



Extração e caracterização de componentes bioativos de
Phaeodactylum tricornutum

SORAIA MATEUS GIL

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

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

Orientadores:

Professora Doutora Magda Nobre Semedo (ISEL)

Doutora Joana Laranjeira da Silva (Allmicroalgae)

Júri:

Professora Doutora Rita Pacheco (Presidente)

Professora Doutora Magda Nobre Semedo (Orientadora)

Professora Doutora Sónia Martins (Arguente)

Fevereiro de 2020



**Extração e caracterização de componentes bioativos de
*Phaeodactylum tricornutum***

SORAIA MATEUS GIL

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

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

Orientadores:

Professora Doutora Magda Nobre Semedo (ISEL)

Doutora Joana Laranjeira da Silva (Allmicroalgae)

Júri:

Professora Doutora Rita Pacheco (Presidente)

Professora Doutora Magda Nobre Semedo (Orientadora)

Professora Doutora Sónia Martins (Arguente)

Fevereiro de 2020

Agradecimentos

Queria deixar um agradecimento a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para este trabalho final de mestrado e sem as quais não seria possível a conclusão do mesmo.

À Professora Doutora Magda Semedo, minha orientadora, por toda a paciência, compreensão, ajuda, encorajamento e pela excelente orientação e apoio incansável que tive durante todo o meu trabalho.

À Doutora Joana Laranjeira Silva, minha orientadora, pela simpatia, pelo apoio e por me fazer sentir em casa na Allmicroalgae.

Ao IPL pelo apoio e financiamento do projeto IPL/2019/PoliMalga/ISEL.

À Professora Doutora Sónia Martins e Professora Doutora Rita Pacheco pelo apoio, pela disponibilidade, ajuda e bons momentos que me proporcionaram durante todo o ano.

Ao Professor Doutor Amin Karmali pela permissão para utilizar, com toda a liberdade, o laboratório de Biotecnologia e o Centro de Investigação de Engenharia Química e Biológica.

Ao Professor Doutor José Coelho pela permissão para utilizar os equipamentos do Centro de Investigação de Engenharia Química e Biológica.

Ao Professor Doutor José Prata pela autorização de realização de parte do trabalho no laboratório de Química Orgânica.

A toda a equipa do Laboratório de Química Orgânica, em especial à Professora Doutora Patrícia Barata, pelo apoio, pela ajuda, a boa disposição e os desafios lançados.

A toda a equipa da UID da Allmicroalgae, Bernardo, João, Mafalda, Joana, Pedro, Alexandra, Diana, por toda a aprendizagem, pela disponibilidade, paciência apoio, amizade, encorajamento, bons momentos e bom ambiente que proporcionaram na minha estadia.

Aos meus amigos e colegas, Luís Correia, Sofia Alves, Teresa Rosa, Manuel Verganista, Márcia Rodrigues e Patrícia Castro, que percorreram esta jornada comigo, quero agradecer-vos por toda a ajuda, disponibilidade, amizade e companheirismo que tiveram nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, que desde que entrei nesta jornada da engenharia foi um grande apoio, um grande incentivo e, acima de tudo, uma grande inspiração. À minha mãe, o meu apoio número um, desde sempre e para sempre, que teve sempre a palavra amiga nos momentos mais desanimados, que incentivou a todos os níveis e me fez crescer com cada conselho. Ao meu irmão e à Beatriz por toda a paciência, amizade, humor, compreensão e o apoio incondicional que me deram para conseguir terminar esta etapa.

Ao Jorge que não só nestes dois anos mas desde que entrou na minha vida foi um braço direito, uma proteção, uma ajuda, um amigo, um apoio incondicional, um ombro amigo.

Ao Hélder que desde o primeiro dia sempre esteve presente, sempre me incentivou. Obrigada pela paciência, pela ajuda incondicional, pelo encorajamento nas horas mais difíceis, e por ser o maior apoio não só ao longo deste trabalho final de mestrado, como nos últimos 2 anos.

Resumo

As microalgas e os seus metabolitos têm despertado bastante interesse, devido às diversas bioatividades, tendo uma vasta aplicação nas indústrias alimentar, cosmética, nutracêutica e farmacêutica.

Este trabalho visa o estudo da produção e extração de biomoléculas de *Phaeodactylum tricornutum*. O seu crescimento foi efetuado em meios de cultura com 25 g/L e 30 g/L de NaCl, durante 1 e 3 semanas. Foram avaliados vários métodos de extração, tendo sido selecionados e otimizados os que aumentaram a eficiência de extração de biomoléculas. Verificou-se que o melhor método foi a extração assistida por micro-ondas (MICRO) com KOH 0,1M a 120°C durante 0,5h, obtendo-se rendimentos de polissacáridos totais de 16,8%, compostos sulfatados de 15,8% e proteínas de 2,1%.

Os extratos obtidos com KOH 0,1M revelaram ser os mais elevados em compostos fenólicos, com 0,2-0,3 mg GAE/g biomassa, na fração FKOH do método em multi-etapas e 0,1 mg GAE/g biomassa no MICRO. Quanto à atividade antioxidante pelo método de ABTS e do teste da capacidade quelante dos iões Fe^{2+} , os valores máximos de 2,4 mg TEAC/g biomassa e 100%, foram também detetados neste extrato, respetivamente.

O extrato MICRO foi ainda sujeito a um fracionamento por cromatografia de troca iónica, tendo sido selecionadas duas frações para análise por FT-IR, com base nas suas concentrações em polissacáridos totais e ausência de contaminantes.

Quanto ao efeito dos fatores de crescimento na produção de biocompostos de *P. tricornutum*, nomeadamente condições de salinidade do meio de cultura e tempo de crescimento, verificou-se que a salinidade de 30 g/L durante 3 semanas potenciou a sua produção. No entanto, da análise aos polissacáridos extracelulares verificou-se que será necessário maior tempo de crescimento para a sua produção.

Os extratos estudados exibiram atividade e componentes antioxidantes, mostrando que, a produção em elevadas quantidades destes biocompostos, têm potencial biotecnológico para aplicações biomédicas ou alimentares.

Palavras-chave: Microalgas, Diatomáceas; compostos bioativos; extração; conteúdo em biomoléculas; atividade antioxidante; cromatografia de troca iónica, FT-IR.

Abstract

Microalgae and its metabolites have gain interest in the last decade due to its diverse biological activities, having been largely used in the food industry and presents great potential in the cosmetic, nutraceutical and pharmaceutic industry.

The present work aims to study the production and extraction of biomolecules from *Phaeodactylum tricornutum*. Its growth was followed in a broth with 25 g/L and 30 g/L of NaCl through 1 and 3 weeks. Several extraction methods were studied, the higher efficiency ones in the extraction of bioactive compounds underwent an optimization process. It was verified that the best method for extracting bioactive compounds is microwave assisted extraction using 0,1M KOH at a temperature of 120 °C for 0,5h. It has a polysaccharide extraction yield of 16,8%, 15,4% for sulfated compound extraction 2,1% and for protein extraction.

The extraction solutions obtained with 0,1M KOH revealed the highest content in phenols with 0,2-0,3 mg GAE/ g biomass in the FKOH fraction of the multistep extraction. Regarding the ABTS method and the chelating capacity of Fe²⁺, the maximum results of 2,4 mg TEAC/g biomass and 100% were detected in the same extraction solution.

The extract MICRO was subjected to a fractionation through ion exchange chromatography, of which was selected two sample fractions to undergo FT-IR characterization based on its polysaccharide concentration and absence of contaminants.

Regarding the effect of growth factors in the production of bioactive compounds of *P.tricornutum*, namely the salinity and growth time, it was verified that the 30 g/L salinity with 3 weeks growth boosted its production. However, from the analysis to extracellular polysaccharides it was found that longer growth time will be required for their production.

The extracts showed activity and antioxidant components, showing that the production in high quantities of these biocompounds have biotechnological potential for biomedical and food applications

Keywords: Microalgae, Diatoms; bioactive compounds; extraction; biomolecule content; antioxidant activity; ion exchange chromatography, FT-IR.

Divulgação Científica

Do trabalho final de mestrado resultaram as seguintes comunicações em conferência (comunicações em painel):

- Gil, S.; Semedo, M.C.; Silva, J.L., *Isolamento, Deteção e Caracterização de Polissacáridos da microalga Phaeodactylum tricornutum*; 6º Fórum de Engenharia Química e Biológica, ISEL, 7 a 9 de Maio **2019**, Lisboa, Portugal.
- Gil, S.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Barata, P.D.; Silva, J.L., *Isolation and characterization of bioactive compounds from Phaeodactylum tricornutum*, XXIII Encontro Galego Português de Química, 20 a 22 de Novembro **2019**, Santiago de Compostela, Espanha.
- Gil, S.; Semedo, M.C.; Barata, P.D.; Martins, S.; Silva, J.L., *Comparison of methods for extraction of biomolecules from Phaeodactylum tricornutum*, XXIII Encontro Galego Português de Química, 20 a 22 de Novembro **2019**, 20 a 22 Santiago de Compostela, Espanha.

Índice

Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Abreviaturas	xix
I. Introdução	3
I.1 Microalgas	3
I.2 Microalgas Diatomáceas	5
I.2.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5
I.3 Compostos Bioativos	7
I.3.1 Polissacáridos	7
I.3.2 Compostos Fenólicos e Flavonóides	10
I.4 Extração e Purificação de Compostos Bioativos a Partir de Microalgas	12
I.4.1 Extrações por Métodos Convencionais	13
I.4.2 Extrações por Sistemas Avançados	14
I.4.3 Métodos de Purificação de Polissacáridos	15
I.5 Métodos e doseamento de componentes bioativos	15
I.5.1 Métodos Colorimétricos	16
I.6 Atividade Antioxidante	22
I.7 Técnicas de Caracterização Estrutural de Polissacáridos	23
I.7.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	24
II. Enquadramento	27
III. Materiais e Métodos	31
III.1 Reagentes	31
III.2 Microalga	31
III.3 Métodos	31
III.3.1 Cultivo e manutenção de culturas	31
III.3.2 Extração de compostos bioativos intracelulares	32
III.3.3 Extração de compostos bioativos extracelulares	36
III.3.4 Doseamento de biomoléculas	36

III.3.5	Determinação de atividade antioxidante.....	38
III.3.6	Fracionamento de polissacáridos por cromatografia de troca iónica	42
III.3.7	Espetroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier.....	43
IV.	Resultados e Discussão.....	47
IV.1	Controlo e Manutenção da cultura de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	47
IV.2	Análise e seleção de métodos de extração	48
IV.3	Otimização dos métodos de extração selecionados	53
IV.3.1	Extração em micro-ondas.....	53
IV.3.2	Extração em autoclave	55
IV.4	Comparação de métodos de extração entre amostras	57
IV.4.1	Extração convencional com água fria e em ebulição seguida de condições ácidas e alcalinas.....	57
IV.4.2	Extração convencional em múltiplas etapas	57
IV.4.3	Extração em autoclave	59
IV.4.4	Extração em micro-ondas.....	62
IV.4.5	Isolamento de Extrapolissacáridos	66
IV.5	Propriedades Antioxidantes.....	71
IV.5.1	Método de Folin-Ciocalteu.....	71
IV.5.2	Determinação do conteúdo em flavonóides.....	73
IV.5.3	Método do Radical ABTS	74
IV.5.4	Método do Radical DPPH.....	77
IV.5.5	Capacidade Quelante dos iões Fe^{2+}	77
IV.5.6	Poder Redutor de Fe^{3+}	80
IV.6	Fracionamento de biomoléculas por cromatografia de troca iónica	80
IV.7	Espetroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier.....	82
V.	Conclusões e perspetivas futuras	89
VI.	Referências Bibliográficas.....	95
VII.	Anexos.....	107

VII.1 Anexo I: Determinação do conteúdo de biomoléculas dos extratos resultante de biomassa de <i>P. tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L.....	109
VII.2 Anexo II: Determinação de conteúdo em biomoléculas dos extratos resultantes da extração multi-etapas com biomassa de <i>P.tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L	111

Índice de Figuras

Figura I.1 - Morfotipos da célula de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . A - Forma Redonda; B - Forma Triirradiada; C - Forma Fusiforme (Adaptado). [19].....	6
Figura I.2 - Estrutura da Leucosina.	9
Figura I.3 - Estrutura geral de um fucano.	10
Figura I.4 - Estrutura básica de flavonóides (Adaptado).[48].....	11
Figura I.5 - Estrutura dos derivados de flavonóides: Flavonol, flavona, flavanol e isoflavona (Adaptado).[52]	12
Figura I.6 - Reações do método fenol-ácido sulfúrico com glucose (Adaptado). [71]	17
Figura I.7 – Estrutura molecular do corante Congo Red.....	18
Figura I.8 - Estrutura molecular do corante Alcian Blue.....	19
Figura I.9 - Estrutura molecular do corante Azul de Coomassie G-250.	20
Figura III.1 - Esquema ilustrativo do método de extração convencional fracionada em 5 etapas com água fria e em ebulição seguida de condições ácidas e alcalinas.	34
Figura III.2 - Esquema reacional do método do radical DPPH (Adaptado).[100]	39
Figura III.3 - Esquema reacional do método do radical ABTS.[45]	40
Figura III.4 - Esquema reacional do método da capacidade quelante de iões Fe^{2+} (Adaptado). [45]	41
Figura III.5 - Esquema reacional do ensaio do poder redutor de iões Fe^{3+} (Adaptado).[45]	42
Figura IV.1 - Observação microscópica da cultura de <i>P.tricornutum</i> (400x).	47
Figura IV.2 - Doseamento de compostos bioativos após extração da biomassa de <i>P.tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade.	49
Figura IV.3 - Doseamento de compostos bioativos após extração da biomassa de <i>P.tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade, das 5 frações obtidas pelo método convencional de multi-etapas.....	50
Figura IV.4 - Doseamento de compostos bioativos após extração da biomassa de <i>P.tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade, das amostras retiradas ao longo da extração (de 10 em 10 minutos durante 1 hora) pelo método assistido por micro-ondas em banho.	50

Figura IV.5 - Doseamento dos polissacáridos e compostos sulfatados nos extratos obtidos pelos métodos de extração convencionais em multi-etapas, autoclave (125 °C; 4 h) e contínua em Soxhlet (água e etanol 80% (v/v); 8°C; 3 h), e pelos métodos avançados assistido por ultrassons (sonda: 62°C; 20kHz; 90w; 10min e banho: 60°C; 40kHz; 100w; 60min) e assistido por micro-ondas (HCl 0,1M; 120 °C; 30 min).....	52
Figura IV.6 - Influência do solvente, tempo e temperatura de extração no método assistido por micro-ondas na extração de biomoléculas de <i>P.tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade.	54
Figura IV.7 - Representação gráfica na Influência do solvente, tempo e temperatura de extração na extração de biomoléculas com H ₂ O em autoclave, a 125°C.	56
Figura IV.8 - Avaliação dos biocompostos na biomassa de <i>P. tricornutum</i> com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L (em NaCl), após extração convencional em multi-etapas.	59
Figura IV.9 - Representação do doseamento de compostos bioativos das amostras na biomassa de <i>P. tricornutum</i> com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L (em NaCl), após extração em autoclave (125 °C; 1,5 h).....	61
Figura IV.10 - Representação do doseamento de compostos bioativos das amostras de biomassa de <i>P. tricornutum</i> com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L (em NaCl), após extração assistida por micro-ondas (KH 0,1 M; 120°C; 30min)	64
Figura IV.11 - Doseamento de biomoléculas extracelulares de <i>P. tricornutum</i> com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L e dos controlos negativos, após precipitação com etanol 96% (v/v).	68
Figura IV.12 - Doseamento de biomoléculas extracelulares de <i>P. tricornutum</i> com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L e dos controlos negativos.	70
Figura IV.13 - Influência dos parâmetros de crescimento na produção de compostos fenólicos determinados pelo método Folin-Ciocalteu, nos extratos obtidos pelos métodos de extração otimizados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas)	73
Figura IV.14 - Influência dos parâmetros de crescimento na atividade antioxidante, determinada pelo do radical ABTS, dos extratos obtidos pelos métodos de extração otimizados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas).....	76
Figura IV.15 - Influência dos parâmetros de crescimento na capacidade quelante de Fe ²⁺ dos extratos obtidos pelos métodos de extração otimizados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas).....	79

Figura IV.16 - Cromatograma da curva de eluição do extrato MICRO (KOH 0,1M, 120°C, 30 min), em coluna contendo a resina DEAE-52 de acordo com os Materiais e Métodos. O conteúdo em polissacáridos nas frações foi doseado pelo método do fenol-ácido sulfúrico. Sistema eluente a) água destilada; b) NaCl 0,1M; c) NaCl 0,3M; d) NaCl 0,5M; e) NaOH 0,1M, f) NaOH 0,5M g) NaOH 1M; h) KCl 2M.....81

Figura IV.17 - Espectros de FT-IR de a) biomassa 1:10 com água destilada, b) extrato micro-ondas (KOH 0,1M; 120 °C, 30 min) e c) Extrato autoclave (125 °C; 1,5h), em pastilhas de KBr.....83

Figura IV.18 - Espectro de FT-IR de a) extrato micro-ondas (KOH 0,1M; 120 °C, 30 min) a 120 °C, 30 min, KOH 1M, b) fração cromatográfica nº 98 eluída com KCl 2M e c) fração cromatográfica nº 87 eluída com NaOH 1M, em pastilhas de KBr.....84

Índice de Tabelas

Tabela IV.1 - Resultados de análise de controlo da cultura de <i>P.tricornutum</i>	47
Tabela IV.2 - Resumo dos parâmetros iniciais aplicados nos vários métodos de extração, utilizados para a extração de biocompostos de <i>P.tricornutum</i>	48
Tabela IV.3 – Resumo da variação dos parâmetros para a otimização dos métodos de extração em autoclave e extração assistida por micro-ondas.....	53
Tabela IV.4 - Doseamento de biomoléculas após extração convencional em multi-etapas e respetivo rendimento de extração.	58
Tabela IV.5 - Doseamento de biomoléculas após extração em autoclave (125°C; 1,5h).	60
Tabela IV.6 – Doseamento de biomoléculas após extração assistida em micro-ondas (KOH 0,1 M; 120°C; 30min).....	63
Tabela IV.7 - Comparação dos melhores resultados obtidos para cada método de extração aplicado.....	65
Tabela IV.8 - Doseamento de compostos extracelulares precipitados.....	67
Tabela IV.9 - Doseamento de compostos extracelulares de <i>P. tricornutum</i> com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L, presentes nos meios de cultura de crescimento e no controlo negativo.	69
Tabela IV.10 - Determinação de compostos fenólicos nos vários extratos pelo método Folin-Ciocalteu.	72
Tabela IV.11 - Atividade antioxidante total nos vários extratos determinada pelo método do radical ABTS.	75
Tabela IV.12 - Capacidade quelante de Fe ²⁺ dos extratos obtidos pelos métodos de extração otimizados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas).	78
Tabela VII.1 - Determinação de conteúdo em polissacáridos, β -(1,3)-glucanos e β -glucanos dos extratos após extração de biomassa de <i>P.tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L.	109
Tabela VII.2 - Determinação de conteúdo em proteína e compostos sulfatados dos extratos após extração de biomassa de <i>P.tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L.	110
Tabela VII.3 - Determinação do conteúdo em biomoléculas dos extratos das diferentes frações da extração multi-etapas aplicada na biomassa de <i>P.tricornutum</i> com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade.	111

Abreviaturas

A

A ₀	Valor de absorvância do branco a determinado comprimento de onda
A _{amostra}	Valor de absorvância da amostra a determinado comprimento de onda
Abs	Valor de absorvância a determinado comprimento de onda
ABTS	2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AUTO	Extrato obtido após extração em autoclave

B

BANHO	Extrato obtido após extração em banho de ultrassons
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina de soro bovino

C

CE	mg equivalentes de catequina por grama de amostra a analisar
----	--

D

DEAE	Dietilaminoetil celulose
DO	Densidade ótica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo

E

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EPs	Polissacáridos extracelulares
<i>Et al.</i>	<i>Et alia</i> (origem do Latim, referência a outros)

F

FCR	Reagente de Folin-Ciocalteu
FHCl	Fração de extração convencional com solução aquosa de ácido clorídrico 1M
FKOH	Fração de extração convencional com solução aquosa de hidróxido de potássio 1M
FNaOH	Fração de extração convencional com solução aquosa de hidróxido de sódio 1M
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
FW1	Fração de extração convencional com água à temperatura ambiente

FW2	Fração de extração convencional com água em ebulição
H	
HAT	Capacidade antioxidante de espécies que envolvem a transferência de um átomo de hidrogénio
HPAEC	Cromatografia de troca iónica de alta performance
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPSEC	Cromatografia de exclusão molecular de alta performance
G	
GAE	mg equivalentes de ácido gálico por grama de amostra a analisar
GC	Cromatografia Gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
I	
ID	Investigação e Desenvolvimento
L	
LC	Cromatografia Líquida
M	
M	Amostra do meio de cultura de crescimento da <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
MICRO	Extrato obtido após extração em micro-ondas a determinada temperatura e tempo
N	
n.d	Não detetado
P	
P	Amostra de precipitação de biocompostos ativos do meio de cultura de crescimento de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
PBS	Tampão fosfato salino 15 mM, pH 7,2
R	
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigénio
S	
SET	Capacidade antioxidante de espécies que envolvem a transferência de um único eletrão

SEtOH Extrato obtido após extração em Soxhlet utilizando como solvente etanol 80% (v/v)

SH₂O Extrato obtido após extração em Soxhlet utilizando como solvente água

SONDA Extrato obtido após extração com sonda de ultrassons

T

t.a Temperatura ambiente

TCA Ácido tricloroacético

TE mg equivalentes de Trolox por grama de amostra

U

UID Unidade de Investigação e Desenvolvimento

UV Ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

I. Introdução

As microalgas têm despertado bastante interesse a nível industrial, não só devido ao facto de produzirem diversos metabolitos com estruturas e atividades biológicas distintas, como também devido à sua facilidade de crescimento e manutenção de culturas. Deste modo, o estudo para obtenção das biomoléculas produzidas por estes microrganismos têm sido alvo de estudo intenso, destacando-se o interesse nos lípidos e polissacáridos. [1], [2]

O mercado mundial de microalgas é considerado um mercado emergente, já que estes compostos bioativos têm demonstrado uma vasta aplicação na alimentação humana e animal, na cosmética, em biocombustíveis e em produtos farmacêuticos e nutracêuticos, esperando-se que o seu crescimento seja exponencial. [1], [3]–[5]

Dentro deste grupo de compostos de alto valor, os polissacáridos provenientes de microalgas marinhas ganharam interesse devido à sua atividade como aderente e gelificante e, atualmente, podem ser considerados como o principal grupo responsável por um vasto leque de propriedades, como atividades antioxidante, antiviral, antimutagénico e anticancerígeno. [1], [5]

I.1 Microalgas

As microalgas são um grupo complexo de microrganismos estimando-se que existam mais de 100000 espécies, embora apenas sejam conhecidas cerca de 30000 até à data, sendo um número muito reduzido de espécies produzidas industrialmente. [6], [7]

As microalgas são microrganismos fotossintéticos que convertem luz solar, água e dióxido de carbono em grandes quantidades de biomassa. São reconhecidas pelo facto de terem capacidade de captar CO₂ atmosférico no seu processo de fotossíntese, contribuindo em larga escala para questões ambientais como a camada de ozono, melhorando a pegada ambiental causada pela indústria. [1]–[3], [6], [8], [9]

O *habitat* das microalgas é extremamente variável, encontrando-se espécies de microalgas em ambientes de água doce, de água salgada, de água salobra e até mesmo nos solos. De acordo com a capacidade de utilização da fonte de carbono (orgânica e/ou inorgânica), as microalgas podem ser designadas por autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. [1], [2], [4], [6], [9]–[11]

Introdução

A complexidade da taxonomia das microalgas reflete-se na diversidade de estruturas celulares básicas, de pigmentação e de ciclos de vida. As quatro classes principais de microalgas em termos de abundância são: *Bacillariophyceae* (diatomáceas; são a forma de vida dominante no fitoplâncton e possivelmente representam o maior grupo de produtores de biomassa na Terra); *Chlorophyceae* (algas verdes); *Chrysophyceae* (algas douradas); *Cyanophyceae* (cianobactérias). A inclusão das cianobactérias nas microalgas é controversa, havendo taxonomistas que as incluem no domínio *Bacteria*. [1], [2]

Estes microrganismos produzem uma grande variedade de biomoléculas com estruturas e atividades biológicas distintas, nomeadamente carbo-hidratos, vitaminas, proteínas, polifenóis, ácidos gordos polinsaturados, pigmentos, e moléculas com bioatividade que são acumulados dentro dos cloroplastos e dos vacúolos intracelulares.[1]–[3], [12]

A diversidade destas biomoléculas, bem como o seu rendimento de produção, dependem da espécie e/ou estirpe, da sua fase de crescimento, e são influenciados por diversos fatores como, a disponibilidade de nutrientes (N, P, K, S), salinidade, tipo de biorreator, condições de operação (e.g. temperatura, pH, agitação, arejamento), intensidade de luz e CO₂. [1], [2], [4], [13], [14]

As microalgas formam, frequentemente, agregados celulares, seja em forma flocular, biofilme ou granulado, que excretam substâncias modificando o meio que as rodeia. Estas substâncias funcionam como um mecanismo de defesa à morte celular, alterando a viscosidade, floculação e propriedades do meio envolvente, de modo a combater fatores como a desidratação, excesso de toxinas e resposta a *stress*. [5], [11], [13]

A matriz extracelular secretada pelas microalgas é bastante complexa e inclui uma quantidade variada e considerável de biomoléculas, nomeadamente proteínas, polissacáridos, ácidos nucleicos e lípidos. Esta matriz depende também fortemente da espécie, meio de cultura, condições operatórias, tempo de crescimento e fisiologia da cultura. [5], [13]

I.2 Microalgas Diatomáceas

As microalgas diatomáceas pertencem à classe *Bacillariophyceae* que engloba organismos com dois tipos de formas celulares: forma arredondada (*Centrophycidae*) e forma alongada (*Pennatophycidae*). A característica que distingue este tipo de microalgas é o facto que apresentarem uma parede celular composta por silicatos que envolvem o conteúdo celular. Relativamente aos seus pigmentos, estas células apresentam clorofilas a e c assim como α -ou β -carotenos, no entanto, na sua maioria são constituída por xantofilas que são responsáveis pela sua coloração acastanhada. Quanto às reservas celulares, é possível afirmar que as microalgas desta espécie são ricas principalmente em lípidos e leucosina (ou crisolaminarina), constituída por polímeros lineares com resíduos de glucose com ligações β -(1,3) e β -(1,6). [15]–[17]

I.2.1 *Phaeodactylum tricornutum*

A *P. tricornutum* é uma microalga unicelular descoberta em 1897 por Knut Bohlin. Esta microalga apresentava uma forma trirradiada, com um cromóforo acastanhado. Mais tarde, após observação verificou-se que apresentava uma forma semelhante a uma microalga diatomácea *Nitzschia coelestridium* na forma “*minutíssima*” tendo sido, frequentemente, considerada a mesma espécie. Em 1958 Lewin isolou a *Phaeodactylum tricornutum* num tanque marinho em Wood Hole, Massachusetts, EUA. [18]–[20]

Concluiu-se, mais tarde, que esta espécie apresentava polimorfismo, sendo possível encontrar-se em três formas: oval, fusiforme e trirradiada, como se pode verificar na Figura I.1. Estas formas são permutáveis entre si de acordo com as condições do meio e o *stress* provocado por falta de nutrientes, azoto, oxigénio, agitação, entre outras. Verificou-se que as formas oval e fusiforme são as mais comuns e a forma fusiforme apresenta-se como a mais estável. [15], [18]–[21]

Introdução

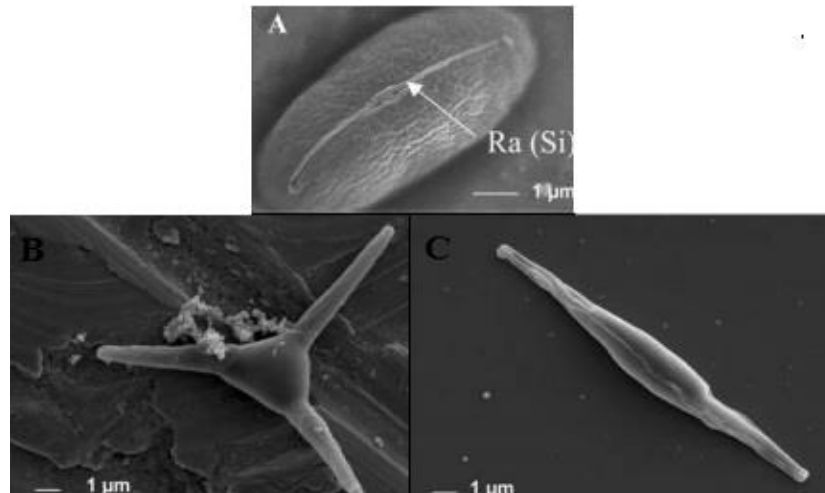


Figura 1.1 - Morfotipos da célula de *Phaeodactylum tricorutum*. A - Forma Redonda; B - Forma Trirradiada; C - Forma Fusiforme (Adaptado). [21]

Ao estudar esta microalga na forma fusiforme, foi difícil realizar a sua classificação taxonômica uma vez que, apesar de apresentar semelhanças com as algas diatomáceas, identificava-se a ausência de silicatos na parede celular. Mais tarde, verificou-se que a forma oval, ao contrário das restantes, apresentava uma única válvula de sílica, de baixa concentração, que preenchia todo o exterior da célula. Desde aí, identificou-se a *Phaeodactylum tricorutum* como microalga diatomácea. [15], [18], [20]

Taxonomicamente a *P. tricorutum* é da classe *Bacillariophyceae*, ordem *Bacillariales*, subordem *Phaeodactylinae* (característica de células contendo apenas uma válvula de silicatos), família *Phaeodactylaceae*, género *Phaeodactylum* e espécie *Phaeodactylum tricorutum*. [18], [21], [22]

Dentro da classe das algas diatomáceas, a caracterização genómica da *P. tricorutum* é interessante devido ao seu genoma de pequenas dimensões, tempos de geração curtos e facilidade de transformação genética. A sequenciação do seu genoma já foi realizada inicialmente por Scott e Amasino em 1998 e, posteriormente por Bowler em 2008. De Martino em 2007 identificou 4 genótipos desta espécie A, B, C e D. No entanto, as características físico-químicas desta espécie ainda não são totalmente conhecidas. [21]–[23]

Atualmente, o modelo de estudo das microalgas diatomáceas é a microalga *P. triornutum* uma vez que pode apresentar, mediante as condições do meio e o *stress* provocado, os três diferentes morfotipos (Fig. I.1). Estas formas dependem das suas características fenotípicas sendo que a forma oval está relacionada com a capacidade de adesão e a fusiforme e trirradiada são planctónicas. O morfotipo pode variar na própria célula dependendo das condições aplicadas. [15], [21]

I.3 Compostos Bioativos

Os compostos bioativos produzidos pelas microalgas podem ser obtidos diretamente do metabolismo primário, tendo-se recentemente verificado uma tendência de utilizar microalgas para a produção de compostos de valor acrescentado. Muitos compostos de alto valor já foram identificados e comercializados, no entanto, com o desenvolvimento de novas tecnologias de crescimento de algas, há sempre a possibilidade de descobrir e identificar metabolitos bioativos com especial interesse nomeadamente na área da medicina e nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar. Inclusive, segundo vários autores, as microalgas são suscetíveis de se tornarem a curto prazo parte integrante da nossa dieta, como aditivo alimentar ou alimento funcional. [13], [24]–[27]

I.3.1 Polissacáridos

Dentro deste grupo de compostos de alto valor, os polissacáridos intra e extracelulares, incluindo complexos proteína-polissacáridos, podem ser considerados como os principais responsáveis por um vasto leque de propriedades, como atividades antioxidante, antibacteriano, antiviral, anticoagulante, antimutagénico, imunomodulatória, anti-inflamatória, anticancerígena e antidiabética. [13], [25], [28], [29]

Os polissacáridos têm despertado bastante interesse a nível industrial devido às suas propriedades gelificantes e espessantes, no entanto apenas um pequeno número de polissacáridos isolados de microalgas se encontram bem caracterizados e estabelecidos como produtos de aplicação industrial, quando comparados com os extraídos de bactérias, fungos, plantas ou até macroalgas. [25], [29]–[33]

Introdução

Os carbo-hidratos representam o maior grupo de compostos sintetizados por microalgas e têm sido alvo de intenso estudo devido às propriedades biológicas referidas anteriormente. A sua atividade biológica está inevitavelmente relacionada com a sua estrutura bioquímica e combinação de ligações glicosídicas, ou seja, com a sua composição química e estrutura polimérica, sendo de máxima importância características como a sua massa molar, conteúdo em sulfatos, número de monómeros e respetiva ligação, conformação, tipo de cadeia e existência de outros grupos que possam estar ligados a estes compostos (proteína, ácidos nucleicos ou lípidos). [13], [25]

Deste grande grupo podem destacar-se os polissacáridos sulfatados e os β -glucanos, uma vez que têm sido descritos como imunoestimuladores. [13]

A matriz extracelular produzida pelas microalgas, mais concretamente os polissacáridos extracelulares (EPs) têm sido tópicos de extenso estudo devido às suas propriedades biológicas e antioxidantes. É de notar que, em estudos anteriores, foi comprovada a sua elevada atividade anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena. [13]

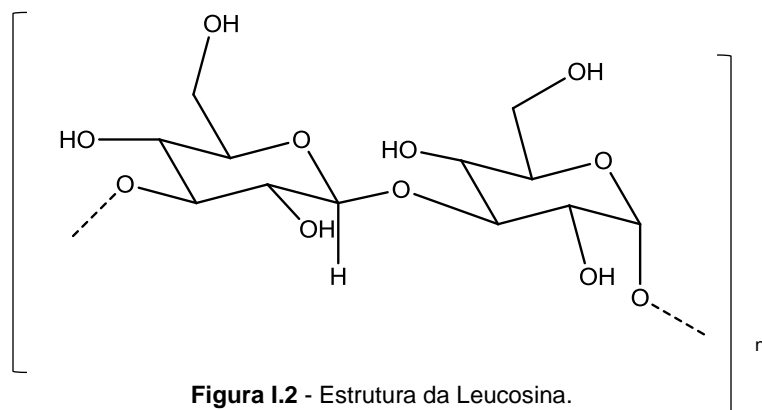
Os polissacáridos de diatomáceas já descritos são geralmente polissacáridos heterogêneos que incluem frequentemente outro tipo de estruturas associadas, nomeadamente ácidos urónicos, proteínas, sulfatos e piruvatos. Como já foi referido anteriormente, estes polissacáridos podem estar associados a proteínas, formando complexos polissacáridos-proteína ou glicoproteínas. Estes complexos auxiliam a adesão do polissacárido à parede celular da microalga. [5], [13], [15], [25]

I.3.1.1 β -glucanos

Os β -glucanos fazem parte da família dos polissacáridos, sendo frequentemente extraídos de plantas, cogumelos e algas e têm sido alvo de elevado estudo ao longo das últimas décadas, uma vez que têm demonstrado uma vasta gama de atividades biológicas, designadamente atividade anti-tumoral, anti-inflamatória e imunomodulatória. [34], [35]

Os β -glucanos são polissacáridos constituídos por monómeros de D-glucose ligados entre si por ligações β -glicosídicas, geralmente (1,3), (1,4) ou (1,6). As características estruturais destas biomoléculas, como o grau de ramificação, a massa molar, a sua estrutura terciária, nomeadamente a presença de tripla ou dupla hélice, o tipo e composição dos açúcares ou não açúcares na sua constituição (especialmente complexos com proteínas ou grupos sulfato) e a presença de outros ligandos (como galactose, manose, xilose, arabinose ou proteínas) são essenciais e influenciam as suas propriedades estando associadas à sua elevada bioatividade. [34]–[36]

Nas microalgas e algas marinhas, especialmente algas castanhas e diatomáceas o β -glucano que existe em maior quantidade é a leucosina, também denominada crisolaminarina. Esta biomolécula é uma reserva de nutrientes para a célula e acumula-se nos seus vacúolos celulares. A leucosina (Figura I.2) trata-se de um β -D-(1,3)-glucano de baixa massa molar, obtida a partir de moléculas de β -D-(1,3)-piranose com ligações (1,6). [16], [37]



I.3.1.2 Polissacáridos Sulfatados

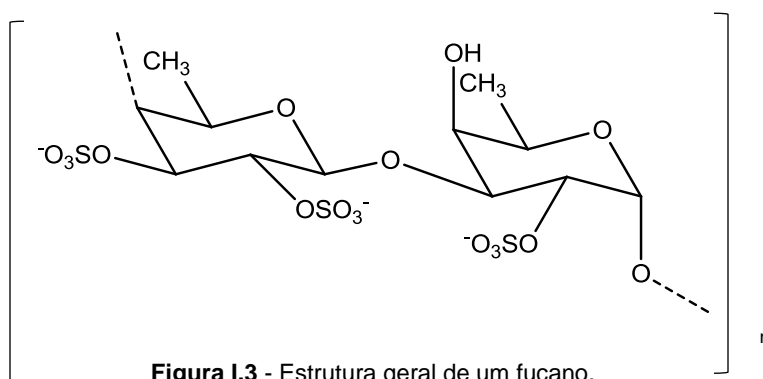
Os polissacáridos sulfatados são uma família de polissacáridos que apresentam grupos éster-sulfato nos seus terminais. A alteração química da introdução do grupo sulfato confere a estas macromoléculas elevada atividade biológica, nomeadamente como agente imunomodulatório. [25], [37]–[39]

Estes polissacáridos ocorrem naturalmente em vários organismos como plantas, animais, cogumelos e algas marinhas e têm a capacidade de se ligar a proteínas e à heparina. Esta capacidade apresenta importância biológica e fisiológica, causando interesse à indústria farmacêutica e nutracêutica. [31], [38], [40]

Introdução

Os polissacáridos sulfatados provenientes de microalgas marinhas podem apresentar-se sob a forma de fucanos ou galactanos sulfatados. Os fucanos são polissacáridos aniônicos heterogêneos que são, normalmente, constituídos por resíduos de fucose com ligação α (1,3) ou (1,4) (Figura I.3). Estes resíduos podem estar associados a grupos sulfatados nos carbonos 2 ou 4 e podem, ainda, conter monómeros como a manose, glucose, ramnose, galactose, xilose e ácidos urónicos. [12], [29], [41], [42]

Os galactanos sulfatados com os agaranos ou os carragenanos são constituídos, geralmente, por resíduos de galactopirranose. A estrutura destas biomoléculas pode variar tendo em conta a sua localização geográfica, espécie, conteúdo em grupos sulfatos, massa molar, condições do meio de crescimento, entre outras. [12]



I.3.2 Compostos Fenólicos e Flavonóides

Na sociedade atual o *stress*, a poluição e substâncias como o tabaco levaram a um aumento do *stress* oxidativo do organismo, e os compostos bioativos produzidos pelo nosso corpo que combatem as espécies oxidativas são insuficientes. O *stress* oxidativo do corpo pode levar a danos graves e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer. Assim, é de extrema importância o reforço nutracêutico e farmacêutico de compostos antioxidantes para anular as espécies oxidativas. [43], [44]

As microalgas, devido ao seu processo fotossintético, acumulam quantidades significativas de espécies reativas de oxigénio (ROS) e radicais livres. Estes compostos causam *stress* oxidativo que provoca dano celular irreversível quando em excesso. Deste modo, estes organismos desenvolveram um mecanismo de combate ao *stress* oxidativo, ao produzirem metabolitos com atividade oxidante. Devido à facilidade de crescimento, desenvolvimento e elevada biodiversidade, as microalgas têm sido alvo de intenso estudo como organismo viável ao ataque oxidativo. [6], [27], [43]

Introdução

Um composto antioxidante é definido como qualquer substância capaz de prevenir eficazmente os efeitos causados pelos radicais livres. Os compostos provenientes de plantas e microalgas que apresentam maior interesse quanto à sua atividade antioxidante são os compostos fenólicos e flavonóides. [17], [33], [39], [45]

Os compostos fenólicos representam um grupo de compostos bioativos de elevada importância tendo em conta a sua contribuição para reações oxidativas pelo facto de apresentarem elevada capacidade de reação com espécies oxidantes, neutralizando o seu efeito. A sua capacidade antioxidante é medida pela capacidade de doar eletrão a espécies oxidativas, a capacidade de estabilizar o eletrão não emparelhado e a sua capacidade quelante de iões metálicos. [46], [47]

Os polifenóis apresentam uma estrutura ideal à doação de um eletrão para neutralização e estabilização de espécies oxidativas, nomeadamente ROS e iões de níquel e ferro. As principais formas de polifenóis nas plantas e algas são os flavonóides. [17], [44], [46]

A estrutura da família dos flavonóides consiste em 15 carbonos organizados em 3 anéis, designados anel A, B e C, substituídos com grupos hidroxilo (Figura I.4). Estes compostos são originados a partir de resíduos de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina e a tirosina e encontram-se na forma de glicosídeos. [44], [47]

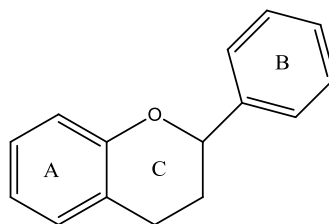


Figura I.4 - Estrutura básica de flavonóides (Adaptado)[44]

A substituição e/ou eliminação de algum dos grupos ligados aos anéis constitui os vários tipos de flavonóides dos quais se destacam: os flavonóis, as flavonas, os flavanóis e as isoflavonas representados na Figura I.5. [44], [47]

Introdução

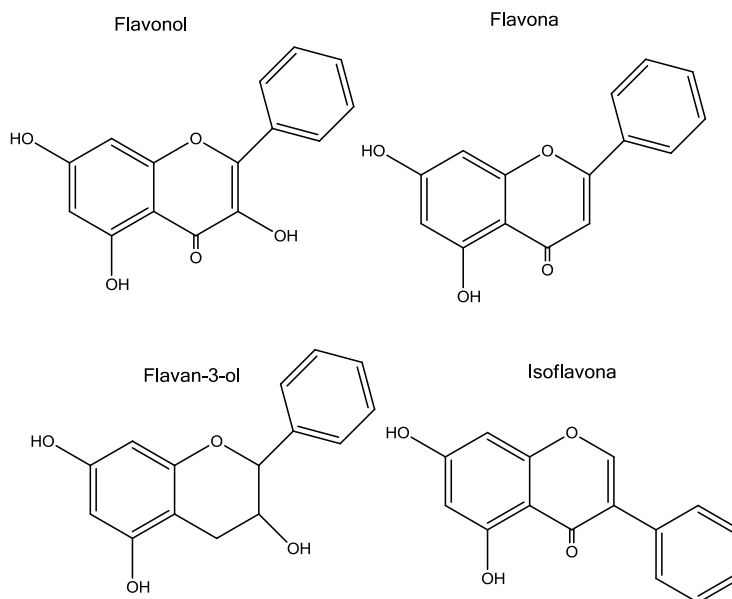


Figura I.5 - Estrutura dos derivados de flavonóides: Flavonol, flavona, flavanol e isoflavona (Adaptado). [47]

Os polifenóis e os flavonóides apresentam estrutura ideal para aplicação enquanto agente antioxidante e, adicionalmente, apresentam capacidade quelante de íons metálicos. Foi demonstrado que estas biomoléculas apresentam resultados promissores tanto *in vitro* como *in vivo*, e exibem maior atividade antioxidante do que as vitaminas C e E. [44], [46], [47]

I.4 Extração e Purificação de Compostos Bioativos a Partir de Microalgas

O atual interesse das comunidades científica e industrial pela investigação e exploração de microalgas, está focado na identificação de espécies específicas que produzam compostos de alto valor e na redução do custo em produção e das etapas de *downstream*, permitindo melhorar a eficiência dos processos e projetar novos produtos. [6], [13]

Um dos principais desafios do estudo destas biomoléculas produzidas pelas microalgas são o seu isolamento, uma vez que os métodos utilizados podem influenciar a composição, estrutura, propriedades e funções destes compostos. As principais metodologias descritas que envolvem lise celular e que têm sido usadas na extração de biocompostos intracelulares envolvem a utilização de solventes orgânicos e água, durante várias horas e a temperaturas diferentes. Métodos alternativos sustentáveis, como extração com fluidos supercríticos, extração assistida por ultrassons e por micro-ondas, têm vindo a ser desenvolvidos para o melhoramento da extração de biomoléculas. [12], [17]

Relativamente aos EPs solubilizados no meio, o método mais comum é o da precipitação com álcoois onde a sua polaridade e temperatura de precipitação exercem um grande impacto no rendimento de obtenção dos polissacáridos, bem como na co-precipitação de impurezas. [13], [48]

I.4.1 Extrações por Métodos Convencionais

As extrações convencionais são utilizadas em larga escala, no entanto apresentam várias desvantagens. A estes métodos estão normalmente associados elevados tempos de extração, utilização de solventes orgânicos tóxicos, pouca seletividade, entre outros. [49]–[51]

O método de extração convencional, habitualmente utilizado na extração de polissacáridos, é a extração fracionada em 5 etapas, e é realizado através de extrações com água quente, seguidas de extrações com soluções alcalinas, em condições diferentes de tempo e temperatura de modo a maximizar a concentração de polissacáridos solúveis e insolúveis em água. A extração de todos os polissacáridos insolúveis em água pode-se tornar difícil, assim, utilizam-se também soluções ácidas, de forma a extrair os restantes polissacáridos. Este método pode alterar a massa molar dos polissacáridos, podendo influenciar as suas propriedades. [48], [52]

A extração em autoclave é um tipo de extração mecânica, mais especificamente uma extração termomecânica, que se baseia na sua elevada temperatura e pressão, fragilizando a parede e membrana celular que permite o acesso facilitado do solvente de extração. [12]

Este método de extração é bastante eficaz e apresenta a vantagem de utilizar água como solvente com ausência de resíduos e sub-produtos perigosos. No entanto, tal como nas extrações convencionais apresenta a desvantagem de necessitar de longos tempos de extração e temperaturas muito elevadas o que resulta num consumo energético considerável e eventuais alterações estruturais das biomoléculas. [12], [53]

A extração contínua em Soxhlet apresenta vantagem de fornecer continuamente solvente fresco à biomassa devido aos seus ciclos de refluxo/condensação, o que minimiza a quantidade de solvente e adicionalmente, está sob constante aquecimento, o que facilita a ruptura celular. No entanto, este método, tal como os restantes métodos convencionais, apresenta tempos de extração bastante longos e é, geralmente, realizado com solventes tóxicos, como acetona, diclorometano, metanol ou etanol. [7], [54]

I.4.2 Extrações por Sistemas Avançados

Como foi referido anteriormente, os métodos de extração convencionais de biomoléculas incluem, geralmente, problemas associados que, não só os tornam processos pouco ecológicos, prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, como também são capazes de destruir a sua estrutura reduzindo e/ou alterando a atividade biológica. [17], [42]

Deste modo, tem sido extensamente utilizada a extração em micro-ondas uma vez que se trata de um método que se rege segundo princípios da Química Verde. Este método reduz drasticamente o tempo de extração, promove a utilização de solventes e condições reacionais mais suaves e temperaturas mais baixas, o que resulta, num custo mais baixo. Os princípios de Química Verde aplicadas na utilização deste método de extração são o uso de recursos naturais, uso de solventes alternativos, redução de consumo energético, redução de operações unitárias e produção de extratos biodegradáveis. [13], [17], [42], [50], [51], [55], [56]

A extração assistida em micro-ondas tem como princípio o rápido aumento de temperatura que causa penetração da energia micro-ondas volumetricamente distribuída na célula, causada pela condução iónica e rotação polar do solvente. Este método aumenta a transferência de massa, provocando rutura celular mais rapidamente, o que resulta numa extração mais rápida e com melhores rendimentos. [13], [17], [42], [50], [51], [54]–[57]

Uma abordagem alternativa a estes procedimentos é a extração assistida por ultrassom, que se baseia na cavitação resultante da criação das bolhas através de ondas de ultrassons. Esta cavitação provoca turbulência e aumenta a colisão das partículas e a força mecânica, causando a rutura celular. [13], [17], [41], [49], [51], [54], [56], [57]

Este processo, face aos processos convencionais, facilita a transferência de massa entre fases imiscíveis através de super agitação em baixa frequência, o que torna o processo mais eficiente, com tempos de extração e consumo energético menores, e uso de condições reacionais mais suaves. [13], [17], [41], [49], [51], [56], [57]

Estes métodos de extração através de sistemas avançados têm sido amplamente empregues na extração de biomoléculas de diferentes fontes. [41], [51]

I.4.3 Métodos de Purificação de Polissacáridos

As amostras obtidas após o processo de extração apresentam uma variedade de biomoléculas, entre as quais, polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, entre outros. Desta forma, são aplicados vários métodos de purificação com o objetivo de obter uma amostra pura. [51]

A purificação pode ser efetuada com diversas técnicas entre as quais precipitações com determinados solventes, hidrólises e cromatografias. A primeira abordagem ao processo de purificação da amostra passa, frequentemente, por processos de precipitação com etanol. Este processo permite a precipitação de polissacáridos e separação de alguns contaminantes de baixa massa molar. Por outro lado, é possível efetuar hidrólise ácida ou tratamento com enzimas, como proteases, para eliminar contaminantes. [48], [51]

Após o processo de tratamento com solventes e/ou enzimas, a amostra pode conter algumas contaminações e uma variedade de polissacáridos com diferentes massas moleculares. Deste modo, aplica-se, frequentemente, técnicas de membranas e cromatografia sendo as mais utilizadas cromatografia de troca iónica e cromatografia de exclusão molecular. A cromatografia de troca iónica é ideal para fracionamento de polissacáridos neutros e acídicos através de gradientes de salinidade ou de pH. A separação dos polissacáridos neutros pode ser efetuada a partir de cromatografia de exclusão molecular que realiza o fracionamento de acordo com a massa molar do polissacárido. [51], [56], [58]

I.5 Métodos e doseamento de componentes bioativos

A deteção e quantificação rápidas e fiáveis do conteúdo de compostos bioativos em espécies de microalgas e seus derivados são de extrema importância. Após a extração destas moléculas, é essencial quantificar os produtos obtidos.

Deste modo são utilizadas várias técnicas de doseamento de compostos bioativos, nomeadamente técnicas enzimáticas, de fluorescência, imunoquímicas e colorimétricas. Um dos tratamentos utilizados para a determinação de compostos bioativos recorre à digestão enzimática destes compostos, nomeadamente a digestão enzimática de polissacáridos a monómeros de glucose que estão disponíveis em kits comerciais. As técnicas enzimáticas são seletivas e sensíveis, no entanto, revelam ser processos bastante dispendiosos e difíceis que os torna pouco práticos para aplicação recorrente. [52], [59]

Por outro lado, são utilizados métodos de quantificação baseados em fluorescência demonstrado pela formação de alguns complexos composto bioativo-corante. Os métodos de fluorescência podem causar um desvio batocrômico ou hipsocrômico no comprimento de onda que resulta numa variação da intensidade de fluorescência. Destas técnicas de fluorescência, podem ser analisados os espectros de emissão e espectros de excitação. O método de quantificação por fluorescência também apresenta desvantagens inerentes à sua complexidade, designadamente o tempo e a estabilidade da solução a analisar. [52], [60], [61]

A abordagem mais usual para a deteção e quantificação de diversas biomoléculas é a utilização de métodos colorimétricos, uma vez que são técnicas rápidas e precisas. [52]

I.5.1 Métodos Colorimétricos

Os métodos colorimétricos têm por base a alteração da absorvância (ou transmitância) de um reagente colorido que é adicionado a uma amostra, podendo esta alteração ser provocada por uma reação com a amostra ou através de interações entre o reagente utilizado e a amostra. Estes métodos são seletivos, sendo necessário utilizar um composto diferente, consoante a substância que se pretende quantificar.

Geralmente, estes métodos consistem na comparação da absorvância da mistura reacional obtida para solução padrão e para amostra, usando uma curva de calibração de forma a determinar a concentração do composto em questão presente na amostra.

I.5.1.1 Método do Fenol-Ácido Sulfúrico

Como já foi referido anteriormente, os polissacáridos de origem vegetal e marinha apresentam bastante interesse na indústria devido à sua atividade biológica e aplicação industrial e ambiental.

Dubois *et al.*, em 1956, desenvolveram um método colorimétrico versátil, de elevada sensibilidade, rápido e mais económico, o método do fenol-ácido sulfúrico. Este método tem como princípio a desidratação dos polissacáridos a derivados de furfural provocada pelo ácido sulfúrico. Posteriormente, os derivados de furfural formam complexos colorimétricos com o fenol que absorvem a luz visível e têm um máximo de absorvância a 490nm (Figura I.6). [62], [63]

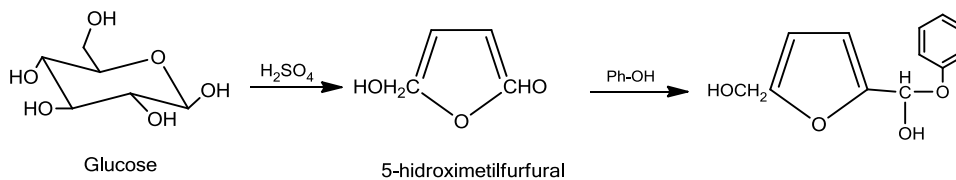


Figura I.6 - Reações do método fenol-ácido sulfúrico com glucose (Adaptado). [64]

O método fenol-ácido sulfúrico, embora não sendo específico, tem sido amplamente utilizado devido à sua sensibilidade e tem sofrido adaptações de modo a alargar o seu espectro de deteção a polissacáridos (neutros e aniónicos), glicoproteínas e glicolípidos e, foi adaptado a microplaca de modo a rentabilizar o processo relativamente à quantidade de reagente e amostra utilizada e ao tempo necessário para a reação. Originalmente eram necessários 50 a 450 nmol de monossacáridos ou equivalente para análise, ao passo que em microplaca que permite uma versão reduzida, exige apenas 10 a 80 nmol de açúcares. [13], [63]–[65]

Apesar das várias vantagens associadas ao método fenol-ácido sulfúrico este apresenta também desvantagens, principalmente ao nível da saúde do utilizador e especificidade. O método utiliza como agente colorimétrico uma solução de fenol, que apresenta inúmeros perigos para a saúde humana e o facto de os hidratos de carbono catiónicos não reagirem com o ácido sulfúrico, afetando assim os coeficientes de absorção molar e a respetiva quantificação.[66]

I.5.1.2 Método do Corante Congo Red

Os β -glucanos têm despertado bastante interesse devido à sua elevada atividade biológica, nomeadamente às propriedades de imunomodulação, antitumorais e antioxidante. Tornou-se essencial a sua deteção e quantificação em várias amostras provenientes de diversas fontes. Inicialmente eram apenas descritos métodos economicamente inviáveis e bastante morosos para a deteção desta biomolécula que incluíam hidrólise ou reações enzimáticas. Pela ausência de praticidade deste método foi de extrema importância encontrar uma alternativa economicamente mais viável com tempos de execução mais favoráveis. [34], [35], [59], [67]

Em 2004, Ko e Lin desenvolveram um método com um corante, azul de anilina (azul da China), que interagiu e quantificava β -glucanos. No entanto, este método apresentava a limitação de detetar apenas β -glucanos de hélice única, o que exibiu uma desvantagem considerável, uma vez que os glucanos que apresentam maior atividade biológica são os (1,3) e (1,6) com estrutura em tripla hélice. [67], [68]

Introdução

Assim sendo, foi estudado por Semedo *et al.* e por Nitschke *et al.* a deteção de β -D-glucanos de tripla hélice com o corante Congo Red. Estes investigadores detetaram que o corante Congo red apresenta interação seletiva e sensível com β -(1,3)-(1,6)-glucanos de tripla hélice provocando um desvio batocrómico de 488 para 516nm, não interagindo com outros polissacáridos. [35], [67]

O corante azo Congo Red, cuja estrutura molecular consta na Figura I.7, estabelece, devido aos seus grupos amino, ligações por pontes de hidrogénio com os grupos hidroxilo dos β -glucanos e interage com a estrutura terciária dos mesmos por forças de Van der Waals. [69]

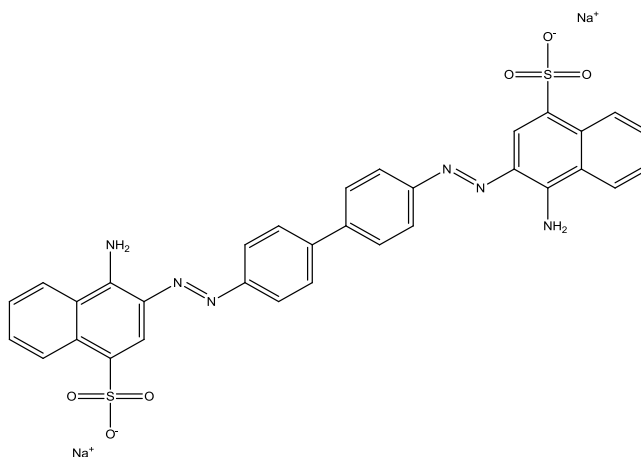


Figura I.7 – Estrutura molecular do corante Congo Red.

Semedo *et al.* apresentaram uma alteração aos protocolos tradicionais, otimizando método à escala em microplaca de 96 poços e no que diz respeito às condições reacionais, permitindo a utilização de menor quantidade de amostra e solvente. [35]

I.5.1.3 Método do corante Alcian Blue

Como foi referido no ponto I.5.1.2 os polissacáridos, especificamente os β -D-glucanos, têm despertado bastante interesse devido à sua elevada atividade biológica. Esta atividade biológica está normalmente associada aos β -glucanos lineares ou ramificados (1,3), (1,4) e (1,6), com especial atenção para o β -(1,3)-(1,6)-glucano. [34]

Introdução

O corante Alcian Blue, cuja estrutura molecular está representada na Figura 1.8, demonstrou ser um corante de interesse, uma vez que já foi aplicado na área da saúde para reconhecimento de polissacáridos e glicosaminoglicanos ácidos e sulfatados, como por exemplo a heparina. A interação com este corante baseia-se na capacidade de ligação tetravalente aos grupos ácidos e sulfatados dos glicosaminoglicanos, a valores de pH que permitam não só a neutralização dos grupos referidos anteriormente, bem como a eliminação de forças eletrostáticas com outros grupos. [34], [70]

Semedo *et al.* otimizaram a aplicação deste corante na deteção de β -glucanos e detetou que, na presença específica de β -(1,3)-glucano existia um desvio hipsocrómico entre 620 e 606 nm. Para além de terem comprovado a possibilidade de deteção destes polissacáridos, Semedo *et al.* adaptou o método à escala de microplaca de 96 poços, facilitando a aplicação do método e otimizando o meio reacional, reduzindo a quantidade de amostra e solventes a utilizar. [34]

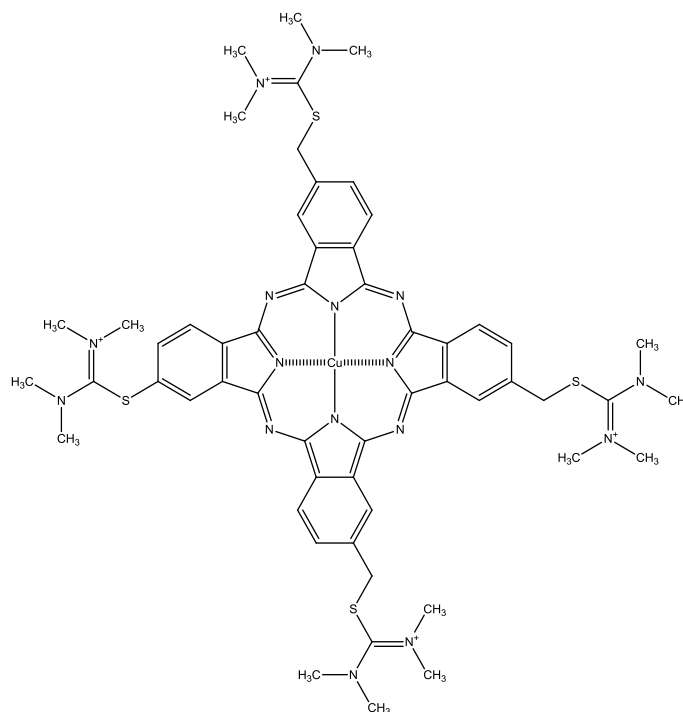


Figura 1.8 - Estrutura molecular do corante Alcian Blue.

I.5.1.4 Método de ligação do Azul de Coomassie

As proteínas enquanto biocomponentes apresentam bastante importância tanto na área da saúde como na área da biofarmacêutica devido à sua elevada atividade biológica.

A sua quantificação já foi executada com reagentes utilizados em larga escala na indústria biológica como Tris, EDTA, carbo-hidratos, entre outros, no entanto estes métodos apresentaram muitas interferências. Outros métodos, revelavam insensibilidade considerável para a detecção de proteínas. Assim, de modo a eliminar este problema foi desenvolvido o estudo para aplicação do corante Azul de Coomassie na detecção de proteínas. [71]

O azul de Coomassie, um corante de trifenilmetano (Figura I.9), estudado por Fazekas de St. Groth em 1963, demonstrou que, na sua forma aniônica, em meio ácido, tinha capacidade de se ligar aos grupos amino das proteínas criando um complexo proteína-corante. Este complexo não só estaria ligado por forças iônicas como teria ainda interações por forças de Van der Waals nos grupos aromáticos de ambos os compostos. No entanto, o desenvolvimento do método apareceu mais tarde com Bradford em 1976, que aplicou o corante Azul de Coomassie G-250 a várias proteínas e definiu que o complexo corante-proteína apresentava um desvio batocromático de 465 para 595-nm alterando a sua coloração original acastanhada para uma coloração azulada. [71]–[74]

A formação do complexo corante-proteína tem sido extensivamente estudada e é possível verificar atualmente que os grupos sulfônicos do corante apresentam bastante importância no processo, uma vez que estes formam um par iônico com resíduos de arginina e lisina. Para além das interações referidas, o complexo formado apresenta ainda interações hidrofóbicas. [72]–[74]

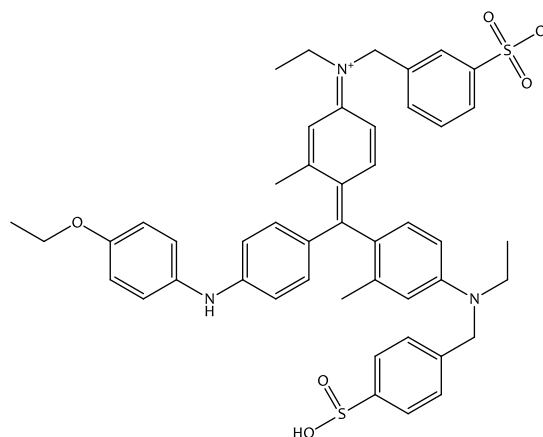


Figura I.9 - Estrutura molecular do corante Azul de Coomassie G-250.

A utilização do azul de Coomassie G-250 tornou-se num método útil para deteção e quantificação de proteína com uma vasta aplicação devido à sua sensibilidade, rapidez, viabilidade económica e ao facto de apresentar menos interferentes que os métodos anteriormente descritos. [71], [74]

Ainda assim, existem algumas desvantagens que, apesar da intensa investigação não foram ultrapassados. O método de ligação de azul de Coomassie está bastante definido e relacionado com os resíduos de arginina e lisina, no entanto, o azul de Coomassie é incapaz de se ligar a aminoácidos de arginina e lisina livres, uma vez que estes apresentam uma massa molar mais elevada. Uma das lacunas do método é a incapacidade de criar complexo com proteínas ou péptidos com massa molar inferior a 3000 Da, o que apresenta uma grande desvantagem visto que exclui biomoléculas como oligopéptidos e hormonas de maior massa molar com bastante aplicabilidade industrial. [73], [75]

A proteína padrão utilizada neste método é habitualmente a albumina de soro bovino (BSA) que apresenta bastante reprodutibilidade no método. [71], [73]

I.5.1.5 Método turbidimétrico de cloreto de bário

Dentro do grupo dos polissacáridos, os polissacáridos sulfatados podem ser considerados pertencentes ao subgrupo dos que apresentam maior atividade biológica e maior benefício para a saúde. Como tal, tornou-se de extrema importância a sua deteção através de métodos simples, rápidos e económicos. [13]

Anteriormente, já tinham sido desenvolvidos métodos que envolviam hidrólise da amostra ou reação enzimática prévia, no entanto este processo torna-se pouco prático, bastante moroso com possível destruição da amostra. Desse modo, a EPA (United States Environmental Protection Agency) desenvolveu um método rápido e eficaz para deteção destas biomoléculas em águas. [76], [77]

Na presença de cloreto de bário em meio acidificado ocorre a precipitação dos iões sulfato, que resulta numa turbidez da solução mensurável a 420nm. O método apresenta um limite de deteção bastante baixo, de 0,05 mg/L o que se torna uma vantagem quando é aplicado a amostras pouco concentradas. [76]–[78]

I.6 Atividade Antioxidante

Durante o ciclo de vida dos organismos humanos, as reações metabólicas do organismo vão gerando espécies oxidativas e radicais livres. Estas biomoléculas apresentam pares de elétrons não compartilhados, o que as torna bastante reativas resultando num *stress* oxidativo do organismo. O excesso destas espécies pode provocar danos irreversíveis, nomeadamente a nível de DNA, lípidos e membranas que resultam, inevitavelmente, em doenças graves nomeadamente a nível do sistema imunomodulatório, cancro e doenças auto-degenerativas como Alzheimer e Parkinson. [33], [43], [44], [79], [80]

O nosso organismo criou um mecanismo de defesa contra o *stress* oxidativo produzindo espécies capazes de reagir com as espécies oxidativas e neutralizar o seu efeito. No entanto, estas espécies de defesa são limitadas e não são capazes de combater o efeito de *stress* oxidativo provocado por fatores exteriores e ambientais relacionados com a poluição, raios UV, entres outros. [33], [43], [44], [57], [81]

Existem, assim, compostos antioxidantes sintéticos autorizados que são introduzidos nos alimentos como hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA). No entanto, existem dúvidas quanto aos efeitos destes compostos no nosso organismo, nomeadamente quanto à sua bioacumulação e absorção por parte dos órgãos. Desta forma, torna-se essencial a procura por compostos antioxidantes naturais provenientes, por exemplo, de plantas, cogumelos e algas que protejam o nosso organismo contra o *stress* oxidativo. [27], [33], [39], [43], [45], [79]

A capacidade antioxidante pode ter origem em espécies de biocompostos, particularmente, enzimas (peroxidase, superóxido dismutase, entre outras), moléculas de elevado peso molecular (ácido ascórbico, ácido úrico), hormonas (estrogénio, melatonina) e radicais livres. [44], [82]

As microalgas têm despertado bastante interesse nesta área, uma vez que produzem ácidos gordos polinsaturados, polissacáridos sulfatados e compostos fenólicos, que são espécies associadas a elevadas propriedades antioxidantes. [27], [45], [83]

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). [82]

Dentro das reações SET utilizam-se habitualmente os métodos dos radicais DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) e ABTS (2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), capacidade redutora de iões Fe^{3+} e capacidade quelante de Fe^{2+} . Estes métodos foram os métodos aplicados no decorrer deste trabalho, com objetivo de estudar *in vitro* a capacidade antioxidante dos compostos produzidos pela microalga *P.tricornutum*. [82]

Apesar da extensa investigação sobre o tema, é difícil prever como as espécies irão combater os mecanismos oxidativos no organismo, uma vez que existem algumas condições particulares inerentes à complexidade inigualável do corpo humano comparativamente aos estudos *in vitro*. [82]

I.7 Técnicas de Caracterização Estrutural de Polissacáridos

A caracterização e análise estrutural de polissacáridos e das respetivas ligações é de elevada importância, uma vez que a sua estrutura e a sua bioatividade estão, inevitavelmente, relacionadas com a sua massa molar, composição em monossacáridos, tipo de ligações presentes, entre outros. Deste modo, são utilizados vários métodos de caracterização estrutural para identificação tanto dos monossacáridos constituintes como das ligações glicosídicas características destas biomoléculas. [57], [84]

Para a análise de composição em monossacáridos são utilizadas diversas técnicas de cromatografia. Previamente à submissão da amostra ao processo cromatográfico é necessário realizar hidrólise da amostra com metanol ou ácido sulfúrico, de modo a quebrar as ligações glicosídicas. Este tratamento apresenta algumas desvantagens, nomeadamente, possível destruição da amostra e alteração ou inibição de bioatividade. [13], [57]

A composição em monossacáridos é realizada frequentemente por cromatografia gasosa (GC), uma vez que se trata de uma técnica rápida, versátil e sensível. Geralmente, esta técnica é acoplada a espectrometria de massa, GC-MS, de modo a aumentar a sua performance e quantificação. A associação destas técnicas permite, ainda, a distinção entre carbo-hidratos de interesse e espécies contaminantes. [7], [13], [57], [58], [84]

Por outro lado, a cromatografia líquida (LC) também é bastante utilizada por se tratar de um método mais simples, reduzindo o tempo de preparação da amostra. Como os monossacáridos não absorvem na zona espectral do ultravioleta, a cromatografia líquida aplicada, HPLC, é geralmente associada a detetores UV, detetores de índice de refração e até detetores de *laser scattering*. [7], [13], [56], [58]

Devido à sua elevada sensibilidade e resolução podem ser também utilizadas ainda técnicas de cromatografia de troca iônica de elevada performance (HPAEC) e cromatografia de exclusão molecular de elevada performance (HPSEC). [13]

Para a análise das ligações presentes nos polissacáridos são aplicados os métodos de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Estas técnicas fornecem informações sobre a estrutura dos polissacáridos, a presença de anómeros α e β e características estruturais das ligações presentes. [7], [13], [48], [56], [57], [84]

Apesar da importância do conhecimento estrutural da biomolécula, a complexidade de ligações e a presença contaminantes como proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, sulfatos, entre outros apresentam interferência e bastante dificuldade à aplicação destes métodos. [13]

I.7.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica de FT-IR é utilizada em larga escala em caracterização estrutural. Esta técnica utiliza radiação infravermelha que causa a vibração por parte dos átomos ou grupos funcionais resultando na identificação de certas ligações características de determinado composto. [13], [84]

Os espectros de FT-IR dos polissacáridos já foram estudados anteriormente e apresentam um *footprint* constituído por determinadas regiões importantes que devem ser investigadas quando é efetuada análise estrutural parcial destas biomoléculas, nomeadamente, a 3600-2800 cm^{-1} que representa a vibração da extensão das ligações O-H, 1500-1200 cm^{-1} que resulta da vibração da extensão das ligações C-H, 1200-950 cm^{-1} que representa a ligação C-O-C, 950-700 cm^{-1} que resulta da vibração da extensão da ligação C-O. Adicionalmente, os carboxilatos (COO^-) e ligação C=O é identificada a cerca de 1600-1730 cm^{-1} , respetivamente, os grupos éster sulfato (O-SO_3^-) identificam-se na gama de 1260-1210 cm^{-1} , os ésteres alifáticos apresentam-se a 1220-1170 cm^{-1} , os anómeros α e β são identificados entre 950-750 cm^{-1} .

É possível verificar a presença de proteínas através das bandas de amida I a 1709-1583 cm^{-1} e amida II a 1585-1481 cm^{-1} e ainda contaminação por ácidos nucleicos a 1356-1191 cm^{-1} . [13], [85], [86]

II. ENQUADRAMENTO

II. Enquadramento

Este trabalho teve como objetivo a produção e extração de biomoléculas a partir de uma diatomácea marinha da espécie *Phaeodactylum tricornutum*.

As microalgas desta espécie produzem uma variedade de polissacáridos, nomeadamente β -glucanos e polissacáridos sulfatados, que podem ser excretados para o meio ou ficarem aderidos na parede celular. Por vezes os polissacáridos destes organismos podem ser encontrados na forma de complexos com outras biomoléculas, nomeadamente proteínas, constituindo complexos proteína-polissacáridos ou glicoproteínas, que melhoram a adesão do polissacárido à parede celular.

Este trabalho final de mestrado iniciou-se com um estágio de 4 semanas (21/01/2019-15/02/2019) na unidade de investigação e desenvolvimento da empresa Allmicroalgae, mais concretamente na sua unidade produção situada em Pataias – Leiria. A Allmicroalgae produz microalgas através da integração do processo desde a escala laboratorial até ao empacotamento do produto final, utilizando a tecnologia em sistemas fechados, fotobiorreactores tubulares e fermentadores, e recentemente em sistemas abertos, *raceways*. A biomassa é produzida e processada para fins industriais, nomeadamente para a alimentação animal e humana e para cosmética.

Assim, no decorrer deste estágio foi produzida à escala laboratorial, biomassa de *P. tricornutum* permitindo a familiarização da produção de microalgas em ambiente industrial e das técnicas associadas a estas metodologias.

O processo teve início com o controlo e manutenção de culturas de diversas espécies de microalgas, nomeadamente *P. tricornutum*, bem como *Chlorella* sp. *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis* sp. e *Pavlova* sp., através de medições diárias de densidade ótica, pH, salinidade, temperatura, determinação dos conteúdos em nitratos e amónia e de pesos secos. Estes parâmetros são controlados de modo a acompanhar o crescimento celular e verificar as necessidades nutricionais das culturas. Foram também realizadas, observações microscópicas de forma a verificar o estado das células e identificação de potenciais contaminações.

Enquadramento

Durante este período, foi também possível acompanhar um processo de *scale-up* da cultura de *P. tricornutum* de balões de 2 L que foram transferidos, posteriormente, para balões de 5 L, e, conseqüentemente para painéis *green-wall* de 1 m³ (incluindo toda a preparação do meio de cultura).

Paralelamente foi prestado auxílio à equipa de fermentação na preparação de meios de cultura, esterilização de material e inoculação dos mesmos.

As culturas de *P. tricornutum* desenvolveram-se em meios de cultura com três diferentes salinidades (25 g/L, 27 g/L e 30 g/L de NaCl) e durante dois tempos de crescimento (1 semana e 3 semanas).

O restante trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e no Laboratório do Centro de Investigação de Engenharia Química e Biológica do ISEL. A biomassa produzida na Allmicroalgae foi sujeita a vários métodos de extração para a obtenção de biomoléculas intracelulares e o meio de cultura permitiu o isolamento e análise de compostos bioativos extracelulares, tendo os seus conteúdos sido analisados e quantificados através dos vários métodos descritos no Capítulo 1.

De forma a otimizar a extração destas biomoléculas, foram testados métodos convencionais bem como procedimentos alternativos sustentáveis, que vão ao encontro dos princípios da Química Verde. Com base nos seus teores, principalmente em polissacáridos, foram selecionados os melhores métodos de extração e otimizados os seus parâmetros. O potencial biológico dos compostos extraídos foi também avaliado por determinação das suas atividades antioxidantes *in vitro*.

Uma vez que, a atividade biológica destes compostos está estreitamente relacionada com a sua composição química e estrutura, aplicou-se a técnica de FT-IR aos extratos obtidos, de forma a identificar as diferenças e particularidades estruturais dos extratos e caracterizar parcialmente os biopolímeros detetados.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III. Materiais e Métodos

III.1 Reagentes

2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), ácido poligalacturônico ($C_6H_{10}O_7$), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) da Alfa Aesar. Ácido acético (CH_3COOH) puro, ácido clorídrico (HCl), etanol (C_2H_6O) 100% da Fisher. Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), ácido tricloroacético (CCl_3COOH) 99,5%, 1-butanol ($CH_3(CH_2)_3OH$) a 100%, cloreto de alumínio ($AlCl_3$), cloreto de bário ($BaCl_2$) 99%, cloreto de ferro (III) ($FeCl_2$), ferrocianeto de potássio ($C_6FeK_4N_6$), gelatina, D-glucose monohidratada, nitrato de sódio ($NaNO_3$), sulfato de sódio (Na_2SO_4) 99%, tritriplex (EDTA) a 99% da Merck. Ácido gálico ($C_7H_6O_5$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) 95-97%, β -D-glucano de *Euglena gracilisa* 95% da Fluka. Albumina de soro bovino sem protease (BSA) da Acros organics. Alcian Blue 8GX, azul de Coomassie G-250, catequina hidratada 98%, congo red 40%, ferrozina, β -D-glucano de Cevada a 95%, reagente de Folin-Ciocalteu, persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), Trolox 97% da Sigma. Carbonato de sódio ($CaCO_3$) anidro, cianeto de potássio (KCN) 99% da Riedel-de-Hägen. Cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de potássio (KOH) da Panreac. Clorofórmio ($CHCl_3$) 100% da Carlo Erba. Fenol (C_6H_6O), metanol (CH_4O) 100% da VWR. Fosfato monossódico (NaH_2PO_4) da José M. Vaz de Pereira Hidróxido de sódio (NaOH) extra puro Scharlau. Resina DEAE-52 de troca aniônica microgranular da Whatman.

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

III.2 Microalga

A microalga utilizada neste estudo foi a diatomácea *Phaeodactylum tricorutum* pertencente à Algoteca da unidade ID da Allmicroalgae.

III.3 Métodos

III.3.1 Cultivo e manutenção de culturas

O crescimento e acompanhamento das culturas de *Phaeodactylum tricorutum* foram efetuados, como referido anteriormente, nas instalações de ID da Allmicroalgae.

As culturas de *Phaeodactylum tricornutum* cresceram durante 1 e 3 semanas em meio comercial MNB, com três concentrações diferentes de salinidade (25 g/L, 27g/L e 30 g/L de NaCl) a pH 7-8, em balões de 5 L. Os meios de cultura para cada condição foram preparados da seguinte forma: 1,6 L de água (33% (v/v) do volume do balão utilizado), 100 mL de meio comercial MNB (contendo 20mL de solução stock de micronutrientes e 550 µL de uma solução de ferro 2% (m/v)), 56 mL de cloreto de magnésio 44 g/L e 192 mL, 226,2 mL ou 276 mL de salmoura (solução de NaCl 30 g/L) para as salinidades de 25 g/L, 27g/L e 30 g/L, respetivamente. Após esterilização em autoclave os meios foram inoculados com 1,6 L de pré-inóculo de *P. tricornutum* com salinidade de 34 g/L. As culturas foram sujeitas a uma temperatura de 27 °C com arejamento constante, injetado com CO₂ e ar.

Durante o processo de crescimento da *P. tricornutum* foi efetuado o controlo e a manutenção das cultura, através da medição da densidade ótica a 600 nm, da temperatura, do pH, salinidade e determinação do peso seco de biomassa e do teor de azoto (amónia e nitratos). As células foram também observadas utilizando um microscópico ótico.

Do estágio realizado na Allmicroalgae resultaram 6 amostras de biomassa e 6 de meio de cultura de *P. tricornutum*.

III.3.2 Extração de compostos bioativos intracelulares

Após os respetivos tempos de crescimento, a biomassa *P. tricornutum* foi separada do meio de cultura por centrifugação (centrífuga HERMLE Z383K) a 4500 rpm durante 30 min a 4 °C. O meio de cultura de crescimento celular foi reservado a -4°C.

Inicialmente selecionou-se a biomassa que cresceu em condições de salinidade de NaCl 30 g/L durante 3 semanas para testar os vários métodos de extração dos compostos intracelulares. Esta escolha baseou-se no facto desta concentração de NaCl representar a salinidade mais próxima da água do mar e no facto de que com maior tempo de crescimento seria expectável um maior teor em biomoléculas. Após análise dos resultados selecionaram-se os métodos que apresentam uma maior capacidade de extração de compostos bioativos e aplicaram-se às restantes culturas que se desenvolveram sob outras condições de crescimento.

III.3.2.1 Extração Convencional em multi-etapas

O primeiro método de extração realizado foi o da extração convencional fracionada em 5 etapas, inicialmente com água fria seguida de extração com água em ebulição e posteriormente em condições ácidas e alcalinas, descrita previamente por Semedo *et al.* 2015 (Figura III.1). [35]

Foram adicionados 2 volumes de água destilada à biomassa à temperatura ambiente, agitou-se durante 5 minutos e centrifugou-se a 11000 rpm durante 5 min a 4 °C. Desta extração recolheu-se o sobrenadante e obteve-se a fração FW1. Ao *pellet* adicionou-se 1 volume de água destilada e ressuspenderam-se as células com a ajuda de um agitador vortéx (Labnet VX100). De seguida, incubou-se a suspensão a 100 °C durante 3h. Centrifugou-se a 11000 rpm durante 5 min a 4 °C e recolheu-se o sobrenadante (FW2). De seguida lavou-se a biomassa com água destilada à temperatura ambiente, e o sobrenadante recolhido adicionou-se a FW2. Ao *pellet* resultante adicionaram-se 2 volumes de uma solução aquosa de KOH 1M e agitou-se numa placa de aquecimento a 60 °C durante 20 min. Centrifugou-se a 11000 rpm durante 10 min a 4 °C e recolheu-se o sobrenadante (FKOH). O *pellet* foi lavado de novo e filtrou-se a mistura no funil de placa filtrante G3 a vácuo e o sobrenadante recolhido foi adicionado a FKOH. O pH desta fração foi neutralizado. O sedimento foi de novo ressuspendido com 2 volumes de uma solução de HCl 0,6M e ajustou-se o pH da solução a 6,3. Incubou-se a mistura num banho a 100 °C durante 1h. Centrifugou-se a 11000 rpm durante 10 min a 4 °C, recolheu-se o sobrenadante e neutralizou-se o seu pH com uma solução de NaOH 6M (FHCl). Por fim, ressuspendeu-se o sedimento com 2 volumes de uma solução de NaOH 1M, agitou-se a suspensão a 60 °C durante 20 min. Centrifugou-se a 11000 rpm durante 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e neutralizado com uma solução de HCl 6M (FNaOH). [34], [35]

Materiais e Métodos

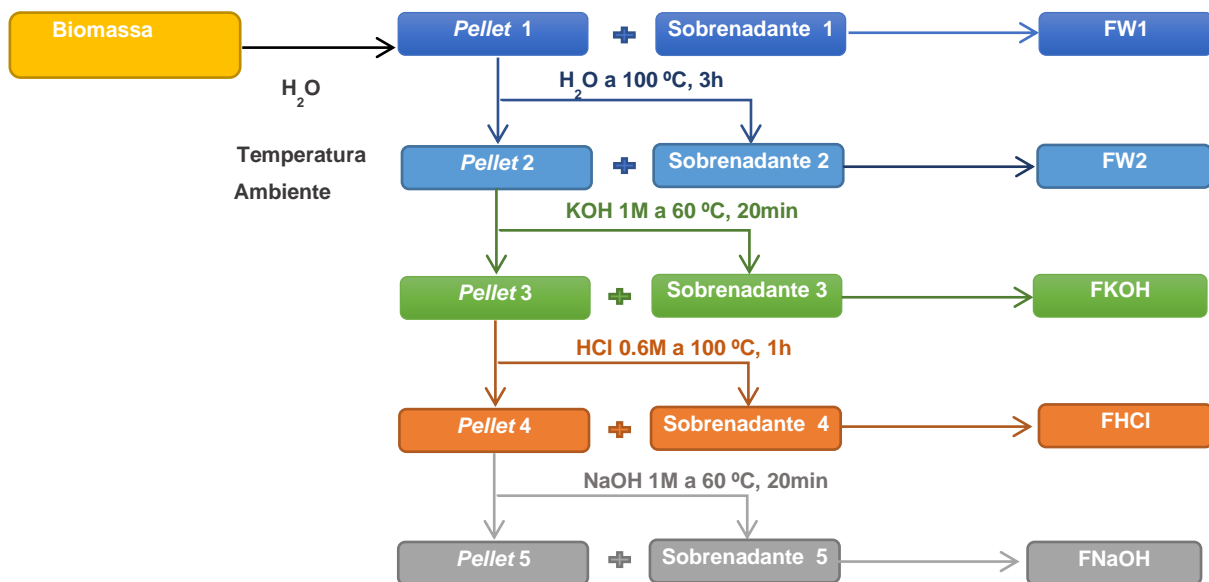


Figura III.1 - Esquema ilustrativo do método de extração convencional fracionada em 5 etapas com água fria e em ebulição seguida de condições ácidas e alcalinas.

III.3.2.2 Extração em Autoclave

A extração em autoclave foi inicialmente realizada segundo o procedimento descrito anteriormente por Zhang *et al.* [87]

Os biocompostos foram extraídos a partir da biomassa de *Phaeodactylum tricornutum* com água numa razão constante biomassa:solvente de 1:10 a uma temperatura de 125 °C. O tempo de extração foi variável: 0,5 h, 1,5 h, 3h e 4h. Após extração o sobrenadante foi separado do sedimento por centrifugação a 11000 rpm durante 10 min. Este extrato foi designado por AUTO.

III.3.2.3 Extração Contínua em Soxhlet

A extração convencional contínua em Soxhlet foi realizada de acordo com o descrito por Silva *et al.*, com algumas modificações. Foram testados dois solventes de extração, água e etanol 80% (v/v), a uma temperatura de 80 °C e com uma razão constante de biomassa:solvente de 1:10, durante 3h. Após extração, separaram-se os sobrenadantes dos sedimentos por centrifugação a 11000 rpm durante 10 min foram identificados por SH₂O e SEtOH, respetivamente. [7], [50]

III.3.2.4 Extração assistida por micro-ondas

A extração assistida em micro-ondas foi efetuada com base no método descrito por Yuan *et al.* A extração foi realizada no reator de micro-ondas monomodo (CEM, Discover SP), e foi testada sob várias condições de temperatura, tempo de extração e solvente, mantendo-se constante a razão de biomassa:solvente de 1:10.

Inicialmente utilizou-se como solvente uma solução aquosa de HCl 0,1M e foram testadas três temperaturas (90 °C, 120 °C e 150 °C) e tempos de extração (5, 15 e 30 min). Posteriormente, selecionou-se a temperatura de 120 °C e utilizou-se água destilada como solvente durante os tempos de extração já referidos. Por fim, testou-se como solvente uma solução de KOH 0,1M a 120 °C e durante 30 min. Os extratos foram obtidos após centrifugação a 11000 rpm durante 15 minutos e posterior filtração com funil de placa filtrante G3 a vácuo. Reservaram-se os sobrenadantes e foram identificados como MICRO. [42]

III.3.2.5 Extração Assistida por Ultrassons

Na extração assistida por ultrassons utilizou-se uma sonda de ultrassons, e um banho de ultrassons segundo os procedimentos descritos por Rahimi *et al.* com alterações. [49]

A extração assistida por ultrassons com banho de ultrassons (Wise Clean, WUC-D10H) foi realizada com uma potência de aquecimento equivalente de 100 W e uma frequência de 40 kHz a uma temperatura constante de 60 °C. Este método foi efetuado durante 1h, tendo sido retiradas amostras a cada 10 min, para posterior análise. A razão biomassa:solvente foi mantida a 1:10. Posteriormente, centrifugou-se o extrato a 11000 rpm durante 5 minutos e reservou-se o sobrenadante, tendo sido identificado como BANHO.

Na extração assistida por ultrassons com sonda (Labsonic L B.Braun) utilizou-se uma razão de biomassa:solvente de 1:10 e uma temperatura de 62 °C, com frequência fixa de 20 kHz e potência 90W durante 11min. O sobrenadante foi recolhido por centrifugação a 11000 rpm durante 5 minutos e foi designado por SONDA.

III.3.3 Extração de compostos bioativos extracelulares

O isolamento dos compostos bioativos do meio de cultura foi efetuada por precipitação segundo Silva *et al.* e Cui *et al.* [88], [89]

Para precipitação dos compostos extracelulares, na sua grande maioria polissacáridos, adicionou-se aos meios de cultura obtidos após centrifugação das culturas celulares, 4 volumes de etanol 96% (v/v) e deixou-se repousar a 4 °C durante 3 dias. De seguida, recolheu-se o precipitado por centrifugação durante 10 minutos a 11000 rpm. O precipitado (P) foi dissolvido em tampão fosfato salino 15 mM, pH 7,2 (PBS).

III.3.4 Doseamento de biomoléculas

III.3.4.1 Método do Fenol-Ácido Sulfúrico

Para a quantificação dos polissacáridos totais foi utilizado o método do fenol-ácido sulfúrico em microplaca previamente descrito por Masuko *et al.* Numa placa NUNC de 96 poços adicionaram-se 50 µL de amostra a analisar, 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e por fim, 30 µL de uma solução aquosa de fenol 5% (m/v). Incubou-se a mistura reacional num banho termostaticado a 90 °C durante 5 min. Após arrefecimento até à temperatura ambiente leu-se a absorvância a 490 nm num leitor de microplaca (Bio-Rad 680). Os doseamentos foram efetuados em triplicado e o ensaio em branco foi realizado com água. Foi utilizado como padrão ácido poligalacturónico de 0-10 µg/µL.[65]

III.3.4.2 Método do corante Congo Red

Para o doseamento de β -(1,3)-D-glucanos com estrutura em tripla hélice nos vários extratos, utilizou-se o método do corante Congo Red otimizado por Semedo *et al.* Estas quantificações foram efetuadas em microplacas NUNC de 96 poços onde se adicionaram 140 µL de amostra e 140 µL da solução de corante Congo Red 0,017% (m/v) em tampão PBS 1x concentrado a pH 7,2. Leu-se a absorvância a 510 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). As amostras foram analisadas em triplicado e os ensaios em branco foram efetuados com água destilada. Como padrão foi utilizado β -(1,3)-D-Glucano de cevada numa gama de 0-30 µg/mL dissolvido numa solução aquosa de NaOH 1M e posteriormente neutralizada. [35]

III.3.4.3 Método do corante Alcian Blue

De modo a determinar o teor em β -glucanos nos extratos obtidos utilizou-se, ainda, o método do corante Alcian Blue descrito anteriormente por Semedo *et al.* Estas quantificações foram efetuadas em microplaca NUNC de 96 poços, onde foram adicionados 100 μ L de amostra a dosear e igual volume de uma solução de Alcian Blue 0,017% (m/v) em ácido acético 2%(v/v). Mediu-se a absorvância a 620 nm num leitor de microplaca (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Utilizou-se como branco, água destilada e como padrão uma solução de β -D-glucano de *Euglena gracilis* de 0-1,5 μ g/mL dissolvido numa solução aquosa de NaOH 1M e posteriormente neutralizada. As absorvâncias das amostras foram subtraídas às absorvâncias dos respetivos ensaios em branco, e todos os ensaios foram realizados em triplicado.[34]

III.3.4.4 Método de ligação do Azul de Coomassie

Para o doseamento de proteína total dos extratos utilizou-se o método de Bradford, ou método de ligação do Azul de Coomassie. Numa microplaca NUNC de 96 poços adicionou-se 100 μ L de amostra a dosear e igual volume de solução de azul de Coomassie G-250 0,06% (m/v) em solução de HCl 0,6M. A absorvância foi lida a 655 nm num leitor de microplaca Bio-Rad 680. Utilizou-se como branco água destilada e como padrão albumina de soro bovino (BSA) numa gama de 0-20 μ g/mL. Todos os doseamentos foram efetuados em triplicado.[71]

III.3.4.5 Método turbidimétrico de cloreto de bário

O método turbidimétrico de cloreto de bário segundo descrito pela EPA foi utilizado para determinar o conteúdo em compostos sulfatados. Este doseamento foi realizado em microplaca NUNC de 96 poços onde se adicionou 25 μ L de amostra e 125 μ L de água destilada, medindo-se de seguida a absorvância a 415 nm num leitor de microplaca (Bio-rad 680). Este valor de absorvância é atribuído ao ensaio em branco. De seguida adicionam-se 40 μ L de solução de precipitação de cloreto de bário em gelatina (preparada com 10,0 g de cloreto de bário, 10,0 g de cloreto de sódio e 0,25 g de gelatina dissolvidos em 300 mL de água com elevada agitação), reservou-se a mistura reacional durante 5 minutos para desenvolvimento da reação, e mediu-se novamente a absorvância a 415nm. As absorvâncias das amostras foram subtraídas às absorvâncias dos respetivos ensaios em branco, e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Utilizou-se como padrão uma solução de Na₂SO₄ de 0-10 mM.[76]

III.3.5 Determinação de atividade antioxidante

III.3.5.1 Método de Folin-Ciocalteu

Para a determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais nos extratos obtidos foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu descrito anteriormente por Reis *et al.* com algumas modificações. [81]

O método de Folin-Ciocalteu é um método colorimétrico rápido, económico e bastante reprodutível para a análise de polifenóis em amostras de plantas, cogumelos, microalgas, entre outros. Este método baseia-se na reação que ocorre quando os polifenóis entram em contacto com um reagente oxidante específico, como o reagente Folin-Ciocalteu (FCR), dando origem a um complexo azul que pode ser quantificado através de espectroscopia UV-Vis a 655nm. A absorção máxima do cromóforo depende da solução utilizada e da concentração total de compostos fenólicos. [90], [91]

Para tal, adicionaram-se, numa microplaca NUNC de 96 poços, 30 µL de amostra, 150 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v) em água destilada e 120 µL de uma solução de NaCO₃ 75 g/L. Incubou-se a mistura durante 30min a 40 °C, num banho termostaticado, ao abrigo da luz. De seguida mediu-se a absorvância a 655nm num leitor de microplaca (BioRad 680). Como ensaio em branco foi utilizada água destilada e como padrão utilizou-se ácido gálico de 0-0,25 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de biomassa.

III.3.5.2 Determinação do conteúdo de flavonóides totais

De modo a determinar o teor total em flavonóides nos extratos utilizou-se o método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito anteriormente por Yeh *et al.* com algumas modificações. [92]

O método de determinação de flavonóides totais baseia-se no princípio da formação de um complexo ácido estável entre o grupo carbonilo C4 ou grupos hidroxilo C3 ou C5 dos flavonóides com o cloreto de alumínio, que é quantificável através de espectroscopia na gama do visível. [93]

Numa microplaca NUNC de 96 poços foram adicionados 25 µL de amostra, 100 µL de água destilada e 7,5 µL de uma solução de NaNO₃ 5% (m/v). Deixou-se repousar durante 5 minutos à temperatura ambiente e, de seguida, adicionou-se 7,5 µL de uma solução de AlCl₃ 10% (m/v). A mistura repousou de novo durante 5 minutos e adicionaram-se 100 µL de uma solução de NaOH 4% (m/v).

Materiais e Métodos

Repousou-se a mistura reacional durante 10 minutos e mediu-se a absorvância a 510 nm num leitor de microplaca (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Como branco utilizou-se água destilada e como padrão utilizou-se catequina preparada em etanol 50% (v/v) de 0-1 µg/µL. Os resultados apresentam-se em mg equivalentes de catequina (CE) por g de biomassa.

III.3.5.3 Método do radical DPPH

Para determinar a capacidade antioxidante das amostras extraídas utilizou-se o método do radical DPPH descrito por Thetsrimaung *et al.* [79]

O DPPH é um radical estável em solução que apresenta coloração violeta, com absorção máxima a 515 nm. O radical DPPH reage com uma espécie antioxidante capaz de doar um eletrão, como por exemplo o trolox (Figura III.2), reduzindo-se à sua forma não radicalar, alterando a sua coloração de violeta a amarelo.[94]–[96]

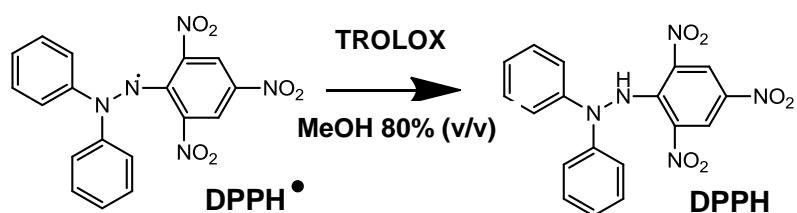


Figura III.2 - Esquema reacional do método do radical DPPH (Adaptado).[95]

Numa microplaca NUNC de 96 poços adicionou-se 10 µL de amostra e 90 µL de solução de DPPH 0,3M em metanol 80% (v/v). A mistura foi incubada durante 1h ao abrigo da luz e posteriormente leu-se a absorvância a 510 nm num leitor de microplaca (Bio-Rad 680). Como branco utilizou-se água destilada e como padrão utilizou-se Trolox 0-200 µg/mL em metanol 80% (v/v), os resultados apresentam-se em mg de equivalente de Trolox (TE) por g de biomassa. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

III.3.5.4 Método do radical ABTS

Determinou-se a atividade antioxidante total a partir do método de inibição do radical ABTS segundo Erel *et al.* e Thaipong *et al.* O ABTS é uma molécula incolor que é oxidada com persulfato de potássio, resultando no radical ABTS que apresenta coloração azul/verde. Quando esta espécie catiónica entra em contacto com compostos antioxidantes (por exemplo trolox) reduz-se à sua forma não radicalar (Figura III.3), e torna-se novamente incolor. [97]–[99]

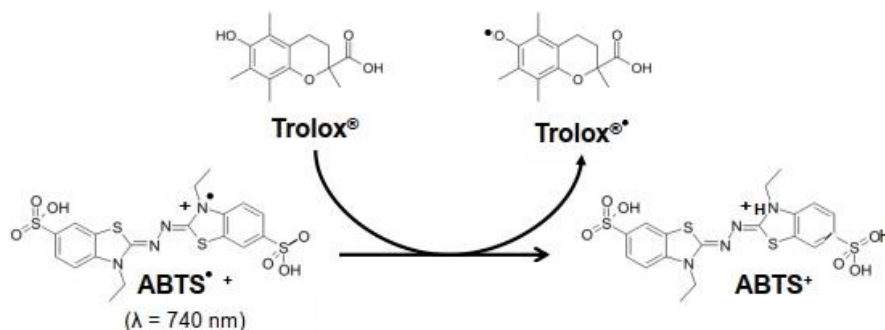


Figura III.3 - Esquema reacional do método do radical ABTS.[100]

Inicialmente foi preparada uma solução stock de ABTS 8 mM contendo $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ em água que foi reservada ao abrigo da luz *overnight* (cerca de 16 h) à temperatura ambiente. Posteriormente esta solução foi diluída em PBS 15 mM pH 7,2 até se obter uma absorvância a 655 nm próxima da unidade. Esta solução diluída foi designada por reagente de trabalho de radical ABTS. Os extratos obtidos (10 μL) foram adicionados a 290 μL reagente de trabalho de radical ABTS numa microplaca NUNC de 96 poços. Mediu-se a absorvância a 655 nm da mistura reacional num leitor de microplaca Bio-Rad 680. Para o branco utilizou-se água destilada e como padrão usou-se Trolox 0-6,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol 80% (v/v), os resultados foram apresentados em mg equivalentes de Trolox (TE) por grama de biomassa. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado [82]

III.3.5.5 Capacidade Quelante de iões Fe^{2+}

Determinou-se a capacidade quelante de iões Fe^{2+} nos vários extratos obtidos da biomassa de *P. tricornutum*, de acordo com o método previamente descrito por Canabady-Rochelle *et al* e Adjimani e Asare. [100], [101]

Os iões Fe^{2+} são responsáveis por várias reações oxidativas devido à sua capacidade de transferir eletrões, deste modo é de elevada importância a utilização de espécies que funcionem como agentes quelantes capazes de impedir esta reação.

Este método tem como princípio a formação de um complexo ferrozina-iões Fe^{2+} de coloração avermelhada, no entanto, na presença de agentes quelantes existe a destruição deste complexo reduzindo a intensidade da cor do complexo com o aumento da capacidade quelante (Figura III.4). [101]

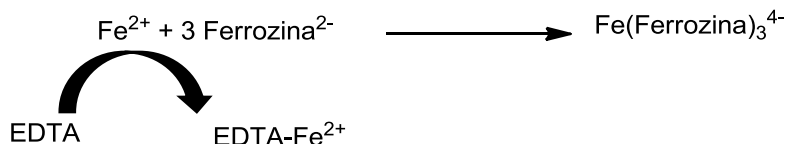


Figura III.4 - Esquema reacional do método da capacidade quelante de íões Fe²⁺ (Adaptado). [100]

Adicionou-se 50 µL de amostra a 185 µL de metanol absoluto, 50 µL de uma solução de cloreto de ferro (II) 2mM e 20 µL de uma solução de ferrozina 5mM numa microplaca NUNC de 96 poços. Deixou-se repousar a mistura reacional durante 10 minutos à temperatura ambiente e de seguida mediu-se a absorvância a 550 nm num leitor de microplaca (Bio-Rad 680). Como controlo negativo utilizou-se água destilada e como controlo positivo utilizou-se EDTA 2 mg/mL. Um decréscimo na absorvância a 550nm resulta num aumento da capacidade quelante de Fe²⁺ e a sua atividade foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\text{Capacidade quelante de íões Fe}^{2+} (\%) = \frac{A_0 - A_{\text{amostra}}}{A_0} \times 100$$

Onde A_0 representa a absorvância do controlo negativo e A_{amostra} representa a absorvância da amostra a 550nm. Estas determinações foram realizadas em triplicado para cada amostra.

III.3.5.6 Poder Redutor de íões Fe³⁺

De modo a determinar o poder redutor de íões Fe³⁺ nos extratos de *P. tricornutum* utilizou-se o método descrito por Canabady-Rochelle com algumas alterações. [100]

O ensaio para determinar o poder redutor de íões Fe³⁺ baseia-se no processo de transferência de eletrão por parte de uma espécie antioxidante. Quando o ferro é reduzido a Fe(II) forma um complexo que apresenta coloração azulada (Figura III.5). O método de análise do poder redutor de íões Fe³⁺ é utilizado para potenciais redox menores que 0,7 V e está relacionado com a quantidade de fenóis presentes na amostra. [27], [82], [100], [102]

Materiais e Métodos

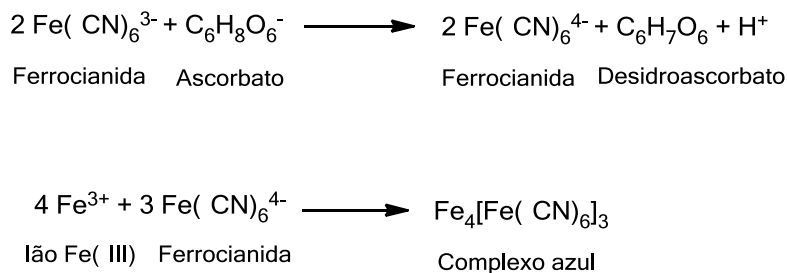


Figura III.5 - Esquema reacional do ensaio do poder redutor de íões Fe^{3+} (Adaptado).[100]

Numa microplaca NUNC de 96 poços adicionou-se 25 μL de amostra, 20 μL de tampão fosfato 2M a pH 6,6, e 25 μL de uma solução de ferrocianeto de potássio 1% (m/v). Incubou-se a mistura durante 20 minutos a 50 $^\circ\text{C}$ e, de seguida, adicionaram-se 25 μL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). Centrifugou-se a mistura a 4500 rpm durante 2 minutos, retirou-se 50 μL de sobrenadante para uma nova microplaca, adicionou-se 50 μL de água destilada e 10 μL de uma solução de cloreto de ferro (III) 0,1% (m/v). Mediu-se a absorvância a 655 nm num leitor de microplaca Bio-Rad 680. Como controlo negativo utilizou-se água destilada e como controlo positivo utilizou-se uma solução de ácido ascórbico 2 mg/mL. [79] Os resultados foram apresentados em poder redutor (%) e foram determinados através seguinte equação: [100]

$$\text{Poder redutor (\%)} = 100 - \left(\frac{A_0 - A_{\text{amostra}}}{A_0} \times 100 \right)$$

Onde A_0 representa a absorvância de uma solução de azul de prússia 66 μM e A_{amostra} representa a absorvância da amostra a 655nm. Estas determinações foram realizadas em triplicado para cada amostra

III.3.6 Fracionamento de polissacáridos por cromatografia de troca iónica

O extrato selecionado para fracionamento por cromatografia de troca aniónica foi o MICRO (120 $^\circ\text{C}$; 1,5h; KOH 0,1M). A resina DEAE-52 da Whatman foi preparada previamente colocando-se em agitação constante com 2 volumes de água destilada *overnight*. No dia seguinte verificou-se o pH a 7,5 da resina e empacotou-se a coluna cromatográfica (1cm x 5cm). A coluna foi equilibrada com água destilada a um caudal de 22 mL/h com auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson Minipuls3).

Foram aplicados 2,5 mL de extrato MICRO diluído de 1:2 em água à coluna, ao caudal pré-estabelecido e a recolha das frações cromatográficas (1,5 mL) foi iniciada de imediato.

A eluição foi inicialmente efetuada com água destilada, e depois por incrementos graduais de força iónica de NaCl 0,1; 0,3 e 0,5M, de NaOH 0,1; 0,5 e 1M e, por fim de KCl 2M. [45], [103], [104]

Este fracionamento foi monitorizado através da leitura de absorvâncias a 200, 260 e 280 nm, com o objetivo de detetar nas várias frações a presença de polissacáridos, ácidos nucleicos e proteína, respetivamente. O conteúdo em polissacáridos totais foi também determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico, descrito no ponto III.3.3.1.

III.3.7 Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier

De modo a caracterizar parcialmente a estrutura dos polissacáridos presentes nos extratos e em algumas frações cromatográficas foi realizada a análise por FT-IR. Todas estas amostras foram previamente liofilizadas (UNICRYO MC2L) e secas em linha de vácuo. Os espetros de infravermelho (FT-IR) foram registados num espectrofotómetro Bruker Vertex 70 (com software OPUS 5.5) num total de 32 varrimentos com uma resolução de 2 cm^{-1} , em pastilhas de KBr, numa gama de $500 - 4000\text{ cm}^{-1}$

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. Resultados e Discussão

IV.1 Controlo e Manutenção da cultura de *Phaeodactylum tricornutum*

O crescimento da cultura de *P. tricornutum*, descrita no capítulo III.3.1, iniciou-se no dia 8 de fevereiro e foram realizadas análises de densidade ótica a 600 nm, pH, salinidade e temperatura nos dias 12 e 14 de fevereiro de 2019. Os resultados apresentam-se na seguinte tabela.

Tabela IV.1 - Resultados de análise de controlo da cultura de *P.tricornutum*.

	12/02/19			14/02/19		
	25 g/L	27 g/L	30 g/L	25 g/L	27 g/L	30 g/L
Salinidade						
DO (600nm)	0,561	0,070	0,512	0,602	0,304	0,548
Salinidade (g/L)	24	25	27	25	27	29
Temperatura (°C)	26,4	26,7	26,4	27,3	28	27,7
pH	7,99	8,22	8,06	7,78	8,69	7,84

Como referido anteriormente, foram efetuadas observações microscópicas às culturas de *P.tricornutum* (Figura IV.1), onde se verificaram algumas contaminações e aglomerados celulares indicando que a cultura se encontrava sob *stress*.

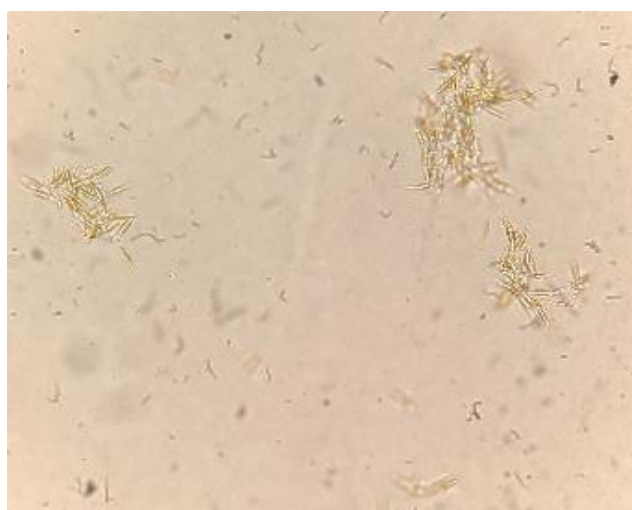


Figura IV.1 - Observação microscópica da cultura de *P.tricornutum* (400x).

IV.2 Análise e seleção de métodos de extração

De forma a selecionar os métodos que conduziam a extratos com teores mais elevados em compostos bioativos utilizou-se a biomassa que cresceu em condições de salinidade de NaCl 30 g/L durante 3 semanas. Como já referido, no ponto III.3.2 do Capítulo Materiais e Métodos, esta seleção baseou-se no facto desta concentração de NaCl à partida representar a salinidade mais próxima da água do mar e no facto de que seria expectável um maior teor em biomoléculas em culturas com tempo de crescimento mais elevado.

Na Tabela IV.2 estão resumidos os métodos de extração utilizados com os respetivos parâmetros de extração.

Tabela IV.2 - Resumo dos parâmetros iniciais aplicados nos vários métodos de extração, utilizados para a extração de biocompostos de *P.tricornutum*.

Método de Extração	Solvente	Tempo	Temperatura (°C)	Potência (W)	Frequência (Hz)
Multi-etapas	Água	5 min; 1h	t.a.; 100	-----	-----
	KOH 1M	20 min	60		
	HCl 0,6M	1h	100		
	NaOH 1M	20 min	60		
Autoclave	Água	4h	125	-----	-----
Soxhlet	Água	3	80	-----	-----
	Etanol 80% (v/V)				
Sonda de Ultrassons	Água	10 min	62	90	20
Banho de Ultrassons	Água	1h (amostra retirada a cada 10 min)	60	100	40
Micro-ondas	HCl 0,1M	30 min	120	-----	-----

Nota: a razão biomassa:solvente de 1:10 foi constante para todos os métodos, exceto para o método em multi-etapas, que variou ao longo do processo (conforme descrito em III.3.2.1).

Resultados e Discussão

De forma a avaliar o conteúdo em compostos bioativos intracelulares da biomassa de *P.tricornutum* selecionada, nos vários extratos obtidos aplicaram-se os métodos do fenol-ácido sulfúrico, do Congo Red, do Alcian Blue, turbidimétrico de cloreto de bário e Bradford. Com base nos valores obtidos selecionaram-se os melhores métodos de extração para aplicar, posteriormente, às restantes amostras. A quantificação destes compostos nos extratos obtidos encontra-se representada na Figura IV.2.

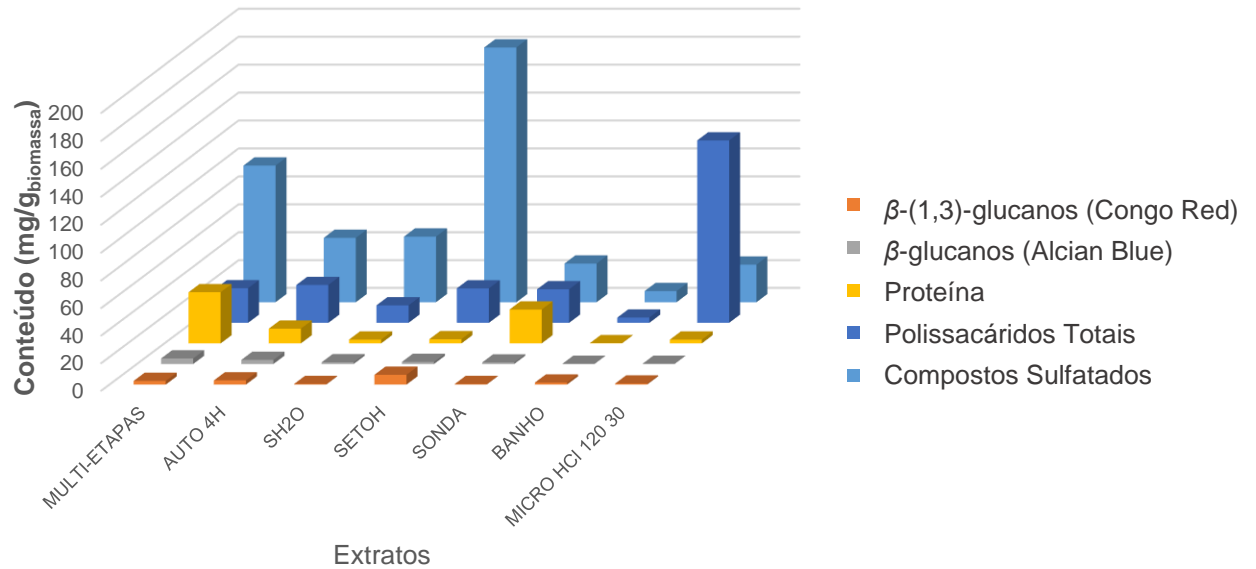


Figura IV.2 - Doseamento de compostos bioativos após extração da biomassa de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade.

Na Figura IV.2 os resultados indicados para o método convencional em multi-etapas representam o somatório dos conteúdos determinados para as 5 frações obtidas (FW1, FW2, FKOH, FHCl and FNaCl). Na Figura IV.3 estão representados os valores obtidos para os referidos conteúdos para cada uma das frações de extração. No que diz respeito ao método de extração assistida por ultrassons em banho, uma vez que ao longo do tempo (de 10 em 10 min durante 1h) verificou-se que, de um modo geral, os valores se mantinham relativamente constantes na mesma gama (Figura IV.4), no gráfico da Figura IV.2 optou-se por representar o valor mais elevado obtido para cada um dos métodos de doseamento.

Resultados e discussão

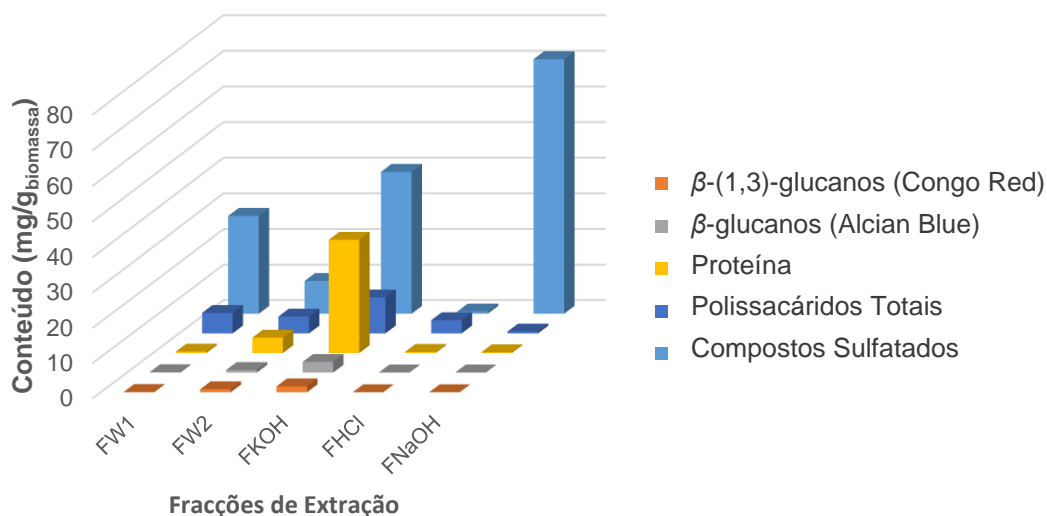


Figura IV.3 - Doseamento de compostos bioativos após extração da biomassa de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade, das 5 frações obtidas pelo método convencional de multi-etapas.

Através da análise da Figura IV.3 é possível verificar que a Fração FKOH é a que exibe valores mais elevados nos vários biocompostos quantificados, exceto no que diz respeito ao conteúdo em compostos sulfatos que foi detetado um valor máximo na FNaOH.

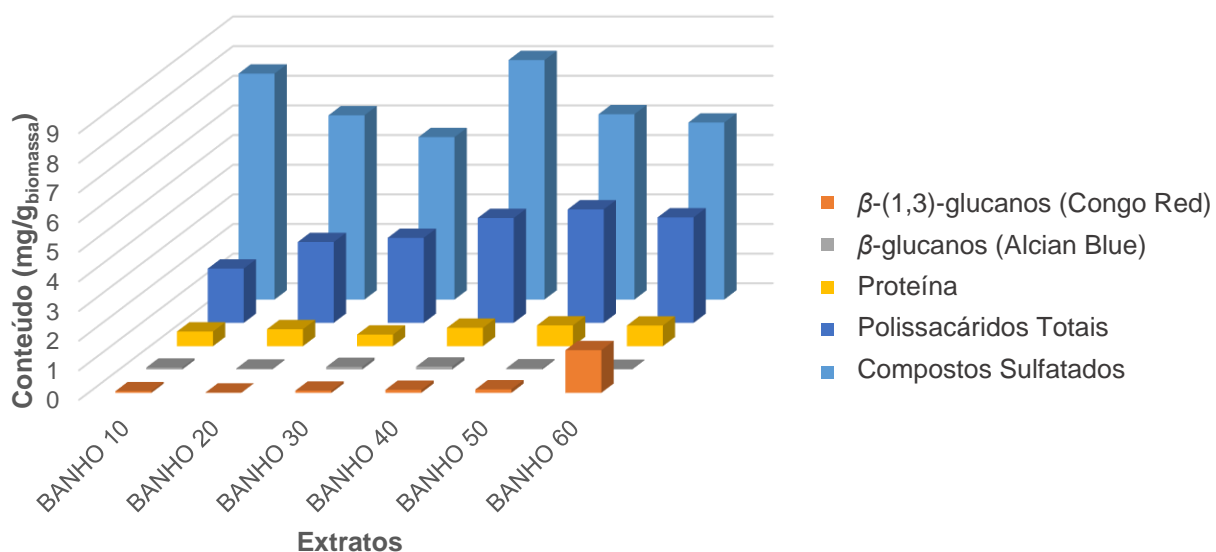


Figura IV.4 - Doseamento de compostos bioativos após extração da biomassa de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade, das amostras retiradas ao longo da extração (de 10 em 10 minutos durante 1 hora) pelo método assistido por micro-ondas em banho.

Resultados e Discussão

Pela Figura IV.4 é possível verificar que ao longo de 60 minutos de extração assistida por ultrassons em banho, os resultados obtidos relativamente aos conteúdos de polissacáridos (inclusive β -glucanos), proteína e compostos sulfatados, não apresentaram uma variação significativa.

Assim, através da Figura IV.2 pode observar-se que a quantidade de β -glucanos extraídos através dos vários métodos é muito baixa quando comparado com o conteúdo de polissacáridos totais e que o conteúdo mais elevado em polissacáridos totais (131,02 mg/g biomassa) foi obtido através da extração assistida por micro-ondas em HCl 0,1M a 120°C durante 30 min (MICRO HCl 120 30). Verifica-se também que o maior conteúdo em compostos sulfatos (182,68 mg/g biomassa) foi obtido através da extração contínua em Soxhlet utilizando etanol a 80 % (v/v). No entanto, ao compararmos este valor com os polissacáridos totais para o mesmo método de extração (24,94 mg/g biomassa), pode-se concluir que esta quantificação diz respeito a compostos sulfatos totais, associados e/ou não associados a polissacáridos.

Tendo em conta que este trabalho tem um grande enfoque na extração e análise de métodos de extração, estes foram selecionados principalmente tendo por base o conteúdo destes compostos. Na Figura IV.5 estão de novo representados conteúdos em polissacáridos totais e compostos sulfatos doseados nos extratos obtidos pelos 5 métodos de extração testados inicialmente neste trabalho.

Resultados e discussão

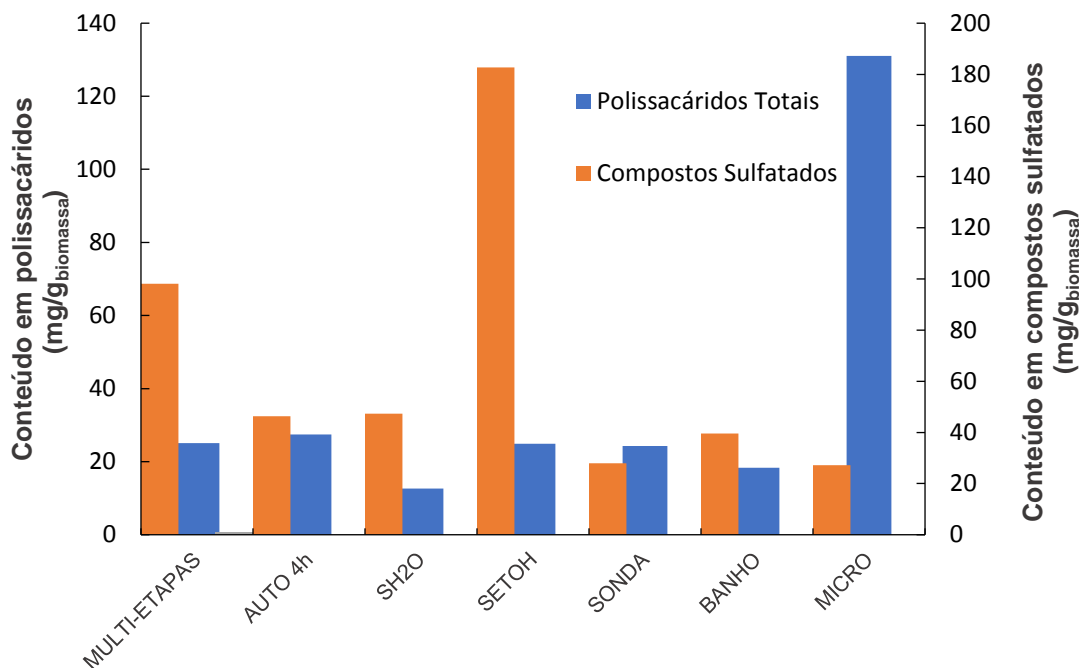


Figura IV.5 - Doseamento dos polissacáridos e compostos sulfatados nos extratos obtidos pelos métodos de extração convencionais em multi-etapas, autoclave (125 °C; 4 h) e contínua em Soxhlet (água e etanol 80% (v/v); 8°C; 3 h), e pelos métodos avançados assistido por ultrassons (sonda: 62°C; 20kHz; 90w; 10min e banho: 60°C; 40kHz; 100w; 60min) e assistido por micro-ondas (HCl 0,1M; 120 °C; 30 min).

Deste modo e com base nesta representação gráfica foram seleccionados os métodos de extração convencional em multi-etapas e em autoclave e o método avançado assistido por micro-ondas para continuação deste trabalho e consequente aplicação nas restantes amostras de biomassa. Apesar do método de extração em multi-etapas apresentar conteúdos em polissacáridos totais muito semelhantes aos encontrados nos extratos obtidos por ultrassons (sonda), este método de extração convencional, embora mais moroso e trabalhoso, apresenta a vantagem de se obterem 5 frações com características diferentes, o que parece indicar que à partida que se conseguiu em simultâneo isolar polissacáridos com características semelhantes. O facto deste método ser fracionado em 5 etapas utilizando diferentes solventes e condições reacionais, permite uma extração máxima de biomoléculas solúveis e insolúveis em água. A extração assistida em micro-ondas apresenta resultados bastante favoráveis quanto ao teor polissacáridos totais e compostos sulfatados e adicionalmente este método rege-se pelos princípios da química verde tornando-se também vantajoso. [52]

O terceiro método seleccionado foi o da extração em autoclave devido aos seus teores em polissacáridos e compostos sulfatados extraídos serem dos mais elevados, quando comparados com os restantes métodos, e pelo facto de se utilizar água como solvente.

IV.3 Otimização dos métodos de extração selecionados

Após seleção dos métodos de extração mais vantajosos na extração de biocompostos a partir da biomassa de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade foram otimizadas as condições de extração para a extração em autoclave, onde se estudou a influência do tempo de extração, e para a extração assistida por micro-ondas, onde se estudou a influência do solvente, tempo de extração e temperatura. O resumo das condições para os parâmetros testados está indicado na Tabela IV.3.

Tabela IV.3 – Resumo da variação dos parâmetros para a otimização dos métodos de extração em autoclave e extração assistida por micro-ondas.

Método de Extração	Solvente	Tempo	Temperatura (°C)
Autoclave	Água	0,5h	125
		1,5h	
		3h	
		4h	
Micro-ondas	HCl 0,1M	5, 15, 30 min	90, 120, 150
	H ₂ O	5, 15, 30 min	120
	KOH 0,1M	30 min	120

Nota: a razão biomassa:solvente de 1:10 foi constante para os dois métodos.

IV.3.1 Extração em micro-ondas

O método de extração assistido em micro-ondas foi um dos métodos que apresentou valores mais elevados em polissacáridos totais e compostos sulfatados. Por esse motivo, variaram-se vários parâmetros de extração (Tabela IV.3) nomeadamente tempo 5, 15 e 30 minutos, temperatura 90 °C, 120 °C e 150 °C e solventes (água, KOH 0,1M e HCl 0,1M), com o objetivo de otimizar este método. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura IV.6.

Resultados e discussão

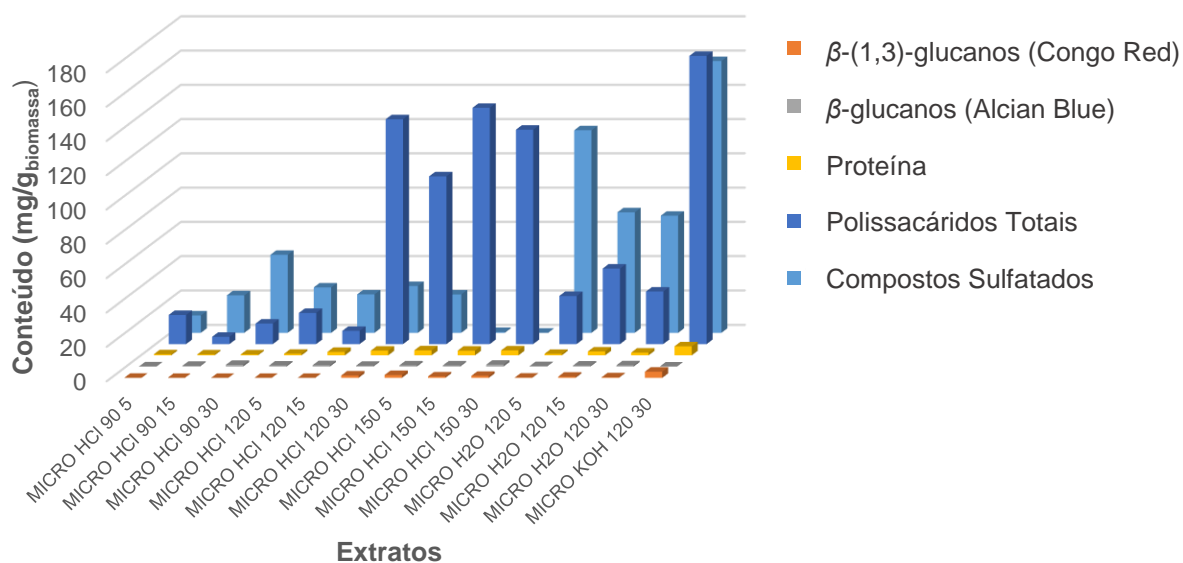


Figura IV.6 - Influência do solvente, tempo e temperatura de extração no método assistido por micro-ondas na extração de biomoléculas de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade.

Como se pode verificar pela Figura IV.6, neste método de extração a temperatura, o tempo de extração e o solvente utilizado, têm bastante importância na recuperação de biocompostos. À temperatura de 90 °C a extração apresenta o menor teor em polissacáridos (4,22-16,90 mg/g biomassa), este resultado permite concluir que estas condições à partida não conduzem a rutura celular total, inviabilizando a solubilização das biomoléculas no solvente. À temperatura de 120 °C e durante 30 minutos, os resultados apresentam-se semelhantes aos obtidos para a temperatura de 150 °C com o mesmo tempo, utilizando HCl 0,1 M (137,71 mg/g biomassa a 150 °C; 131,02 mg/g biomassa a 120°C). Uma vez que a temperatura pode alterar a estrutura destes biocompostos, a seleção deste parâmetro recai na temperatura mais baixa (120°C), tornando assim também o processo energeticamente mais sustentável.

Após seleção da temperatura de 120 °C, variaram-se os tempos de extração utilizando H₂O como solvente, verificando-se que a concentração de polissacáridos extraídos a 120°C durante 15 min, foi a maior obtida (43,87 mg/g biomassa), ainda que seja menor quando comparada com o solvente anterior. A concentração mais elevada em biocompostos foi obtida utilizando como solvente KOH 0,1M a 120°C durante 30 min, obtendo-se uma concentração de polissacáridos totais de 168,00 mg/g biomassa, dos quais 3,60 mg/g biomassa são β -1,3-glucanos, e de compostos sulfatados de 158,44 mg/g biomassa.

Assim, estas condições foram selecionadas para aplicar nas restantes amostras de biomassa obtidas em diferentes condições de crescimento.

IV.3.2 Extração em autoclave

O método de extração em autoclave foi selecionado, como referido anteriormente, devido aos resultados obtidos no doseamento de polissacáridos totais e compostos sulfatados, e também pelo facto de se utilizar água como solvente de extração.

A otimização deste método baseou-se na variável do tempo, uma vez que a temperatura inicial testada, 125 °C, se encontra bastante próxima da temperatura de extração assistida por micro-ondas. À semelhança dos métodos anteriormente descritos, foram, determinados os conteúdos em compostos bioativos pelos métodos Fenol-Ácido Sulfúrico, Alcian Blue, método de ligação do Azul de Coomassie, Congo Red e turbidimétrico de cloreto de bário. Os resultados estão representados graficamente na Figura IV.7.

Resultados e discussão

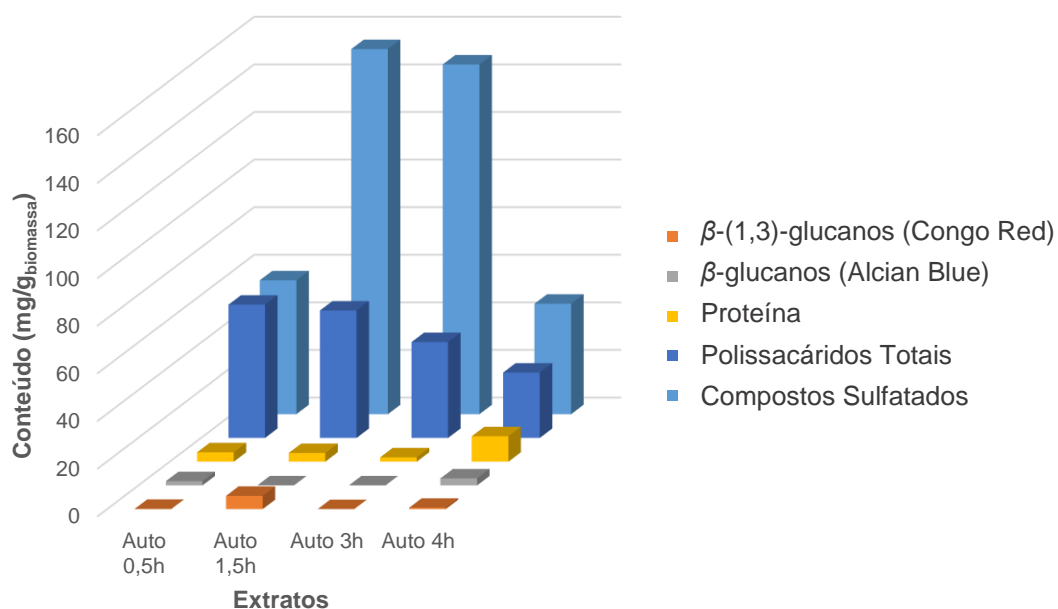


Figura IV.7 - Representação gráfica da influência do tempo de extração na extração de biomoléculas com H₂O em autoclave, a 125°C.

Na análise da influência do tempo de extração em autoclave a temperatura constante (125 °C), verifica-se que à medida que o tempo diminui a quantidade de polissacáridos extraídos detetados aumenta, ao passo que a quantidade de proteínas diminui. O tempo de extração em autoclave selecionado foi de 1,5h, uma vez que ao fim deste tempo (2,5 vezes menor que o tempo inicial utilizado) foi detetada uma concentração de polissacáridos totais de 53,49 mg/g biomassa e de β-1,3-glucanos com tripla hélice de 5,57 mg/g biomassa. O conteúdo detetado em compostos sulfatados foi também bastante elevado nestas condições (158,44 mg/g biomassa). No entanto, mais uma vez, é de salientar que este valor é bastante mais elevado do que o obtido para os polissacáridos totais, o que leva a afirmar que este conteúdo de compostos sulfatados diz respeito a grupos sulfato totais eventualmente ligados a polissacáridos e também aos não ligados. A importância dos polissacáridos sulfatados é de salientar de novo, já que são uns dos biocompostos de maior interesse devido à sua elevada bioatividade.

É de referir ainda, que ao fim de 4 h de extração foram também quantificados 2,94 mg/g biomassa de β-D-glucanos através do método do corante Alcian Blue.

Considerando os resultados obtidos, o tempo de extração selecionado para extrair biocompostos a partir das restantes amostras de biomassa de *P.tricornutum* em autoclave foi de 1,5 h.

IV.4 Comparação de métodos de extração entre amostras

IV.4.1 Extração convencional com água fria e em ebulição seguida de condições ácidas e alcalinas

As culturas de *P.tricornutum* sujeitas aos três métodos de extração selecionados e otimizados foram as que se desenvolveram no meio de cultura com salinidades 25 g/L e 30 g/L em NaCl durante 1 e 3 semanas de crescimento. A biomassa recuperada do meio de cultura com salinidade de 27 g/L não consta nesta análise, uma vez que os seus resultados foram inconclusivos quando comparados com as restantes amostras. Estes resultados podem ser justificados pelo facto de que durante a avaliação dos parâmetros associados ao meio de cultura e crescimento celular, verificou-se que esta amostra apresentava valor de pH acima de 8 e uma densidade ótica bastante inferior à das restantes culturas, como se pode observar na Tabela IV.1. Por estes motivos, optou-se por não incluir esta a análise desta cultura no restante estudo.

IV.4.2 Extração convencional em múltiplas etapas

A extração em multi-etapas foi um dos métodos selecionados para a extração de biomoléculas a partir da biomassa de *P.tricornutum* desenvolvida nas várias condições de crescimento em estudo. Esta extração, pelo facto de ser fracionada em cinco etapas maximiza à partida a extração de biocomponentes celulares uma vez que, inicialmente, extrai as biomoléculas solúveis em água e nas três etapas seguintes, com solução aquosa de hidróxido de potássio, solução aquosa de ácido clorídrico e solução aquosa de hidróxido de sódio, não só solubiliza biomoléculas insolúveis em água como proporciona condições de pH e temperatura indicadas para rutura celular e solubilização de biomoléculas mais eficazes.[36]

De forma a monitorizar estes extratos foram também doseados polissacáridos totais, β -glucanos, proteínas e compostos sulfatados pelos métodos já descritos anteriormente. Os resultados encontram-se na Tabela IV.4 e representados graficamente da Figura IV.8. Estes resultados representam o somatório dos conteúdos determinados para as 5 frações obtidas (FW1, FW2, FKOH, FHCl e FNaCl).

Resultados e discussão

Tabela IV.4 - Doseamento de biomoléculas após extração convencional em multi-etapas e respetivo rendimento de extração.

	Tempo de crescimento (semanas)	Salinidade (g/L)	Conteúdo (mg/g _{biomassa})	Rendimento de extração (%)
Polissacáridos Totais	1	25	$8,22 \times 10^1$	8,22
		30	$4,15 \times 10^1$	4,15
	3	25	$5,98 \times 10^1$	5,98
		30	$2,50 \times 10^1$	2,50
β-(1,3)-glucanos (Congo Red)	1	25	$3,37 \times 10^0$	0,34
		30	$7,45 \times 10^{-1}$	0,07
	3	25	$2,78 \times 10^0$	0,28
		30	$2,61 \times 10^0$	0,26
β-glucanos (Alcian Blue)	1	25	$3,62 \times 10^0$	0,36
		30	$8,44 \times 10^{-1}$	0,08
	3	25	$1,49 \times 10^0$	0,15
		30	$3,99 \times 10^0$	0,40
Proteína	1	25	$4,48 \times 10^1$	4,48
		30	$2,94 \times 10^1$	2,94
	3	25	$1,43 \times 10^1$	1,43
		30	$3,71 \times 10^1$	3,71
Compostos Sulfatados	1	25	$2,82 \times 10^2$	28,24
		30	$2,05 \times 10^2$	20,55
	3	25	$2,45 \times 10^2$	24,54
		30	$9,81 \times 10^1$	9,81

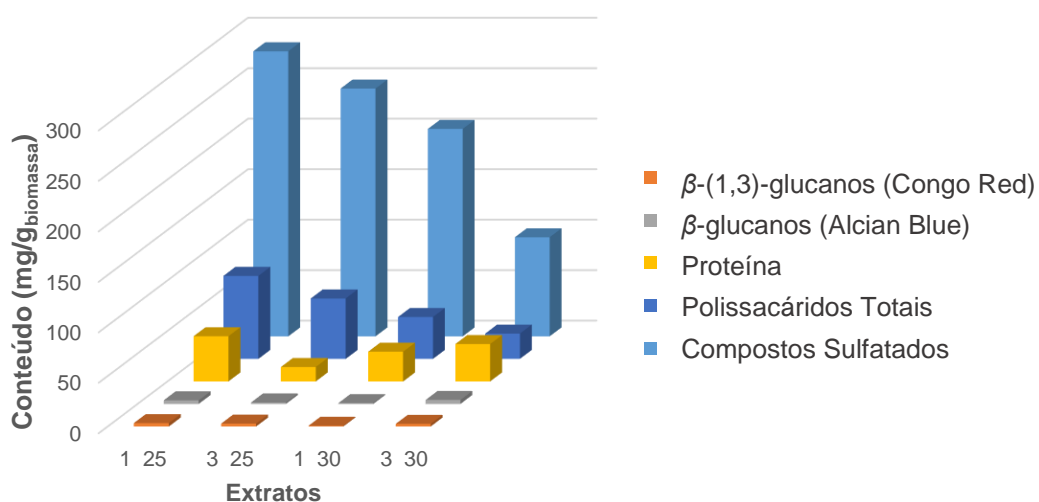


Figura IV.8 - Avaliação dos biocompostos na biomassa de *P. tricornutum* com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L (em NaCl), após extração convencional em multi-etapas.

É possível verificar um comportamento linear na extração de biomoléculas transversal aos métodos de doseamento, sendo que o conteúdo em biomoléculas, de forma geral, diminui quer com o aumento do tempo de crescimento, quer com o aumento da salinidade, o que não era esperado. Observa-se, ainda, que o teor em β -glucanos é baixo comparativamente às restantes biomoléculas apresentando, de acordo com a tabela IV.4, rendimentos abaixo de 1%.

A biomassa da qual foi extraída maior quantidade de biocompostos foi a amostra com 1 semana de crescimento e 25 g/L de salinidade, sendo o seu conteúdo máximo de polissacáridos extraído de 82,2 mg/g biomassa correspondente a um rendimento de 8,2%, o conteúdo máximo de proteína extraída foi de 44,8 mg/g biomassa correspondente a um rendimento de 4,5% e o conteúdo máximo de compostos sulfatados foi de 282,4 mg/g biomassa correspondente a um rendimento de 28,2%.

IV.4.3 Extração em autoclave

O método de extração em autoclave trata-se de um método eficaz na lise celular o que facilita a solubilização dos compostos bioativos no solvente aplicado. O facto de este método utilizar água como solvente apresenta vantagens, uma vez que torna o processo mais eficiente e viável, quer economicamente, quer ecologicamente.

Resultados e discussão

Como descrito anteriormente, a extração em autoclave sofreu um processo de otimização relativamente ao tempo de extração. Foi selecionado 1,5h como tempo ótimo que conduz à obtenção maiores teores em biocompostos. Deste modo, aplicaram-se às amostras com 1 e 3 semanas de crescimento e 25 g/L e 30 g/L de salinidade do meio de cultura o método de extração em autoclave a 125 °C durante 1,5h. Os extratos obtidos foram doseados pelos métodos colorimétricos já descritos, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela IV.5 e na Figura IV.9.

Tabela IV.5 - Doseamento de biomoléculas após extração em autoclave (125°C; 1,5h).

	Tempo de crescimento (semanas)	Salinidade (g/L)	Conteúdo (mg/g _{biomassa})	Rendimento de extração (%)
Polissacáridos Totais	1	25	$1,99 \times 10^1 \pm 9,97 \times 10^{-2}$	1,99
		30	$2,43 \times 10^1 \pm 5,37 \times 10^{-2}$	2,43
	3	25	$2,91 \times 10^1 \pm 3,22 \times 10^{-1}$	2,91
		30	$5,32 \times 10^1 \pm 4,08 \times 10^{-1}$	5,32
β-(1,3)-glucanos (Congo Red)	1	25	$1,33 \times 10^{-1} \pm 1,84 \times 10^{-2}$	0,01
		30	$1,27 \times 10^{-1} \pm 1,79 \times 10^{-2}$	0,01
	3	25	$1,19 \times 10^{-1} \pm 2,80 \times 10^{-3}$	0,01
		30	$5,57 \times 10^0 \pm 1,32 \times 10^{-1}$	0,56
β-glucanos (Alcian Blue)	1	25	$4,58 \times 10^{-1} \pm 4,57 \times 10^{-2}$	0,04
		30	$1,13 \times 10^{-1} \pm 1,13 \times 10^{-2}$	0,01
	3	25	$2,07 \times 10^{-1} \pm 2,06 \times 10^{-2}$	0,02
		30	$1,14 \times 10^0 \pm 1,14 \times 10^{-1}$	0,11
Proteína	1	25	$2,07 \times 10^0 \pm 2,09 \times 10^{-1}$	0,21
		30	$1,25 \times 10^0 \pm 1,32 \times 10^{-1}$	0,12
	3	25	$2,93 \times 10^0 \pm 1,33 \times 10^{-2}$	0,29
		30	$3,62 \times 10^0 \pm 1,68 \times 10^{-1}$	0,36
Compostos Sulfatados	1	25	$5,00 \times 10^1 \pm 1,71 \times 10^0$	5,00
		30	$4,01 \times 10^1 \pm 1,13 \times 10^0$	4,01
	3	25	$5,17 \times 10^1 \pm 3,60 \times 10^0$	5,17
		30	$1,53 \times 10^2 \pm 2,16 \times 10^0$	15,34

Resultados e Discussão

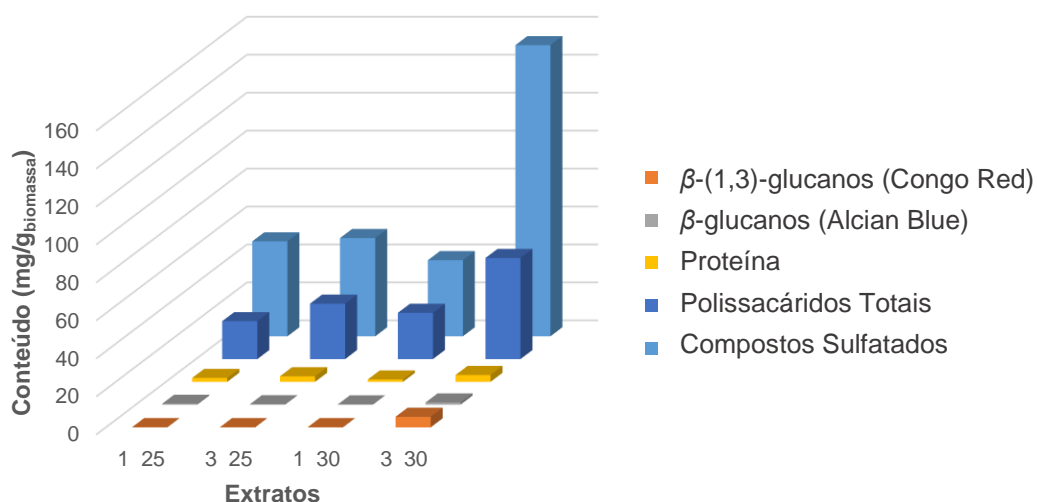


Figura IV.9 - Representação do doseamento de compostos bioativos das amostras na biomassa de *P. tricornutum* com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L (em NaCl), após extração em autoclave (125 °C; 1,5 h).

Através deste método de extração, verifica-se que o aumento da salinidade e do tempo de crescimento aumenta, de forma geral, o conteúdo em biocompostos. As moléculas detetadas em maior concentração relevância foram os compostos sulfatados (40,09 - 153,39 mg/g biomassa) e os polissacáridos totais (19,93 – 53,19 mg/g biomassa), já que, mais uma vez os resultados para os β -glucanos se apresentam baixos (0,13 – 5,56 mg/g biomassa) com rendimentos abaixo de 1%. Paralelamente, as proteínas apresentam, resultados de baixo teor, com rendimentos abaixo dos 1%.

Assim, o conteúdo máximo de polissacáridos totais obtido com este método de extração foi de $53,2 \pm 0,41$ mg/g biomassa correspondente a um rendimento de 5,3%, o conteúdo máximo de compostos sulfatados foi de $153,4 \pm 2,16$ mg/g biomassa correspondente a um rendimento de 15,3% e o conteúdo máximo de proteínas obtido foi de $3,6 \pm 0,17$ mg/g biomassa correspondendo a um rendimento de 0,4%. Estes resultados foram obtidos para a extração da biomassa de *P. tricornutum* com três semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade.

Comparação com a extração convencional em multi-etapas, verifica-se que esta apresenta melhores resultados para a extração de biomoléculas, provavelmente pelo facto de utilizar quatro solventes diferentes que maximiza a solubilização de compostos bioativos, ao passo que a extração em autoclave utiliza apenas água como solvente, limitando-se à solubilização de biomoléculas solúveis em água.

IV.4.4 Extração em micro-ondas

O método de extração assistida por micro-ondas foi um dos métodos selecionados para aplicação em todas amostras de biomassa de *P. tricornutum* obtidas.

Este método foi sujeito a um processo de otimização relativamente à temperatura, ao tempo de extração e ao solvente utilizado. As melhores condições de extração selecionadas foram: 120 °C durante 30 minutos utilizando como solvente KOH 0,1M. Este método foi aplicado às amostras de biomassa *P. tricornutum* produzidas durante 1 e 3 semanas num meio de cultura com 25g/L e 30 g/L de salinidade. Após doseamento dos vários biocompostos, obtiveram-se os resultados indicados na tabela IV.6 e que estão representados graficamente na figura IV.10.

Resultados e Discussão

Tabela IV.6 – Doseamento de biomoléculas após extração assistida em micro-ondas (KOH 0,1 M; 120°C; 30min)

	Tempo de crescimento (semanas)	Salinidade (g/L)	Conteúdo (mg/g _{biomassa})	Rendimento de extração (%)
Polissacáridos Totais	1	25	$1,03 \times 10^2 \pm 2,56 \times 10^{-1}$	10,34
		30	$3,13 \times 10^1 \pm 1,86 \times 10^0$	3,13
	3	25	$6,95 \times 10^1 \pm 1,07 \times 10^0$	6,95
		30	$1,68 \times 10^2 \pm 5,57 \times 10^0$	16,84
β-(1,3)-glucanos (Congo Red)	1	25	$4,00 \times 10^0 \pm 1,08 \times 10^{-1}$	0,40
		30	$8,20 \times 10^{-1} \pm 4,44 \times 10^{-2}$	0,08
	3	25	$2,31 \times 10^0 \pm 3,36 \times 10^{-1}$	0,23
		30	$3,60 \times 10^0 \pm 2,42 \times 10^{-1}$	0,36
β-glucanos (Alcian Blue)	1	25	$1,09 \times 10^0 \pm 9,80 \times 10^{-3}$	0,11
		30	$1,79 \times 10^{-1} \pm 4,92 \times 10^{-4}$	0,02
	3	25	$2,80 \times 10^{-3} \pm 3,00 \times 10^{-4}$	n.d
		30	$7,47 \times 10^{-1} \pm 7,46 \times 10^{-2}$	0,7
Proteína	1	25	$1,89 \times 10^1 \pm 1,39 \times 10^0$	1,89
		30	$1,04 \times 10^1 \pm 2,78 \times 10^{-1}$	1,04
	3	25	$1,70 \times 10^1 \pm 1,58 \times 10^0$	1,70
		30	$2,09 \times 10^1 \pm 1,39 \times 10^0$	2,09
Compostos Sulfatados	1	25	$1,03 \times 10^2 \pm 1,76 \times 10^0$	10,26
		30	$4,48 \times 10^1 \pm 1,93 \times 10^0$	4,48
	3	25	$1,29 \times 10^2 \pm 4,92 \times 10^0$	12,92
		30	$1,58 \times 10^2 \pm 2,71 \times 10^0$	15,84

Nota: n.d. – não detetado

Resultados e discussão

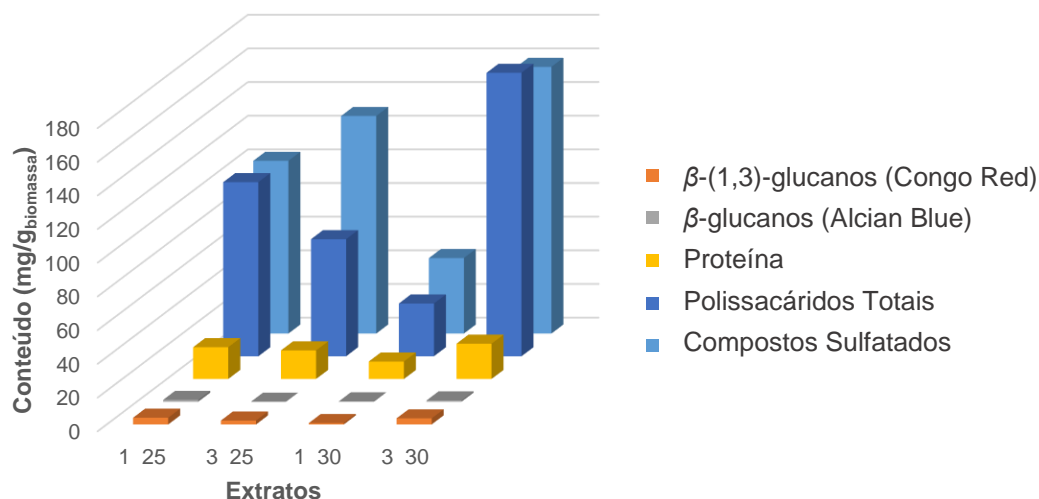


Figura IV.10 - Representação do doseamento de compostos bioativos das amostras de biomassa de *P. tricornutum* com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L (em NaCl), após extração assistida por micro-ondas (KH 0,1 M; 120°C; 30min) .

Através deste método não é possível concluir quanto ao tempo de crescimento e salinidade mais favoráveis à produção de biomoléculas. Os β -glucanos apresentam um conteúdo semelhante ao verificado nas extrações convencional e autoclave, embora ligeiramente mais elevados são pouco significativos relativamente às restantes biomoléculas doseadas. O conteúdo em proteína encontra-se praticamente constante, independentemente do tempo de crescimento e salinidade. Quanto aos polissacáridos totais, verificam-se comportamentos contrários quanto à salinidade e tempo de crescimento, com a amostra de salinidade de 25g/L o teor em polissacáridos diminui com o aumento do tempo de crescimento, no entanto, na amostra de salinidade 30 g/L o teor polissacáridos aumenta com o aumento do tempo de crescimento. Relativamente aos compostos sulfatados verifica-se um aumento deste conteúdo com o aumento do tempo de crescimento.

O conteúdo máximo de polissacáridos totais doseado foi de $168,4 \pm 5,57$ mg/g biomassa correspondente a um rendimento de 16,8%, o conteúdo máximo em compostos sulfatados foi de $158,4 \pm 2,70$ mg/g biomassa correspondente a um rendimento 15,8% e o conteúdo máximo de proteína foi de $20,9 \pm 1,39$ mg/g biomassa correspondente a um rendimento de 2,1%.

Resultados e Discussão

À semelhança do sucedido com a extração em autoclave, a biomassa que apresentou maior quantidade em biocompostos foi a amostra com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L.

Atendendo aos resultados obtidos, o método de extração assistido por micro-ondas foi considerado o melhor método para a extração de polissacáridos. O conteúdo de compostos sulfatados é muito semelhante ao obtido através da extração em autoclave. A comparação dos melhores resultados obtidos pelos métodos de extração otimizados pode ser observada na Tabela IV.7.

Tabela IV.7 - Comparação dos melhores resultados obtidos para cada método de extração aplicado.

	Convencional		Autoclave		Micro-ondas	
	Rendimento	Biomassa	Rendimento	Biomassa	Rendimento	Biomassa
Polissacáridos	8,2%	1	5,3%	3	16,8%	3
Proteína	4,5%	semana	0,4%	semanas	2,1%	semanas
Compostos		25 g/L		30 g/L		30 g/L
Sulfatados	28,2%	salinidade	15,3%	salinidade	15,8%	salinidade

Em 1965, Ford e Percival extraíram biomoléculas de *Phaeodactylum tricornutum*. O seu método de extração, para além de moroso necessitava de congelação com nitrogénio líquido, para posterior redução a pó, seguida de descoloração com butan-1-ol e tratamento com água fria, dentro das várias frações, tendo obtido como melhor rendimento após a lavagem com água um valor de 55%. Mais recentemente, em 2003, Gúzman realizou uma extração com ultrassons em água, seguido de uma etapa em Soxhlet extenso com metanol, refluxo em triplicado e concentração a vácuo. Apesar do método de Gúzman apresentar métodos de extração modernos, o rendimento de extração de polissacáridos foi apenas de 6,85% com um rendimento de extração de compostos sulfatados de 7,5%. No presente trabalho, a extração de polissacáridos foi inferior à de Ford e Percival mas superior à de Gúzman, no entanto, atingiu-se um maior rendimento na extração de compostos sulfatados em comparação com o referido anteriormente. [105], [106]

IV.4.5 Isolamento de Extrapolissacáridos

Uma das propriedades mais promissoras das microalgas, nomeadamente da *P. tricornutum*, é a capacidade de secretar polissacáridos e outras biomoléculas com bioatividade. Estas moléculas são secretadas como mecanismo de defesa celular contra o stress e toxicidade do meio de cultura. De forma a isolar os polissacáridos extracelulares realizou-se a precipitação com em etanol 96% (v/v) conforme descrito em III.3.3 (no Capítulo 3 – Materiais e Métodos) e efetuou-se posteriormente o doseamento, quer dos precipitados obtidos quer do meio de cultura diretamente. Os meios de cultura iniciais (sem inoculo) foram igualmente doseados e considerados como controlo negativo (identificados como P0 para o meio precipitado com etanol e M0 para os meios de cultura diretos). Estes resultados estão apresentados nas Tabelas IV.8 e IV.9, que estão também representados graficamente nas Figuras IV.11 e IV.12.

Resultados e Discussão

Tabela IV.8 - Doseamento de compostos extracelulares precipitados.

	Tempo de crescimento (semanas)	Salinidade (g/L)	Conteúdo (mg/L)
Polissacáridos Totais	P 0	25	$2,00 \times 10^{-1} \pm 6,13 \times 10^{-2}$
		30	$2,11 \times 10^{-1} \pm 1,02 \times 10^{-1}$
	P 1	25	$2,46 \times 10^{-1} \pm 7,70 \times 10^{-3}$
		30	$3,30 \times 10^{-1} \pm 1,25 \times 10^{-1}$
	P 3	25	n.d
		30	n.d
β-(1,3)-glucanos (Congo Red)	P 0	25	$2,20 \times 10^{-1} \pm 2,00 \times 10^{-2}$
		30	$1,90 \times 10^{-1} \pm 6,73 \times 10^{-4}$
	P 1	25	$1,30 \times 10^{-1} \pm 1,81 \times 10^{-2}$
		30	$2,97 \times 10^{-1} \pm 4,71 \times 10^{-3}$
	P 3	25	$7,27 \times 10^{-3} \pm 5,38 \times 10^{-4}$
		30	n.d
β-glucanos (Alcian Blue)	P 0	25	$3,17 \times 10^{-3} \pm 4,86 \times 10^{-4}$
		30	$3,48 \times 10^{-3} \pm 2,03 \times 10^{-4}$
	P 1	25	$1,88 \times 10^{-2} \pm 5,11 \times 10^{-4}$
		30	$1,48 \times 10^{-2} \pm 1,97 \times 10^{-4}$
	P 3	25	$7,21 \times 10^{-1} \pm 5,89 \times 10^{-2}$
		30	$1,41 \times 10^0 \pm 2,80 \times 10^{-2}$
Proteína	P 0	25	$1,92 \times 10^{-2} \pm 1,26 \times 10^{-3}$
		30	$1,96 \times 10^{-2} \pm 1,89 \times 10^{-3}$
	P 1	25	$5,41 \times 10^{-1} \pm 6,31 \times 10^{-3}$
		30	$7,63 \times 10^{-2} \pm 1,14 \times 10^{-2}$
	P 3	25	$4,52 \times 10^{-2} \pm 2,48 \times 10^{-3}$
		30	$2,19 \times 10^{-2} \pm 1,45 \times 10^{-3}$
Compostos Sulfatados	P 0	25	$9,02 \times 10^0 \pm 1,05 \times 10^{-1}$
		30	$1,79 \times 10^1 \pm 2,46 \times 10^{-1}$
	P 1	25	$9,82 \times 10^1 \pm 2,28 \times 10^0$
		30	$6,59 \times 10^1 \pm 5,80 \times 10^0$
	P 3	25	$1,02 \times 10^2 \pm 1,76 \times 10^{-1}$
		30	$1,04 \times 10^2 \pm 1,23 \times 10^0$

Nota: n.d. – não detetado

Resultados e discussão

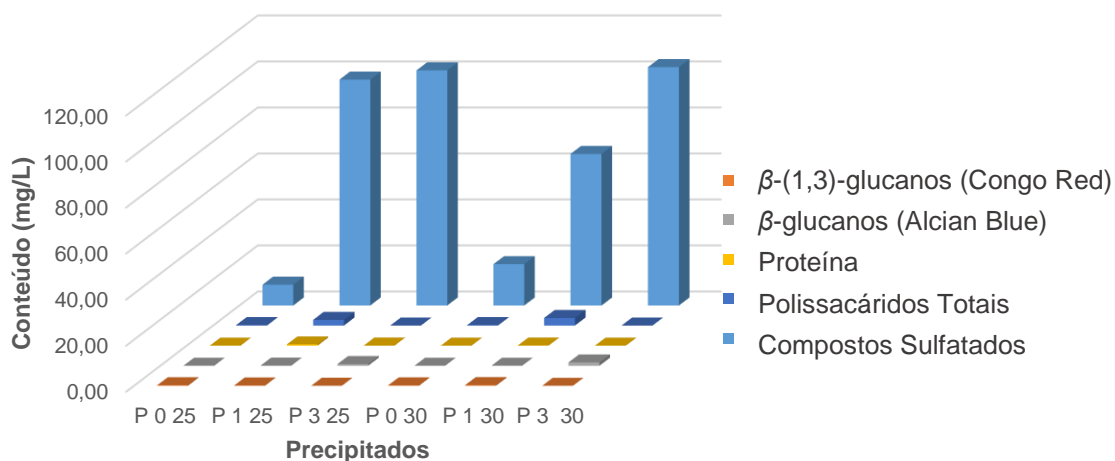


Figura IV.11 - Doseamento de biomoléculas extracelulares de *P. tricornutum* com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L e dos controlos negativos, após precipitação com etanol 96% (v/v).

No precipitado do meio de cultura foram detetados essencialmente compostos sulfatados, apresentando teores pouco significativos nas restantes biomoléculas com rendimentos abaixo de 1%. Relativamente a esta análise, observa-se um aumento do conteúdo em compostos sulfatados com o aumento do tempo de crescimento, independentemente da salinidade. Relativamente à concentração em proteínas os valores obtidos foram nulos, como seria expectável, uma vez que este método é aplicado para a precipitação de polissacáridos.

O conteúdo máximo de compostos sulfatados é registado para a amostra com 3 semanas de crescimento e com uma salinidade de 30 g/L com um valor de $103,6 \pm 1,23$ mg/L e o conteúdo em extrapolissacáridos apresentou-se bastante inferior ao atingido com a extração de intrapolissacáridos revelando um conteúdo máximo de $0,3 \pm 0,12$ mg/L.

No entanto, através da análise dos valores obtidos para o controlo negativo e comparando com os das restantes amostras, verifica-se que são detetados compostos sulfatos no meio de cultura antes de inoculação, e em alguns casos superiores aos detetados para as várias amostras. Este facto leva a afirmar que os teores em compostos extracelulares são extremamente reduzidos ou inexistentes.

Resultados e Discussão

Tabela IV.9 - Doseamento de compostos extracelulares de *P. tricornutum* com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L, presentes nos meios de cultura de crescimento e no controlo negativo.

	Tempo de crescimento (semanas)	Salinidade (g/L)	Conteúdo (mg/L)
Polissacáridos Totais	M 0	25	$2,25 \times 10^0 \pm 2,56 \times 10^{-3}$
		30	$1,94 \times 10^0 \pm 1,28 \times 10^{-1}$
	M 1	25	$2,46 \times 10^0 \pm 8,18 \times 10^{-2}$
		30	$3,30 \times 10^0 \pm 2,30 \times 10^{-2}$
	M 3	25	$2,34 \times 10^0 \pm 4,32 \times 10^{-1}$
		30	$2,63 \times 10^0 \pm 1,48 \times 10^{-1}$
β-(1,3)-glucanos (Congo Red)	M 0	25	n.d
		30	n.d
	M 1	25	$2,19 \times 10^{-2} \pm 1,08 \times 10^{-2}$
		30	$3,19 \times 10^{-2} \pm 2,02 \times 10^{-3}$
	M 3	25	n.d
		30	n.d
β-glucanos (Alcian Blue)	M 0	25	$3,04 \times 10^{-2} \pm 1,97 \times 10^{-5}$
		30	$2,40 \times 10^{-2} \pm 2,36 \times 10^{-4}$
	M 1	25	$2,86 \times 10^{-3} \pm 1,97 \times 10^{-5}$
		30	$7,48 \times 10^{-3} \pm 1,97 \times 10^{-4}$
	M 3	25	$9,51 \times 10^{-1} \pm 1,96 \times 10^{-2}$
		30	$2,84 \times 10^{-1} \pm 1,57 \times 10^{-2}$
Proteína	M 0	25	$3,04 \times 10^{-2} \pm 1,03 \times 10^{-3}$
		30	$2,40 \times 10^{-2} \pm 1,26 \times 10^{-3}$
	M 1	25	$2,86 \times 10^{-3} \pm 1,26 \times 10^{-3}$
		30	$7,48 \times 10^{-3} \pm 3,46 \times 10^{-3}$
	M 3	25	$1,96 \times 10^{-1} \pm 2,41 \times 10^{-2}$
		30	$1,36 \times 10^{-1} \pm 1,18 \times 10^{-2}$
Compostos Sulfatados	M 0	25	$6,64 \times 10^0 \pm 5,74 \times 10^{-2}$
		30	$6,85 \times 10^0 \pm 5,27 \times 10^{-2}$
	M 1	25	$2,23 \times 10^1 \pm 2,11 \times 10^{-1}$
		30	$2,20 \times 10^1 \pm 7,03 \times 10^{-2}$
	M 3	25	$2,43 \times 10^1 \pm 4,22 \times 10^{-1}$
		30	$2,11 \times 10^1 \pm 7,03 \times 10^{-2}$

Resultados e discussão

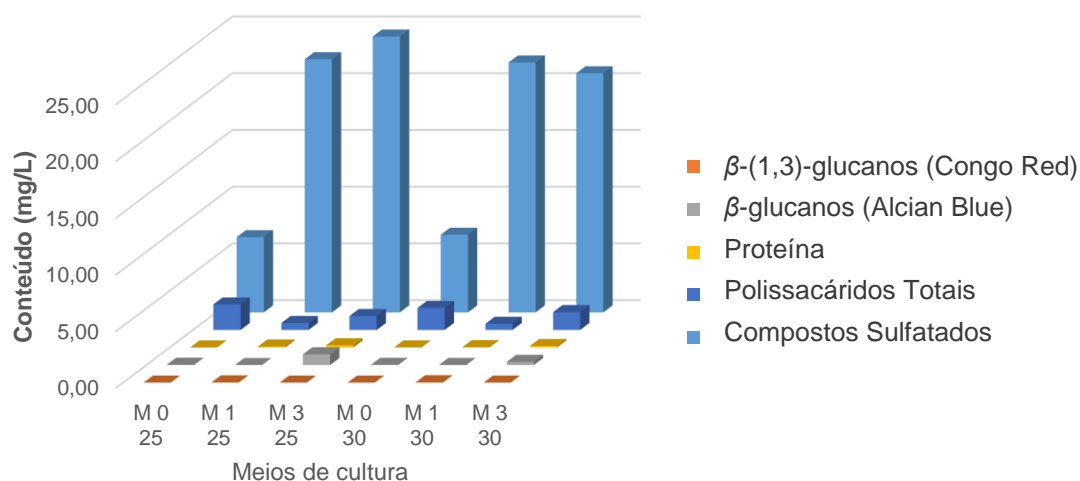


Figura IV.12 - Doseamento de biomoléculas extracelulares de *P. tricornutum* com 1 e 3 semanas de crescimento e salinidade de 25 e 30 g/L e dos controlos negativos.

Á semelhança do sucedido com as amostras os precipitados, os teores mais elevados detetados nos meios de cultura foram os dos polissacáridos totais e compostos sulfatados.

Comparando as Figuras IV.11 e IV.12, bem como as Tabelas IV.8 e IV.9, verifica-se que os precipitados apresentam valores mais elevados nos compostos sulfatados, o que seria expectável uma vez que, após a precipitação e centrifugação ocorre um processo de concentração da amostra. No entanto, verificou-se diminuição no conteúdo em polissacáridos totais, o que não seria de esperar.

A amostra que apresenta conteúdo máximo em polissacáridos totais é a amostra com tempo de crescimento de 3 semanas e com salinidade de 30 g/L, registando-se um valor de $2,6 \pm 0,15$ mg/L e o conteúdo máximo em compostos sulfatados de $24,3 \pm 0,42$ mg/L na amostra com tempo de crescimento de 3 semanas e salinidade 25 g/L.

De forma geral, a quantidade de compostos extracelulares detetados são em valores bastante inferiores aos compostos intracelulares, o que representa uma desvantagem, uma vez que, com a secreção dos compostos bioativos para o meio celular, o custo de processos de *downstream* (isolamento e purificação) diminuem consideravelmente. É possível que, para que a secreção destes compostos seja significativa, a cultura necessite de tempos de crescimento superiores.

Um indicativo de que a cultura apresenta compostos bioativos excretados pela célula é o aumento da sua viscosidade, devido ao seu conteúdo polissacáridos que apresentam elevada atividade como agente espessante e gelificante. Este aspecto não foi observado nos meios de cultura em estudo, verificando-se que apresentavam baixa viscosidade.

IV.5 Propriedades Antioxidantes

Os polissacáridos são biomoléculas que estão associadas a atividades antioxidantes. Os polissacáridos extraídos de microalgas têm sido identificados e descritos como compostos com estas propriedades. Os estudos que já foram efetuados e descritos por vários autores, levaram ao estudo de atividades antioxidantes nos extratos de *P. tricornutum* obtidos pelos métodos de extração otimizados descritos anteriormente, bem como a análise da possível influência das condições de crescimento nestas propriedades. [25], [104]

IV.5.1 Método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu permite quantificar compostos fenólicos, compostos que apresentam elevada atividade antioxidante. Efetuou-se a quantificação destas biomoléculas nos extratos obtidos pelos métodos de extrações selecionados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas). Os resultados encontram-se na Tabela IV.10 e foram representados graficamente na Figura IV.13. Neste doseamento as 5 frações de extração em multi-etapas estão individualizadas. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de biomassa.

Resultados e discussão

Tabela IV.10 - Determinação de compostos fenólicos nos vários extratos pelo método Folin-Ciocalteu.

Extrato	Tempo de crescimento (semanas)	Salinidade (g/L)	Conteúdo em compostos fenólicos (mg GAE/ g _{biomassa})
FW1	1	25	$1,43 \times 10^{-1} \pm 6,70 \times 10^{-4}$
		30	$6,00 \times 10^{-2} \pm 2,33 \times 10^{-3}$
	3	25	$1,66 \times 10^{-1} \pm 1,74 \times 10^{-3}$
		30	$1,37 \times 10^{-1} \pm 2,87 \times 10^{-3}$
FW2	1	25	$6,34 \times 10^{-3} \pm 7,46 \times 10^{-4}$
		30	$5,91 \times 10^{-4} \pm 3,73 \times 10^{-4}$
	3	25	$2,27 \times 10^{-1} \pm 9,70 \times 10^{-3}$
		30	$7,57 \times 10^{-2} \pm 2,92 \times 10^{-3}$
FKOH	1	25	$3,10 \times 10^{-1} \pm 7,17 \times 10^{-3}$
		30	$2,11 \times 10^{-1} \pm 3,43 \times 10^{-3}$
	3	25	$2,76 \times 10^{-1} \pm 8,96 \times 10^{-4}$
		30	$2,56 \times 10^{-1} \pm 8,46 \times 10^{-3}$
FHCl	1	25	n.d
		30	$1,16 \times 10^{-2} \pm 1,32 \times 10^{-3}$
	3	25	$3,20 \times 10^{-2} \pm 1,87 \times 10^{-5}$
		30	$1,26 \times 10^{-2} \pm 2,20 \times 10^{-4}$
FNaOH	1	25	$5,50 \times 10^{-3} \pm 4,48 \times 10^{-3}$
		30	n.d
	3	25	$2,13 \times 10^{-2} \pm 1,52 \times 10^{-3}$
		30	$5,26 \times 10^{-2} \pm 5,22 \times 10^{-4}$
Autoclave	1	25	$6,36 \times 10^{-2} \pm 2,57 \times 10^{-3}$
		30	$1,71 \times 10^{-2} \pm 4,27 \times 10^{-4}$
	3	25	$6,04 \times 10^{-2} \pm 2,16 \times 10^{-3}$
		30	$4,28 \times 10^{-2} \pm 2,24 \times 10^{-4}$
Micro-ondas	1	25	$9,98 \times 10^{-2} \pm 4,23 \times 10^{-3}$
		30	$2,35 \times 10^{-2} \pm 7,03 \times 10^{-4}$
	3	25	$6,30 \times 10^{-2} \pm 3,17 \times 10^{-3}$
		30	$7,41 \times 10^{-2} \pm 1,27 \times 10^{-3}$

Nota: n.d. – não detetado

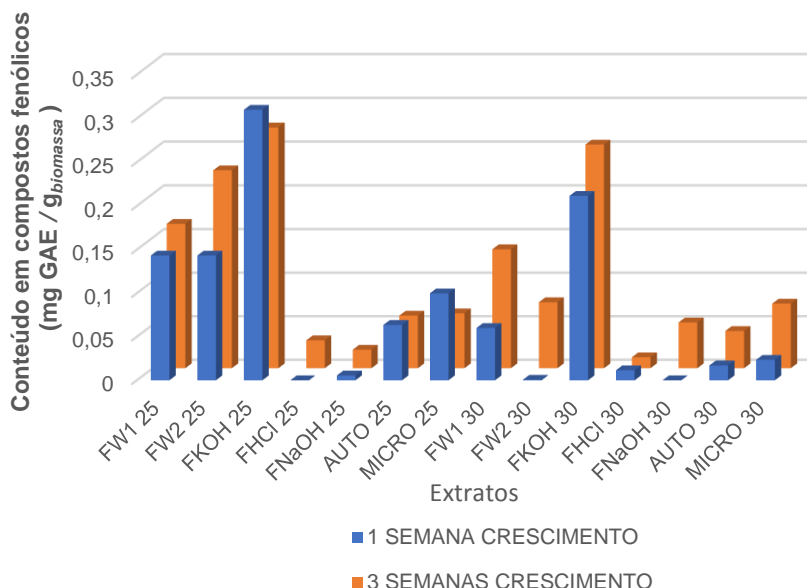


Figura IV.13 - Influência dos parâmetros de crescimento na produção de compostos fenólicos determinados pelo método Folin-Ciocalteu, nos extratos obtidos pelo métodos de extração otimizados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas)

A quantidade de compostos fenólicos aumenta, de forma geral, com o aumento do tempo de crescimento, o que seria esperado dado que, com o aumento da densidade celular, existe libertação de toxinas para o meio. Havendo escassez de nutrientes, a cultura inicia um processo de *stress* por falta de nutrientes essenciais ao seu crescimento. Como combate à condição de *stress* a cultura irá produzir maior quantidade de compostos antioxidantes, nomeadamente, compostos fenólicos e polifenóis. [25], [57], [89]

É notório através da análise da Figura IV.13 que, todas as frações de FKOH obtidas pelo método convencional em multi-etapas demonstram ter o maior teor em compostos fenólicos. No entanto, os valores detetados encontram-se baixos em comparação com a determinação de compostos fenólicos realizada por Goiris *et al* em 2012 que detetou $3,75 \pm 0,46$ mg GAE / g biomassa para *P. tricornutum*. [27]

IV.5.2 Determinação do conteúdo em flavonóides

Os flavonóides são biomoléculas que, devido à sua estrutura, apresentam elevada atividade antioxidante e capacidade quelante de iões metálicos. As características referidas tornam a quantificação destas biomoléculas um tópico interessante para posterior aplicação como agente antioxidante ou no combate ao *stress* oxidativo celular. [92]

Foi realizado um estudo na determinação do conteúdo em flavonóides das amostras com 1 e 3 semanas de crescimento, 25 e 30 g/L de salinidade, aos extratos obtidos pelos três métodos selecionados e otimizados. Apesar das diversas tentativas, incluindo mudança de solvente e proporção da mistura reacional, não foram detetados estes compostos nas amostras analisadas, através do método de doseamento descrito (em III.3.5.2). Estes resultados não são os expectáveis, uma vez que está descrito que nas microalgas os polifenóis detetados pelo método de Folin-Ciocalteu deveriam estar na forma de flavonóides. [27], [46], [47]

IV.5.3 Método do Radical ABTS

A atividade antioxidante total das amostras selecionadas foi determinada através do método do radical ABTS, que mede a capacidade da amostra para reduzir o radical ABTS a ABTS. Esta reação é verificada pela passagem de um complexo azul/verde para incolor.

Os resultados da determinação da atividade antioxidante total dos extratos obtidos através de extração convencional em multi-etapas, em autoclave e assistida por micro-ondas para as biomassas crescidas com salinidades de 25 g/L e 30 g/L, e tempos de crescimento de 1 e 3 semanas, encontram-se indicados na Tabela IV.11 e na Figura IV.14. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de Trolox (TEAC) por g de biomassa.

Resultados e Discussão

Tabela IV.11 - Atividade antioxidante total nos vários extratos determinada pelo método do radical ABTS.

Extrato	Tempo de crescimento (semanas)	Salinidade (g/L)	Atividade Antioxidante (mg TEAC/ g _{biomassa})
FW1	1	25	$5,42 \times 10^{-1} \pm 3,15 \times 10^{-3}$
		30	$4,17 \times 10^{-1} \pm 1,68 \times 10^{-2}$
	3	25	$5,11 \times 10^{-1} \pm 2,53 \times 10^{-3}$
		30	$5,44 \times 10^{-1} \pm 1,98 \times 10^{-3}$
FW2	1	25	$8,60 \times 10^{-2} \pm 8,01 \times 10^{-18}$
		30	$1,73 \times 10^{-2} \pm 1,17 \times 10^{-3}$
	3	25	$4,02 \times 10^{-1} \pm 1,31 \times 10^{-3}$
		30	$3,54 \times 10^{-1} \pm 2,95 \times 10^{-3}$
FKOH	1	25	$7,60 \times 10^{-1} \pm 1,41 \times 10^{-3}$
		30	$5,94 \times 10^{-1} \pm 1,07 \times 10^{-2}$
	3	25	$8,63 \times 10^{-1} \pm 2,11 \times 10^{-3}$
		30	$8,48 \times 10^{-1} \pm 3,08 \times 10^{-3}$
FHCI	1	25	$4,36 \times 10^{-2} \pm 3,80 \times 10^{-3}$
		30	$3,73 \times 10^{-1} \pm 3,65 \times 10^{-2}$
	3	25	$4,38 \times 10^{-1} \pm 1,10 \times 10^{-2}$
		30	$3,34 \times 10^{-1} \pm 6,68 \times 10^{-3}$
FNaOH	1	25	$1,80 \times 10^{-1} \pm 1,06 \times 10^{-2}$
		30	$3,82 \times 10^{-2} \pm 3,17 \times 10^{-2}$
	3	25	$4,67 \times 10^{-1} \pm 1,66 \times 10^{-2}$
		30	$4,50 \times 10^{-1} \pm 7,09 \times 10^{-3}$
Autoclave	1	25	$1,95 \times 10^0 \pm 1,42 \times 10^{-2}$
		30	$1,02 \times 10^0 \pm 4,56 \times 10^{-2}$
	3	25	$2,43 \times 10^0 \pm 2,33 \times 10^{-2}$
		30	$2,06 \times 10^0 \pm 1,50 \times 10^{-2}$
Micro-ondas	1	25	$1,88 \times 10^0 \pm 1,21 \times 10^{-2}$
		30	$9,38 \times 10^{-1} \pm 1,08 \times 10^{-2}$
	3	25	$1,97 \times 10^0 \pm 8,37 \times 10^{-2}$
		30	$2,38 \times 10^0 \pm 1,08 \times 10^{-2}$

Resultados e discussão

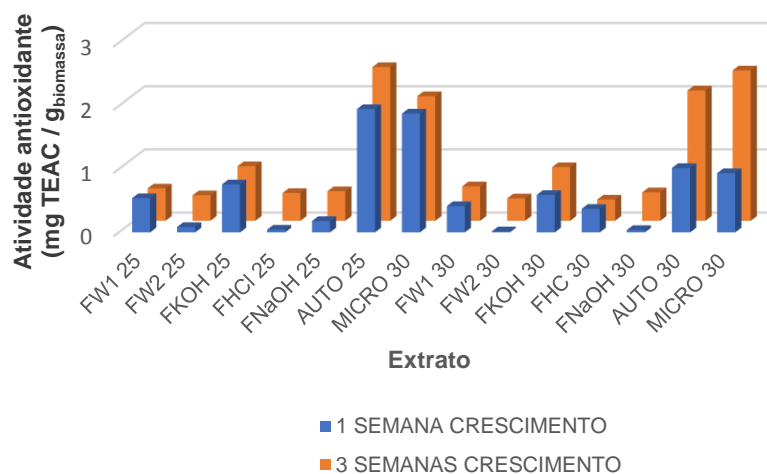


Figura IV.14 - Influência dos parâmetros de crescimento na atividade antioxidante, determinada pelo do radical ABTS, dos extratos obtidos pelos métodos de extração otimizados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas).

Relativamente ao método de extração convencional em multi-etapas, as frações que demonstraram uma atividade antioxidante mais elevada foram as frações FKOH de todas as condições de crescimento. Na análise da influência dos parâmetros de crescimento na atividade antioxidante, pode-se verificar que esta diminui com o aumento da salinidade e aumenta com o tempo de crescimento. Estes resultados vão de encontro ao esperado uma vez que, com o aumento do tempo de cultura, existe maior toxicidade do meio e as células produzem maior quantidade de compostos bioativos de modo a lidar com o *stress* provocado pela ausência de nutrientes e aumento de substâncias tóxicas.

O valor máximo de atividade antioxidante de $2,38 \pm 0,01$ mg TEAC /g biomassa foi determinado para o extrato obtido através de extração assistida por micro-ondas para a biomassa com 3 semanas de crescimento e com salinidade de 30 g/L. No método de extração em autoclave obteve-se o valor mais elevado de $2,43 \pm 0,02$ mg TEAC/g biomassa para a biomassa com 3 semanas de crescimento e com salinidade de 25 g/L.

Os resultados do método do radical ABTS apresentam-se concordantes com os resultados da determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu, no entanto, apresentam-se superior aos valores da literatura reportados por Goiris *et al.* em 2012 que detetou um valor de atividade antioxidante para *P.tricornutum* de $4,55 \pm 0,01$ μ mol TEAC/g biomassa, o que equivale a $1,14 \pm 2,50 \times 10^{-3}$ mg TEAC/g biomassa. [27]

IV.5.4 Método do Radical DPPH

A atividade antioxidante das amostras após extração foi também estudada pelo método de DPPH, com o objetivo de avaliar a capacidade de ligação a radicais e evitar reações com espécies oxidativas que dá origem a *stress* oxidativo.

Foram realizados ensaios para as amostras obtidas pelos métodos de extração já descritos, extraídas da biomassa crescida nas várias condições estudadas. No entanto este método demonstrou-se não ser aplicável às amostras em estudo. Após várias tentativas, inclusive com mudança de mistura reacional, não foi possível obter resultados conclusivos para este.

IV.5.5 Capacidade Quelante dos iões Fe^{2+}

Foi medida a capacidade quelante de iões $Fe(II)$ das amostras de extração selecionadas e já referidas anteriormente, uma vez que estes iões são responsáveis por várias reações oxidativas no organismo podendo, no limite, originar *stress* oxidativo. Desta forma, a capacidade da amostra criar um complexo com os iões $Fe(II)$, impedindo o desenvolvimento de reações oxidativas é de elevada importância. Esta técnica baseia-se na destruição do complexo ferrozina- $Fe(II)$ que causa uma diminuição da intensidade da cor da mistura reacional.

Os resultados da determinação da capacidade quelante de Fe^{2+} foram calculados em % através da fórmula indicada em III.3.5.5 e estão apresenta-se na tabela IV.12 e na figura IV.15.

Resultados e discussão

Tabela IV.12 - Capacidade quelante de Fe²⁺ dos extratos obtidos pelos métodos de extração otimizados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas).

Extratos	Tempo de crescimento (semanas)	Salinidade (g/L)	Atividade Antioxidante (%)
FW1	1	25	$2,69 \times 10^1 \pm 1,92 \times 10^{-1}$
		30	$2,80 \times 10^1 \pm 2,71 \times 10^{-2}$
	3	25	$1,29 \times 10^1 \pm 2,63 \times 10^{-1}$
		30	$7,50 \times 10^0 \pm 8,84 \times 10^{-1}$
FW2	1	25	n.d
		30	$4,75 \times 10^{-1} \pm 3,23 \times 10^{-1}$
	3	25	$6,49 \times 10^0 \pm 1,00 \times 10^0$
		30	$5,58 \times 10^0 \pm 5,15 \times 10^{-1}$
FKOH	1	25	$2,57 \times 10^1 \pm 1,09 \times 10^0$
		30	$1,64 \times 10^0 \pm 2,74 \times 10^{-1}$
	3	25	$1,99 \times 10^1 \pm 2,10 \times 10^0$
		30	$2,63 \times 10^0 \pm 8,81 \times 10^{-1}$
FHCl	1	25	n.d
		30	$2,02 \times 10^0 \pm 4,63 \times 10^{-1}$
	3	25	n.d
		30	$5,24 \times 10^0 \pm 1,10 \times 10^0$
FNaOH	1	25	$2,85 \times 10^1 \pm 1,26 \times 10^0$
		30	$8,92 \times 10^1 \pm 3,85 \times 10^{-1}$
	3	25	$5,76 \times 10^{-1} \pm 2,08 \times 10^{-1}$
		30	$3,24 \times 10^0 \pm 5,37 \times 10^{-1}$
Autoclave	1	25	$5,86 \times 10^1 \pm 6,07 \times 10^{-1}$
		30	$4,79 \times 10^1 \pm 7,52 \times 10^{-2}$
	3	25	$9,89 \times 10^0 \pm 4,13 \times 10^0$
		30	$7,89 \times 10^1 \pm 1,01 \times 10^0$
Micro-ondas	1	25	$7,88 \times 10^1 \pm 1,17 \times 10^0$
		30	$1,00 \times 10^2 \pm 1,65 \times 10^{-1}$
	3	25	$7,83 \times 10^1 \pm 2,68 \times 10^0$
		30	$3,84 \times 10^1 \pm 5,17 \times 10^0$

Nota: n.d. – não detetado

Resultados e Discussão

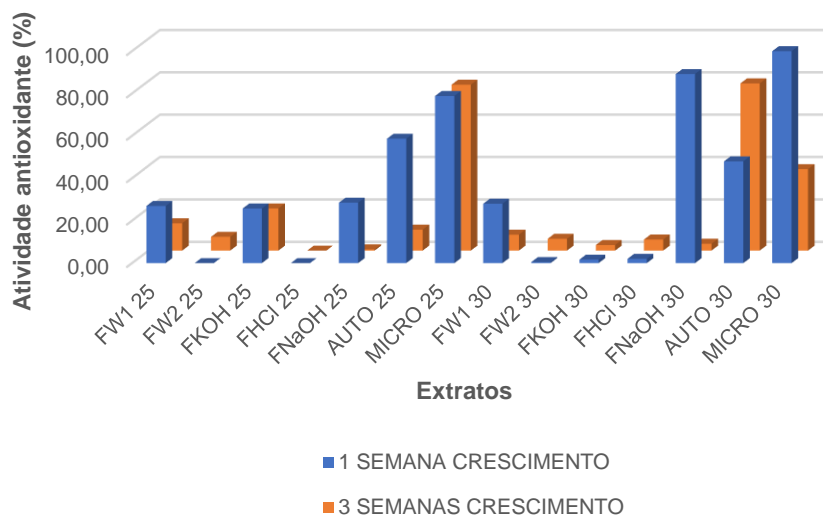


Figura IV.15 - Influência dos parâmetros de crescimento na capacidade quelante de Fe^{2+} dos extratos obtidos pelos métodos de extração otimizados (multi-etapas, autoclave e micro-ondas).

Verificou-se que, para os extratos de biomassa com crescimento de 1 semana, a capacidade quelante de íons $\text{Fe}(\text{II})$, de um modo geral, diminui com o tempo de crescimento. Relativamente à amostra de extrato obtida por extração assistida por micro-ondas verifica-se um aumento de capacidade quelante com o aumento da salinidade, no entanto na amostra de extração em autoclave diminui com a salinidade. Através destes resultados pode-se verificar que à partida a salinidade não influencia a produção de compostos com esta capacidade.

O maior valor de atividade antioxidante relativamente à capacidade quelante de íons Fe^{2+} verificou-se na amostra de biomassa com 1 semanas de crescimento e salinidade de 30 g/L extraída em micro-ondas com um valor de $100,0 \pm 0,16\%$. Ou seja, tem uma capacidade quelante de íons Fe^{2+} igual ao padrão utilizado (EDTA 2 mg/mL).

IV.5.6 Poder Redutor de Fe³⁺

Foi estudado também o poder redutor de Fe³⁺ nas mesmas amostras, uma vez que os íons de ferro são precursores de reações oxidativas do organismo. No entanto, apesar dos extratos apresentarem uma elevada capacidade quelante dos íons Fe²⁺, não se verificou potencial redutor dos íons Fe(III). Foram realizadas várias alterações ao método, nomeadamente, envolvendo mudança de reagente e mistura reacional, no entanto não foram detetados valores de potencial redutor pelo presente método descrito em III.3.5.6. Concluiu-se, deste modo, que à partida que os extratos estudados não apresentam potencial redutor de íons Fe³⁺.

IV.6 Fracionamento de biomoléculas por cromatografia de troca iónica

Após determinação dos conteúdos em polissacáridos totais, β -glucanos, proteínas, compostos sulfatados e compostos fenólicos, selecionou-se um extrato para fracionamento de polissacáridos.

A seleção do extrato teve por base a concentração em polissacáridos totais, tendo recaído a escolha no extrato obtido por extração assistida por micro-ondas (KOH 0,1M; 120 °C, 30 minutos) da biomassa desenvolvida durante 3 semanas em condições de salinidade de 30g/L.

Após esta seleção realizou-se um fracionamento destas biomoléculas por cromatografia de troca iónica com resina DEAE-52 numa coluna (1 x 5cm) por incrementos graduais na força iónica (água destilada, NaCl 0,1; 0,3 e 0,5M, NaOH 0,1; 0,5M e 1M e KCl 2M). Numa primeira tentativa, foi aplicado 2,5 mL de extrato (MICRO KOH 0,1M, 120°C, 30 min) contendo cerca de 37 mg de polissacáridos (diluição 1:2 em água). O objetivo principal deste processo seria isolar o máximo de polissacáridos devido à sua bioatividade.

A cromatografia foi acompanhada por leitura de absorvância a 200, 260 e 280 nm, de forma a monitorizar a presença de polissacáridos, ácidos nucleicos e proteína. O cromatograma deste processo de fracionamento está representado nas figuras IV.16. [103]

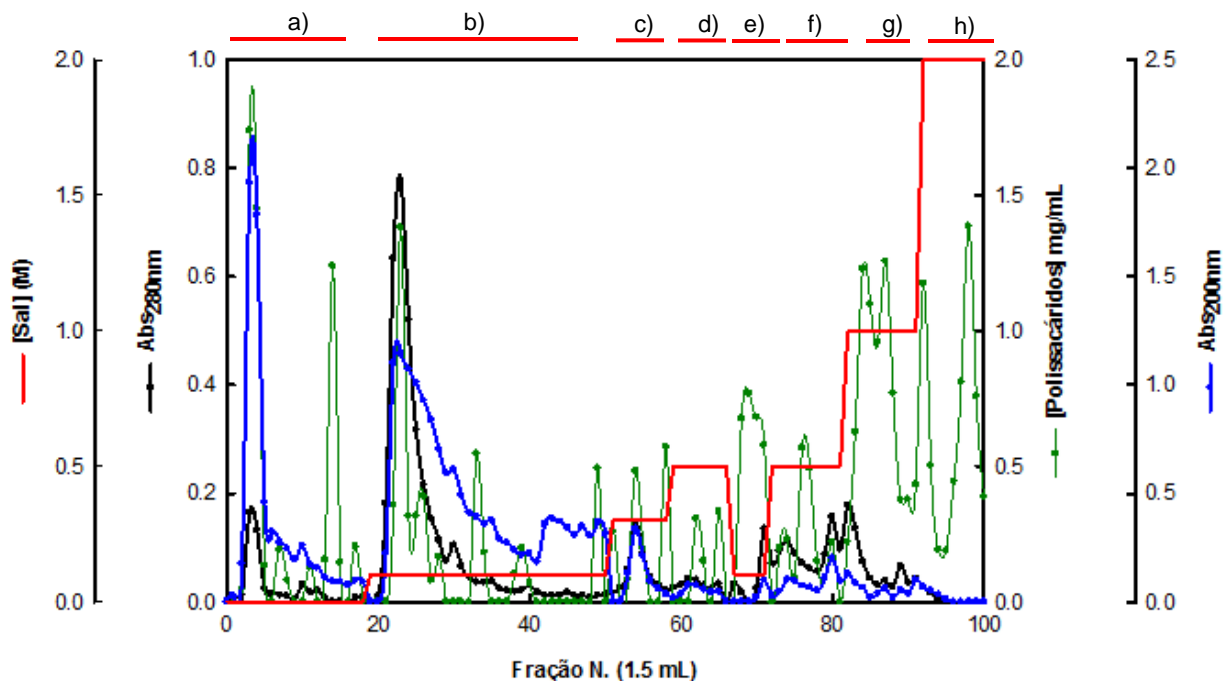


Figura IV.16 - Cromatograma do extrato MICRO (KOH 0,1M, 120°C, 30 min), obtido em coluna contendo a resina DEAE-52 de acordo com os Materiais e Métodos. O conteúdo em polissacarídeos nas frações foi doseado pelo método do fenol-ácido sulfúrico. Sistema eluente a) água destilada; b) NaCl 0,1M; c) NaCl 0,3M; d) NaCl 0,5M; e) NaOH 0,1M, f) NaOH 0,5M g) NaOH 1M; h) KCl 2M

A presença de ácidos nucleicos na amostra como contaminação foi detetada seguindo o perfil cromatográfico a 260nm, no entanto este perfil não se encontra representado na figura anterior. Através da Abs a 260 nm verificou-se uma presença acentuada de ácidos nucleicos nas frações iniciais eluídas com NaCl 0,1M e que as frações finais estão, praticamente, livres de contaminação por ácidos nucleicos.

A leitura da Abs a 280 nm das frações cromatográficas permitiu detetar a presença de proteínas. As proteínas podem estar sob a forma de um complexo proteína-polissacárido, sendo este complexo um composto bioativo de interesse, ou na forma de proteína isolada, sendo, deste modo uma contaminação da amostra.

À semelhança do sucedido com o acompanhamento de contaminação por ácidos nucleicos, a maior concentração de proteínas foi detetada nas frações eluídas com NaCl 0,1M observando-se uma diminuição ao longo do fracionamento, sendo praticamente indetetáveis nas últimas frações deste processo.

O acompanhamento da cromatografia a 200 nm teve como objetivo detetar de uma forma rápida a presença de polissacáridos nas frações cromatográficas. Observando a curva de eluição a 200nm, verifica-se à partida uma concentração mais elevada de polissacáridos nas frações iniciais eluídas com água e nas frações eluídas com NaCl 0,1 M.

No entanto, a deteção de polissacáridos a este comprimento não é um método muito específico, podendo haver a interferência de proteínas e ácidos nucleicos. De modo a confirmar a presença e quantificar os polissacáridos eluídos, as frações foram doseadas pelo método fenol-ácido sulfúrico.

Através deste doseamento confirmou-se um teor mais elevado de polissacáridos nas frações iniciais eluídas com água e nas frações eluídas com NaCl 0,1M. O que confirma os resultados obtidos através da Abs a 200nm. Verifica-se também a diminuição da concentração de polissacáridos com o aumento da concentração de NaCl e, no entanto, com o aumento da força iónica das soluções de NaOH e KCl observa-se o aumento o seu teor, nomeadamente nas frações 87 e 98.

Estas frações foram ainda doseadas pelo método de ligação do azul de Coomassie e pelo método turbidimétrico de $BaCl_2$. Para este fim, as frações tiveram que ser neutralizadas previamente uma vez que estes métodos de doseamento de proteína e de compostos sulfatados são sensíveis ao pH alcalino. Após neutralização dosearam-se as frações pelos referidos métodos, no entanto, não foram detetados quaisquer destes compostos. Estes resultados contrariam o cromatograma a 280 nm que apresenta proteína em diversas frações, o que indica que, ao proceder-se à neutralização das frações, é possível que estas tenham ficado demasiado diluídas não sendo possível o seu doseamento.

IV.7 Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier foi realizada com o objetivo de detetar características estruturais parciais das amostras.

Esta técnica foi aplicada a várias amostras, nomeadamente à biomassa inicial (crescida durante 3 semanas com uma salinidade de 30 g/mL), aos extratos obtidos por extração em autoclave e assistida por micro-ondas e convencional por multi-etapas. Posteriormente, foi também aplicada às frações da cromatografia de troca iónica nº 87 eluída com NaOH 1M e nº 98 eluída com KCl 2M.

Resultados e Discussão

Inicialmente compararam-se os espectros de FT-IR da amostra de biomassa com 3 semanas de crescimento e salinidade de 30 g/L, com os extratos obtidos em autoclave (125 °C; 1,5h) e assistido por micro-ondas (KOH 0,1M; 120 °C; 30 min) a partir da mesma amostra de biomassa (Figura IV.17).

De seguida, comparou-se o espectro de FT-IR dos extratos obtidos da de biomassa com 3 com crescimento de 3 semanas e salinidade de 30 g/L após extração assistida por micro-ondas (KOH 0,1M; 120 °C; 30 min) com o da fração de cromatografia de troca iónica nº 87 eluída com NaOH 1M e com o da fração nº98 eluída com KCl 2M (FiguraIV.18)

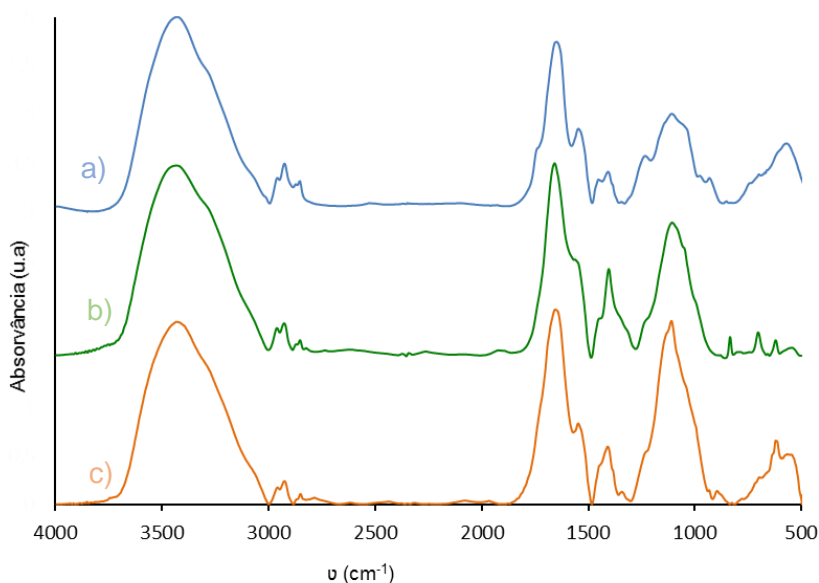


Figura IV.17 - Espectros de FT-IR de a) biomassa 1:10 com água destilada, b) extrato micro-ondas (KOH 0,1M; 120 °C; 30 min) e c) Extrato autoclave (125 °C; 1,5h), em pastilhas de KBr.

Através da análise de figura IV.17 é possível verificar que, independentemente do solvente e processo de extração, o comportamento do espectro FT-IR apresenta-se muito semelhante ao da biomassa inicial anterior ao processo de extração, o que indica que a extração não causou alterações estruturais dos compostos presentes na biomassa.

Observa-se nos diferentes espectros algumas bandas características dos polissacáridos. Próximo de 3430 cm^{-1} verifica-se a presença de uma banda com elevada intensidade correspondente à ligação O-H. A banda presente no intervalo de 2970-2850 cm^{-1} representa a ligação C-H. A biomassa apresenta uma banda ausente nas restantes amostras a 1736 cm^{-1} correspondente ao anião carboxilato. A 1450-1410 cm^{-1} verifica-se uma banda característica da deformação assimétrica de CH_3 e CH_2 .

Resultados e discussão

Apresenta-se uma banda de baixa intensidade a 1230 cm^{-1} que indica a presença de ésteres sulfatados O-SO_3 . A presença da banda a 110 cm^{-1} representa a ligação simétrica C-O-C . Adicionalmente, verifica-se a presença de banda abaixo de 700 cm^{-1} em todas as amostras à exceção da amostra de biomassa, esta banda indica a presença de conformação β de polissacáridos. [13], [85], [86]

Verifica-se, ainda, a presença de duas bandas a 1654 cm^{-1} que representam a ligação C=O característica da amida I e a 1549 cm^{-1} encontra-se uma banda característica da extensão C-N da amida II o que indica contaminação de proteínas. Com a ausência de banda característica do complexo proteína-polissacárido a 1250 cm^{-1} , pode-se afirmar que não existe proteína conjugada nas amostras. [13], [85], [86]

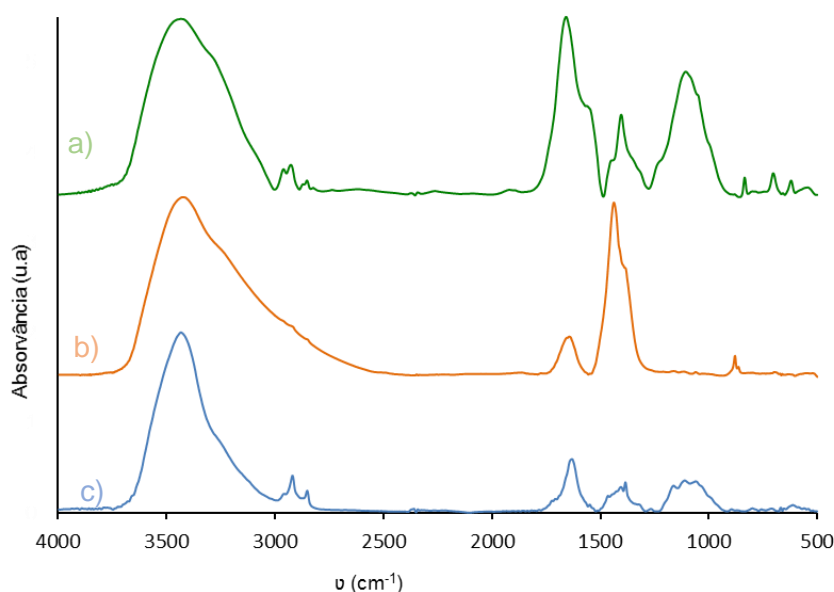


Figura IV.18 - Espectro de FT-IR de a) extrato micro-ondas (KOH 0,1M; $120\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min) a $120\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, KOH 1M, b) fração cromatográfica nº 98 eluída com KCl 2M e c) fração cromatográfica nº 87 eluída com NaOH 1M, em pastilhas de KBr.

Na figura IV.18, a 3437 cm^{-1} observa-se nos espectros das duas frações 87 e 98, a presença de uma banda larga correspondente à ligação O-H . A $2960\text{-}2852\text{ cm}^{-1}$ é possível verificar na fração 87 a presença da banda de extensão da ligação C-H . A $1465\text{-}1386$ verifica-se nas duas frações a presença da banda de deformação dos grupos alquilo. [13], [85], [86]

Resultados e Discussão

A 1174-1055 a fração 87 apresenta uma banda correspondente à ligação simétrica C-O-C. Não existe presença da banda de éster-sulfato nas frações contrariamente à amostra de extrato, no entanto, na fração 98 verifica-se a presença de uma banda a 883 cm^{-1} relativa à ligação C-O-S. [13], [85], [86]

Com a ausência das bandas da amida I e amida II conclui-se que o fracionamento da amostra possibilitou a separação dos polissacáridos da contaminação de proteínas. [13], [85], [86]

V. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

V. Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho final de mestrado teve como objetivo a produção, a extração e a caracterização parcial de compostos bioativos da microalga diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*.

A produção de biomassa de *P.tricornutum* foi efetuada variando duas salinidades do meio de cultura (25 g/L e 30 g/L de NaCl) durante 1 e 3 semanas. Posteriormente, estudaram-se vários métodos de extração, dos quais se selecionaram três que apresentaram melhor *performance* no que diz respeito ao teor em compostos bioativos: extração convencional em multi-etapas, extração em autoclave e extração assistida por micro-ondas. Os métodos de extração selecionados (autoclave e micro-ondas) foram sujeitos a processos de otimização relativamente a tempo de extração, a temperatura e/ou ao solvente de extração. Verificou-se que as condições ótimas para o método de extração em autoclave foram temperatura de 125 °C durante 1,5h, na extração assistida por micro-ondas as condições ótimas de extração foram atingidas utilizando como solvente uma solução de KOH 0,1M, a uma temperatura de 120 °C e durante 0,5h.

Após a aplicação dos vários métodos de extração analisou-se o teor em biomoléculas dos vários extratos obtidos verificando-se um elevado teor em polissacáridos totais e compostos sulfatados. A análise quantitativa e qualitativa de compostos bioativos a partir de microalgas baseia-se principalmente na seleção de métodos de extração adequados, pois desempenha um papel crucial nos resultados finais e respetivas conclusões.

Assim, com base nos valores obtidos através dos vários métodos de doseamento aplicados aos extratos, foi possível concluir que o método que aumentou a eficiência de extração de compostos bioativos foi a extração assistida por micro-ondas, através do qual foi possível obter um rendimento de 16,8% para extração de polissacáridos, 15,8% para a extração de compostos sulfatados e 2,1% para a extração de proteínas. Os valores referidos acima ultrapassam os valores da literatura atingidos por Guzmán em 2003. Os teores em β -glucanos detetado pelo método do Congo Red e pelo método do Alcian Blue foram muito reduzidos ou em alguns casos praticamente inexistentes. O método de extração que demonstrou ser mais eficiente na extração destes compostos foi o que utilizou o autoclave durante 1,5h a 125°C, verificando-se um teor de 5,57 mg/g de biomassa.

Conclusões e perspectivas futuras

Foi também estudada a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos através dos métodos selecionados e otimizados. Os compostos fenólicos são constituintes muito importantes devidos à sua capacidade de eliminação de radicais livres contribuindo diretamente para ação antioxidativa dos extratos onde estão presentes, sugerindo desempenhar um papel preventivo no desenvolvimento tumores e doenças cardíacas. Os extratos obtidos com KOH 0,1 M como solvente revelaram ser os mais elevados em compostos fenólicos, com um teor de 0,2-0,3 mg GAE /g de biomassa na fração alcalina (FKOH) do método convencional em multi-etapas e 0,1 mg GAE /g de biomassa no MICRO.

A atividade antioxidante dos extratos foi também avaliada pelo teste de inibição do radical ABTS e pelo teste da capacidade quelante dos iões Fe^{2+} . O máximo de 2,4 mg TEAC /g de biomassa foi observado no MICRO seguido pelo AUTO com 2,4 mg de TEAC /g de biomassa. O extrato AUTO também revelou elevada atividade quelante de iões Fe^{2+} (78,87%) sendo o extrato que apresentou maior atividade quelante de iões Fe^{2+} o assistido por micro-ondas, revelando 100% de atividade.

O extrato MICRO (KOH 0,1M, 120°C, 30 min) foi também sujeito a um fracionamento de polissacáridos por cromatografia de troca iónica, em coluna, contendo a resina catiónica DEAE-52, de onde foram selecionadas as frações nº 87 e nº 98 para análise por FT-IR. Esta seleção teve por base as suas concentrações em polissacáridos totais, 1,26 e 1,39 mg/mL, respetivamente, e a ausência, à partida, de contaminantes (proteínas e ácidos nucleicos).

A identificação e caracterização parcial dos compostos presentes na biomassa de *P.tricornutum* desenvolvida no meio de cultura com 30 g/L de salinidade durante 3 semanas, o extrato MICRO (KOH 0,1M, 120°C, 30 min) , o extrato AUTO (H₂O, 125°C, 0,5h) e duas frações da cromatografia de troca iónica, foram efetuadas por FT-IR. Foram identificadas em todas as amostras analisadas as regiões de *footprint* dos polissacáridos e verificou-se que, independentemente dos processos de extração, do solvente utilizado, da temperatura e do tempo de extração, os polissacáridos não apresentaram diferenças estruturais significativas.

Quanto ao efeito dos fatores de crescimento analisados na produção de compostos sulfatados e polissacáridos de *P.tricornutum*, nomeadamente condições de salinidade do meio de cultura e tempo de crescimento, verificou-se que a salinidade de 30 g/L durante 3

Conclusões e perspectivas futuras

semanas potenciaram a sua produção. No entanto, da análise aos polissacáridos extracelulares verifica-se que à partida, será necessário um tempo de crescimento mais elevado para a sua produção.

Tendo em conta que os polissacáridos, mais especificamente, os polissacáridos sulfatados são dos compostos bioativos de maior interesse e tendo em vista a caracterização estrutural destes compostos produzidos, é de extrema importância no futuro estudar um esquema de purificação adequado de modo a obter polissacáridos mais isolados.

Estudos *in vitro* poderão ser realizados para analisar algumas propriedades, nomeadamente atividade antitumoral em linhas celulares de carcinoma humano. A caracterização estrutural destes polissacáridos pelas técnicas de espectroscopia ^1H e ^{13}C RMN e GC-MS pode ser importante na identificação de novos polissacáridos com propriedades potenciais para diversas aplicações industriais e medicinais.

A produção de microalgas com níveis elevados de compostos-alvo é o primeiro passo importante para a fabricação comercial de compostos bioativos. Assim, o estudo mais aprofundado ao nível do meio cultura variando algumas condições de crescimento nomeadamente a intensidade de luz, o arejamento, o teor de nitratos no meio, a temperatura, de modo a obter uma cultura de *P. tricornutum* com produção máxima de compostos bioativos de interesse, deverá ser desenvolvido.

Por último, uma grande vantagem de utilizar este tipo de microrganismo, para além do seu crescimento rápido e económico, é o facto deste tipo de microalgas ser capaz de excretar biomoléculas para o seu meio de cultura. Como tal, no futuro, é fundamental estudar as condições ótimas de crescimento, nomeadamente o tempo de crescimento, de modo a obter um maior teor em compostos bioativos extracelulares que vão diminuir, em larga escala, o custo dos processos de *downstream*.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

VI. Referências Bibliográficas

- [1] 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.
- [2] M. I. Khan, J. H. Shin, and J. D. Kim, "The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products," *Microb. Cell Fact.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–21, 2018.
- [3] S. P. M. Ventura *et al.*, "Extraction of value-added compounds from microalgae," in *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, C. Gonzalez-Fernandez and R. Muñoz, Eds. Duxford, Reino Unido: Elsevier Ltd, pp. 461–483, 2017.
- [4] F. G. Acién *et al.*, "Photobioreactors for the production of microalgae," in *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, 1st ed., C. Gonzalez-Fernandez and R. Muñoz, Eds. Duxford, Reino Unido: Elsevier Ltd, pp. 1–44, 2017.
- [5] R. Xiao and Y. Zheng, "Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 7, pp. 1225–1244, 2016.
- [6] I. Priyadarshani and B. Rath, "Commercial and industrial applications of micro algae – A review," *J. Algal Biomass Util.*, vol. 3, no. 4, pp. 89–100, 2012.
- [7] A. Alassali and I. Cybulska, "Methods for Upstream Extraction and Chemical Characterization of Secondary Metabolites from Algae Biomass," *Adv. Tech. Biol. Med.*, vol. 04, no. 01, pp. 1–16, 2016.
- [8] A. Demirbas, "Use of algae as biofuel sources," *Energy Convers. Manag.*, vol. 51, no. 12, pp. 2738–2749, 2010.
- [9] S. Leu and S. Boussiba, "Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae," *Ind. Biotechnol.*, vol. 10, no. 3, pp. 169–183, 2014.
- [10] S. Velea, F. Oancea, and F. Fischer, "Heterotrophic and mixotrophic microalgae cultivation," in *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, 1st ed., C. Gonzalez-Fernandez and R. Muñoz, Eds. Duxford, Reino Unido: Elsevier Ltd, pp. 45–65, 2017.

Referências Bibliográficas

- [11] A. I. Neto and I. S. Pinto, "Introduction to the Marine Algae: Overview," in *Marine Macro- and Microalgae: An Overview*, 1st ed., F. X. Malcata, I. S. Pinto, and A. C. Guedes, Eds. Porto, Portugal: CRC Press, pp. 1–19, 2019.
- [12] S. Khanra, M. Mondal, G. Halder, O. N. Tiwari, K. Gayen, and T. K. Bhowmick, "Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review," *Food Bioprod. Process.*, vol. 110, pp. 60–84, 2018.
- [13] 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.
- [14] R. Raja, H. Shammugam, R. Ravikumar, and S. I. Carvalho, "Microalgal Biomass Production," in *Marine Macro- and Microalgae: An Overview*, 1st ed., F. X. Malcata, I. S. Pinto, and A. C. Guedes, Eds. Porto, Portugal: CRC Press, pp. 63–77, 2019.
- [15] A. Willis, A. Chiovitti, T. M. Dugdale, and R. Wetherbee, "Characterization of the extracellular matrix of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): Structure, composition, and adhesive characteristics," *J. Phycol.*, vol. 49, no. 5, pp. 937–949, 2013.
- [16] B. Gügi, T. Le Costaouec, C. Burel, P. Lerouge, W. Helbert, and M. Bardor, "Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms," *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 9, pp. 5993–6018, 2015.
- [17] S. U. Kadam and B. K. Tiwari, "Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, pp. 4667–4675, 2013.
- [18] J. C. Lewin, "The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 18, no. 2, pp. 427–432, 1958.
- [19] J. C. Lewin, R. A. Lewin, and D. E. Philpott, "Observations on *Phaeodactylum tricornutum*," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 18, no. 2, pp. 418–426, 1958.
- [20] W. M. Darley, "Deoxyribonucleic Acid Content of The Three Cell Types," *J Phycol*, vol. 4, pp. 219–220, 1968.
- [21] B. Tesson, C. Gaillard, and V. Martin-je, "Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin," *Bot. Mar.*, vol. 52, no. 2, pp. 104–116, 2009.

Referências bibliográficas

- [22] A. De Martino, A. Meichenin, J. Shi, K. Pan, and C. Bowler, "Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions," *J. Phycol.*, vol. 43, no. 5, pp. 992–1009, 2007.
- [23] C. Bowler *et al.*, "The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes," *Nature*, vol. 456, no. 7219, pp. 238–244, 2008.
- [24] G. L. Bhalamurugan, O. Valerie, and L. Mark, "Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review," *Environ. Eng. Res.*, vol. 23, no. 3, pp. 229–241, 2018.
- [25] M. F. De Jesus Raposo, A. M. B. De Moraes, and R. M. S. C. De Moraes, "Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications," *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 5, pp. 2967–3028, 2015.
- [26] S. U. Kadam, C. Álvarez, B. K. Tiwari, and C. P. O'Donnell, "Extraction of biomolecules from seaweeds", in *Seaweed Sustainability*, 1st ed., B. Tiwari and D. Troy, Eds. Dublin, Irlanda: Academic Press, pp. 243-268, 2015.
- [27] K. Goiris, K. Muylaert, I. Fraeye, I. Foubert, J. De Brabanter, and L. De Cooman, "Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content," *J. Appl. Phycol.*, vol. 24, no. 6, pp. 1477–1486, 2012.
- [28] S. K. Kim and J. Venkatesan, "Introduction to marine glycobiology," in *Marine Glycobiology: Principles and Applications*, 1st ed., S. K. Kim, Ed. Nova Iorque, EUA: CRC Press, pp. 3–6, 2017.
- [29] B. P. Chatterjee and P. P. Bose, "Marine carbohydrates and their applications," in *Marine Glycobiology: Principles and Applications*, 1st ed., S. K. Kim, Ed. Nova Iorque, EUA: CRC Press, pp. 469–478, 2017.
- [30] V. Amarendra and R. S. Santhosh, "Bioactivity and mechanism of action of marine glycans," in *Marine Glycobiology: Principles and Applications*, 1st ed., S. K. Kim, Ed. Nova Iorque, EUA: CRC Press, pp. 51–66, 2017.
- [31] S. Jana, A. Gandhi, and S. Jana, "Polysaccharides from marine sources and their pharmaceutical approaches," in *Marine Glycobiology: Principles and Applications*, 1st ed., S. K. Kim, Ed. Nova Iorque, EUA: CRC Press, pp. 207–225, 2017.

Referências Bibliográficas

- [32] P. Michaud, "Polysaccharides from Microalgae , What's Future ?," *Adv. Biotechnology Microbiol.*, vol. 8, no. 2, pp. 8–9, 2018.
- [33] B. W. S. Souza *et al.*, "Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*," *Food Hydrocoll.*, vol. 27, no. 2, pp. 287–292, 2012.
- [34] M. C. Semedo, A. Karmali, and L. Fonseca, "A novel colorimetric assay of β -D-glucans in basidiomycete strains by alcian blue dye in a 96-well microtiter plate," *Biotechnol. Prog.*, vol. 31, no. 6, pp. 1526–1535, 2015.
- [35] 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.
- [36] F. Zhu, B. Du, Z. Bian, and B. Xu, " β -Glucans from edible and medicinal mushrooms : Characteristics, physicochemical and biological activities," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 41, pp. 165–173, 2015.
- [37] S. U. Kadam, B. K. Tiwari, and C. P. O'Donnell, "Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 50, pp. 24–31, 2015.
- [38] H. Majdoub, M. Ben Mansour, F. Chaubet, M. S. Roudesli, and R. M. Maaroufi, "Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1790, no. 10, pp. 1377–1381, 2009.
- [39] P. Seedeви, M. Moovendhan, S. Viramani, and A. Shanmugam, "Bioactive potential and structural chracterization of sulfated polysaccharide from seaweed (*Gracilaria corticata*)," *Carbohydr. Polym.*, vol. 155, pp. 516–524, 2017.
- [40] P. Seedeви, M. Moovendhan, S. Vairamani, and A. Shanmugam, "Structural characterization and biomedical properties of sulfated polysaccharide from the gladius of *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1831)," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 85, pp. 117–125, 2016.

Referências bibliográficas

- [41] N. Flórez-Fernández, M. López-García, M. J. González-Muñoz, J. M. L. Vilariño, and H. Domínguez, "Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 29, no. 3, pp. 1553–1561, 2017.
- [42] 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.
- [43] C. Vizetto-Duarte, C. B. Sousa, M. Rodrigues, L. Custódio, L. Barreira, and J. Varela, "Marine Algal Bioactivities," in *Marine Macro- and Microalgae: An Overview*, 1st ed., F. X. Malcata, I. S. Pinto, and A. C. Guedes, Eds. Porto, Portugal: CRC Press, pp. 115–145, 2019.
- [44] P. G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 7, pp. 1035–1042, 2000.
- [45] Y. Sun, H. Wang, G. Guo, Y. Pu, and B. Yan, "The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*," *Carbohydr. Polym.*, vol. 113, pp. 22–31, 2014.
- [46] M. Rico, A. López, J. M. Santana-Casiano, A. G. González, and M. González-Dávila, "Variability of the phenolic profile in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* growing under copper and iron stress," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 58, no. 1, pp. 144–152, 2013.
- [47] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Antioxidant properties of phenolic compounds," *Trends Plant Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 152–159, 1997.
- [48] M. Zhang, S. W. Cui, P. C. K. Cheung, and Q. Wang, "Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity," *Food Sci. Technol.*, vol. 18, pp. 4–19, 2007.
- [49] F. Rahimi, M. Tabarsa, and M. Rezaei, "Ulvan from green algae *Ulva intestinalis*: optimization of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity," *J. Appl. Phycol.*, vol. 28, no. 5, pp. 2979–2990, 2016.
- [50] 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, no. June, pp. 178–184, 2018.

Referências Bibliográficas

- [51] S. Y. Xu, X. Huang, and K. L. Cheong, "Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities," *Mar. Drugs*, vol. 15, pp. 1–16, 2017.
- [52] M. C. Semedo, " β -Glucans from Basidiomycete Strains: Isolations, Purification, Characterization and Production of Monoclonal Antibodies," Tese de Doutorado, Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, 2015.
- [53] I. Kamal, C. Besombes, and K. Allaf, "A Novel One-Step Method For Extraction Lutein From Microalgae *Phaeodactylum* Using Accelerated Solvent Extraction (ASE).," in *First International Scientific Conference, University of Zakho, April 23rd-25th*, 2013, August 2015.
- [54] M. Mubarak, A. Shaija, and T. V. Suchithra, "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production," *Algal Res.*, vol. 7, pp. 113–123, 2015.
- [55] R. M. Rodriguez-Jasso, S. I. Mussatto, L. Pastrana, C. N. Aguilar, and J. A. Teixeira, "Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed," *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 3, pp. 1137–1144, 2011.
- [56] A. M. Ciko, S. Jokić, D. Šubarić, and I. Jerković, "Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae," *Mar. Drugs*, vol. 16, no. 10, 2018.
- [57] A. Villares, L. Mateo-vivaracho, and E. Guillamón, "Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms," *Agriculture*, vol. 2, pp. 452–471, 2012.
- [58] C. W. Huie and X. Di, "Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 812, pp. 241–257, 2004.
- [59] B. V. McCleary and R. Codd, "Measurement of (1-3), (1-4)- β -D-Glucan in Barley and Oats: A Streamlined Enzymic Procedure," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 55, pp. 303–312, 1991.
- [60] M. R. Schmitt and A. D. Budde, "Calcofluor fluorescence assay for wort β -glucan in a microplate format," *Cereal Chem.*, vol. 86, pp. 33–36, 2009.

Referências bibliográficas

- [61] J. R. Lakowicz and B. R. Masters, "Protein Fluorescent," in *Principles of Fluorescent Spectroscopy*, 3rd ed., J. R. Lakowicz, Ed. Baltimore, EUA, 2006.
- [62] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances," *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- [63] G. Cuesta, N. Suarez, M. I. Bessio, F. Ferreira, and H. Massaldi, "Quantitative determination of *pneumococcal* capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method," *J. Microbiol. Methods*, vol. 52, no. 1, pp. 69–73, 2003.
- [64] C. Panagiotopoulos and R. Sempéré, "Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions," *Limnol. Oceanogr. Methods*, vol. 3, no. 10, pp. 419–454, 2005.
- [65] 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, pp. 69–72, 2005.
- [66] 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, pp. 253–261, 2013.
- [67] J. Nitschke, H. Modick, E. Busch, R. W. Von Rekowski, H. J. Altenbach, and H. Mölleken, "A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms," *Food Chem.*, vol. 127, no. 2, pp. 791–796, 2011.
- [68] Y. T. Ko and Y. L. Lin, "1,3-B-Glucan Quantification By a Fluorescence Microassay and Analysis of Its Distribution in Foods," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 11, pp. 3313–3318, 2004.
- [69] M. Kupetz, S. Procopio, B. Sacher, and T. Becker, "Critical review of the methods of β -glucan analysis and its significance in the beer filtration process," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 241, no. 6, pp. 725–736, 2015.

Referências Bibliográficas

- [70] U. Passow and A. L. Alldredge, "A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP)," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 40, no. 7, pp. 1326–1335, 1995.
- [71] 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, pp. 248–254, 1976.
- [72] S. Fazekas de St. Groth, R. G. Webster, and A. Datyner, "Two New Staining Procedures for Quantitative Estimation of Proteins on Electrophoretic Strips," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 71, pp. 377–391, 1962.
- [73] M. R. de Moreno, J. F. Smith, and R. V. Smith, "Mechanism studies of Coomassie blue and silver staining of proteins," *J. Pharm. Sci.*, vol. 75, no. 9, pp. 907–911, 1986.
- [74] C. V Sapan, R. L. Lundblad, and N. C. Price, "Colorimetric protein assay techniques," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 29, pp. 99–108, 1999.
- [75] J. J. Sedmak and S. E. Grossberg, "A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250," *Anal. Biochem.*, vol. 79, no. 1–2, pp. 544–552, 1977.
- [76] J. W. O. Dell, "Method 375.2: Determination of Sulfate By Automated Colorimetry," in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, EPA, Ohio, EUA, 1993.
- [77] K. S. Dodgson, "Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters.," *Biochem. J.*, vol. 78, pp. 312–319, 1961.
- [78] R. Sakthivel and K. Pandima Devi, "Evaluation of physicochemical properties, proximate and nutritional composition of *Gracilaria edulis* collected from Palk Bay," *Food Chem.*, vol. 174, pp. 68–74, 2015.
- [79] C. Thetsrimuang, S. Khammuang, and R. Sarnthima, "Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus* sp. strain RJ-2," *Int. J. Pharmacol.*, vol. 7, no. 1, pp. 58–65, 2011.

Referências bibliográficas

- [80] E. Wei *et al.*, "Microwave-assisted extraction releases the antioxidant polysaccharides from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 123, pp. 280–290, 2019.
- [81] 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, pp. 1201–1207, 2012.
- [82] 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.
- [83] M. G. De Moraes, S. Vaz, E. G. De Moraes, J. Alberto, and V. Costa, "Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [84] A. C. Ruthes, F. R. Smiderle, and M. Iacomini, "D-Glucans from edible mushrooms : A review on the extraction , purification and chemical characterization approaches," *Carbohydr. Polym.*, vol. 117, pp. 753–761, 2015.
- [85] D. Fimbres-Olivarría *et al.*, "*Navicula* sp. Sulfated polysaccharide gels induced by Fe(III): Rheology and microstructure," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 8, 2016.
- [86] K. Stehfest, J. Toepel, and C. Wilhelm, "The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 43, no. 7, pp. 717–726, 2005.
- [87] Z. Zhang, F. Wang, X. Wang, X. Liu, Y. Hou, and Q. Zhang, "Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity *in vitro*," *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, pp. 181-121, 2010.
- [88] S. Silva, S. Martins, A. Karmali, and E. Rosa, "Production, purification and characterisation of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumour activity," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 92, no. 9, pp. 1826–1832, 2012.
- [89] J. Cui, K. K. T. Goh, R. Archer, and H. Singh, "Characterisation and bioactivity of protein-bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 strains," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 5, pp. 393–402, 2007.

Referências Bibliográficas

- [90] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. P. De Mello, "Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L.," *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6852–6865, 2013.
- [91] İ. Gülçin, I. G. Şat, Ş. Beydemir, M. Elmastaş, and Ö. I. Küfrevioğlu, "Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.)," *Food Chem.*, vol. 87, no. 3, pp. 393–400, 2004.
- [92] 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.
- [93] C.-C. Chang, M.-H. Yang, H.-M. Wei, and J.-C. Chern, "Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods," *J. Food Drug Anal.*, vol. 10, no. 3, pp. 178–182, 2002.
- [94] K. Mishra, H. Ojha, and N. K. Chaudhury, "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results," *Food Chem.*, vol. 130, pp. 1036–1043, 2012.
- [95] P. Gaikwad, A. Barik, K. I. Priyadarsini, and B. S. M. Rao, "Antioxidant activities of phenols in different solvents using DPPH assay," *Res. Chem. Intermed.*, vol. 36, no. 9, pp. 1065–1072, 2010.
- [96] Molyneux P, "The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant activity," *Songklanakarın J. Sci. Technol.*, vol. 26, pp. 211–219, 2004.
- [97] 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, pp. 277–285, 2004.
- [98] 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, pp. 669–675, 2006.
- [99] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, 1999.

Referências bibliográficas

- [100] L. L. S. Canabady-Rochelle, C. Harscoat-Schiavo, V. Kessler, A. Aymes, F. Fournier, and J. M. Girardet, "Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods," *Food Chem.*, vol. 183, pp. 129–135, 2015.
- [101] J. P. Adjimani and P. Asare, "Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators," *Toxicol. Reports*, vol. 5, pp. 721–728, 2015.
- [102] S.-H. Goh, F. M. Yusoff, and S. P. Loh, "A Comparison of the Antioxidant Properties and Total Phenolic Content in a Diatom, *Chaetoceros* sp. and a Green Microalga, *Nannochloropsis* sp.," *J. Agric. Sci.*, vol. 2, no. 3, 2010.
- [103] B. Chen, W. You, J. Huang, Y. Yu, and W. Chen, "Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 5, pp. 833–840, 2010.
- [104] H. Song *et al.*, "Extraction Optimization, Purification, Antioxidant Activity, and Preliminary Structural Characterization of Crude Polysaccharide from an Arctic *Chlorella* sp.," *Polym.*, vol. 10, pp. 292-310, 2018.
- [105] W. C. Ford and E. Percival, "Carbohydrates of *Phaeodactylum tricornutum* Part II - A Sulphated Glucuronomannan," *J. Chem. Soc.*, no. 1299, pp. 7042–7046, 1964.
- [106] S. Guzmán, A. Gato, M. Lamela, M. Freire-Garabal, and J. M. Calleja, "Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*," *Phyther. Res.*, vol. 17, no. 6, pp. 665–670, 2003.

Referências Bibliográficas

VII. Anexos

VII.1 Anexo I: Determinação do conteúdo de biomoléculas dos extratos resultante de biomassa de *P. tricornutum* com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L

Tabela VII.1 - Determinação de conteúdo em polissacáridos, β -(1,3)-glucanos e β -glucanos dos extratos após extração de biomassa de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L.

	Método de Extração	Conteúdo (mg/g biomassa)
Polissacáridos Totais	Multi-etapas	$2,50 \times 10^1$
	Auto 4h	$2,74 \times 10^1 \pm 1,49 \times 10^0$
	SH ₂ O	$1,26 \times 10^1 \pm 3,08 \times 10^{-1}$
	SEtOH	$2,49 \times 10^1 \pm 9,61 \times 10^{-1}$
	Sonda	$2,43 \times 10^1 \pm 5,78 \times 10^{-1}$
	Banho	$3,83 \times 10^0 \pm 1,38 \times 10^{-1}$
	Micro HCl 120 30	$1,31 \times 10^2 \pm 9,71 \times 10^{-1}$
β-(1,3)-glucanos (Congo Red)	Multi-etapas	$2,61 \times 10^0$
	Auto 4h	$3,01 \times 10^0 \pm 2,22 \times 10^{-1}$
	SH ₂ O	$4,14 \times 10^{-1} \pm 5,07 \times 10^{-3}$
	SEtOH	$7,06 \times 10^0 \pm 1,69 \times 10^{-1}$
	Sonda	$3,60 \times 10^{-1} \pm 4,56 \times 10^{-2}$
	Banho	$1,44 \times 10^0 \pm 2,28 \times 10^{-1}$
	Micro HCl 120 30	$7,42 \times 10^{-1} \pm 1,07 \times 10^{-2}$
β-glucanos (Alcian Blue)	Multi-etapas	$3,99 \times 10^0$
	Auto 4h	$2,93 \times 10^0 \pm 2,10 \times 10^{-1}$
	SH ₂ O	$1,23 \times 10^{-1} \pm 2,10 \times 10^{-2}$
	SEtOH	$1,47 \times 10^0 \pm 5,59 \times 10^{-2}$
	Sonda	$1,10 \times 10^{-1} \pm 7,54 \times 10^{-2}$
	Banho	$9,88 \times 10^{-2} \pm 7,78 \times 10^{-3}$
	Micro HCl 120 30	$1,26 \times 10^{-1} \pm 8,34 \times 10^{-3}$

Anexos

Tabela VII.2 - Determinação de conteúdo em proteína e compostos sulfatados dos extratos após extração de biomassa de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L.

	Método de Extração	Conteúdo (mg/g biomassa)
Proteína	Multi-etapas	$3,71 \times 10^1$
	Auto 4h	$1,06 \times 10^1 \pm 1,77 \times 10^{-1}$
	SH ₂ O	$2,73 \times 10^0 \pm 3,59 \times 10^{-1}$
	SEtOH	$3,03 \times 10^0 \pm 3,14 \times 10^{-1}$
	Sonda	$2,45 \times 10^1 \pm 1,46 \times 10^0$
	Banho	$2,01 \times 10^{-1} \pm 1,64 \times 10^{-2}$
	Micro HCl 120 30	$2,73 \times 10^0 \pm 3,64 \times 10^{-2}$
Compostos Sulfatados	Multi-etapas	$9,81 \times 10^1$
	Auto 4h	$4,64 \times 10^1 \pm 1,41 \times 10^0$
	SH ₂ O	$4,73 \times 10^1 \pm 3,95 \times 10^{-1}$
	SEtOH	$1,83 \times 10^2 \pm 2,63 \times 10^0$
	Sonda	$2,80 \times 10^1 \pm 1,11 \times 10^0$
	Banho	$8,08 \times 10^0 \pm 7,73 \times 10^{-1}$
	Micro HCl 120 30	$2,72 \times 10^1 \pm 9,22 \times 10^{-1}$

VII.2 Anexo II: Determinação de conteúdo em biomoléculas dos extratos resultantes da extração multi-etapas com biomassa de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e salinidade 30 g/L

Tabela VII.3 - Determinação do conteúdo em biomoléculas dos extratos das diferentes frações da extração multi-etapas aplicada na biomassa de *P.tricornutum* com 3 semanas de crescimento e 30 g/L de salinidade.

	Amostra	Conteúdo (mg/g biomassa)
Polissacáridos Totais	FW1	$5,82 \times 10^0 \pm 2,98 \times 10^{-1}$
	FW2	$4,78 \times 10^0 \pm 7,36 \times 10^{-1}$
	FKOH	$1,03 \times 10^1 \pm 1,63 \times 10^{-2}$
	FHCl	$3,75 \times 10^0 \pm 1,15 \times 10^{-1}$
	FNaOH	$5,23 \times 10^{-1} \pm 7,08 \times 10^{-2}$
β-(1,3)-glucanos (Congo Red)	FW1	$6,91 \times 10^{-2} \pm 1,93 \times 10^{-2}$
	FW2	$8,46 \times 10^{-1} \pm 1,01 \times 10^{-2}$
	FKOH	$1,67 \times 10^0 \pm 1,82 \times 10^{-1}$
	FHCl	$2,37 \times 10^{-2} \pm 3,04 \times 10^{-3}$
	FNaOH	$1,03 \times 10^{-2} \pm 8,93 \times 10^{-3}$
β-glucanos (Alcian Blue)	FW1	$1,48 \times 10^{-1} \pm 5,45 \times 10^{-3}$
	FW2	$7,38 \times 10^{-1} \pm 1,40 \times 10^{-3}$
	FKOH	$3,04 \times 10^0 \pm 1,26 \times 10^{-2}$
	FHCl	$5,15 \times 10^{-2} \pm 8,12 \times 10^{-4}$
	FNaOH	$5,87 \times 10^{-2} \pm 7,27 \times 10^{-4}$
Proteína	FW1	$4,10 \times 10^{-1} \pm 8,59 \times 10^{-3}$
	FW2	$4,36 \times 10^0 \pm 1,27 \times 10^{-1}$
	FKOH	$3,20 \times 10^1 \pm 1,21 \times 10^0$
	FHCl	$3,17 \times 10^{-1} \pm 3,39 \times 10^{-2}$
	FNaOH	$2,10 \times 10^{-1} \pm 1,75 \times 10^{-2}$
Compostos Sulfatados	FW1	$2,76 \times 10^1 \pm 4,47 \times 10^{-1}$
	FW2	$9,31 \times 10^0 \pm 8,69 \times 10^{-1}$
	FKOH	$3,99 \times 10^1 \pm 1,40 \times 10^0$
	FHCl	$6,44 \times 10^{-1} \pm 1,24 \times 10^{-1}$
	FNaOH	$7,15 \times 10^1 \pm 1,91 \times 10^1$