, numa gama de 0 a 2,5 mg/mL, e os ensaios em branco foram realizados com etanol absoluto. Os resultados foram expressos em mg/g biomassa.

3.3.4.9. Método de Quantificação de Pigmentos

A concentração de pigmentos, nomeadamente clorofilas *a* e *b* e a concentração total de carotenoides foram determinadas através da leitura da absorvância a diversos comprimentos de onda (Espectrofotómetro UV-Vis, TURNER 390) e das equações em seguida descritas. A escolha das equações variou consoante o solvente de extração, tendo sido usadas, para extratos em etanol absoluto, as expressões [1] a [4]; para extratos em acetona pura as expressões [5] a [8]; e, como aproximação a extratos aquosos, as equações [9] a [12], determinadas para extratos em éter dietílico saturado em água. As expressões anteriormente mencionadas encontram-se abaixo indicadas [128]:

- Extratos em etanol absoluto;

$$C_a = 13,36\text{Abs}_{664,2} - 5,19\text{Abs}_{648,6} \quad (1)$$

$$C_b = 27,43\text{Abs}_{648,6} - 8,12\text{Abs}_{664,2} \quad (2)$$

$$C_{a+b} = 5,24\text{Abs}_{664,2} + 22,24\text{Abs}_{648,6} \quad (3)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000\text{Abs}_{470} - 2,13C_a - 97,64C_b}{209} \quad (4)$$

- Extratos em acetona pura:

$$C_a = 11,24\text{Abs}_{661,6} - 2,04\text{Abs}_{644,8} \quad (5)$$

$$C_b = 20,13\text{Abs}_{644,8} - 4,19\text{Abs}_{661,6} \quad (6)$$

$$C_{a+b} = 7,05\text{Abs}_{661,6} + 18,09\text{Abs}_{644,8} \quad (7)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000\text{Abs}_{470} - 1,90C_a - 63,14C_b}{214} \quad (8)$$

- Extratos aquosos:

$$C_a = 10,36\text{Abs}_{661,6} - 1,28\text{Abs}_{644,2} \quad (9)$$

$$C_b = 17,49\text{Abs}_{643,2} - 2,72\text{Abs}_{661,6} \quad (10)$$

$$C_{a+b} = 7,64\text{Abs}_{661,6} + 16,21\text{Abs}_{643,2} \quad (11)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000\text{Abs}_{470} - 1,38C_a - 48,05C_b}{211} \quad (12)$$

onde, C_a e C_b representam a concentração de clorofila *a* e *b* respetivamente, C_{a+b} a concentração total de clorofila e C_{x+c} a concentração total de carotenoides. Os resultados obtidos foram expressos em mg/g de biomassa.

3.3.5. Fracionamento de Biomoléculas por Cromatografia de Troca Iónica

Para a etapa de fracionamento de PS foram selecionados os extratos de MAE **AT_F1** e **AT_C2**. A técnica utilizada encontra-se descrita por Hussen [57] e Liu *et al.* [129], com algumas modificações.

Inicialmente, preparou-se a resina aniónica DEAE-52, da Whatman, tendo sido colocada em agitação *overnight* com 2 volumes de água ultrapura. Após verificação do pH a 6,3, empacotou-se a resina numa coluna cromatográfica (1,5 x 10 cm), a qual foi

equilibrada com água ultrapura a um caudal de 20 mL/h com recurso a uma bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3). Aplicou-se um volume de 1,5 mL de extrato **AT_F1** (30 mg nPS) e de extrato **AT_C2** (132 mg nPS) à coluna, tendo sido recolhidas frações cromatográficas de 1,5 mL ao caudal definido. A eluição foi efetuada com um gradiente de NaCl. As condições de cada cromatografia estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições do fracionamento por cromatografia de troca iónica, dos extratos **AT_F1** e **AT_C2** obtidos por MAE.

Extrato	Gradiente de concentração de NaCl (M)	Caudal (mL/h)
AT_F1	0-2	18
AT_C2	0-1; 1; 2	20

As frações recolhidas foram sujeitas a diversos doseamentos, a fim de quantificar biomoléculas como polissacáridos, proteína total e compostos fenólicos. Posteriormente, as frações contendo maior conteúdo em polissacáridos neutros foram reunidas num *Pool*, tendo sido denominadas por **Pool_AT_F1** e **Pool_AT_C2**.

3.3.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Com o objetivo de analisar os polissacáridos presentes no extrato **MAE_AT_F1** e nas respetivas frações cromatográficas (F4, F6, F7, F8 e *Pool_AT_F1*), foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida (PAGE) a 6% em tampão Tris-Borato (TBE) 100 mM, 1 mM EDTA a pH 8,3. Para tal foram utilizados diferentes padrões, nomeadamente dextrano Mr ~ 70000 Da, dextrano Mr ~100000 Da, sulfato de dextrano Mr ~ 40000 Da e heparina de mucosa intestinal suína Mr ~17000 Da (Tabela 7). As amostras alvo desta técnica foram o extrato **MAE_AT_F1** (799,4 µg/poço) e as respetivas frações provenientes da cromatografia de troca iónica: F4 (74,4 µg/poço), F6 (105,4 µg/poço), F7 (45 µg/poço), F8 (35,2 µg/poço) e o **Pool_AT_F1** (75 µg/poço). Estas amostras foram misturadas com sacarose 2M numa proporção de 1:4. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 100 V durante 45 minutos, à temperatura ambiente, utilizando tampão TBE pré-arrefecido a 4°C.

As colorações dos géis foram realizadas recorrendo a três métodos distintos: o método de coloração com azul de toluidina 0,1% (m/V) em ácido acético 1% (V/V); o

método do corante *stains all* 0,5% (m/V) em etanol 50% (V/V); e a combinação do método corante Azul de Alciano 0,125% (m/V) numa solução de etanol 25% (V/V) e ácido acético 10% (V/V), seguido do método de coloração do nitrato de prata, adaptados [130]–[132]. Na Tabela 7 estão apresentadas as massas dos padrões aplicada nos poços, em cada método.

Tabela 7 – Métodos de coloração e massas de padrões aplicadas em PAGE.

Gel	Coloração	Massa (μg)	
		Dextrano 70 e 100 Da	Sulfato de dextrano e heparina
1	a) Azul de Toluidina 0,1% (m/V)	20	20
2	<i>Stains all</i> 0,5% (m/V)	40	10
3	Azul de Alciano 0,125% (m/V)/ Nitrato de Prata 0,4% (m/V)	80	

3.3.7. Determinação da Atividade Antioxidante

De forma a avaliar a capacidade antioxidante total dos diversos extratos obtidos, recorreu-se ao método do radical ABTS [113], [133].

Inicialmente, preparou-se uma solução *stock* de ABTS 7 mM, contendo $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ 2,5 mM em água, que foi guardada no escuro durante 16h, à temperatura ambiente. Posteriormente, esta solução foi diluída em PBS de modo que a absorvância, ao comprimento de onda de 655 nm, se aproximasse da unidade. A solução resultante foi designada por solução *stock* de ABTS^{*+} .

Posteriormente, numa microplaca de 96 poços, adicionou-se 10 μL de amostra a 290 μL da solução de ABTS^{*+} e registou-se a absorvância a 655 nm, num leitor de microplacas (Bio-Rad 680). Os doseamentos foram realizados em triplicado e os ensaios em branco foram efetuados com água.

Foi utilizado como padrão o Trolox, preparado em metanol 80% (V/V), numa gama de 0 a 0,0067 mg/mL. Os resultados obtidos foram expressos em mg TEAC/g de biomassa.

3.3.8. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana contra as espécies *Echerichia coli* ATCC25922 (Gram negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Gram positiva) efetuou-se segundo a técnica de difusão em disco [116], [134].

Os meios de cultura MHA (*Muller-Hinton Agar*) e MHB (*Muller-Hinton Broth*) foram esterilizados a 121 °C, durante 15 minutos, em autoclave (Uniclave 99). Em seguida, verteu-se o meio de cultura MHA em placas de Petri, previamente esterilizadas, e deixou-se em repouso à temperatura ambiente.

Preparou-se um pré-inóculo no meio líquido MHB, no qual foram suspensas 2-3 colónias, em assepsia. O pré-inóculo foi incubado a 37 °C e 180 rpm, *overnight*. Leu-se a absorvância, a 625 nm, de uma alíquota de suspensão celular, tendo sido ajustada a turbidez da suspensão ao padrão 0,5 de McFarland em soro fisiológico (NaCl 0,85 % (m/V)). Posteriormente procedeu-se à inoculação no meio MHA, recorrendo à técnica de riscado, 3 vezes em amplitudes de 60°.

Por fim, aplicou-se numa placa de Petri os discos (9 mm de diâmetro) embebidos com 10 µL de: controlo positivo com antibiótico (10 mg/mL de gentamicina), controlo negativo com água esterilizada e a fração cromatográfica F8 proveniente da purificação do extrato **MAE_AT_F1** (1,76 mg/mL). Após incubação *overnight* a 37 °C, procedeu-se à medição dos diâmetros das zonas de inibição de crescimento celular em torno de cada disco.

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

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada na caracterização parcial da estrutura dos polissacáridos intra e extracelulares alvo de purificação. Adicionalmente, procedeu-se à caracterização dos extratos de MAE e SE, bem como à análise estrutural da composição da biomassa de *C. amblystomatis* antes da aplicação dos métodos de extração. Foi utilizado um espectrofotómetro Bruker Vertex 70, com *software* OPUS 5.5. Os varrimentos foram efetuados em modo de transmitância com uma resolução de 2 cm⁻¹, em pastilhas de KBr, numa gama entre os 500 e os 4000 cm⁻¹. Todas as amostras sujeitas a FTIR foram previamente liofilizadas (UNICRYO MC2L) e secas em linha de vácuo durante 6h a 25°C.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Crescimento e Manutenção da Cultura de *C. amblystomatis*

A microalga *C. amblystomatis* foi cultivada em condições auto e heterotróficas e a manutenção das culturas celulares foi efetuada com recurso a análises diárias de densidade ótica, concentração de nitratos, pH e temperatura. Na Figura 15, a título de exemplo, encontra-se uma observação ao microscópio ótico da espécie em estudo em condições autotróficas (AT_C1). Nas figuras subsequentes apresentam-se os biorreatores utilizados em cada ensaio e as respetivas curvas de crescimento da *C. amblystomatis*, resultantes da média aritmética dos triplicados de peso seco da biomassa, com a respetiva barra de erro associado (Figuras 16, 17 e 18).

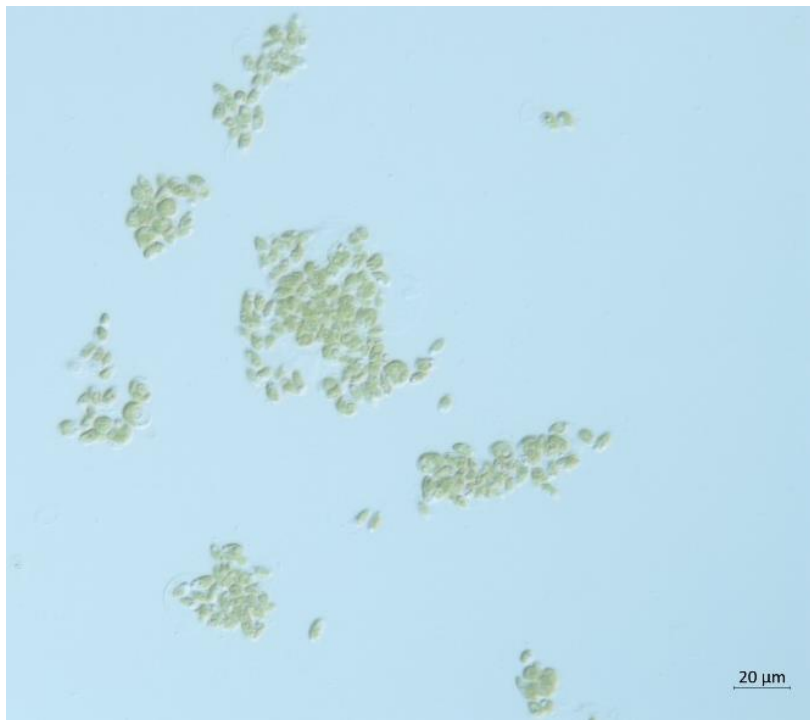


Figura 15 – Observação ao microscópio ótico de *C. amblystomatis* (400x).

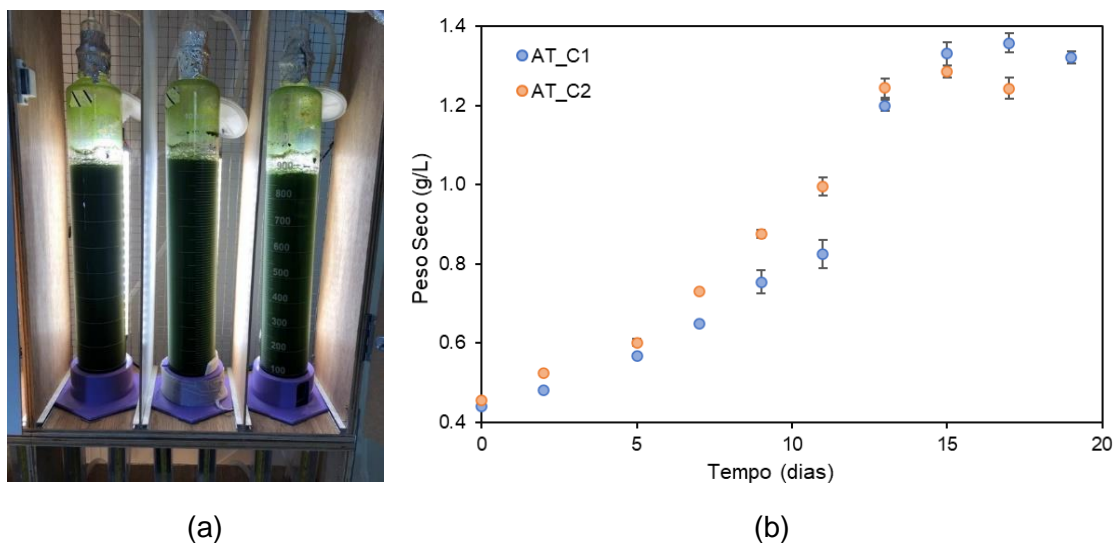


Figura 16 – Cultura de *C. amblyostomatis* em condições autotróficas em reator de coluna de bolhas (**AT_C1** e **AT_C2**) (a) e respectivas curvas de crescimento (b). Cada condição foi realizada em triplicado.

Pela Figura 16-(b) é possível identificar as seguintes fases de crescimento celular: fase de latência, desde o dia da inoculação até ao 5^o dia; fase exponencial, do 5^o ao 13^o dia em **AT_C2**/15^o dia em **AT_C1**, a partir dos quais se inicia a fase estacionária. As culturas apresentaram, ao longo de todo o ensaio, cor verde intensa, à exceção do ensaio **AT_C2** que, durante a fase estacionária, apresentou uma coloração ligeira, mas quase impercetível, tonalidade acastanhada. Até ao 13^o dia, a condição de *stress* **AT_C2** apresentou um crescimento superior ao da condição de controlo **AT_C1**. No entanto verificou-se que, no início da fase estacionária, a condição de controlo atingiu uma concentração celular ($1,32 \pm 0,02$ g/L) ligeiramente superior à condição de *stress* ($1,24 \pm 0,03$ g/L), como seria expectável. A partir do 13^o dia, não foi efetuada a reposição de NO_3^- na condição **AT_C2**, o que levou ao esgotamento deste nutriente no meio de cultura e, conseqüentemente, à privação do mesmo. Correia [35] estudou o efeito da concentração de NO_3^- (1 e 10 mM) no crescimento e composição celular da microalga de água doce *Chlorococcum amblyostomatis*, em reatores de coluna de bolhas, em meio de cultura F/2 de Guillard (suplementado com ferro), pH entre 7,5 e 8, fotoperíodo de 24:0 h luz:escuro a 6410 lux e a uma temperatura de 24 °C. Este investigador verificou que o crescimento da microalga num meio contendo 10 mM de NO_3^- levou à obtenção de concentrações celulares superiores, uma vez que a disponibilidade do nitrogénio influencia não só a composição celular, mas também o seu crescimento.

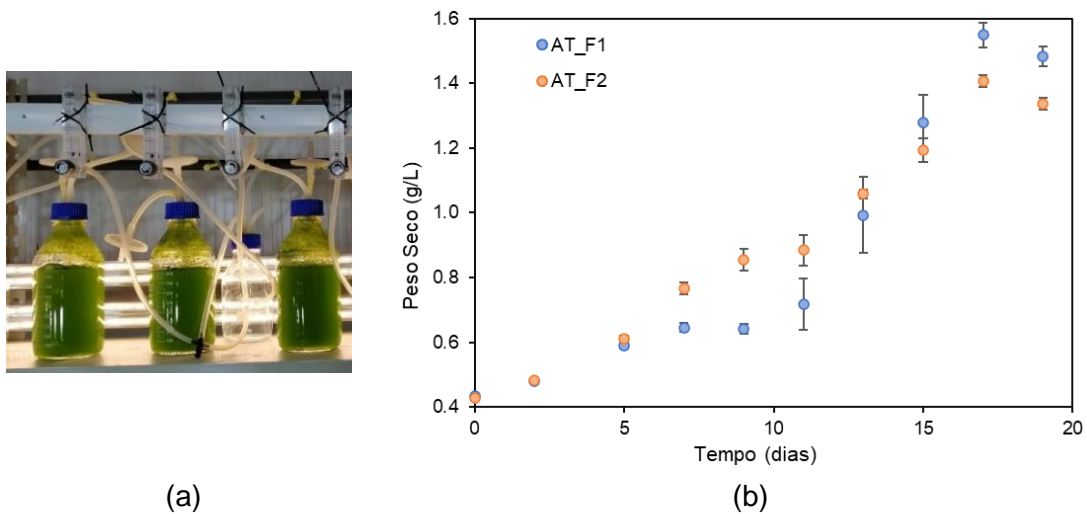


Figura 17 – Cultura de *C. amblystomatis*, em condições autotróficas em frascos de 1 L (**AT_F1** e **AT_F2**) (a) e respectivas curvas de crescimento (b). Cada condição foi realizada em triplicado.

Analogamente, segundo a Figura 17-(b) é possível identificar as fases de crescimento celular do ensaio **AT_F**. A fase de latência teve início no dia da inoculação até ao 5^o dia em **AT_F2**/11^o dia em **AT_F1**, a partir dos quais se inicia a fase exponencial, e cujo término se deu ao 17^o dia. A fase estacionária teve início ao 17^o dia e terminou ao 19^o dia, no qual se recolheu a biomassa. Inicialmente, as culturas apresentaram uma cor verde intensa. Contudo, ao longo do ensaio, verificou-se a sedimentação da biomassa (*vide* Figura i, Anexos) e uma mudança notória de coloração para uma tonalidade acastanhada (*vide* Figura ii-(a), Anexos). Apesar de existirem poucos estudos relativos à influência do arejamento/agitação no crescimento de microalgas e na sua produtividade, regra geral, verifica-se que o aumento da turbulência num sistema de cultivo leva ao aumento da produtividade da biomassa, uma vez que providencia uma melhor homogeneização do meio e, conseqüentemente, melhor exposição das células a fatores que influenciam o crescimento como luminosidade e nutrientes [135].

Analogamente ao ensaio **AT_C**, a condição de *stress* **AT_F2** apresentou um crescimento superior a **AT_F1** (até ao 14^o dia); no final do ensaio a condição **AT_F1** atingiu uma concentração celular ($1,48 \pm 0,03$ g/L) ligeiramente superior à condição de *stress* ($1,34 \pm 0,02$ g/L), conforme descrito na literatura [35]. A partir do 13^o dia, não foi efetuada a reposição de NO_3^- na condição **AT_F2**, levando à carência deste nutriente.

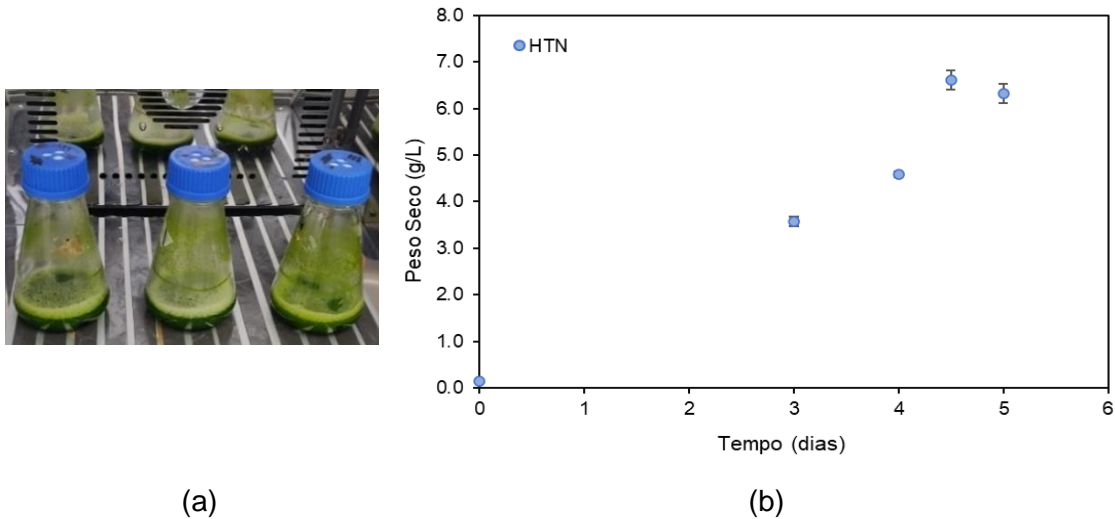


Figura 18 –Cultura de *C. amblystomatis*, em condições heterotróficas (**HTN**) (a) e respetiva curva de crescimento (b). O ensaio **HTN** foi realizado em triplicado.

Analisando a Figura 18-(b) identificam-se duas fases de crescimento celular: fase exponencial, desde o dia da inoculação até 4,5 dias; fase estacionária, entre o 4,5^o e o 5^o dia. O ensaio heterotrófico **HTN**, recolhido na fase estacionária da curva de crescimento, teve uma duração de 5 dias) e apresentou uma concentração celular de $6,33 \pm 0,027$ g/L, ou seja, cerca de 5 vezes superior à dos ensaios autotróficos. A cultura apresentou, ao longo do ensaio, coloração verde-escura. Relativamente aos ensaios heterotróficos **HTU** e **HTA**, fornecidos pela empresa Allmicroalgae, é possível constatar que ambos os ensaios, recolhidos na fase estacionária da curva de crescimento, tiveram uma duração de 70 horas (*vide* Figura iii, Anexos). O ensaio **HTU** (ureia como fonte de nitrogénio) apresentou uma concentração celular de $15,08 \pm 0,47$ g/L, aproximadamente o dobro da concentração celular obtida no ensaio **HTA** (sulfato de amónia como fonte de nitrogénio) ($7,66 \pm 0,69$ g/L).

4.2. Extração de Biocompostos Intracelulares

4.2.1. Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)

4.2.1.1. Estudos preliminares com biomassa fornecida pela Allmicroalgae

As biomoléculas intracelulares da biomassa de *C. amblystomatis* foram extraídas pelo método de extração assistida por micro-ondas (MAE), cujo procedimento se encontra descrito no capítulo anterior (*vide* 3.3.2.). Neste sentido, foram testadas duas

condições de extração distintas, com base nos resultados obtidos por Gil [86] e Hussen [57]: extração em etanol absoluto e extração em KOH 0,1 M, conforme descrito no subcapítulo 3.3.2.1 de Materiais e Métodos. Tais estudos demonstraram que este método de extração, para além de se reger pelos princípios da Química Verde, permite ainda uma extração eficiente de compostos intracelulares de microalgas.

A fim de testar as duas condições acima mencionadas, utilizou-se biomassa produzida em autotrofia em balões de 5 L com o meio de cultura MNS, fornecida pela empresa Allmicroalgae. Os extratos resultantes, identificados como **MAE_KOH** e **MAE_EtOH**, foram alvo de quantificação de polissacáridos neutros, sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos, conforme demonstrado na figura abaixo.

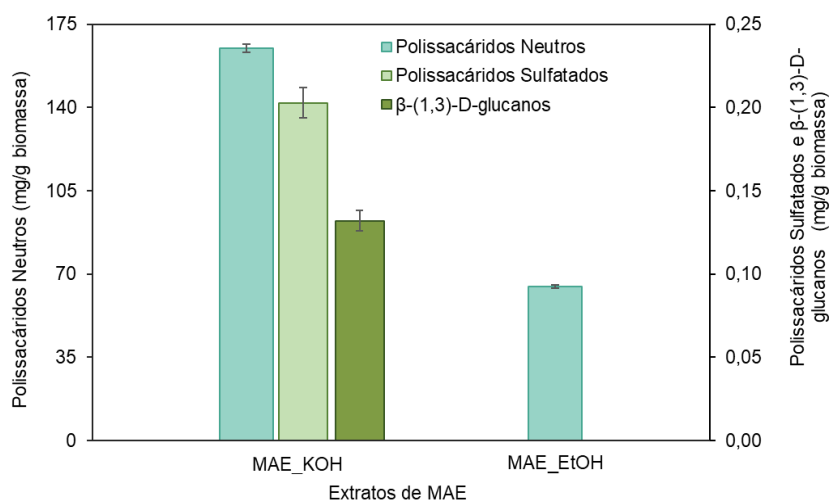


Figura 19 – Teores de polissacáridos neutros, sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos extraídos por MAE em KOH 0,1 M (120 °C/30 min) e em EtOH (150 °C/15 min).

Segundo a Figura 19, a extração em **MAE_KOH** (KOH 0,1 M/150 °C/30 min) permitiu a obtenção de vários tipos de polissacáridos, nomeadamente 164,79±1,73 mg de nPS/g biomassa, 0,20±0,01 mg de sPS/g biomassa e 0,13±0,01 mg de β -(1,3)-D-glucanos/g biomassa. Por esta razão, a condição **MAE_KOH** foi adotada para todas as extrações dos compostos intracelulares.

Em seguida, estudou-se o efeito da liofilização da biomassa anteriormente referida, na extração de biomoléculas, nomeadamente de PS e proteínas. Neste sentido, a biomassa foi submetida a 3 tratamentos diferentes: biomassa não liofilizada, incubada *overnight* em KOH 0,1 M (**M_ON**); biomassa liofilizada, incubada *overnight* em KOH 0,1 M (**S_ON**); biomassa liofilizada, extração imediata em KOH 0,1 M (**S_i**). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 19.

Resultados e Discussão

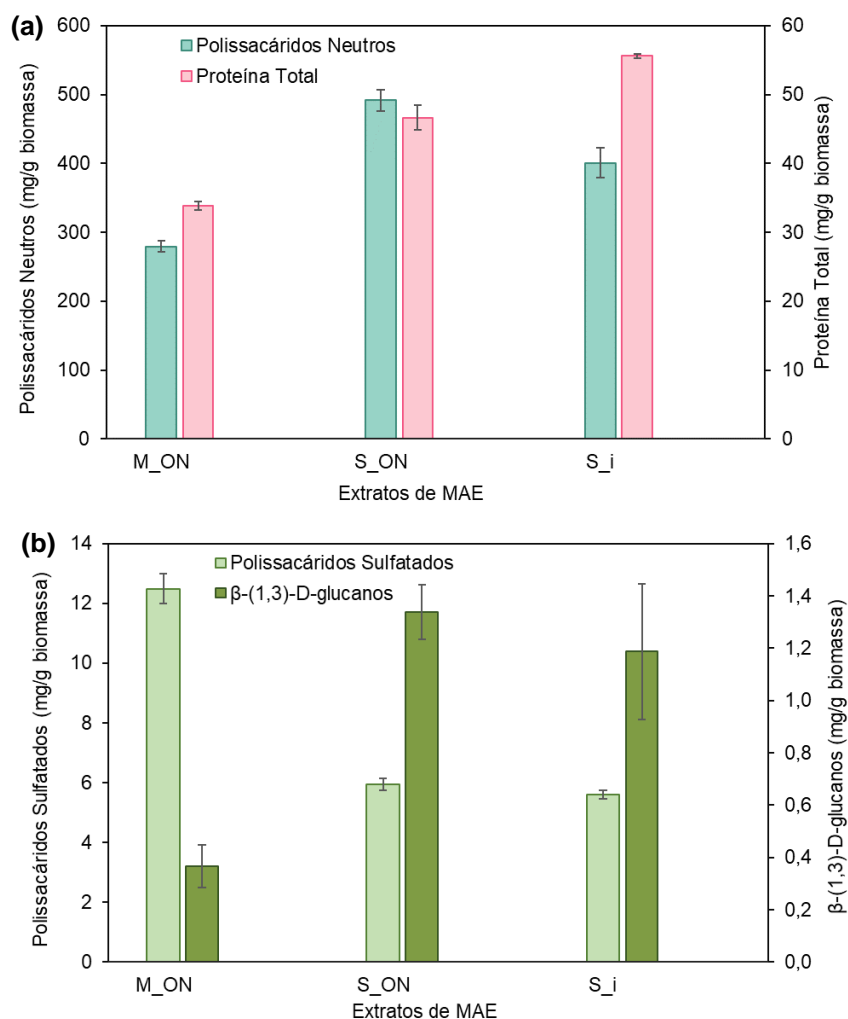


Figura 20 – Teores de polissacáridos neutros e proteína total **(a)**, polissacáridos sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos **(b)**, nos extratos **M_ON**, **S_ON** e **S_i** provenientes de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min).

De acordo com a figura acima, os teores mais elevados em nPS ($491,56 \pm 15,09$ mg/g biomassa) e β -D-glucanos ($1,34 \pm 0,10$ mg/g biomassa) correspondem à amostra **S_ON**. Já o teor máximo de proteína total foi atingido na amostra **S_i** ($55,61 \pm 0,31$ mg/g biomassa) e o de sPS ($12,49 \pm 0,49$ mg/g biomassa) na amostra **M_ON**. Verificou-se que a liofilização e incubação da biomassa no solvente de extração permitiu a extração de um conteúdo de nPS superior aos restantes tratamentos. Por conseguinte, de forma a maximizar a extração destas biomoléculas, aplicou-se a todas as amostras subsequentes o pré-tratamento anteriormente mencionado, seguido de MAE (KOH 0,1M/150 °C/30 minutos).

4.2.1.2. Biomassa produzida no estágio na Allmicroalgae

Como anteriormente mencionado, a biomassa resultante dos ensaios **AT_C**, **AT_F**, **HTN HTU** e **HTA** foi sujeitas a MAE, segundo as condições (razão biomassa:solvente, tempo de irradiação, temperatura e solvente) anteriormente mencionadas (*vide* 3.3.2.1). Os extratos obtidos foram alvo de quantificação de biomoléculas, nomeadamente nPS, aPS, sPS, β -(1,3)-D-glucanos, proteína total, compostos fenólicos, flavonoides totais e foram avaliadas as suas propriedades antioxidantes. Nas Figuras 21 e 22 apresentam-se os resultados obtidos relativos aos teores em polissacáridos e proteína total.

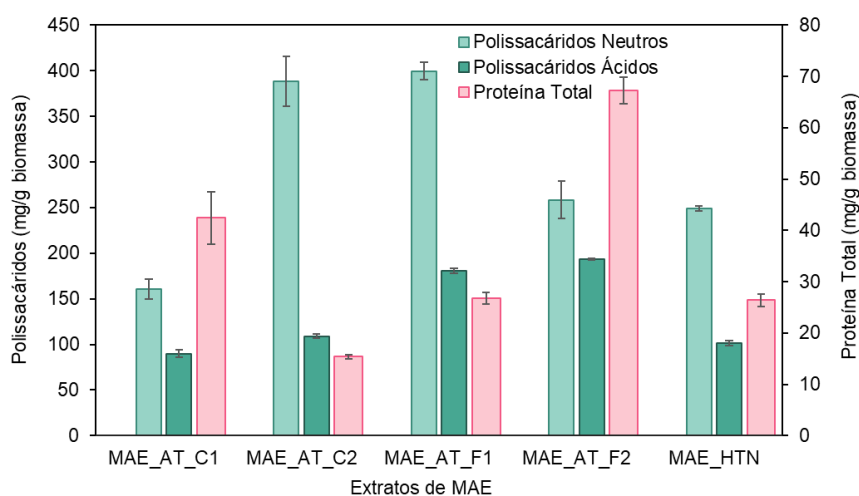


Figura 21 – Teores de polissacáridos neutros, ácidos e proteína total para os extratos provenientes de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min), da biomassa produzida em condições autotróficas (**AT_C** e **AT_F**) e heterotróficas (**HTN**).

Segundo a Figura 21, é possível constatar que os nPS são as biomoléculas sintetizadas em maior quantidade pela microalga *C. amblystomatis*, atingindo um valor máximo de $399,75 \pm 9,64$ mg/g biomassa, em **AT_F1**. Analisando os resultados obtidos em **AT_C**, verifica-se que a indução de *stress* de nutrientes (privação de NO_3^-) (**AT_C2**) promove uma síntese significativa destas moléculas, tendo-se obtido sensivelmente o dobro do teor de nPS ($388,65 \pm 27,27$ mg/g biomassa) face a **AT_C1**. Esta condição (**AT_C2**) permitiu ainda a extração de um conteúdo ligeiramente superior de aPS ($109,12 \pm 1,96$ mg/g biomassa) a **AT_C1**. Em oposição, constata-se que a imposição de *stress* promove a diminuição do conteúdo de proteína total, passando de $42,41 \pm 5,10$ para $15,40 \pm 0,44$ mg/g biomassa.

Um estudo realizado por Liu *et al.* [136], com a microalga verde *Chlorella vulgaris* FACHB-1068, em meio de cultura basal e um fotoperíodo de 12:12h luz:escuro, constatou que a indução de *stress* promoveu o aumento de hidratos de carbono e

lípidos, mas levou à diminuição do teor de proteína e clorofilas. A privação da fonte de nitrogénio promove alterações metabólicas, redirecionando o metabolismo dos microrganismos para a síntese de compostos de armazenamento como os triglicéridos e o amido. Consoante a espécie de microalga, esta pode acumular amido ou lípidos neutros como resposta a este *stress*. Geralmente, a acumulação de hidratos de carbono pode atingir concentrações elevadas sem que isso implique uma redução da produtividade da biomassa. No entanto, a acumulação de lípidos está comumente associada à redução da produtividade da biomassa, uma vez que requer a degradação de biomoléculas (nomeadamente proteínas) contendo nitrogénio de forma a satisfazer esta carência. Desta forma, ainda que se tenha verificado o aumento da concentração de hidratos de carbono neutros com a indução de *stress*, verificou-se também a diminuição do teor de proteínas, podendo esta redução estar associada à degradação das mesmas a fim da produção lipídica [137].

Em oposição ao verificado em **AT_C**, constatou-se que no ensaio **AT_F** houve uma diminuição no teor de nPS com a privação de NO_3^- ($258,29 \pm 20,55$ mg/g biomassa) face ao controlo. No entanto, verificou-se o aumento do teor de proteínas com a indução de *stress*, tendo-se atingido um valor máximo de $67,27 \pm 2,27$ mg/g biomassa. Já os aPS mantiveram o seu valor semelhante nas duas condições, sendo superiores aos teores obtidos em **AT_C**. Conforme mencionado em 4.1. Cultivo e Manutenção da Cultura de *Chlorococcum amblystomatis*, o ensaio realizado em frascos de 1L apresentou um arejamento ineficiente o que, por sua vez, promoveu uma agitação do meio de cultura ineficaz. Desta forma, seria expectável que o meio de cultura não apresentasse homogeneidade e que as células não fossem expostas homogeneamente à radiação e a todos os nutrientes em solução, nomeadamente à fonte de nitrogénio.

Por fim, comparando os ensaios autotróficos de controlo (**AT_C1** e **AT_F1**) com o ensaio heterotrófico (**HTN**), é possível constatar que este último apresentou um teor em nPS ($249,11 \pm 2,45$ mg/g biomassa) superior a **AT_C1**, mas inferior a **AT_F1**, um teor em aPS semelhante a **AT_C1** e em proteína total semelhante ao de **AT_F1**.

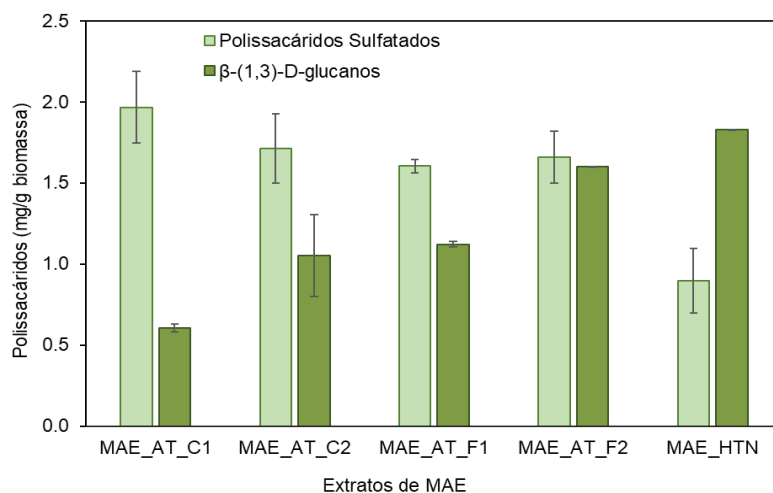


Figura 22 – Teores de β -(1,3)-D-glucanos e polissacáridos sulfatados para os extratos provenientes de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min), da biomassa produzida em condições autotróficas e heterotróficas.

Pela análise da Figura 22 é possível inferir que o teor de sPS e β -D-glucanos é largamente inferior aos teores de nPS. Em relação aos sPS, obtiveram-se teores semelhantes entre os ensaios autotróficos, tendo-se obtido um conteúdo máximo em **AT_C1** (1,97±0,22 mg/g biomassa). Contudo, as condições de *stress* apresentaram maior concentração de β -(1,3)-D-glucanos (1,60±0,00 mg/g biomassa em **AT_F2**).

Por fim, constata-se que a biomassa cultivada em **HTN** originou o menor conteúdo em sPS (0,90±0,20 mg/g biomassa) face aos ensaios autotróficos de controlo e, em oposição, o maior conteúdo em β -(1,3)-D-glucanos, tendo atingido os (1,83±0,00 mg/g biomassa).

Em seguida, procedeu-se à quantificação de polissacáridos neutros e de proteína total das amostras heterotróficas **HTA** e **HTU**. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 23.

Resultados e Discussão

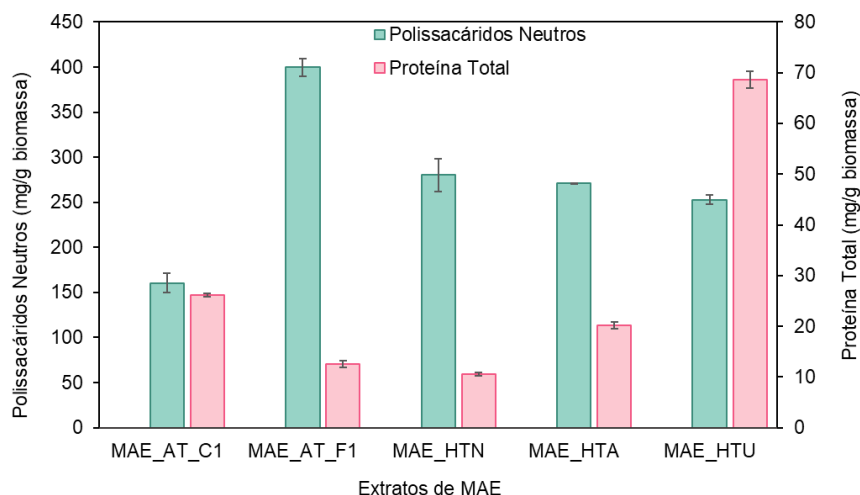


Figura 23 – Teores de polissacáridos neutros e de proteína total para os ensaios de controlo autotróficos (**AT_C1** e **AT_F1**) e para os ensaios heterotróficos **HTN**, **HTA** e **HTU** provenientes de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min).

Com base na Figura 23 é possível observar que foram obtidos teores semelhantes de nPS nos diversos ensaios heterotróficos, com valores entre os $249,11 \pm 2,45$ e $270,83 \pm 0,04$ mg/g biomassa. O ensaio **HTU** apresentou a maior concentração em proteína total ($68,62 \pm 1,61$ mg/g biomassa) comparativamente aos ensaios autotróficos de controlo e heterotróficos. Um estudo realizado por Fatini, Basri e Maznah [138], com a microalga *Chlorococcum sp.* (cultivada em condições autotróficas, em meio BBM e um fotoperíodo de 24:0 h luz:escuro), que teve como objetivo avaliar o efeito de três fontes de nitrogénio: nitrato de sódio, cloreto de amónia e ureia, verificou que a cultura celular cultivada com ureia como fonte de N deu origem ao maior conteúdo de proteína. Tal evidência poderá estar relacionada com o facto da molécula de ureia $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$ ser constituída por 2 átomos de nitrogénio, contrariamente às restantes moléculas em estudo, fornecendo, assim, um maior conteúdo de nitrogénio às células.

Com o objetivo de quantificar a extração de compostos fenólicos e flavonoides foram utilizados os métodos do Folin-Ciocalteu e do cloreto de alumínio, respetivamente. Os resultados obtidos relativos aos extratos de MAE encontram-se representados na Figura 24.

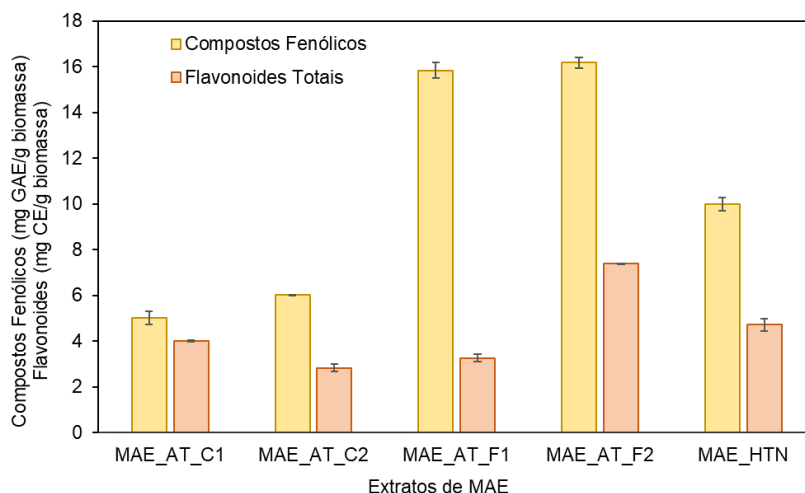


Figura 24 – Teores de compostos fenólicos totais e flavonoides para os extratos obtidos a partir da biomassa produzida em condições autotróficas (**AT_C** e **AT_F**) e heterotróficas (**HTN**) por MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min).

Através da Figura 24, é possível verificar que os ensaios realizados em frascos levaram à síntese de compostos fenólicos com teores máximos na mesma ordem de grandeza (**AT_F2**: 16,17±0,24 mg GAE/g biomassa). Em relação ensaio **AT_C** foi possível constatar que a privação de NO_3^- promoveu um ligeiro aumento do teor de compostos fenólicos de 5,03±0,28 (**AT_C1**) para 6,01±0,02 mg GAE/g biomassa (**AT_C2**). Comparando o crescimento autotrófico de controlo com o heterotrófico, verifica-se que se obteve 9,98±0,29 mg GAE/g biomassa em **HTN**, superior ao teor obtido em **AT_C1**, mas inferior ao obtido no ensaio **AT_F1**.

Um estudo realizado por Choochote, Suklampoo e Ochaikul [139] com a microalga *Chlorococcum* sp. E53, originou um teor em compostos fenólicos de 7,00 mg GAE/g extrato (biomassa cultivada no meio de cultura N-8 e com uma irradiação de 32 $\mu\text{mol.fotão}/(\text{m}^2.\text{s})$; extração realizada em água destilada). Tais resultados encontram-se semelhantes aos resultados obtidos nos ensaios **AT_C**.

Na presença de condições de *stress* (nomeadamente exposição a radiação intensa ou limitação de nutrientes), a eficiência fotossintética diminui, promovendo o *stress* foto-oxidativo e a acumulação de energia. Tais estímulos levam à síntese de compostos antioxidantes, nomeadamente polifenóis. O *stress* ao nível da carência de nutrientes, principalmente de nitrogénio, fósforo e enxofre, pode resultar em diferentes consequências para as células, nomeadamente acumulação de lípidos e de amido, de ROS, aumento da síntese de compostos antioxidantes, degradação de pigmentos e aminoácidos e desregulação da fotossíntese [63], [74]. No decorrer dos ensaios em frascos verificou-se, efetivamente, uma agitação ineficiente do meio de cultura, o que

poderá estar associado aos elevados teores de compostos fenólicos obtidos, quando comparados com os ensaios em reator de coluna de bolhas. Tal fator pode ter promovido outro *stress* além da carência de nitrogénio imposta.

É ainda possível observar que no ensaio **AT_C**, especialmente em **AT_C1**, os polifenóis detetados pelo método do Folin-Ciocalteu encontram-se na forma de flavonoides, conforme esperado para as microalgas. No entanto, tal não se verifica nos restantes ensaios.

Os resultados obtidos em termos de flavonoides revelam, em **AT_C**, que a condição sujeita a *stress* apresentou um conteúdo destas biomoléculas inferior ($2,83 \pm 0,17$ mg CE/g biomassa) ao respetivo controlo ($4,02 \pm 0,03$ mg CE/g biomassa). Contudo, observou-se o oposto em **AT_F**, ou seja, um aumento deste teor com a indução de *stress* de $3,27 \pm 0,15$ (**AT_F1**) para $7,38 \pm 0,03$ mg CE/g biomassa (**AT_F2**). O ensaio **HTN** apresentou um teor de $4,72 \pm 0,44$ mg CE/g biomassa, superior aos teores apresentados por **AT_C1** e **AT_F1**.

Em suma, verifica-se que as condições **AT_C2** e **AT_F2** apresentam, na sua maioria, teores das moléculas em estudo superiores aos respetivos controlos. Destaca-se ainda a condição **AT_F2** que, apesar das dificuldades associadas ao arejamento da cultura, apresenta teores superiores a **AT_F1** em todas as biomoléculas, excetuando aPS e sPS. Por fim, o ensaio **HTN**, que teve o menor tempo de duração, conforme expectável, destaca-se dos restantes ensaios no que diz respeito ao seu conteúdo em β -(1,3)-D-glucanos e flavonoides.

4.2.2. Extração de Lípidos

Com o objetivo de quantificar o teor de lípidos produzido em cada condição de crescimento, foram aplicados os seguintes métodos de extração: extração contínua em Soxhlet com *n*-hexano (**SE_Hex**) e com etanol (**SE_EtOH**) aos extratos **AT_C1** e **AT_C2** e, ainda, extração assistida por micro-ondas com etanol absoluto para o extrato **AT_C1** (**MAE_EtOH_A1**). Destes extratos (à exceção do extrato **MAE_EtOH_C1**), retirou-se 1 mL para quantificação de lípidos pelo método colorimétrico SPV. O restante extrato foi seco, tendo-se obtido resíduos sólidos com aspeto pastoso. Os resultados obtidos encontram-se indicados na tabela seguinte.

Tabela 8 – Doseamento de lípidos por gravimetria e pelo método SPV dos extratos de SE realizados com etanol e *n*-hexano (80 °C/6h) para os ensaios **AT_C1** e **AT_C2**, e por MAE com etanol (150°C/ 15 min) para o ensaio **AT_C1**.

Extrato	Rendimento de Extração (%)		Conteúdo (mg/g biomassa)
	Gravimetria	Método SPV	Método SPV
SE_EtOH_C1	18,1	21,0	209,89±8,01
SE_Hex_C1	12,9	29,1	290,74±20,98
SE_EtOH_C2	13,2	30,3	302,92±27,40
SE_Hex_C2	25,2	5,1	51,50±8,24
MAE_EtOH_C1	-	23,6	235,68±22,60

É possível verificar que, por gravimetria, a condição **AT_C1** utilizando etanol como solvente permitiu a obtenção de um rendimento de extração superior ao obtido com *n*-hexano, em oposição aos resultados obtidos para a condição de *stress*. Estudos realizados por Cancela, Maceiras, Alfonsín e Sánchez [140] e Ramluckan, Moodley e Bux [141], nos quais se procedeu à extração de lípidos por extração contínua em Soxhlet com etanol e *n*-hexano, revelaram que o solvente que apresentou melhores resultados foi o etanol. Quando o objetivo é a extração de lípidos neutros, são geralmente utilizados solventes não polares, como o hexano; para a extração de lípidos membranares, regra geral, utilizam-se solventes polares, como o etanol, uma vez que revelam ser mais adequados para a sua recuperação. O *n*-hexano, para além de ser seletivo para lípidos neutros, apresenta ainda baixa afinidade para possíveis contaminantes, ao contrário do etanol.

Um outro estudo, realizado por Gil [86], com a microalga diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*, verificou que a extração contínua em Soxhlet com etanol 80% (V/V) (80°C/3h) levou à obtenção de um conteúdo de compostos sulfatados substancialmente superior face a MAE (HCl 0,1M/120 °C/30 min). Os resultados obtidos por Hussen [57] relativos à extração contínua em Soxhlet de biomoléculas da microalga *C. vulgaris*, colhida na fase exponencial de crescimento celular e utilizando etanol absoluto como solvente (80°C/3h), revelaram que esta metodologia permitiu a extração de elevados teores de nPS (204,25 mg/g biomassa) e compostos sulfatados (ca. 75 mg/g biomassa). O teor de nPS obtido por SE com etanol apresentou-se superior ao obtido por MAE com o mesmo solvente (120°C/30 min) (ca.120 mg nPS/g biomassa). Neste sentido, é possível inferir que a extração **SE_EtOH** pode apresentar maior afinidade, não só para lípidos, como também para outras biomoléculas, como

compostos sulfatados. Tal pode explicar o facto de o extrato **SE_EtOH_C1** apresentar um rendimento de extração superior a **SE_Hex_C1** [91].

Os resultados obtidos pelo método colorimétrico SPV para os diferentes extratos etanólicos de AT_C1 (**SE_EtOH_C1** e **MAE_EtOH_C1**) apresentam rendimentos de extração de lípidos semelhantes entre si. Contudo, o extrato **MAE_EtOH_C1** apresentou coloração verde-escura após a realização do método SPV, afetando os resultados obtidos. Por fim, extrato **SE_Hex_C1** apresentou um teor superior relativamente aos extratos anteriormente mencionados (29,1%).

Analisando agora os extratos relativos à condição de *stress*, verifica-se que o extrato **SE_EtOH_C2** exibiu o maior rendimento de extração (30,3%), superior ao respetivo controlo, como seria expectável. Um estudo realizado por Rehman e Anal [142], utilizando a microalga *Chlorococcum* sp. TISTR 8583, cultivada em meio BG-11, verificou o aumento da produção de lípidos totais ($29,59 \pm 0,82\%$) e de hidratos de carbono totais, nos ensaios decorridos com limitação da fonte de nitrogénio comparativamente ao ensaio suplementado com a fonte de nitrogénio ($17,05 \pm 1,03\%$). Contudo, contrariamente ao esperado, segundo o método SPV, extrato **SE_Hex_C2** apresentou um teor de lípidos substancialmente reduzido face à extração com etanol. O extrato **SE_Hex_C2**, apesar de ter apresentado, por gravimetria, o maior rendimento de extração, exibiu o menor teor de lípidos determinados pelo método SPV, contrariamente ao extrato **SE_Hex_C1**. Os resultados obtidos podem dever-se não só à coloração dos extratos após a realização do método SPV, influenciado a leitura da absorvância, mas também ao facto de nas extrações etanólicas o solvente apresentar afinidade para com outras biomoléculas, nomeadamente compostos sulfatados.

4.2.3. Extração de Pigmentos

O teor de pigmentos foi quantificado com recurso às equações enunciadas no tópico 3.3.4.7 (*vide* Materiais e Métodos). Neste sentido, quantificaram-se as clorofilas *a* e *b* e o teor de carotenoides totais nos extratos **AT_C** e **AT_F** provenientes de **MAE_KOH** (KOH 0,1M/120°C/30min), somente denominados **MAE_KOH_AT_C** e **MAE_KOH_AT_F**. Estes pigmentos foram ainda quantificados no extrato **AT_C1** proveniente de **MAE_EtOH** (EtOH/150°C/15min), designado por **MAE_EtOH_AT_C1**.

Procedeu-se ainda à extração de pigmentos com acetona (**Ac**), verificando-se que a extração de pigmentos não foi completa na maioria dos ensaios, uma vez que, mesmo após extração, o *pellet* permaneceu com coloração verde intensa, especialmente no ensaio **Ac_AT_C**. Já os ensaios **Ac_AT_F** apresentaram uma tonalidade acastanhada,

mais evidente na condição de controlo (*vide* Figura iv, Anexos). Na Tabela 9 encontram-se os resultados referentes aos teores de pigmentos obtidos nas diferentes extrações.

Tabela 9 – Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg/g biomassa) obtidos por MAE com KOH e EtOH, e por extração com acetona (Ac) da biomassa liofilizada de *C. amblystomatis* cultivada em autotrofia com e sem indução de *stress* ao nível da fonte de N.

Ensaio	Clorofila <i>a</i> (mg/g biomassa)	Clorofila <i>b</i> (mg/g biomassa)	Carotenoides Totais (mg/g biomassa)
MAE_KOH_AT_C1*	0,70	0,67	0,33
MAE_KOH_AT_C2*	0,69	0,90	0,50
MAE_KOH_AT_F1*	0,42	0,64	0,35
MAE_KOH_AT_F2*	1,39	1,83	1,01
MAE_EtOH_AT_C1**	10,68	9,53	2,27
Ac_AT_C1	15,31	10,33	2,20
Ac_AT_C2	8,57	3,78	0,66
Ac_AT_F1	4,76	1,01	0,08
Ac_AT_F2	1,31	0,56	0,08

*Condições de extração: KOH 0,1M/120 °C/30 min. **Condições de extração: EtOH/150 °C/15 min

Para a quantificação de clorofilas e carotenoides totais nos extratos **MAE_KOH**, consideraram-se as expressões correspondentes a éter dietílico saturado em água como uma aproximação (equações 9, 10, 11 e 12). Pela análise da Tabela 9, é possível verificar que o extrato com o solvente KOH que exibiu maior teor de pigmentos foi o **MAE_KOH_AT_F2**. Verifica-se que os extratos **MAE_KOH** de controlo (**MAE_KOH_AT_C1** e **MAE_KOH_AT_F1**) apresentam teores semelhantes de clorofila *b* (0,67 e 0,64 mg clorofila *b*/g biomassa, respetivamente) e carotenoides totais (0,33 e 0,35 mg carotenoides totais/g biomassa, respetivamente), ambos inferiores às respetivas condições de *stress*., especialmente em **MAE_KOH_AT_F2**. No entanto, o ensaio **MAE_EtOH_AT_C1** apresentou resultados substancialmente superiores aos restantes: 10,68 mg clorofila *a*/g biomassa, 9,53 mg clorofila *b*/g biomassa e 2,27 mg carotenoides totais/g biomassa.

Relativamente à extração com acetona, e como expectável, o extrato **Ac_AT_C1**, para além de ter apresentado coloração verde intensa, apresentou ainda o maior teor de pigmentos fotossintéticos. Verifica-se ainda que os teores de pigmentos na condição de controlo são superiores aos da condição de *stress*, e que os extratos **Ac_AT_C** apresentam teores superiores a **Ac_AT_F**, o que está de acordo com a literatura, uma vez que a indução de *stress* ao nível da fonte de nitrogénio pode levar não só à degradação de proteínas, mas também à degradação de pigmentos [35], [74].

Um estudo realizado por Correia [35] permitiu determinar o teor de pigmentos sintetizados por *C. amblystomatis* em balões de 5 L, com as seguintes condições de crescimento: meio de cultura F/2 de Guillard, suplementado com ferro, pH entre 7,5 e 8, fotoperíodo de 24:0 h luz:escuro, a 6410 lux e a uma temperatura de 24 °C, tendo sido testado o efeito da concentração de NO₃⁻. Neste sentido, a microalga foi cultivada nas condições anteriormente mencionadas com 10 e 1 mM NO₃⁻ (com posterior esgotamento da fonte de nitrogénio). Na condição de *stress*, verificou-se uma diminuição do conteúdo de clorofila total ao longo do ensaio, especialmente quando a cultura atingiu a fase estacionária da curva de crescimento, tendo-se obtido ca. 3 mg clorofila total/g biomassa e ca. de 2 mg carotenoides totais/g biomassa. Em oposição, no ensaio com 10 mM de NO₃⁻, o teor de pigmentos aumentou ao longo do tempo, atingindo conteúdos semelhantes de pigmentos nas fases exponencial e estacionária da curva de crescimento (ca. 32,5 mg clorofila total/g biomassa e ca. 10 mg carotenoides totais/g biomassa).

Os resultados obtidos para os extratos em acetona encontram-se de acordo com os obtidos por Correia [35]. A indução de *stress* ao nível da privação de NO₃⁻ leva à obtenção de conteúdos de clorofila e carotenoides totais inferiores aos respetivos controlos. No entanto, os conteúdos obtidos em carotenoides totais são largamente inferiores aos reportados na literatura, à exceção dos ensaios **Ac_AT_C1** e **MAE_EtOH_C1**.

Por fim, avaliou-se o teor de pigmentos dos extratos obtidos SE (Tabela 10). Os diferentes extratos apresentaram colorações distintas: os extratos em etanol exibiram coloração verde-azeitona escura, enquanto os extratos em *n*-hexano apresentaram coloração verde-clara (**SE_Hex_C1**) e amarela (**SE_Hex_C2**), conforme ilustrado na figura seguinte.

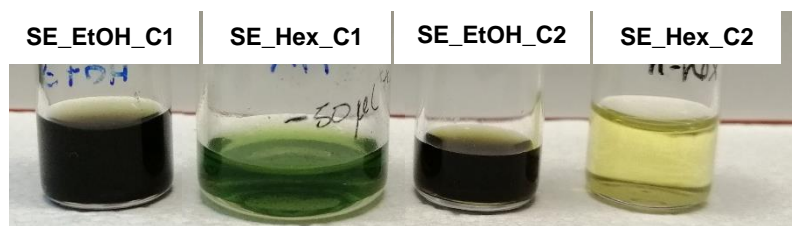


Figura 25 – Coloração dos extratos **SE_EtOH** e **SE_Hex**, obtidos por extração contínua em Soxhlet (6h/ 80°C), realizada às amostras **AT_C1** e **AT_C2**.

Tabela 10 – Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg/g biomassa) nos extratos obtidos por extração contínua em Soxhlet.

Ensaio	Clorofila a (mg/g biomassa)	Clorofila b (mg/g biomassa)	Carotenoides Totais (mg/g biomassa)
SE_EtOH_C1	10,15	1,28	0,33
SE_Hex_C1	1,42	2,54	0,00
SE_EtOH_C2	10,26	0,38	0,98
SE_Hex_C2	0,70	0,00	0,62

Nota: Extração contínua em Soxhlet (6h/80°C) com etanol absoluto (**SE_EtOH**) e *n*-hexano (**SE_Hex**) da biomassa liofilizada de *C. amblyostomatis* cultivada em autotrofia em reatores de coluna de bolhas (**AT_C1** e **AT_C2**).

A extração utilizando etanol absoluto permitiu a obtenção de teores de clorofila *a* de ca. 10 mg/g biomassa para o ensaio **AT_C**. O resultado obtido para o extrato **SE_EtOH_C1** encontra-se ainda concordante com o teor obtido em **MAE_EtOH_AT_C1**. No caso da clorofila *b*, a extração **SE_Hex_C1** (2,54 mg/g biomassa) permitiu a obtenção de um teor superior relativo face à extração com etanol (1,28 mg/g biomassa). No entanto, a situação inversa foi observada no ensaio **AT_C2**, onde se obteve 0,38 mg clorofila *b*/g biomassa em **SE_EtOH_C2** e quantidade não detetável de clorofila *b* em **SE_Hex_C2**. Em termos de carotenoides totais, verifica-se uma extração superior destes compostos nos extratos relativos à condição de stress, destacando-se o extrato **SE_EtOH_C2** que apresentou um teor de 0,98 mg/g biomassa (superior ao teor obtido pela extração com acetona). Regra geral, os resultados obtidos por **SE** são inferiores aos teores obtidos por **Ac**.

4.2.4. Atividade Antioxidante

A capacidade antioxidante pode dever-se a inúmeros compostos, tais como sPS, compostos fenólicos, dos quais se destacam os flavonoides e pigmentos. Neste sentido foi utilizado o método do radical ABTS para a avaliação da capacidade antioxidante da biomassa de *C. amblysomatis* produzida em condições auto e heterotróficas. Os resultados obtidos dos extratos de MAE (Figura 26).

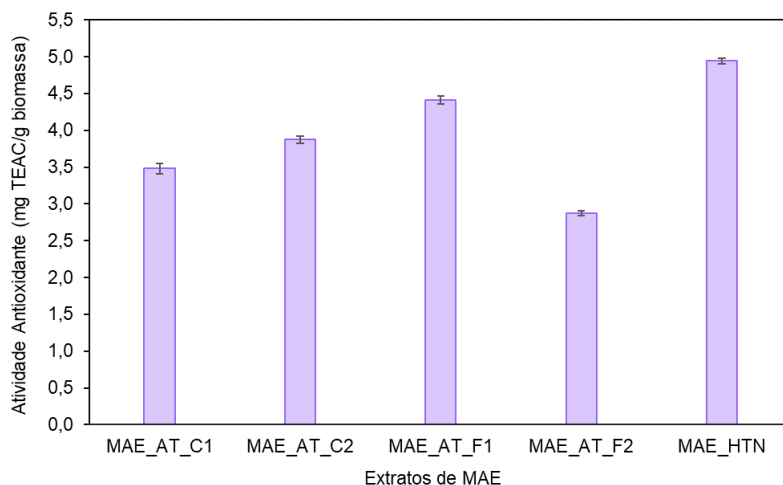


Figura 26 – Atividade antioxidante (mg TEAC/g biomassa) para os extratos da biomassa produzida em condições autotróficas (**AT_C** e **AT_F**) e heterotróficas (**HTN**) obtidos por MAE (KOH 0,1M/150 °C/30 min).

É possível verificar que a maior atividade antioxidante foi obtida para o extrato **HTN** (4,94±0,03 mg TEAC/g biomassa), seguida do extrato **AT_F1** (4,41±0,06 mg TEAC/g biomassa). O ensaio **HTN** poderá ter sido recolhido no fim da fase estacionária da curva de crescimento ou já no início da fase de declínio celular. Geralmente, na fase estacionária, a taxa de crescimento celular iguala à taxa de morte, verificando-se a produção de metabolitos secundários, nomeadamente metabolitos tóxicos, bem como o esgotamento de nutrientes. Tais fatores podem ter contribuído para o aumento do *stress* celular e, conseqüentemente, para o aumento de metabolitos com atividade antioxidante. No ensaio **AT_F** verifica-se uma diminuição da atividade antioxidante na condição de *stress* face ao respetivo controlo (2,88±0,03 mg TEAC/g biomassa em **AT_F2**). No entanto, em **AT_C** constata-se que ambas as condições (controlo e *stress*) apresentam resultados semelhantes: 3,48±0,07 mg TEAC/g biomassa em **AT_C1** e 3,87±0,04 mg TEAC/g biomassa em **AT_C2**. Seria expectável que a condição de *stress* apresentasse atividade antioxidante superior ao controlo, uma vez a carência de

nitrogénio pode induzir a síntese de ROS que, por sua vez, promove a síntese de compostos antioxidantes como mecanismo de defesa [74].

4.3. Extração de Biocompostos Extracelulares

As biomoléculas extracelulares têm despertado cada vez mais interesse por poderem exibir diversas atividades biológicas. A síntese destes compostos pode estar relacionada com mecanismos de defesa das células face ao *stress* e toxicidade do meio de cultura [72].

Com o objetivo de isolar EPS, foram efetuadas precipitações alcoólicas nos meios de cultura (obtidos após separação da biomassa) dos ensaios realizados na Allmicroalgae e, ainda, dos ensaios heterotróficos **HTU** e **HTA** fornecidos pela empresa.

Após precipitação, os sobrenadantes dos diferentes ensaios autotróficos apresentaram colorações distintas, podendo-se verificar pela Figura 27 o aspeto turvo dos sobrenadantes dos ensaios **AT_C**, em contraste com a aparência translúcida das soluções dos ensaios **AT_F**. Em ambos os casos, as amostras sujeitas a indução de *stress* revelaram uma coloração ligeiramente mais intensa que os respetivos controlos.

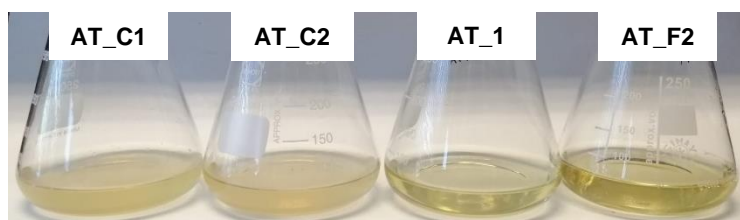


Figura 27 – Sobrenadantes dos ensaios autotróficos em reatores de coluna de bolhas (**AT_C**) e em frascos (**AT_F**), obtidos por precipitação alcoólica.

Com o objetivo de escolher a melhor condição de precipitação, foram testadas 3 condições distintas aos meios de cultura após separação da biomassa (doravante denominados por sobrenadantes) **AT_C1** e **AT_C2**: 1ª) 3 volumes de etanol 90%, extração imediata (**Eti**); 2ª) 2 volumes de etanol 96% com incubação *overnight* (**EtON**); 3ª) 2 volumes de propanol 95% com incubação *overnight* (**PON**). A condição selecionada foi a precipitação **Eti** tendo sido, posteriormente, aplicada aos sobrenadantes **AT_F1** e **AT_F2**. Após aplicação dos métodos de precipitação, constatou-se que os sobrenadantes do ensaio **AT_C** apresentaram maior massa de EPS face a **AT_F**. Constatou-se ainda outra diferença entre os ensaios: os EPS do

ensaio **AT_C** apresentaram uma tonalidade mais alaranjada, enquanto os EPS de **AT_F** apresentaram uma tonalidade mais bege/verde (*vide* Figura v, Anexos).

Os extratos resultantes das precipitações alcoólicas foram sujeitos a quantificação de aPS, nPS e sPS, β -(1,3)-D-glucanos e proteína total. Os resultados respetivos aos diversos métodos de precipitação e aos sobrenadantes sem aplicação de qualquer método de precipitação (doravante denominados por sobrenadantes diretos) encontram-se nas figuras seguintes.

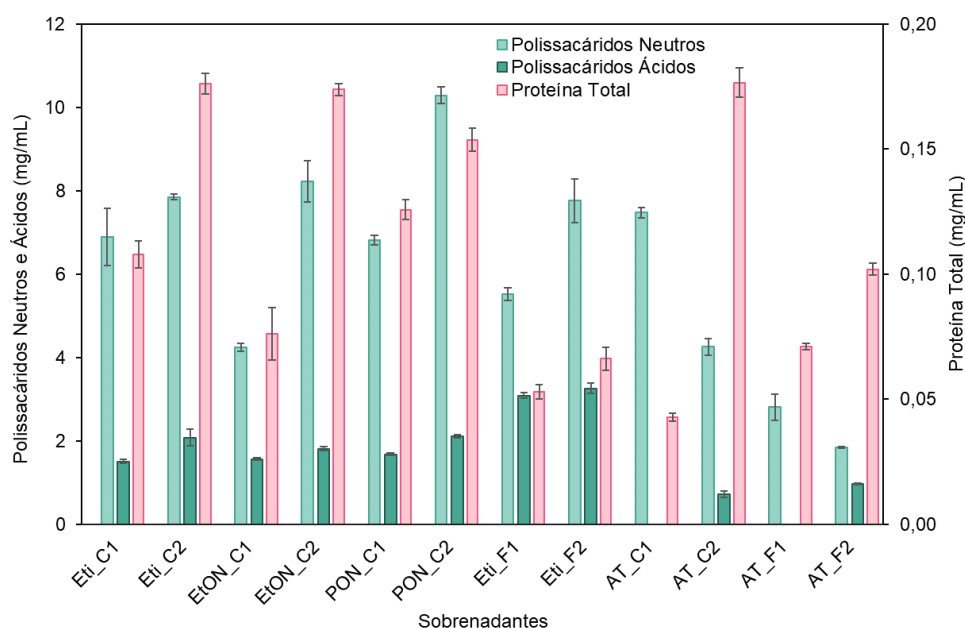


Figura 28 – Teores de polissacáridos neutros, ácidos e proteína total nos sobrenadantes diretos (**AT_C** e **AT_F**) e nos sobrenadantes sujeitos a precipitações alcoólicas (**Eti**, **EtON** e **PON**).

Analisando a Figura 28, é possível visualizar que o maior teor em nPS obtido nos sobrenadantes diretos (sem qualquer tratamento) corresponde ao ensaio **AT_C1**, tendo apresentando $7,47 \pm 0,12$ mg/mL, e o menor teor nPS ao sobrenadante direto **AT_F2** ($1,85 \pm 0,03$ mg/mL). Constata-se ainda que os sobrenadantes diretos dos ensaios autotróficos de controlo (**AT_C1/F1**) apresentam teores superiores de nPS em relação às condições de *stress* (**AT_C2/F2**). Após aplicação das diferentes condições de precipitação (**Eti**, **EtON** e **PON**) ao ensaio **AT_C**, é possível verificar a obtenção de conteúdos de nPS superiores na condição de *stress*, sendo esta diferença mais evidente nas extrações **EtON** e **PON**. O teor máximo de nPS, obtido no ensaio **PON_C2**, foi de $10,28 \pm 0,20$ mg/mL. Após análise dos resultados obtidos para as 3 extrações no ensaio **AT_C**, selecionou-se a extração **Eti** (extração imediata com 3 volumes de etanol a 90%)

como sendo a melhor condição de extração de biomoléculas de interesse, nomeadamente de polissacáridos neutros. Posteriormente, aplicou-se o método de extração selecionado aos sobrenadantes do ensaio **AT_F** e constatou-se que o ensaio **Eti_F1** apresentou um teor de nPS inferior ($5,52 \pm 0,15$ mg/mL) à condição de *stress* ($7,76 \pm 0,52$ mg/mL).

Em termos de aPS, estas biomoléculas não foram detetadas nos sobrenadantes diretos de controlo, tendo sido apenas detetadas nos sobrenadantes diretos relativos à condição de *stress* (teor máximo de $0,97 \pm 0,03$ mg aPS/mL em **AT_F2**). No entanto, após aplicação das diversas precipitações alcoólicas aos ensaios, verificou-se a deteção destas biomoléculas em todos os ensaios, tendo-se obtido teores ligeiramente superiores nas condições de *stress* (teor máximo de $3,26 \pm 0,12$ mg/mL em **Eti_F2**).

Os exemplos que se encontram na literatura sobre a síntese de exopolissacáridos sob diferentes condições de cultivo, diferentes espécies de microalgas, etc., são escassos. Um estudo, realizado por Cheirsilp, Mandik e Prasertsan [143], com a microalga *Chlorella* sp. cultivada em condições autotróficas e com meio de cultura BBM (intensidade luminosa $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ e um fotoperíodo de 16:8 h luz:escuro), apresentou um teor de EPS de ca. 0,18 g/L. Desta forma, e apesar das diferenças em termos de condições de crescimento, os resultados obtidos para *C. amblystomatis* são largamente superiores aos revelados pela *Chlorella* sp. no estudo acima referido. No entanto, no trabalho realizado por Hussen [57], utilizando *C. vulgaris* (cultivada em condições autotróficas com meio de cultura MNB, a 6410 lux e um fotoperíodo de 24:0 h luz:escuro) verificou-se a ausência destas biomoléculas no meio de cultura. Contudo, foi detetada a presença de nPS no meio de cultura não inoculado, representando ca. 0,874 mg/mL. Neste sentido, a possível existência de polissacáridos no meio de cultura sem inóculo poderá ser uma justificação para os elevados teores em nPS obtidos no presente trabalho.

Por fim, analisando os teores em proteína total, verificou-se que o sobrenadante direto **AT_C2** apresentou a maior concentração destas biomoléculas ($0,18 \pm 0,01$ mg/mL) e, ainda, que os sobrenadantes diretos referentes à condição de *stress* levaram à excreção de um maior teor de proteínas face aos respetivos controlos. Analisando agora os resultados após aplicação de precipitações alcoólicas, um teor máximo destas biomoléculas em **Eti_C2** ($0,18 \pm 0,00$ mg/mL). Constata-se ainda que as condições de *stress* apresentaram teores superiores de proteína total comparativamente aos respetivos controlos. Contudo, a aplicação de precipitações alcoólicas pode levar à

desnaturação de proteínas podendo, estas, não ser detetadas pelo método colorimétrico de Bradford.

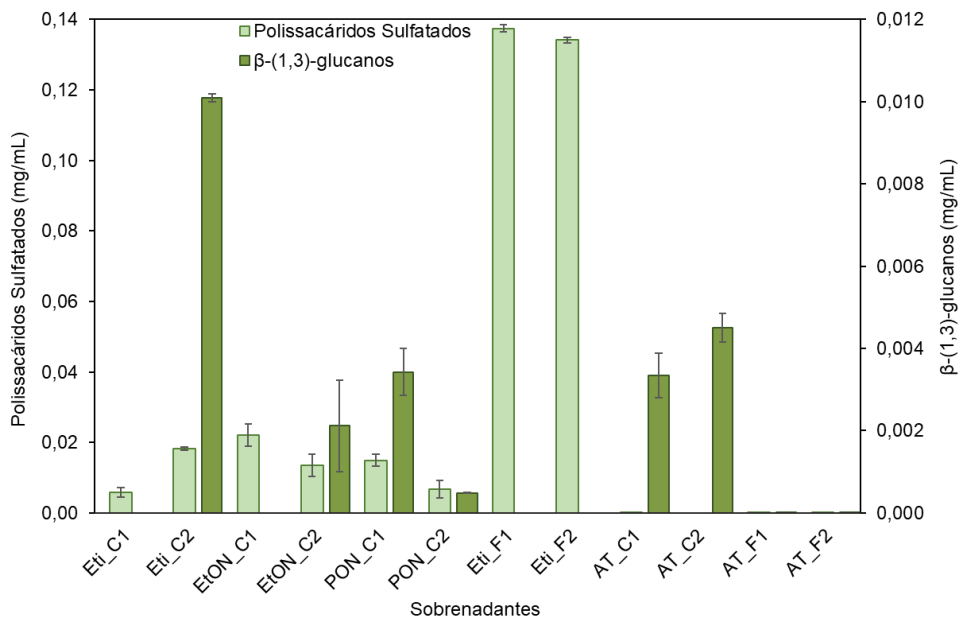


Figura 29 – Teores de polissacáridos sulfatados e β-(1,3)-D-glucanos, nos sobrenadantes diretos (**AT_C** e **AT_F**) e nos sobrenadantes sujeitos a precipitações alcoólicas (**Eti**, **EtON** e **PON**).

Pela análise da Figura 29 verifica-se que os sobrenadantes diretos, regra geral, não apresentaram teores significativos de sPS e β-glucanos. O teor máximo obtido de β-(1,3)-glucanos foi de $0,005 \pm 0,000$ mg/mL no sobrenadante direto **AT_C2**. Após aplicação das diversas condições de precipitação aos sobrenadantes do ensaio **AT_C**, verificou-se que apenas a condição **Eti_C2** permitiu a concentração β-(1,3)-glucanos ($0,010 \pm 0,000$ mg/mL). Nas condições de controlo **Eti_C1**, **EtON_C1**, **Eti_F1** e **F2** não foram detetados β-glucanos. Relativamente a sPS, a aplicação de precipitações alcoólicas permitiu a sua concentração, tendo-se obtido um teor máximo destas biomoléculas de ca. $0,13 \pm 0,00$ mg/mL em **Eti_F**, substancialmente superior aos teores obtidos no ensaio realizado em **AT_C**.

Posteriormente, aplicou-se o método da extração alcoólica anteriormente selecionado aos ensaios heterotróficos **HTN**, **HTA** e **HTU**. Após a adição do etanol, verificou-se a formação de um precipitado branco apenas no sobrenadante do ensaio **HTA**. Nos sobrenadantes dos restantes ensaios não foi observada a formação de precipitado tendo, as soluções, permanecido translúcidas e transparentes. Foi obtida uma massa de precipitado de **HTA** superior às alcançadas para os ensaios autotróficos.

De forma análoga, após dissolução dos EPS, procedeu-se à quantificação de diversas biomoléculas, cujos resultados se apresentam na Figura 30.

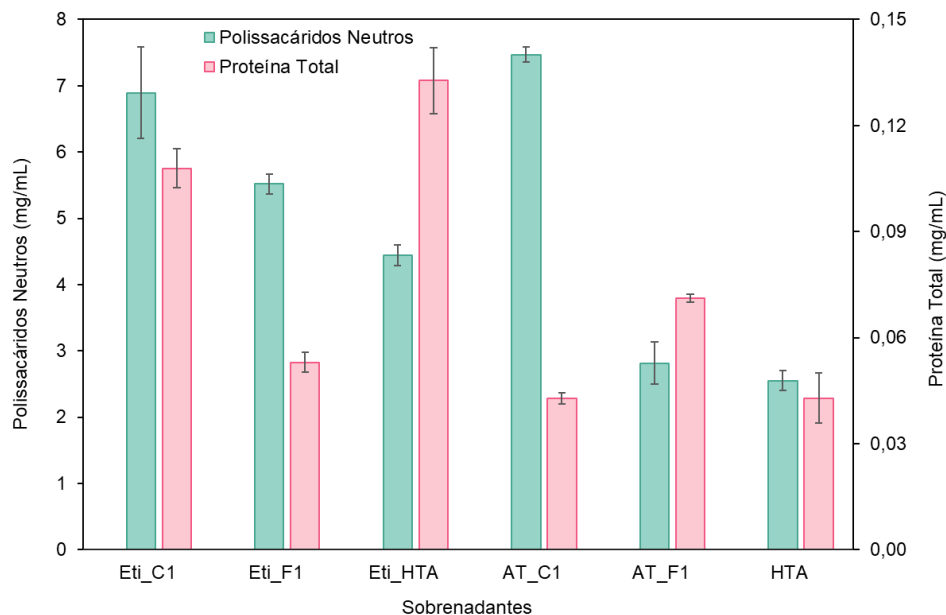


Figura 30 – Teores de polissacáridos neutros e proteína total nos sobrenadantes diretos e nos sobrenadantes sujeitos à condição de precipitação **Eti** (EtOH 90%, extração imediata), dos ensaios autotróficos de controlo (**AT_C1** e **AT_F1**) e do ensaio heterotrófico com amónia como fonte de N (**HTA**).

Pela análise da figura acima é possível observar que o meio de cultura do ensaio **HTA** foi o que apresentou menores teores em nPS ($2,55 \pm 0,15$ mg/mL) e em proteína total ($0,04 \pm 0,011$ mg/mL). Após aplicação do método de precipitação, este ensaio apresentou o teor máximo de proteína total ($0,13 \pm 0,02$ mg/mL) face aos controlos dos ensaios autotróficos (**Eti_C1** e **Eti_F1**). Constatou-se ainda o aumento do teor e nPS em **Eti_HTA** ($4,44 \pm 0,15$ mg/mL) face ao respetivo sobrenadante direto (**HTA**).

Os ensaios heterotróficos **HTN** e **HTU** não apresentaram uma precipitação significativa de biomoléculas após a adição de etanol. No entanto, o crescimento em condições heteortróficas requer a adição de uma fonte de carbono orgânica. A presença desta fonte de carbono no meio de cultura pode promover o aumento da síntese de polissacáridos intracelulares, mas também de exopolissacáridos. Um estudo realizado por Cheirsilp, Mandik e Prasertsan [143], avaliou a produção de EPS pela microalga *Chlorella* sp. em heterotrofia (meio de cultura BG11 e glucose como fonte de carbono) e autotrofia (meio de cultura BG11, intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ e um fotoperíodo de 16:8 h luz:escuro) tendo-se obtido o dobro do teor de EPS em condições

heterotróficas (ca. 0,36 g EPS/L). No entanto, tal não se verificou nas culturas **HTN** e **HTU**.

Uma vez que um dos objetivos, nesta fase do trabalho, estava relacionado com o isolamento de EPS, foram testados dois métodos de desproteinização: o método enzimático (**E**), usando papaína, e o método Sevage (**S**), uma vez que o método convencional da precipitação alcoólica permite, não só, a precipitação de exopolissacáridos, mas também de proteínas e ácidos nucleicos. Ambos os métodos foram aplicados às condições de precipitação **Eti** e **PON** e aos sobrenadantes diretos. Posteriormente foram avaliados os conteúdos em nPS e proteína total após desproteinização (Figura 31), de forma a avaliar a eficácia dos métodos aplicados.

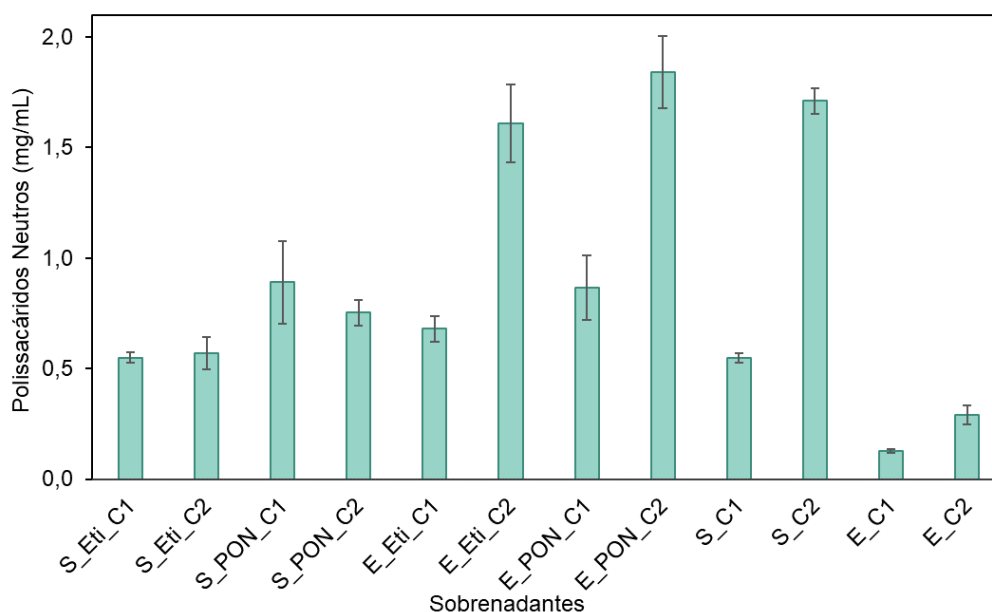


Figura 31 – Teores de polissacáridos neutros nos sobrenadantes autotróficos **AT_C1** e **AT_C2** diretos e sujeitos a precipitações alcoólicas, após aplicação dos métodos de desproteinização enzimático (**E**) e Sevage (**S**).

Após aplicação dos métodos de desproteinização, não foram detetados teores em proteína total, como seria expectável. No entanto, verificou-se, também, uma perda significativa do conteúdo de nPS em todos os sobrenadantes sujeitos a desproteinização (*vide* Figura 28). O teor de nPS máximo obtido após desproteinização foi de $1,71 \pm 0,06$ mg/mL no sobrenadante direto **S_C2** e $1,84 \pm 0,16$ mg/mL no sobrenadante **E_PON_C2**.

Após análise dos resultados obtidos antes e depois da aplicação dos métodos de desproteinização aos sobrenadantes sujeitos a precipitação alcoólica, verificou-se que,

em média, a perda do conteúdo de nPS ronda os 91% após aplicação do método Sevage e os 85% para o método enzimático. Relativamente à aplicação destes métodos aos sobrenadantes diretos, a perda de nPS foi de, aproximadamente, 76% e 95% para os métodos Sevage e enzimático, respetivamente. A perda de polissacáridos devida à aplicação destes métodos seria expectável. Um estudo realizado por Chen *et al.* [81] obteve uma perda de polissacáridos de ca. 35,6 e 24,5% após aplicação dos métodos Sevage e enzimático, respetivamente, a uma solução de polissacáridos (obtidos por extração etanólica). A aplicação de tratamentos químicos agressivos a soluções ricas em polissacáridos pode, não só, levar à perda de biomoléculas, mas também à perda de bioatividade.

A fim de quantificar compostos fenólicos e flavonoides extracelulares no meio de cultura, foram utilizados, mais uma vez, os métodos do Folin-Ciocalteu e do cloreto de alumínio, respetivamente. Os resultados obtidos, antes e após aplicação das diversas condições de precipitação aos ensaios autotróficos apresentam-se na figura abaixo.

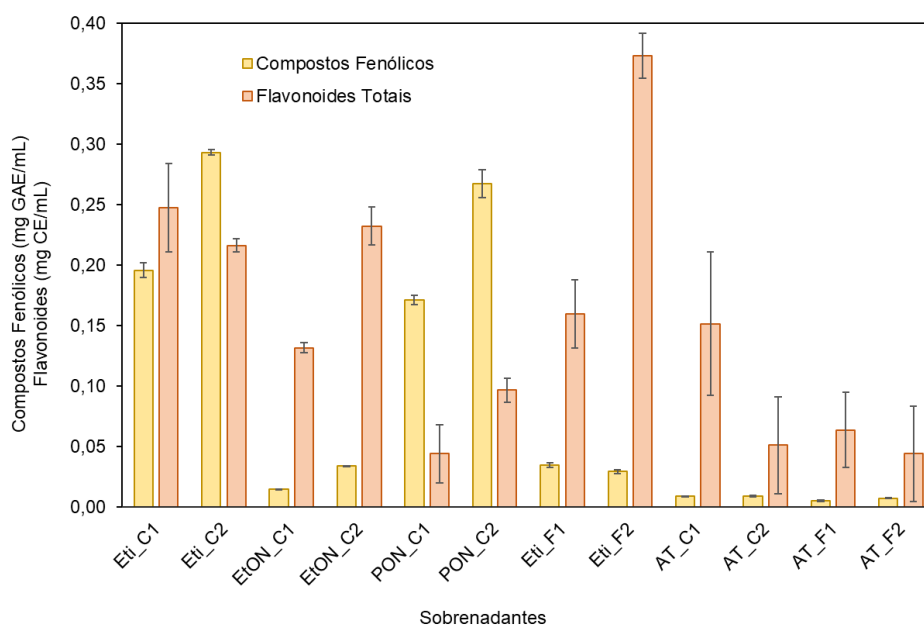


Figura 32 – Teores de compostos fenólicos e flavonoides totais nos sobrenadantes diretos (**AT_C** e **AT_F**) e nos sobrenadantes sujeitos a precipitações alcoólicas (**Eti**, **EtON** e **PON**).

Na Figura 32 pode observar-se que o teor máximo de flavonoides nos sobrenadantes diretos foi de $0,15 \pm 0,06$ mg CE/mL em **AT_C1**. No entanto, constata-se que todos os sobrenadantes diretos apresentaram concentrações semelhantes de polifenóis (ca. $0,01 \pm 0,00$ mg GAE/mL). É ainda possível verificar que

os sobrenadantes diretos dos ensaios de controlo apresentam conteúdos de flavonoides superiores à condição de *stress*.

Regra geral, após aplicação dos métodos de precipitação, foi possível concentrar ambas as biomoléculas. Analisando as condições de precipitação empregues nos ensaios **AT_C1** e **AT_C2**, a condição **Eti** foi a que permitiu a obtenção de conteúdos mais elevados das biomoléculas em estudo. O teor máximo em compostos fenólicos foi de $0,29 \pm 0,00$ mg GAE/mL em **Eti_C2**. Já o teor máximo de flavonoides corresponde ao ensaio **Eti_F2** ($0,37 \pm 0,03$ mg CE/mL). Constata-se ainda que os ensaios **Eti_F1/F2** apresentaram conteúdos de compostos fenólicos largamente inferiores (ca. $0,03 \pm 0,00$ mg GAE/mL) aos dos ensaios **Eti_C1/C2**.

4.3.1. Propriedades Antioxidantes

A atividade antioxidante total dos meios de cultura, após separação da biomassa, com e sem aplicação de precipitação alcoólica, foi determinada utilizando ao método do radical ABTS. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 33.

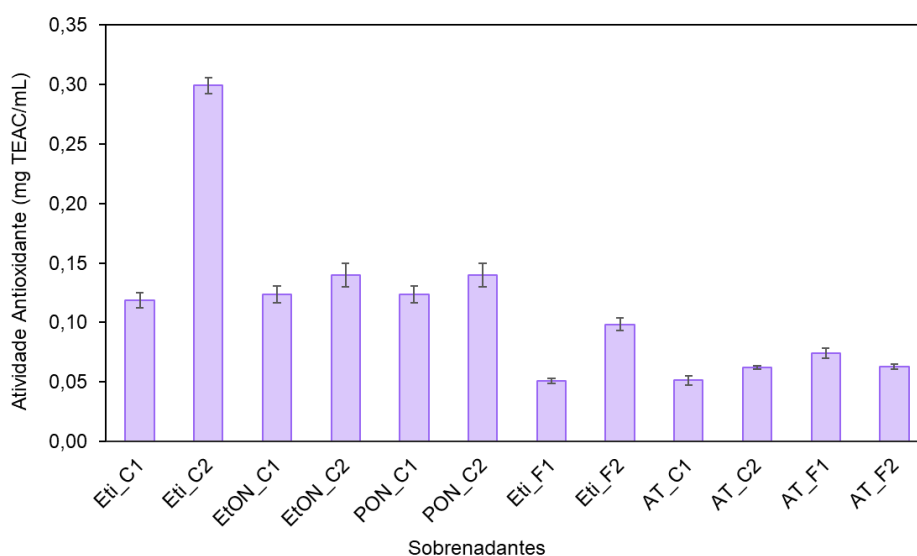


Figura 33 – Atividade antioxidante total (mg TEAC/mL), determinada pelo método do radical ABTS, dos meios de cultura após separação da biomassa desenvolvida em condições autotróficas (**AT_C** e **AT_F**) com e sem aplicação de precipitação alcoólica.

Segundo a figura acima é possível observar que o sobrenadante direto que exibiu maior atividade antioxidante foi o **AT_F1** ($0,07 \pm 0,00$ mg TEAC/mL). Analisando os meios após precipitação alcoólica, a condição **Eti_C2** apresentou a maior capacidade

antioxidante, de $0,30 \pm 0,01$ mg TEAC/mL. Esta condição de precipitação apresentou também o teor mais elevado em compostos fenólicos, β -(1,3)-glucanos e proteína total.

Verificou-se ainda que, regra geral, após precipitação alcoólica, ocorreu um aumento da capacidade antioxidante, sendo possível inferir que a aplicação destas condições conduz ao isolamento de biomoléculas com este tipo de bioatividade.

4.4. Fracionamento de Biomoléculas por Cromatografia de Troca Iónica

Após a análise dos conteúdos de polissacáridos intra e extracelulares produzidos pela microalga *C. amblystomatis* nas diversas condições de crescimento, procedeu-se ao fracionamento de 2 extratos de MAE: **AT_F1** e **AT_C2**, uma vez que apresentaram o maior conteúdo em polissacáridos neutros.

A cromatografia foi acompanhada através da quantificação de nPS (método de fenol-ácido sulfúrico), de proteína total (método do Bradford) e de compostos fenólicos (método do Folin-Ciocalteu) nas diversas frações. Os respetivos cromatogramas encontram-se abaixo apresentados.

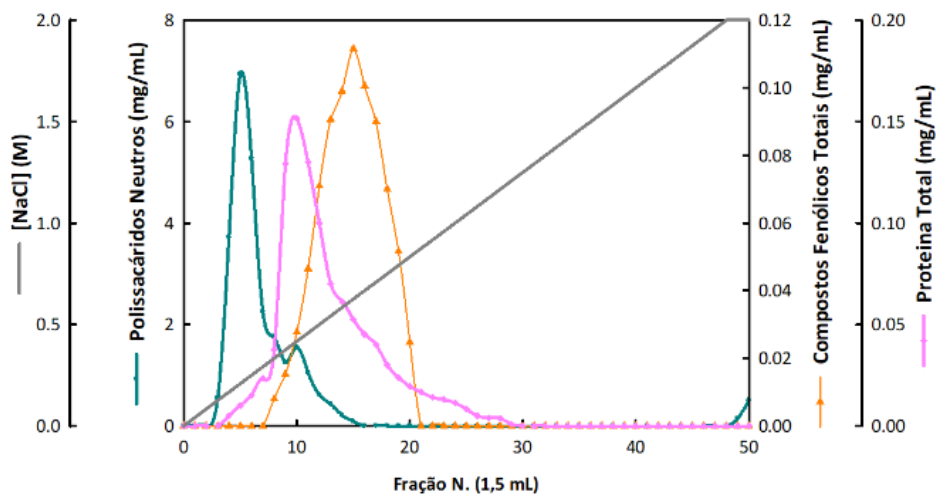


Figura 34 – Cromatograma do extrato **AT_F1** proveniente de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min), obtido numa coluna de resina DEAE-52, com um gradiente de concentração de NaCl 0-2 M, acordo com os Materiais e Métodos.

Pela análise do perfil cromatográfico das biomoléculas em estudo, é possível constatar que os nPS começaram a ser eluídos com NaCl 0,17 M. É ainda possível observar que as frações (F) 4 a 8 são as mais concentradas nestas biomoléculas, atingindo uma concentração de 6,94 mg /mL. A partir da F8, a concentração de polissacáridos neutros diminui, terminando quando a concentração de NaCl atinge os

0,67 M. Já a eluição das proteínas inicia-se com NaCl 0,17 M e termina a NaCl 1 M, sendo as frações 9, 10 e 11 as mais concentradas, atingido um teor máximo de 0,15 mg/mL de proteína total. Por fim, os compostos fenólicos totais foram eluídos numa gama de concentração de NaCl entre os 0,33 e 0,83 M e o conteúdo máximo, de 0,11 mg/mL, ocorreu na F15.

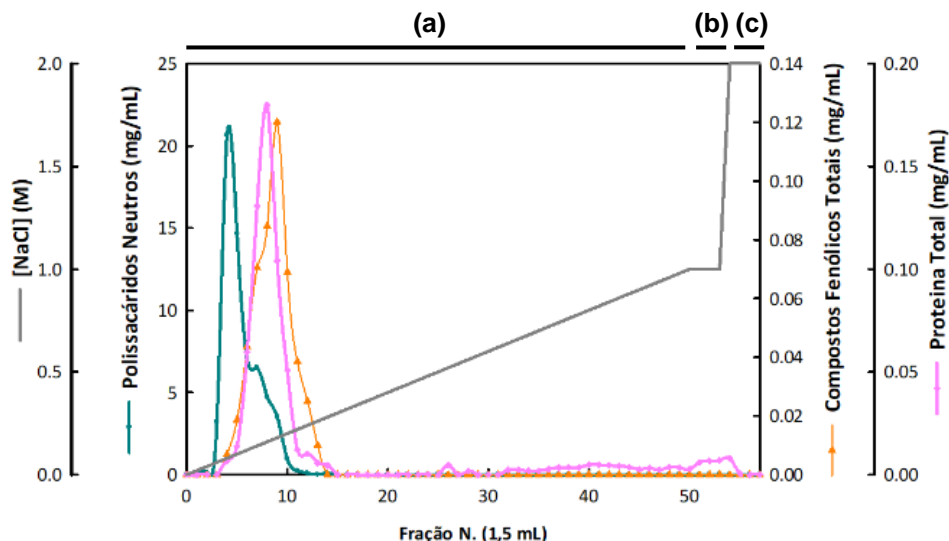


Figura 35 – Cromatograma do extrato **AT_C2** proveniente de MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min), obtido numa coluna de resina DEAE-52. *Sistema eluente*: (a) 0-50 gradiente de NaCl 0-1M; (b) 51-53 NaCl 1M; (c) 54-57 NaCl 2M de acordo com os Materiais e Métodos.

Segundo a Figura 35, referente ao extrato de MAE **AT_C2**, é possível observar que os nPS começaram a ser eluídos logo na 1ª fração. A concentração máxima destas biomoléculas foi de 20,6 mg/mL, atingida em F4 e com uma concentração de NaCl de 0,08 M. A eluição destas moléculas terminou na fração 14, que corresponde a uma concentração de NaCl de 0,28 M. Em termos de proteína total, verifica-se que a sua eluição teve também início no princípio da cromatografia (F4), tendo o seu teor máximo sido atingido em F8 (0,18 mg proteína total/mL), a uma concentração de 0,16 M de sal. Entre as frações 50 e 54, correspondentes a NaCl 1M, verificou-se, novamente, a eluição de proteínas. Os polifenóis totais começaram a ser eluídos da coluna a uma concentração de NaCl de 0,08 M (F4), terminando a 0,26 M (F13). A concentração máxima obtida foi de 0,12 mg GAE/mL (F8), com NaCl 0,18 M.

4.5. Análise de Biomoléculas por Eletroforese

Com o objetivo de caracterizar os polissacáridos isolados por cromatografia de troca iônica a partir do extrato **MAE_AT_F1**, recorreu-se a técnicas eletroforéticas PAGE, aplicando-se diferentes métodos de coloração.

Inicialmente realizaram-se duas corridas eletroforéticas conforme descrito em 3.3.5 em Materiais e Métodos, utilizando os corantes azul de toluidina e *stains all* na coloração dos géis obtidos, conforme ilustrado nas Figuras 37 e 38, que se apresentam de seguida.

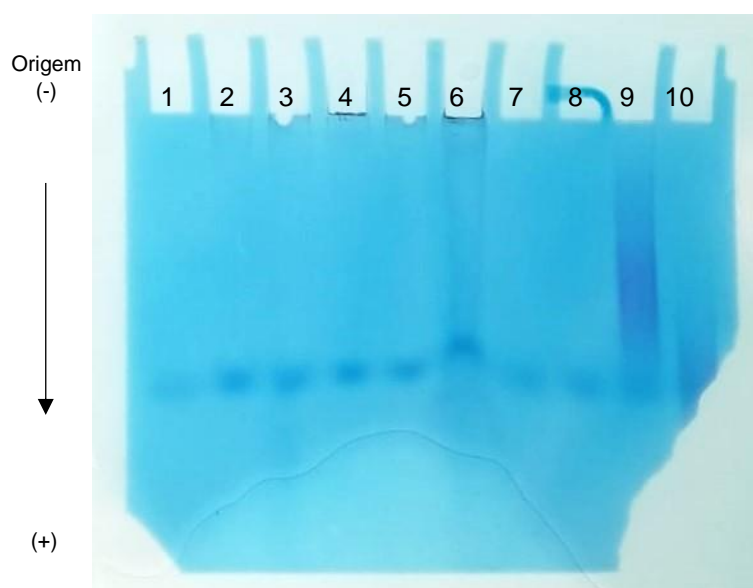


Figura 36 – Eletroforese em gel de poli-acrilamida 6%, em tampão TBE 1 mM (pH 8,4), a 100 V/45 min/corado com azul de toluidina 0,1% (m/V): **1** – F4 (74,4 µg/poço), **2** – F6 (105,4 µg/poço), **3** – F7 (45 µg/poço), **4** – *Pool_AT_F1* (75 µg/poço), **5** – F8 (35,2 µg/poço), **6** – extrato de MAE AT_F1 (799,4 µg/poço), **7** – dextrano 70 kDa (20 µg/poço), **8** – dextrano 100 kDa (20 µg/poço), **9** – sulfato de dextrano 40 kDa (20 µg/poço), **10** – heparina de mucosa intestinal suína 17 kDa (20 µg/poço).

O corante catiónico azul de toluidina permite corar ácidos nucleicos (macromoléculas aniónicas) em tons de azul, enquanto sPS são corados em tons de roxo/rosa. No entanto, este corante não apresenta especificidade para polissacáridos não sulfatados e proteínas ácidas [132].

A Figura 36 sugere a existência de uma banda no poço 6, referente à amostra **MAE_AT_F1**, perto dos 40 kDa. Esta banda pode ser associada à existência de sPS, uma vez que o azul de toluidina apresenta especificidade para estas biomoléculas. No entanto, todos os poços apresentam bandas perto dos 40 kDa, podendo estas corresponder à frente de migração.

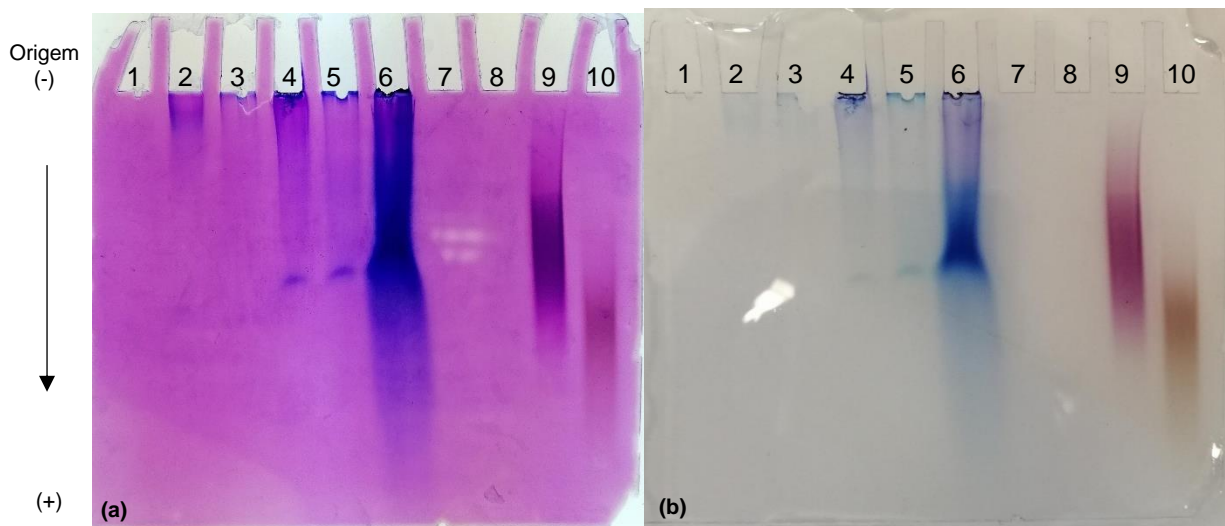


Figura 37 – Electroforeses em gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1 mM (pH 8,4), a 100 V/45 min/corado com *stains all* 0,5% (m/V): **1** – F4 (74,4 µg/poço), **2** – F6 (105,4 µg/poço), **3** – F7 (45 µg/poço), **4** – *Pool_AT_F1* (75 µg/poço), **5** – F8 (35,2 µg/poço), **6** – extrato de MAE_AT_F1 (799,4 µg/poço), **7** – dextrano 70 kDa (40 µg/poço), **8** – dextrano 100 kDa (40 µg/poço), **9** – sulfato de dextrano 40 kDa (10 µg/poço), **10** – heparina de mucosa intestinal suína 17 kDa (10 µg/poço). **(a)** 20 minutos após aplicação da solução de descoloração; **(b)** 48h após aplicação da solução de descoloração.

Analisando a Figura 37, é possível observar bandas nos poços referentes às amostras F6 (poço 2), ***Pool_AT_F1*** (poço 4), F8 (poço 5) e ao extrato ***MAE_AT_F1*** (poço 6). O marcador sulfato de dextrano (poço 9) apresentou coloração rosa e a heparina coloração amarela (poço 10), como seria expectável, tendo em conta que o corante catiónico *stains all* apresenta a vantagem de corar diversos tipos de biomoléculas com uma coloração específica, em gel de poliacrilamida, e é mais sensível [132]. O 2º poço (Figura 38-(a)) exibe uma banda de coloração azul com massa molecular superior ao marcador sulfato de dextrano (40 kDa). O ***Pool_AT_F1*** (composto por F4, F6, F7 e F8) e a F8 apresentam bandas com mobilidade relativa semelhante, entre os 40 kDa e os 17 kDa, de coloração azul. No entanto, a banda referente ao ***Pool*** apresentou uma coloração mais intensa que a fração F8. No extrato ***MAE_AT_F1*** foi visualizada uma banda entre os 40 kDa e os 17 kDa, de coloração azul intensa. Geralmente, o ácido hialurónico não sulfatado quando corado com *stains all* apresenta uma cor azul intensa. No entanto, moléculas como o DNA ou RNA podem apresentar colorações azul e azul arroxado, respetivamente. No caso de proteínas, estas podem ser visualizadas em azul, vermelho ou roxo, enquanto os aPS podem apresentar diversos tons, consoante o tipo de biomoléculas presente [132]. Neste sentido, é possível sugerir que o tipo de polissacáridos presentes no ***Pool_AT_F1*** possa não ser necessariamente igual aos presentes em F8, uma vez que os tons de azul são

diferentes. No entanto, é observável uma semelhança entre as colorações das amostras **Pool_AT_F1** e **MAE_AT_F1**, como expectável.

Numa tentativa de identificar outras biomoléculas presentes nas amostras já analisadas, nomeadamente proteoglicanos e glicosaminoglicanos, foi ainda testado o método de coloração combinado com azul de alciano seguido de nitrato de prata.

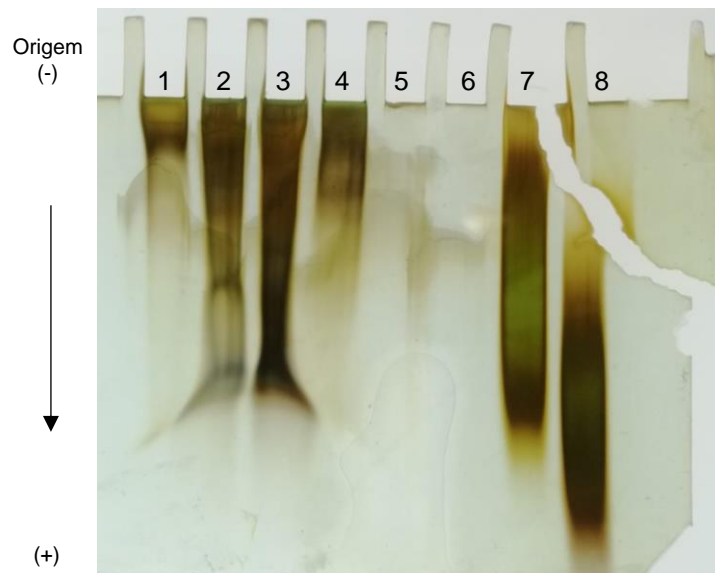


Figura 38 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1 mM (pH 8,4), a 100 V/45 min/corado com Azul de Alciano 0,125% (m/V)/Nitrato de Prata 0,4% (m/V):

1 – *Pool_AT_F1* (75 µg/poço), **2** e **3** – extrato de *MAE_AT_F1* (799,4 µg/poço), **4** – F8 (35,2 µg/poço), **5** – dextrano 70 kDa (80 µg/poço), **6** – dextrano 100 kDa (80 µg/poço), **7** – sulfato de dextrano 40 kDa (10 µg/poço), **8** – heparina de mucosa intestinal suína 17 kDa (10 µg/poço).

Pela análise da Figura 38 é possível visualizar a existência de bandas que não foram detetadas pelos métodos anteriormente mencionados. Verifica-se a presença de uma banda com massa molecular superior a 40 kDa no poço onde foi aplicado o **Pool_AT_F1**. Em relação ao extrato **MAE_AF_F1** (2º poço), visualizam-se 3 bandas: uma banda entre 17 e 40 kDa, uma banda próxima dos 40 kDa e, por fim, uma banda com massa molecular superior a 40 kDa. Na fração cromatográfica F8 (4º poço) poderá estar presente uma banda com massa molecular superior a 40 kDa.

Em suma, no gel corado com o corante *stains all* salienta-se a presença de aPS, como o ácido hialurónico e tal seria expectável, uma vez que o doseamento efetuado pelo método do carbazole – ácido sulfúrico apresentou resultados positivos para este tipo de biomoléculas. De forma análoga, o gel corado com azul de alciano/nitrato de prata também revela a presença de polissacáridos de diversos tamanhos moleculares,

como esperado, tendo em conta que neste trabalho foram detetados e quantificados nPS, aPS, β -D-glucanos e sPS. Contudo, o gel corado com azul de toluidina, sendo um método menos sensível, mostra-se inconclusivo, ainda que tenham sido quantificados sPS nos extratos de MAE de *C. amblystomatis*.

4.6. Atividade Antibacteriana

De forma a avaliar a potencial aplicação dos compostos sintetizados pela microalga verde *C. amblystomatis* como agentes antimicrobianos, foi estudada a atividade antibacteriana da fração F8 (fração com uma das maiores concentrações em nPS), proveniente do extrato de **MAE AT_F1** (vide Figura 39) contra as espécies *E. coli* (Gram negativa) e *S. aureus* (Gram positiva), através da técnica de difusão em disco, utilizando gentamicina como controlo positivo. Os resultados obtidos referentes à medição do diâmetro da zona de inibição encontram-se apresentados na Tabela 12.

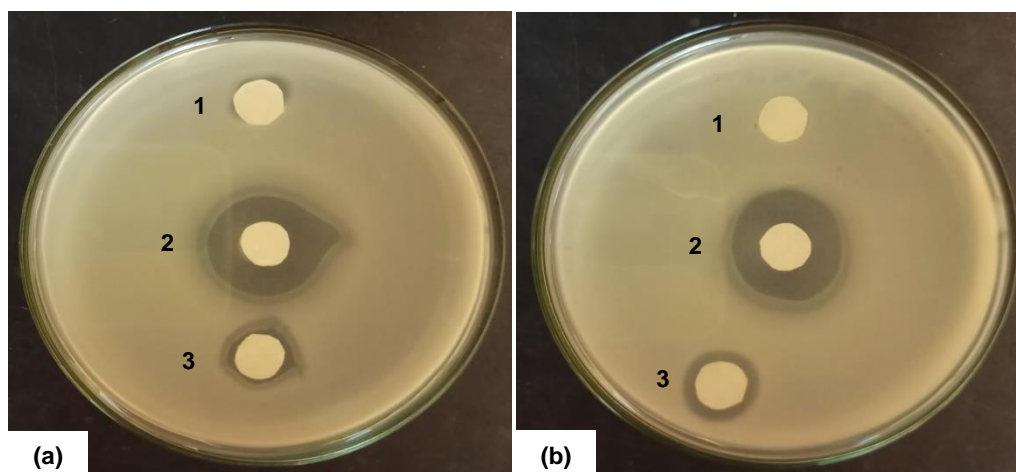


Figura 39 – Atividade antibacteriana contra as bactérias *Echerichia coli* ATCC25922 (a) e *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (b): 1 - H₂O, 2 - antibiótico gentamicina (10 mg/mL), 3 – F8 (1,76 mg nPS/mL) proveniente da MAE ao extrato **AT_F1** de *C. amblystomatis*.

Tabela 11 – Atividade antibacteriana da fração cromatográfica F8 (1,76 mg nPS/mL), da água (H₂O) e do antibiótico gentamicina (10 mg/mL) contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Composto	Zona de inibição (cm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
H ₂ O	0,00±0,00	0,00±0,00
Gentamicina (10 mg/mL)	2,8 ± 0,14	2,65±0,07
F8 (1,76 mg nPS/mL)	1,65±0,07	1,7±0,00

Nota: Fração cromatográfica F8 (1,76 mg/mL de polissacáridos neutros) provém do extrato MAE_AT_F1 de *C. amblystomatys*.

Pela análise da Tabela 12 é possível constatar que a fração 8 apresentou atividade antibacteriana contra ambas as bactérias (*E. coli* e *S. aureus*), exibindo uma inibição máxima de 1,7±0,00 cm para *S. aureus*. Esta fração (concentração de nPS de 1,76 mg/mL), apresentou zonas de inibição com um diâmetro de *ca.* de 58,9% (*E. coli*) e 64,2% (*S. aureus*) relativa à inibição do antibiótico gentamicina, de concentração superior (10 mg/mL).

4.7. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Na tentativa de caracterizar estruturalmente de forma parcial as biomoléculas presentes na biomassa e nos extratos obtidos no decorrer do trabalho experimental, foram traçados os espectros de infravermelho das seguintes amostras: biomassa dos ensaios autotróficos **AT_C** e **AT_F**; extratos de MAE com KOH 0,1 M (150 °C/30 min) dos ensaios **AT_C** e **AT_F**; extrato de MAE com etanol absoluto (120 °C/15 min) realizado à amostra **AT_C1**; extratos SE com etanol absoluto e *n*-hexano dos ensaios **AT_C1** e **AT_C2**; *pools* resultantes da cromatografia de troca iónica dos extratos **MAE_AT_F1** e **MAE_AT_C2**; EPS precipitados com etanol a 90% dos sobrenadantes dos ensaios **AT_C** e **AT_F**. Nas figuras seguintes encontram-se representados os espectros de FTIR obtidos para os diversos ensaios.

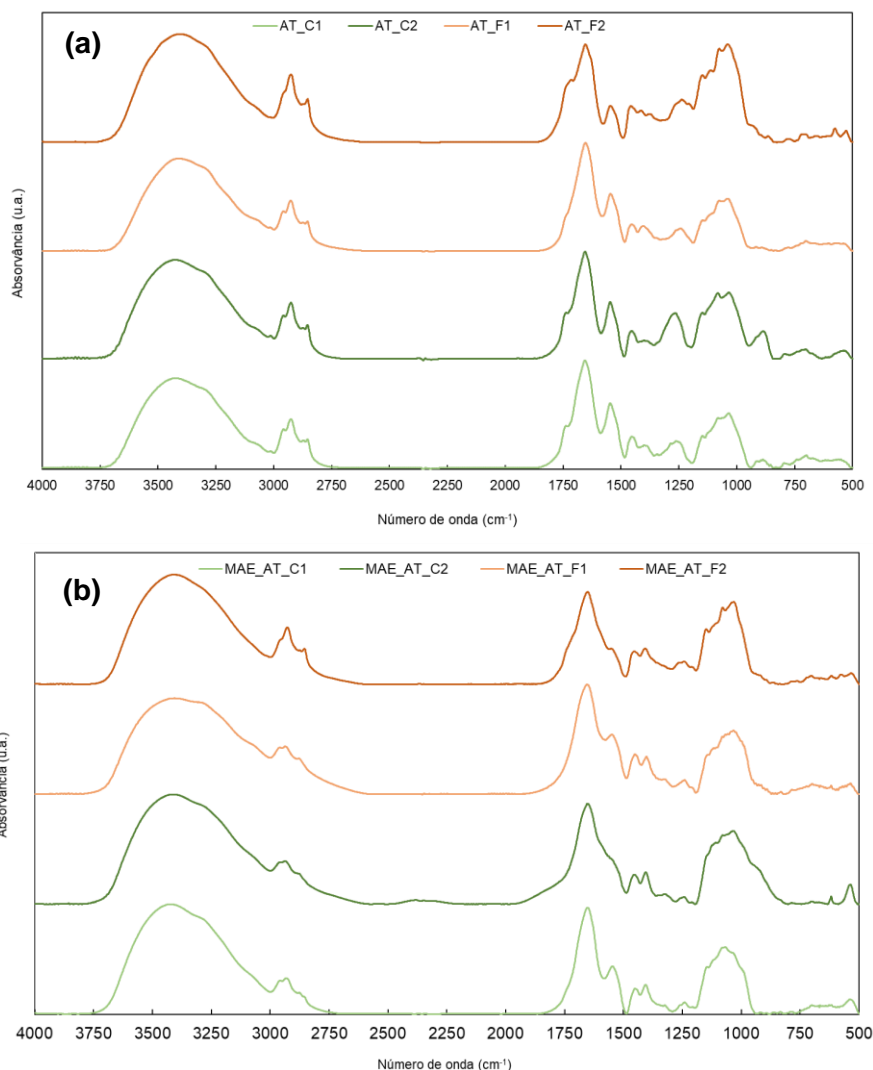


Figura 40 – Espectros de FTIR da biomassa liofilizada antes (a) e após (b) extração por MAE com KOH (0,1 M/120 °C/30 min) referentes aos ensaios autotróficos em reatores *de coluna de bolhas* (AT_C) e em frascos (AT_F) (pastilha de KBr).

Pela análise da Figura 40-(a) verifica-se que o perfil dos espectros das amostras dos ensaios autotróficos é bastante semelhante. É possível visualizar, entre os 3480 e os 3327 cm^{-1} , a presença de bandas intensas características da vibração de extensão do grupo OH de PS. As bandas presentes no intervalo 2965-2844 cm^{-1} podem representar as vibrações de extensão simétricas e assimétricas da ligação C-H dos grupos CH, CH₂ e CH₃ de PS e/ou lípidos. Entre os 1750 e os 1710 cm^{-1} visualiza-se a existência de uma pequena banda, que poderá estar relacionada com vibrações de extensão de grupos C=O e COO⁻ de PS ou de grupos C=O de lípidos (ésteres de colesterol e triglicéridos). Na região entre os 1440-1410 cm^{-1} encontram-se as bandas características da vibração de deformação de grupos CH₃, CH₂ e C-OH.

A visualização de bandas na região de *fingerprint* (1200-800 cm^{-1}) destacam a presença de polissacáridos nos extratos. Nas amostras liofilizadas **AT_C1** e **AT_C2** são, ainda, visualizadas bandas entre os 900 e os 860 cm^{-1} , indicando a possível presença de configurações α e β do carbono anomérico. Abaixo dos 800 cm^{-1} apresentam-se algumas bandas, correspondentes a vibrações do esqueleto carbonado de polissacáridos ou a bandas de deformação do CH_2 de lípidos.

A existência de sPS pode ser assinalada através da presença de um conjunto característico de bandas a 1270-1220 cm^{-1} e 1060-1010 cm^{-1} , correspondentes à extensão simétrica e assimétrica da ligação S=O, respetivamente, e ainda a 900-800 cm^{-1} , intervalo associada à vibração de extensão da ligação C–O–S, que pode indicar a ligação do grupo sulfonilo aos PS.

Em todas as amostras é possível visualizar a presença de bandas correspondentes à ligação C=O da amida I, entre os 1651 e os 1659 cm^{-1} , e da amida II, entre os 1541 e os 1543 cm^{-1} , características de proteínas.

A mesma análise pode ser feita aos extratos após MAE (Figura 40b), uma vez que apresentam comportamentos semelhantes. A diferença mais significativa entre as amostras pré e pós MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min) consiste no desaparecimento de uma banda de baixa intensidade entre 1750-1710 cm^{-1} nas amostras após extração.

Na Figura 41 encontram-se representados os espetros referentes aos extratos obtidos por SE realizada às amostras **AT_C1** e **AT_C2** e ao extrato MAE do ensaio **AT_C1**.

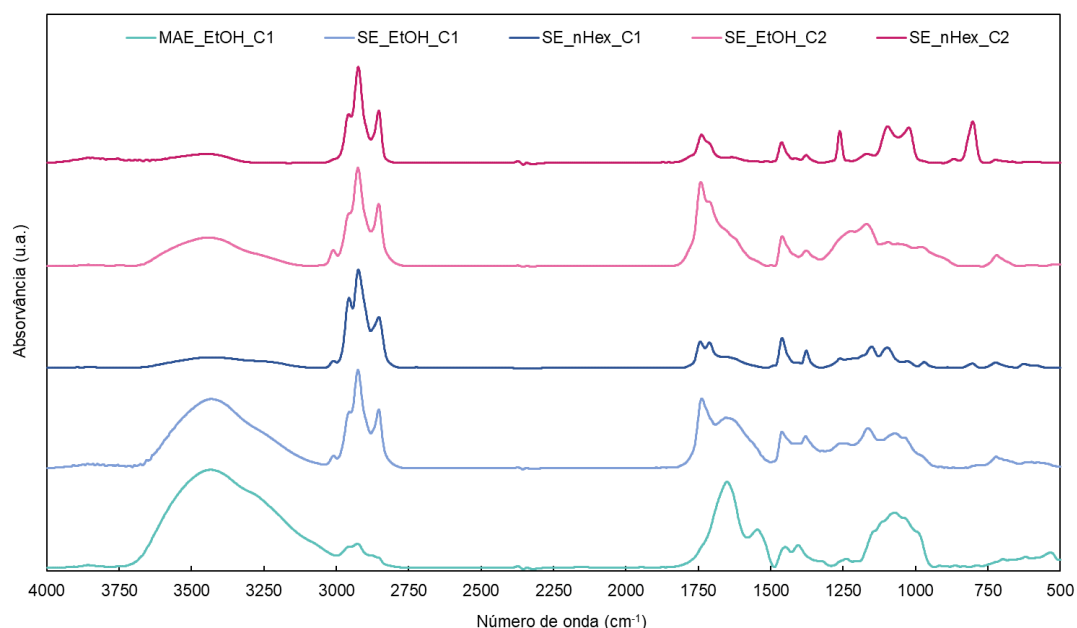


Figura 41 – Espetro de FTIR dos extratos de SE (Hex e EtOH/180 °C/6h) referentes aos ensaios autotróficos em coluna de bolhas (**AT_C1** e **AT_C2**) e do extrato de MAE (EtOH/150 °C/15 min) do extrato **AT_C1** (pastilha de KBr).

É possível verificar a existência da banda característica da vibração de extensão do grupo OH nos extratos etanólicos (**MAE_EtOH_C1**, **SE_EtOH_C1** e **SE_EtOH_C2**) na região espectral 3470-3232 cm^{-1} , evidenciando a possível existência de polissacáridos nestes extratos e/ou a existência de etanol residual. Constata-se que todos os extratos obtidos apresentam bandas com intensidade diferenciada no intervalo 2960-2840 cm^{-1} , associadas a diferentes vibrações de extensão, nomeadamente simétrica/assimétrica dos grupos CH/CH_2 e assimétrica dos grupos CH_3/CH_2 de lípidos. Em todos os extratos é visualizada uma banda na região 1468-1458 cm^{-1} , que pode corresponder à vibração de deformação de grupos CH_2 e C-OH de PS, ou a vibrações de deformação de grupos CH_2 e C-O-H de lípidos. Verifica-se também a existência de uma banda de baixa intensidade no intervalo 1380-1375 cm^{-1} , que poderá estar associada à vibração de extensão simétrica de grupos COO^- de ácidos gordos ou à vibração de deformação de grupos CH_3 de lípidos ou, então, a vibrações de deformação de grupos $\text{CH}_2/\text{C-OH}$. O espectro do extrato **SE_Hex_C2** revela uma banda bem definida a 1266 cm^{-1} , podendo ser associada à vibração de deformação de grupos CH_2 (simetria local) e deformações C-OH ou a vibrações de extensão simétrica de grupos S=O. Com exceção do extrato **SE_EtOH_C2**, todas as amostras apresentam bandas entre os 1172 e 1032 cm^{-1} , geralmente associadas à vibração de extensão de grupos C-O de lípidos ou à região de *fingerprint* de polissacáridos.

Nos extratos SE são ainda observadas bandas entre os 1748 e os 1745 cm^{-1} , podendo ser associadas à vibração de extensão do grupo C=O de ésteres de triglicéridos e bandas na região dos 1720-1708 cm^{-1} , possivelmente referentes à vibração de extensão do grupo C=O de ácidos gordos. Da análise do espectro relativo ao extrato **MAE_EtOH_C1** poder-se-á inferir a presença de proteínas, uma vez que são visualizadas as bandas da amida I (1638 cm^{-1}) e II (1533 cm^{-1}).

Na Figura 42 encontram-se representados os espectros de infravermelho dos EPS precipitados com 3 volumes de etanol 90% **Eti_C1/C2F1/F2**.

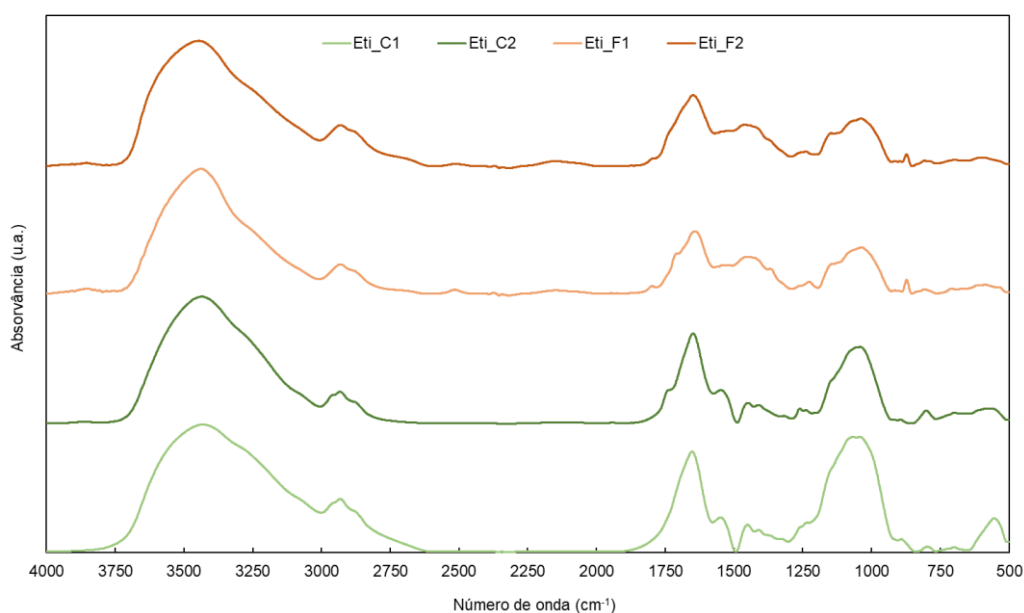


Figura 42 – Espectro de FTIR dos EPS precipitados (**Eti**; EtOH 90%/extração imediata) dos ensaios autotrófico em coluna de bolhas (**AT_C**) e em frascos (**AT_F**) (pastilha de KBr).

De um modo geral, verifica-se que todos os espectros apresentam comportamentos semelhantes. Entre os 3600 e os 3250 cm^{-1} é possível visualizar a banda correspondente à vibração de extensão do grupo OH, bem como a presença de bandas associadas a vibrações de extensão de grupos CH e CH₂ na região 2950-2861 cm^{-1} , podendo ser indicativas da presença de polissacáridos. No intervalo 1462-1410 cm^{-1} é possível observar a presença de bandas de baixa intensidade, possivelmente relacionadas com a vibração de deformação de grupos CH₂/CH₃ e deformações da ligação C-OH de PS. A banda presente entre os 1090 e os 990 cm^{-1} está associada à vibração de extensão assimétrica de ligações S=O de sPS. Por fim, visualiza-se ainda uma banda de baixa intensidade na região dos 870 cm^{-1} , associada à configuração α e β do carbono anomérico, bem como a presença de uma banda, especialmente nos EPS

da amostra **AT_C1**, no intervalo 575-530 cm^{-1} , associada à presença de conformação β de PS ou a vibrações do esqueleto carbonado, características de PS.

A presença de proteínas nas amostras analisadas pode ser detetada pela presença das bandas da ligação C=O da amida I (1600-1700 cm^{-1}) e da amida II (1480-1575 cm^{-1}).

A Figura 43 permite comparar os espectros do extrato de MAE do ensaio **AT_F1** com o respetivo **Pool_AT_F1**, resultante do fracionamento do extrato obtidos por cromatografia de troca iónica.

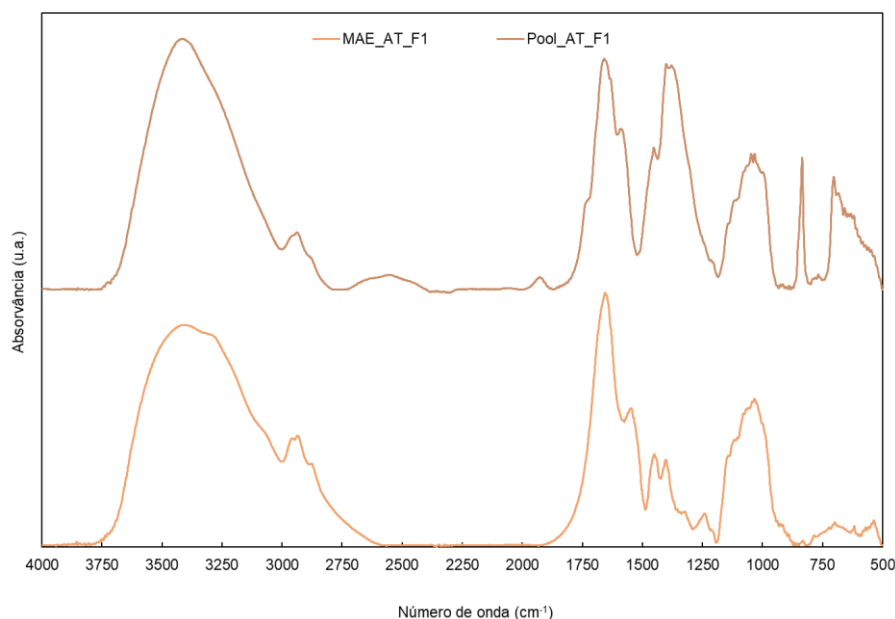


Figura 43 – Espectros de FTIR do extrato de MAE (KOH 0,1 M/150 °C/30 min) do ensaio **AT_F1** e do respetivo **Pool_AT_F1** concentrado em polissacáridos, obtido por cromatografia de troca iónica (pastilha de KBr).

Em ambos os espectros é observável a presença da banda característica da vibração de extensão do grupo OH de PS, entre 3470 e os 3340 cm^{-1} , bem como bandas correspondentes a vibrações de extensão simétrica/assimétrica de grupos CH e CH_2 , no intervalo 2955-2849 cm^{-1} . Na região espectral entre 1450-1365 cm^{-1} , salienta-se a existência de bandas, mais evidentes no **Pool_AT_F1**, correspondentes à vibração de deformação de grupos CH_2 e C-OH. Na região dos 1075 a 1017 cm^{-1} constata-se, ainda, a existência de uma banda comum a ambos os espectros, referente à região de *fingerprint* de polissacáridos. A presença das bandas anteriormente mencionadas podem indicar a presença destas biomoléculas nas referidas amostras, estando de acordo com os doseamentos efetuados. O **Pool_AT_F1** apresenta uma

banda bem definida aos 840 cm^{-1} , característica da vibração de extensão da ligação C-O-S, e de bandas no intervalo espectral $710\text{-}670\text{ cm}^{-1}$, associadas a vibrações do esqueleto carbonado ou à presença de PS com conformação β .

A presença de bandas nos intervalos $1667\text{-}1632$ e $1595\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$, referentes às ligações C=O das amidas I e II, respetivamente, indicam a contaminação do **Pool_AT_F1** com proteínas.

Pela análise da Figura 44 é possível comparar o extrato **MAE_AT_C2** com o respetivo *Pool* resultante da aplicação do extrato a uma coluna de cromatografia de troca iónica.

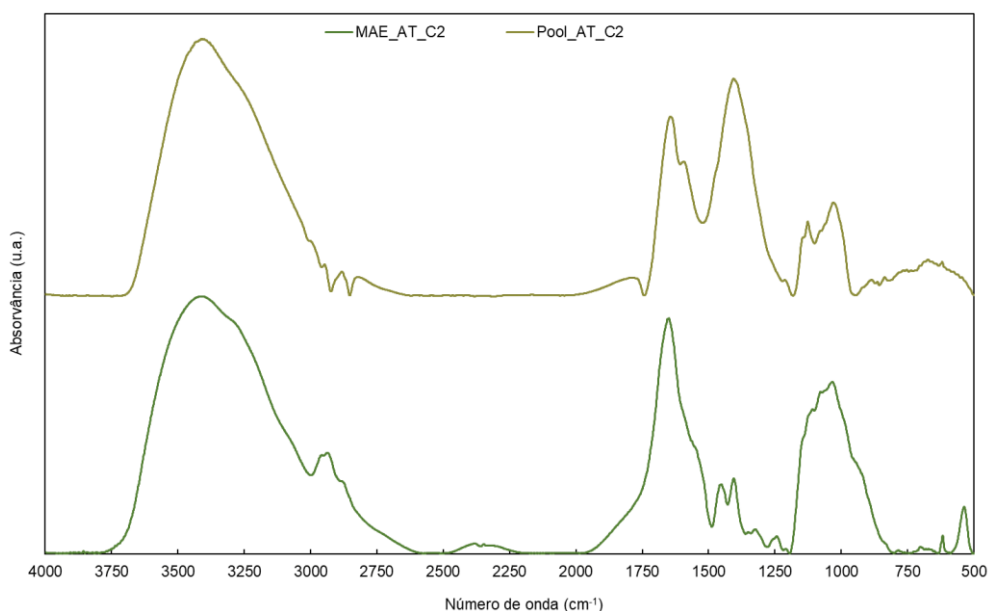


Figura 44 – Espectros de FTIR do extrato de MAE (KOH 0,1 M/150 °C/30 min) do ensaio **AT_C2** e do respetivo *Pool* concentrado em polissacáridos, obtido por cromatografia de troca iónica (pastilha de KBr).

Ambos os extratos apresentam a banda característica da vibração de extensão do grupo OH, entre os 3490 e os 3330 cm^{-1} , assim como a presença de bandas a $1645\text{-}1633\text{ cm}^{-1}$ e a $1586\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$, identificadas como bandas C=O de amida I e II respetivamente, associadas a proteínas. Na região espectral dos 1395 cm^{-1} salienta-se a existência de uma banda bem definida na amostra **Pool_AT_C2**, que poderá corresponder a vibrações de deformação dos grupos CH_2 e C-OH e, ainda, bandas a 1131 e 1018 cm^{-1} , geralmente associadas à região de *fingerprint* de polissacáridos.

Em suma, é possível constatar que os resultados obtidos pela análise dos espectros de FTIR se encontram concordantes com os doseamentos efetuados às diferentes

Resultados e Discussão

amostras, sendo identificáveis diversas biomoléculas, nomeadamente diferentes tipos de polissacáridos.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho final de mestrado teve como objetivo produzir e caracterizar compostos de valor acrescentado sintetizados pela microalga verde *Chlorococcum amblyostomatis* em diversas condições, nomeadamente e condições autotróficas (**AT**), com (**2**) e sem (**1**) indução de *stress* (privação de NO_3^-) em reatores distintos (reator de coluna de bolhas (**C**) e frascos (**F**)), e em condições heterotróficas (**HTN**).

Após análise dos resultados obtidos relativos à extração de moléculas intracelulares, verificou-se que o ensaio autotrófico realizado em frascos (**AT_F**) apresentou conteúdos de biomoléculas superiores ao ensaio efetuado em coluna de bolhas (**AT_C**). Constatou-se que condição **AT_F1** apresentou o teor máximo de nPS ($399,75 \pm 9,64$ mg/g biomassa), semelhante ao apresentado por **AT_C2**, bem como um dos teores mais elevados em aPS ($180,65 \pm 2,76$ mg/g biomassa) e compostos fenólicos ($15,83 \pm 0,35$ mg/g biomassa). O ensaio **AT_F2** apresentou, regra geral, os teores máximos em aPS ($193,27 \pm 0,89$ mg/g biomassa), β -(1,3)-D-glucanos ($1,60 \pm 0,00$ mg/g biomassa), proteína total ($67,27 \pm 2,53$ mg/g biomassa), compostos fenólicos ($16,17 \pm 0,24$ mg/g biomassa) e flavonoides ($7,28 \pm 0,03$ mg/g biomassa). Contudo, a agitação/arejamento neste tipo de reator foi ineficiente, tendo-se verificado a sedimentação da biomassa. Tal pode ter constituído uma fonte adicional de *stress*, o que poderá ter influenciado os resultados obtidos.

Os resultados obtidos para o reator de coluna de bolhas sugerem que a indução de *stress* (privação de NO_3^-) promove a síntese de nPS, aPS e β -(1,3)-D-glucanos e o ligeiro aumento de compostos fenólicos, mas também a diminuição do teor de proteína total. Conclui-se ainda que o seu *design* demonstrou ser o mais indicado, providenciado uma agitação/arejamento eficientes e, conseqüentemente, uma exposição adequada da cultura celular à radiação e aos nutrientes.

Comparando o crescimento em autotrofia (**AT_C1**) e heterotrofia (**HTN**), é possível constatar que o ensaio **HTN** teve uma duração largamente inferior ao crescimento autotrófico e permitiu a obtenção de concentrações celulares substancialmente superiores. O ensaio **HTN**, comparativamente a **AT_C1**, apresentou teores superiores de nPS, aPS, polifenóis e flavonoides, o teor máximo de β -(1,3)-D-glucanos ($1,83 \pm 0,00$ mg/g biomassa), o teor mínimo em sPS e, ainda, a maior capacidade antioxidante ($4,94 \pm 0,03$ mg TEAC/g biomassa). Relativamente aos ensaios heterotróficos com alteração na fonte de nitrogénio (**HTN**, **HTA**, **HTU**), avaliou-se a síntese de nPS e proteína total e verificou-se que os ensaios apresentaram conteúdos

semelhantes de nPS. O ensaio com ureia como fonte de nitrogénio (**HTU**) apresentou o teor máximo de proteína total ($68,62 \pm 1,61$ mg/g biomassa).

Foi também estudada a extração de pigmentos fotossintéticos com recurso a diferentes metodologias, tendo-se verificado que a extração com acetona pura apresentou teores de clorofilas *a*, *b* e carotenoides totais superiores aos obtidos por MAE (KOH 0,1 M/120 °C/30 min e EtOH/150 °C/15 min). Analisando a extração com acetona pura, é possível verificar uma diminuição de pigmentos fotossintéticos com a indução de *stress*.

A extração de biomoléculas extracelulares revelou que a aplicação de métodos de precipitação alcoólica, nomeadamente a extração **Eti** (extração imediata com 3 volumes de etanol 90% V/V) permitiu a concentração dos meios de cultura, não só em termos de polissacáridos, mas também em termos das restantes biomoléculas analisadas. Os meios de cultura concentrados referentes às condições de *stress* (**Eti_C2/Eti_F2**) apresentaram teores de nPS e proteína total superiores aos respetivos controlos (**Eti_C1/F1**). O extrato **Eti_C2** apresentou a concentração máxima de nPS ($7,85 \pm 0,06$ mg/mL) e de proteína total ($0,18 \pm 0,00$ mg/mL), bem como de β -D-glucanos ($0,01 \pm 0,00$ mg/mL), compostos fenólicos ($0,29 \pm 0,00$ mg GAE/mL) e atividade antioxidante ($0,30 \pm 0,01$ mg TEAC/mL).

O extrato de **MAE AT_F1**, o **Pool_AT_F1** (composto pelas frações cromatográficas mais ricas em nPS) e as frações cromatográficas constituintes do **Pool_AT_F1** foram alvo de separação com recurso a técnicas de eletroforese em gel de poli-acrilamida com diferentes corantes. Os resultados decorrentes da coloração com o corante *Stains All* podem sugerir a existência de bandas referentes a polissacáridos, nomeadamente ácido hialurónico. Já a corrida respetiva ao método de coloração Azul de Alciano/Nitrato de Prata pode sugerir a existência de polissacáridos de diversos tamanhos moleculares. Contudo, para a obtenção de resultados quantitativos, sugere-se a repetição destes ensaios.

Testou-se a aplicabilidade dos extratos de MAE e respetivas frações cromatográficas contra dois microrganismos (*E. coli* ATCC25922 e *S. aureus* ATCC25923). A fração F8 (com $1,76$ mg/mL de nPS) apresentou atividade antibacteriana contra os organismos estudados. Neste sentido, é imperativo estudar a possível atividade antibacteriana de extratos e de biomoléculas, como polissacáridos, sintetizados pela microalga em estudo. O desenvolvimento de superbactérias com elevada resistência a antibióticos, nomeadamente antibióticos sintéticos, tem levado à

necessidade de desenvolver substitutos, especialmente de origem biológica, que sejam eficazes no combate a tais organismos.

Os diferentes extratos foram identificados e caracterizados parcialmente por FTIR. À exceção dos extratos **SE** (extração contínua em Soxhlet), constatou-se a presença de bandas características de polissacáridos, nomeadamente a região de *fingerprint*, bandas características de proteínas (amidas I e II) e, ainda, bandas que podem indicar a presença de sPS e de polissacáridos com conformação β . Sugere-se a repetição do espectro de FTIR do **Pool_AT_C2**, uma vez que se mostrou inconclusivo. Como seria expectável, os extratos **SE** apresentam bandas características de lípidos. No entanto, no extrato etanólico são também visualizáveis bandas características de polissacáridos.

Uma vez que a microalga *C. amblystomatis* demonstrou capacidade de sintetizar biocompostos de valor acrescentado, especialmente biocompostos intracelulares, como polissacáridos diversos, lípidos, proteínas e polifenóis, é necessário proceder a uma melhor caracterização estrutural dos extratos obtidos. Neste sentido, sugere-se o recurso a técnicas como ^1H e ^{13}C RMN, bem como GC-MS, de forma validar os resultados obtidos nesta dissertação, bem como proceder à identificação de outras biomoléculas. Sugere-se, ainda, a avaliação *in vitro* dos extratos quanto à sua possível atividade antibacteriana, mas também avaliar outro tipo de atividades biológicas, tais como atividades antitumoral em linhas celulares de carcinoma humano, antioxidante, antiviral, entre outras.

As microalgas são uma das mais promissoras fontes de biomoléculas de valor acrescentado, sendo possível induzir a síntese de determinados compostos em detrimento de outros, através da alteração de um ou mais parâmetros de cultivo. Neste sentido é fundamental o estudar dos efeitos da variação das condições de crescimento (nutrientes, fotoperíodo, intensidade luminosa, arejamento ou temperatura), ou até mesmo a modificação genética destes organismos, de forma a maximizar a síntese de biocompostos, especialmente de compostos extracelulares, bem como as respetivas atividades biológicas e aplicações, bem como a sua incorporação em formulações alimentares, nutracêuticas e farmacêuticas.

6. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- [1] R. Hachicha *et al.*, “Biomolecules from Microalgae and Cyanobacteria: Applications and Market Survey,” *Appl. Sci.*, vol. 12, no. 4, pp. 1924–1949, 2022, doi: 10.3390/app12041924.
- [2] Y. Torres-Tijji, F. J. Fields, and S. P. Mayfield, “Microalgae as a future food source,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 41, pp. 107536–107458, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107536.
- [3] D. Zhuang, N. He, K. S. Khoo, E. P. Ng, K. W. Chew, and T. C. Ling, “Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics,” *Chemosphere*, vol. 291, no. P2, p. 132932, 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132932.
- [4] A. Kusmayadi, Y. K. Leong, H. W. Yen, C. Y. Huang, and J. S. Chang, “Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans – Biotechnological and environmental aspects,” *Chemosphere*, vol. 271, pp. 129800–129808, 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129800.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] F. Khavari, M. Saidijam, M. Taheri, and F. Nouri, “Microalgae: therapeutic potentials and applications,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 48, no. 5, pp. 4757–4765, 2021, doi: 10.1007/s11033-021-06422-w.
- [8] 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.
- [9] C. Gagnard *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.
- [10] J. Masojídek, K. Ranglová, G. E. Lakatos, A. M. S. Benavides, and G. Torzillo, “Variables governing photosynthesis and growth in microalgae mass cultures,” *Processes*, vol. 9, no. 5, pp. 820–853, 2021, doi: 10.3390/pr9050820.
- [11] M. A. Borowitzka, “High-value products from microalgae-their development and commercialisation,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, no. 3, pp. 743–756, 2013, doi: 10.1007/s10811-013-9983-9.
- [12] E. Daneshvar, M. J. Zarrinmehr, A. M. Hashtjin, O. Farhadian, and A. Bhatnagar, “Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption,” *Bioresour. Technol.*, vol. 268, pp. 523–530, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.08.032.
- [13] M. Ma *et al.*, “High-cell-density cultivation of the flagellate alga *Poterioochromonas malhamensis* for biomanufacturing the water-soluble β -1,3-glucan with multiple biological activities,” *Bioresour. Technol.*, vol. 337, pp. 125447–125454, 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125447.
- [14] 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, no. March 2017, pp. 394–404, 2018, doi: 10.1016/j.rser.2018.04.034.
- [15] L. Liu, G. Pohnert, and D. Wei, “Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential,” *Mar. Drugs*, vol. 14, no. 10, pp. 191–209, 2016, doi: 10.3390/md14100191.
- [16] J. H. Yim, S. J. Kim, S. H. Ahn, C. K. Lee, K. T. Rhie, and H. K. Lee, “Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03,” *Mar. Biotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 17–25, 2004, doi: 10.1007/s10126-003-0002-z.
- [17] 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.
- [18] H. H. Chen and J. G. Jiang, “Lipid Accumulation Mechanisms in Auto- and Heterotrophic Microalgae,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 37, pp. 8099–8110, 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b03495.
- [19] O. Perez-Garcia, F. M. E. Escalante, L. E. de-Bashan, and Y. Bashan, “Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products,” *Water Res.*, vol. 45, no. 1, pp. 11–36, 2011, doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037.
- [20] S. Banerjee and S. Ramaswamy, “Dynamic process model and economic analysis of microalgae cultivation in open raceway ponds,” *Algal Res.*, vol. 26, pp. 330–340, 2017, doi: 10.1016/j.algal.2017.08.011.
- [21] M. Barceló-Villalobos, P. Fernández-del Olmo, J. L. Guzmán, J. M. Fernández-Sevilla, and F. G. Acién Fernández, “Evaluation of photosynthetic light integration by microalgae in a pilot-scale raceway reactor,” *Bioresour. Technol.*, vol. 280, pp. 404–411, 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.02.032.
- [22] F. G. Acién Fernández, J. M. Fernández Sevilla, and E. Molina Grima, “Photobioreactors for the production of microalgae,” *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 131–151, 2013, doi: 10.1007/s11157-012-9307-6.
- [23] Z. Y. Wen and F. Chen, “Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 21, no. 4, pp. 273–294, 2003, doi: 10.1016/S0734-9750(03)00051-X.
- [24] A. Saeid and K. Chojnacka, “Toward production of microalgae in photobioreactors under temperate climate,” *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 93, pp. 377–391, 2015, doi: 10.1016/j.cherd.2014.06.008.
- [25] J. Hu, D. Nagarajan, Q. Zhang, J. S. Chang, and D. J. Lee, “Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 1, pp. 54–67, 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.009.
- [26] T. Castillo, D. Ramos, T. García-Beltrán, M. Brito-Bazan, and E. Galindo, “Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce high-value metabolites,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 176, pp. 108183–108198, 2021, doi: 10.1016/j.bej.2021.108183.
- [27] S. Khan, M. Naushad, J. Iqbal, C. Bathula, and G. Sharma, “Production and harvesting of microalgae and an efficient operational approach to biofuel production for a sustainable environment,” *Fuel*, vol. 311, pp. 122543–122561, 2022, doi: 10.1016/j.fuel.2021.122543.

- [28] B. Y. Ozturk, B. Asikkutlu, C. Akkoz, and T. Atici, "Molecular and morphological characterization of several cyanobacteria and chlorophyta species isolated from lakes in turkey," *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 19, no. 8, pp. 635–643, 2019, doi: 10.4194/1303-2712-v19_8_01.
- [29] F. Leliaert *et al.*, "Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae," *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 31, no. 1, pp. 1–46, 2012, doi: 10.1080/07352689.2011.615705.
- [30] I. T. K. Ru, Y. Y. Sung, M. Jusoh, M. E. A. Wahid, and T. Nagappan, "*Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts," *Appl. Phycol.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–11, 2020, doi: 10.1080/26388081.2020.1715256.
- [31] N. Correia *et al.*, "Isolation, identification and biotechnological applications of a novel, robust, free-living *Chlorococcum (Oophila) amblystomatis* strain isolated from a local pond," *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 9, pp. 3040–3053, 2020, doi: 10.3390/app10093040.
- [32] A. Regueiras *et al.*, "Potential anti-obesity, anti-steatosis, and anti-inflammatory properties of extracts from the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorococcum amblystomatis* under different growth conditions," *Mar. Drugs*, vol. 20, no. 1, pp. 9–23, 2022, doi: 10.3390/md20010009.
- [33] Allmicroalgae - Natural Products, "Microalgas," [Online]. Available: <https://www.allmicroalgae.com/pt-pt/microalgas/>.
- [34] T. A. Conde *et al.*, "Polar lipidomic profile shows *Chlorococcum amblystomatis* as a promising source of value-added lipids," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 4355–4377, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83455-y.
- [35] N. S. G. Correia, "Characterization and analysis of the biotechnological potential of a *Chlorococcum* strain isolated at the microalgae production unit-ALGAFARM," Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Repositório Científico da Universidade de Coimbra, 2018.
- [36] A. Saide, K. A. Martínez, A. Ianora, and C. Lauritano, "Unlocking the health potential of microalgae as sustainable sources of bioactive compounds," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 9, pp. 4393–4432, 2021, doi: 10.3390/ijms22094383.
- [37] S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, A. Otero, and P. Coutinho, "Application of microalgae and microalgal bioactive compounds in skin regeneration," *Algal Res.*, vol. 58, pp. 102395–102408, 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102395.
- [38] M. Nicoletti, "Microalgae nutraceuticals," *Foods*, vol. 5, no. 3, pp. 54–66, 2016, doi: 10.3390/foods5030054.
- [39] A. E. Pink, K. S. Stylianou, L. Ling Lee, O. Jolliet, and B. K. Cheon, "The effects of presenting health and environmental impacts of food on consumption intentions," *Food Qual. Prefer.*, vol. 98, pp. 104501–104513, 2022, doi: 10.1016/j.foodqual.2021.104501.
- [40] J. Román-Padilla, A. Rodríguez-Rúa, M. Ponce, M. Manchado, and I. Hachero-Cruzado, "Effects of dietary lipid profile on larval performance and lipid management in Senegalese sole," *Aquaculture*, vol. 468, pp. 80–93, 2017, doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.005.
- [41] C. E. C. C. Ejike, S. A. Collins, N. Balasuriya, A. K. Swanson, B. Mason, and C. C. Udenigwe, "Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health," *Trends Food Sci. Technol.*,

- vol. 59, pp. 30–36, 2017, doi: 10.1016/j.tifs.2016.10.026.
- [42] N. Yan, C. Fan, Y. Chen, and Z. Hu, “The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 6, pp. 1–24, 2016, doi: 10.3390/ijms17060962.
- [43] A. Decamp *et al.*, “A New, Quick, and Simple Protocol to Evaluate Microalgae Polysaccharide Composition,” *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 2, pp. 101–118, 2021, doi: 10.3390/md19020101.
- [44] 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.
- [45] M. Chanda, N. Merghoub, and H. EL Arroussi, “Microalgae polysaccharides: the new sustainable bioactive products for the development of plant bio-stimulants?,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 11, pp. 177–186, 2019, doi: 10.1007/s11274-019-2745-3.
- [46] J. Wu *et al.*, “Bioactive substances and potentiality of marine microalgae,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 9, no. 9, pp. 5279–5292, 2021, doi: 10.1002/fsn3.2471.
- [47] E. Zanchetta *et al.*, “Algal cellulose, production and potential use in plastics: Challenges and opportunities,” *Algal Res.*, vol. 56, p. 102288, 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102288.
- [48] M. Filomena, D. J. Raposo, A. Maria, M. Bernardo, R. Manuel, and S. Costa, “Bioactivity and Applications of Polysaccharides from Marine Microalgae,” in *Polysaccharides*, K. G. Ramawat and J.-M. Mérillon, Eds. Springer Cham, 2014, pp. 1–38.
- [49] J. Bai *et al.*, “Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 88, pp. 57–66, 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2019.03.023.
- [50] R. Bozbulut and N. Sanlier, “Promising effects of β -glucans on glyceamic control in diabetes,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 83, pp. 159–166, 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2018.11.018.
- [51] C. Carballo *et al.*, “Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*),” *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 92, pp. 31–39, 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.05.044.
- [52] E. H. Song, J. Shang, and D. M. Ratner, “Polysaccharides,” in *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, vol. 9, K. Matyjaszewski and M. Möller, Eds. Elsevier, 2012, pp. 137–155.
- [53] M. Ciancia, P. V. Fernández, and F. Leliaert, “Diversity of Sulfated Polysaccharides From Cell Walls of Coenocytic Green Algae and Their Structural Relationships in View of Green Algal Evolution,” *Front. Plant Sci.*, vol. 11, pp. 554585–554599, 2020, doi: 10.3389/fpls.2020.554585.
- [54] 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.
- [55] D. A. Carbone, P. Pellone, C. Lubritto, and C. Ciniglia, “Evaluation of microalgae antiviral activity and their bioactive compounds,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 6, pp. 746–766, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10060746.

- [56] G. N. Liberman, G. Ochbaum, M. Mejubovsky-Mikhelis, R. Bitton, and S. M. Arad, "Physico-chemical characteristics of the sulfated polysaccharides of the red microalgae *Dixoniella grisea* and *Porphyridium aeruginum*," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 145, pp. 1171–1179, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.205.
- [57] S. N. F. Hussen, "Produção, Extração e Caracterização Parcial de Compostos Bioativos de *Chlorella vulgaris* e de *Tetraselmis chuii*," Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2021.
- [58] B. J. Kerr, T. A. Kellner, and G. C. Shurson, "Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets," *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 30–52, 2015, doi: 10.1186/s40104-015-0028-x.
- [59] 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.
- [60] V. Dolganyuk *et al.*, "Microalgae: A promising source of valuable bioproducts," *Biomolecules*, vol. 10, no. 8, pp. 1153–1176, 2020, doi: 10.3390/biom10081153.
- [61] M. M. Vuolo, V. S. Lima, and M. R. Maróstica Junior, "Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power," in *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*, M. R. S. Campos, Ed. Elsevier Inc., 2019, pp. 33–50.
- [62] I. Dahmen-Ben Moussa, D. Belhaj, and H. Ayadi, "Optimization of extraction process of polyphenols from wild halotolerant cyanobacteria, *Phormidium versicolor* (NCC 466)," *Biomass Convers. Biorefinery*, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1007/s13399-022-02651-6.
- [63] C. Faraloni, T. Di Lorenzo, and A. Bonetti, "Impact of light stress on the synthesis of both antioxidants polyphenols and carotenoids, as fast photoprotective response in *Chlamydomonas reinhardtii*: New prospective for biotechnological potential of this microalga," *Symmetry (Basel)*, vol. 13, no. 11, pp. 2220–2234, 2021, doi: 10.3390/sym13112220.
- [64] P. G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 7, pp. 1035–1042, 2000, doi: 10.1021/np9904509.
- [65] H. Kiani, R. Aznar, M. M. Poojary, B. K. Tiwari, and R. Halim, "Chromatographic Techniques to Separate and Identify Bioactive Compounds in Microalgae," *Front. Energy Res.*, vol. 10, pp. 904014–904037, 2022, doi: 10.3389/fenrg.2022.904014.
- [66] S. Kulkarni and Z. Nikolov, "Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*," *Algal Res.*, vol. 35, pp. 185–193, 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.08.024.
- [67] M. I. Queiroz, J. G. Vieira, and M. M. Maroneze, "Handbook of Microalgae-Based Processes and Products," in *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*, E. Jacob-Lopes, M. M. Maroneze, M. I. Queiroz, and L. Q. Zepka, Eds. Academic Press, 2020, pp. 25–48.
- [68] V. S. Ferreira and C. Sant'Anna, "Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1007/s11274-016-2181-6.
- [69] I. Haoujar *et al.*, "Mediterranean Morocco," vol. 24, no. 22, pp. 4037–4053, 2019, doi: 10.3390/molecules24224037.

Referências Bibliográficas

- [70] Y. Ren, H. Sun, J. Deng, J. Huang, and F. Chen, "Carotenoid production from microalgae: Biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies," *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 12, pp. 713–733, 2021, doi: 10.3390/md19120713.
- [71] T. Naz *et al.*, "Genetic Modification of *Mucor circinelloides* for Canthaxanthin Production by Heterologous Expression of β -carotene Ketolase Gene," *Front. Nutr.*, vol. 8, no. 756218, pp. 1–11, 2021, doi: 10.3389/fnut.2021.756218.
- [72] W. Babiak and I. Krzemińska, "Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes," *Energies*, vol. 14, no. 13, pp. 4007–4029, 2021, doi: 10.3390/en14134007.
- [73] C. Paliwal *et al.*, "Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae," *Bioresour. Technol.*, vol. 244, pp. 1216–1226, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.058.
- [74] M. R. Gauthier, G. N. A. Senhorinho, and J. A. Scott, "Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants," *Algal Res.*, vol. 52, pp. 102104–102113, 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.102104.
- [75] H. Sun, W. Zhao, X. Mao, Y. Li, T. Wu, and F. Chen, "High-value biomass from microalgae production platforms: Strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, no. 1, pp. 1–24, 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1225-6.
- [76] J. Martínez, J. F. Cortés, and R. Miranda, "Green Chemistry Metrics, A Review," *Processes*, vol. 10, no. 7, pp. 1274–1299, 2022, doi: 10.3390/pr10071274.
- [77] P. S. Corrêa, W. G. M. Júnior, A. A. Martions, N. S. Caetano, and T. M. Mata, "Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods," vol. 9, no. 1, pp. 10–52, 2021.
- [78] J. Sen Tan *et al.*, "A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids," *Bioengineered*, vol. 11, no. 1, pp. 116–129, 2020, doi: 10.1080/21655979.2020.1711626.
- [79] M. Anticono, J. Blesa, A. Frigola, and M. J. Esteve, "High biological value compounds extraction from citruswaste with non-conventional methods," *Foods*, vol. 9, no. 6, pp. 811–834, 2020, doi: 10.3390/foods9060811.
- [80] 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.
- [81] Y. Chen *et al.*, "An effective method for deproteinization of bioactive polysaccharides extracted from lingzhi (*Ganoderma atrum*)," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 21, no. 1, pp. 191–198, 2012, doi: 10.1007/s10068-012-0024-2.
- [82] R. Sarkarat, S. Mohamadnia, and O. Tavakoli, "Recent advances in non - conventional techniques for extraction of phycobiliproteins and carotenoids from microalgae," *Brazilian J. Chem. Eng.*, 2022, doi: 10.1007/s43153-022-00256-0.
- [83] J. F. Osorio-Tobón, "Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 57, no. 12, pp. 4299–4315, 2020, doi: 10.1007/s13197-020-04433-2.
- [84] N. Saravanabavan, K. J. Salwe, R. Sudar Codi, and M. Kumarappan, "Herbal extraction procedures: need of the hour," *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.*, vol. 9, no. 7, pp. 1135–1139, 2020, doi: 10.18203/2319-2003.ijbcp20202566.

- [85] Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye, "Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review," *Chinese Med. (United Kingdom)*, vol. 13, no. 1, pp. 1–26, 2018, doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.
- [86] S. M. Gil, "Extração e caracterização de componentes bioativos de *Phaeodactylum tricornutum*," Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2020.
- [87] P. Imbimbo, L. D'Elia, D. Liberti, G. Olivieri, and D. M. Monti, "Towards green extraction methods from microalgae learning from the classics," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 104, no. 21, pp. 9067–9077, 2020, doi: 10.1007/s00253-020-10839-x.
- [88] A. Sridhar, M. Ponnuchamy, P. S. Kumar, A. Kapoor, D. V. N. Vo, and S. Prabhakar, *Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review*, vol. 19, no. 4. Springer International Publishing, 2021.
- [89] Z. Yirgu, S. Leta, A. Hussen, M. M. Khan, and T. Aragaw, "Optimization of microwave-assisted carbohydrate extraction from indigenous *Scenedesmus* sp. grown in brewery effluent using response surface methodology," *Heliyon*, vol. 7, no. 5, p. e07115, 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07115.
- [90] X. Zhou *et al.*, "Optimization of microwave assisted lipid extraction from microalga *Scenedesmus obliquus* grown on municipal wastewater," *J. Clean. Prod.*, vol. 221, pp. 502–508, 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2019.02.260.
- [91] R. Halim, B. Gladman, M. K. Danquah, and P. A. Webley, "Oil extraction from microalgae for biodiesel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 178–185, 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.136.
- [92] J. A. V. Costa, B. F. Lucas, A. G. P. Alvarenga, J. B. Moreira, and M. G. de Moraes, "Microalgae Polysaccharides: An Overview of Production, Characterization, and Potential Applications," *Polysaccharides*, vol. 2, no. 4, pp. 759–772, 2021, doi: 10.3390/polysaccharides2040046.
- [93] 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. 388–403, 2017, doi: 10.3390/md15120388.
- [94] L. Shi, "Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 92, pp. 37–48, 2016.
- [95] M. Jia, S. Li, L. Zang, X. Lu, and H. Zhang, "Analysis of biomolecules based on the surface enhanced raman spectroscopy," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 9, pp. 730–756, 2018, doi: 10.3390/nano8090730.
- [96] R. Zhang, B. Song, and J. Yuan, "Bioanalytical methods for hypochlorous acid detection: Recent advances and challenges," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 99, pp. 1–33, 2018, doi: 10.1016/j.trac.2017.11.015.
- [97] 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.
- [98] A. A. Albalasmeh, A. A. Berhe, and T. A. Ghezzehei, "A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry," *Carbohydr. Polym.*, vol. 97, no. 2, pp. 253–261, 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.072.
- [99] 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.
- [100] 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.
- [101] 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.
- [102] 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.
- [103] 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.
- [104] A. C. Lucarini and B. V. Kilikian, "Comparative study of Lowry and Bradford methods: Interfering substances," *Biotechnol. Tech.*, vol. 13, no. 2, pp. 149–154, 1999, doi: 10.1023/A:1008995609027.
- [105] 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.
- [106] R. Amorati and L. Valgimigli, "Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants," *Free Radic. Res.*, vol. 49, no. 5, pp. 633–649, 2015, doi: 10.3109/10715762.2014.996146.
- [107] L. M. Magalhães, M. A. Segundo, S. Reis, and J. L. F. C. Lima, "Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties," *Anal. Chim. Acta*, vol. 613, no. 1, pp. 1–19, 2008, doi: 10.1016/j.aca.2008.02.047.
- [108] A. Pełkal 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.
- [109] C. Caleja, L. Barros, A. L. Antonio, M. B. P. P. Oliveira, and I. C. F. R. Ferreira, "A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits," *Food Chem.*, vol. 216, pp. 342–346, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.075.
- [110] S. C. Lourenço, M. Moldão-Martins, and V. D. Alves, "Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications," *Molecules*, vol. 24, no. 22, pp. 14–16, 2019, doi: 10.3390/molecules24224132.
- [111] 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.
- [112] N. Coulombier, E. Nicolau, L. Le Déan, C. Antheaume, T. Jauffrais, and N. Lebouvier, "Impact of light intensity on antioxidant activity of tropical microalgae," *Mar. Drugs*, vol. 18, no. 2, pp. 122–139, 2020, doi: 10.3390/md18020122.
- [113] 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.
- [114] P. Shah and H. A. Modi, “Comparative Study of DPPH, ABTS and FRAP Assays for Determination of Antioxidant Activity,” *Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol.*, vol. 3, no. 6, pp. 636–641, 2015, [Online]. Available: www.ijraset.com.
- [115] M. E. Elshobary, R. A. El-Shenody, M. Ashour, H. M. Zabed, and X. Qi, “Antimicrobial and antioxidant characterization of bioactive components from *Chlorococcum minutum*,” *Food Biosci.*, vol. 35, no. 301, pp. 100567–100576, 2020, doi: 10.1016/j.fbio.2020.100567.
- [116] J. Hudzicki, “Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol,” *Am. Soc. Microbiol.*, pp. 1–14, 2009.
- [117] S. Sukhikh *et al.*, “Identification of Metabolites with Antibacterial Activities by Analyzing the FTIR Spectra of Microalgae,” *Life*, vol. 12, no. 9, pp. 1–18, 2022, doi: 10.3390/life12091395.
- [118] C. E. E. Grace, P. K. Lakshmi, S. Meenakshi, S. Vaidyanathan, S. Srisudha, and M. B. 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.
- [119] K. Candoğan, E. G. Altuntas, and N. İğci, “Authentication and Quality Assessment of Meat Products by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy,” *Food Eng. Rev.*, vol. 13, no. 1, pp. 66–91, 2021, doi: 10.1007/s12393-020-09251-y.
- [120] 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. 100168–100183, 2021, doi: 10.1016/j.fochx.2021.100168.
- [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] 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.
- [123] 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.
- [124] 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.
- [125] 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.
- [126] 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.
- [127] 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.
- [128] H. K. Lichtenthaler, "Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes," *Methods Enzymol.*, vol. 148, pp. 350–382, 1987, doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
- [129] 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.
- [130] M. C. Semedo, A. Karmali, S. Martins, and L. Fonseca, "Novel polyol-responsive monoclonal antibodies against extracellular β -d-glucans from *Pleurotus ostreatus*," *Biotechnol. Prog.*, vol. 32, no. 1, pp. 116–125, 2016, doi: 10.1002/btpr.2196.
- [131] H. J. Møller and P. H. Jørgen, "Staining of Glycoproteins/Proteoglycans in SDS-Gels," in *The Protein Protocols Handbook*, 2nd ed., no. January, J. M. Walker, Ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1996, pp. 773–777.
- [132] J. P. S. Andrade, C. P. Oliveira, A. M. F. Tovar, P. A. de S. Mourão, and E. Vilanova, "A color-code for glycosaminoglycans identification by means of polyacrylamide gel electrophoresis stained with the cationic carbocyanine dye Stains-all," *Electrophoresis*, vol. 39, no. 4, pp. 666–669, 2018, doi: 10.1002/elps.201700391.
- [133] 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.
- [134] K. L. Hockett and D. A. Baltrus, "Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds," *J. Vis. Exp.*, no. 119, pp. 55064–55068, 2017, doi: 10.3791/55064.
- [135] S. O. Ajala and M. L. Alexander, "Evaluating the effects of agitation by shaking, stirring and air sparging on growth and accumulation of biochemical compounds in microalgae cells," *Biofuels*, vol. 13, no. 3, pp. 371–381, 2022, doi: 10.1080/17597269.2020.1714161.
- [136] T. Liu *et al.*, "Biochemical and Morphological Changes Triggered by Nitrogen Stress in the Oleaginous Microalga *Chlorella vulgaris*," *Microorganisms*, vol. 10, no. 3, pp. 566–581, 2022, doi: 10.3390/microorganisms10030566.
- [137] G. Procházková, I. Brányiková, V. Zachleder, and T. Brányik, "Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae," *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 3, pp. 1359–1377, 2014, doi: 10.1007/s10811-013-0154-9.
- [138] M. A. Fatini, E. M. Basri, and W. O. Wan Maznah, "Effect of different nitrogen sources on cell growth and biochemical compositions of *Chlorococcum sp.* cultivated under laboratory conditions," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 711, no. 1, p. 012010, 2021, doi: 10.1088/1755-1315/711/1/012010.
- [139] W. Choochote, L. Suklampoo, and D. Ochaikul, "Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae," *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 1, pp. 43–48, 2014,

doi: 10.1007/s10811-013-0084-6.

- [140] Á. Cancela, R. Maceiras, V. Alfonsín, and Á. Sánchez, “A Study on Techniques for Microalgae Separation and Lipid Extraction for *Desmodesmus subspicatus*,” *Int. J. Environ. Res.*, vol. 11, no. 3, pp. 387–394, 2017, doi: 10.1007/s41742-017-0035-1.
- [141] K. Ramluckan, K. G. Moodley, and F. Bux, “An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method,” *Fuel*, vol. 116, pp. 103–108, 2014, doi: 10.1016/j.fuel.2013.07.118.
- [142] Z. U. Rehman and A. K. Anal, “Enhanced lipid and starch productivity of microalga (*Chlorococcum* sp. TISTR 8583) with nitrogen limitation following effective pretreatments for biofuel production,” *Biotechnol. Reports*, vol. 20, p. e00298, 2018, doi: 10.1016/j.btre.2018.e00298.
- [143] B. Cheirsilp, Y. I. Mandik, and P. Prasertsan, “Evaluation of optimal conditions for cultivation of marine *Chlorella* sp. as potential sources of lipids, exopolymeric substances and pigments,” *Aquac. Int.*, vol. 24, no. 1, pp. 313–326, 2016, doi: 10.1007/s10499-015-9927-2.

7. Anexos

7. Anexos



Figura i – Cultura de *C. amblystomatis* cultivada em condições autotróficas em frascos (AT_F), sedimentada devido a uma agitação deficiente.

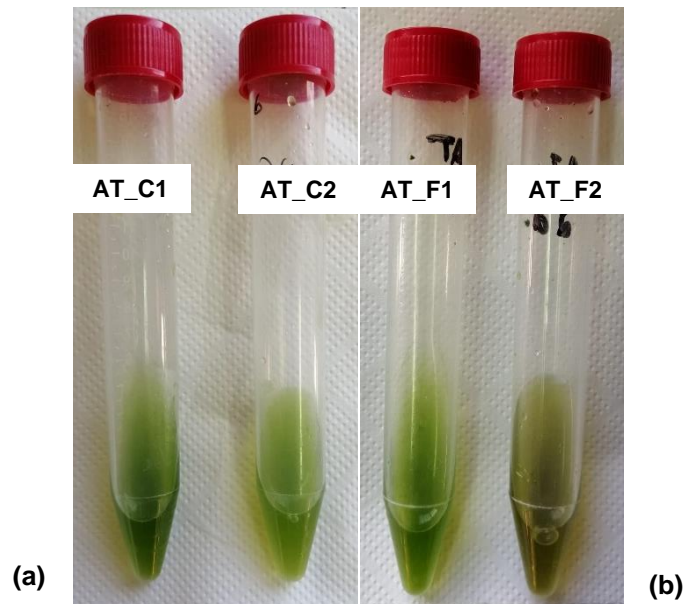


Figura ii – Coloração das culturas autotróficas de *C. amblystomatis* cultivadas em (a) reator de coluna de bolhas (AT_C1 e AT_C2) e em (b) frascos (AT_F1 e AT_F2), recolhidas no início da fase estacionária.

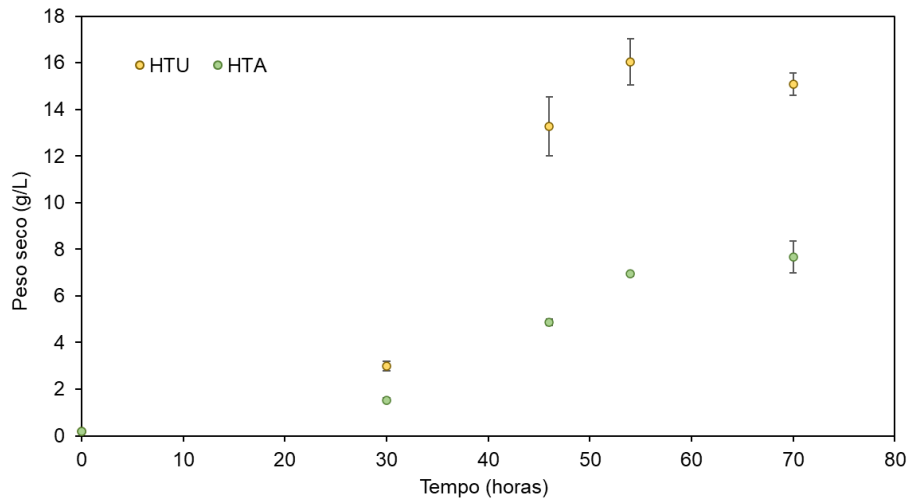


Figura iii – Curvas de crescimento celular dos ensaios heterotróficos com ureia como fonte de nitrogénio (**HTU**) e sulfato de amónia (**HTA**).

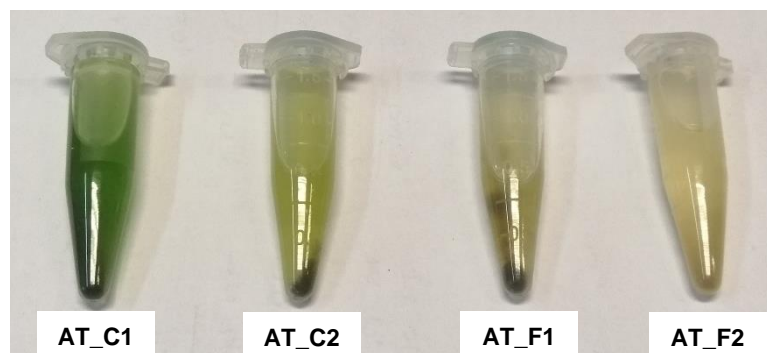


Figura iv – Coloração dos sobrenadantes e respetivos *pellets* após extração de pigmentos com acetona pura.

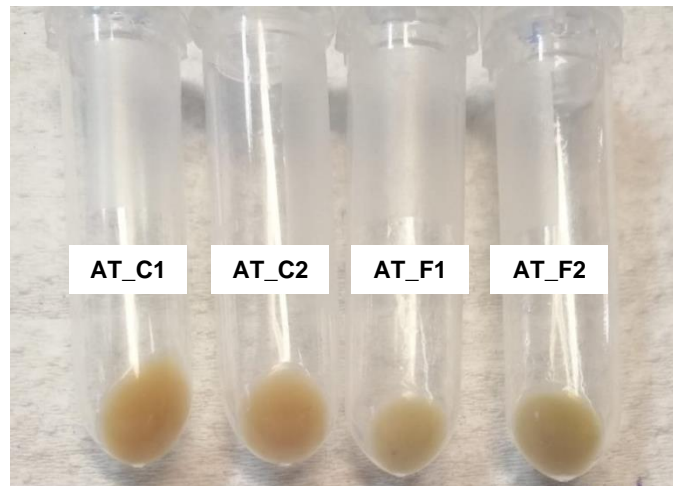


Figura v – Coloração dos EPS provenientes da precipitação etanólica (3 volumes de EtOH a 90%, extração imediata) dos sobrenadantes dos ensaios realizados em reator de coluna de bolhas (**AT_C1** e **AT_C2**) e em frascos (**AT_F1** e **AT_F2**), de *C. amblystomatis*, recolhidas no início da fase estacionária.