



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Pesquisa de compostos bioativos em
microalgas da Algoteca de Coimbra (ACOI)

Mariana Filipa Gomes Assunção

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Pesquisa de compostos bioativos em microalgas da Algoteca de Coimbra (ACOI)

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Lilia Maria Antunes dos Santos (Universidade de Coimbra) e sob a coorientação do Professor Doutor Jorge Manuel Tavares Branco Varejão (Escola Superior Agrária de Coimbra).

Mariana Filipa Gomes Assunção

2014

“Sometimes your joy is the source of your smile, but sometimes your smile can be the source of your joy.” Thích Nhất Hạnh

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Lilia Santos, por todo o apoio e toda a confiança que depositou em mim. Por me dar a possibilidade de trabalhar nesta coleção fantástica, por me incentivar e ajudar nestes primeiros passos no mundo científico. Acima de tudo pela pessoa que é, obrigada!

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Jorge Varejão, por todos os ensinamentos, toda a paciência demonstrada quando as coisas não corriam bem e por ter acreditado e demonstrado interesse pelo trabalho.

Às funcionárias da Algoteca de Coimbra, por todos os momentos passados nestes laboratórios, por todas as gargalhadas e palhaçadas que tornam os dias mais alegres.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Química da Escola Superior Agrária de Coimbra, por me terem acolhido de forma tão carinhosa, por serem os companheiros de “sexta-feira”, por todas as horas extra que ficaram para me acompanhar e ajudar no trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, em especial à Raquel, por me ter recebido e iniciado nas rotinas de laboratório e pelas ideias trocadas ao longo do trabalho.

Aos meus pais que em todas as situações me apoiaram e suportaram, por serem incansáveis, pelo seu amor, por serem essenciais e indispensáveis no meu crescimento e na formação do meu carácter. Ao meu irmão e à minha cunhada por me terem dado a sobrinha mais linda e fofa do mundo, que torna as nossas vidas muito mais divertidas. Obrigada por aturarem tudo, até o mau feitio!

Por fim ao Ricardo, que tem uma paciência enorme. Por estar sempre presente e acima de tudo por ter a capacidade de me ouvir, de ser o meu pilar, a pessoa com quem partilho a vida. Obrigada pela amizade, amor e por todo o apoio!

Índice

Resumo	IX
Abstract	XI
Introdução	1
1. Microalgas	3
2. Género <i>Porphyridium</i> Nägeli	3
2.1 <i>Porphyridium purpureum</i> (Bory de Saint-Vincent) K.M. Drew & R. Ross	4
3. Género <i>Chrysotila</i> Anand	7
3.1 <i>Chrysotila lamellosa</i> P.L. Anand	7
4. Interesse biotecnológico das microalgas	8
5. Microalgas e lípidos	11
5.1 Biocombustíveis	16
5.2 Alimentação	20
6. Microalgas e hidratos de carbono	24
7. Microalgas e atividade antioxidante	29
8. Objetivos	33
Material e métodos	35
1. Estabelecimento e crescimento de culturas	37
2. Extração, qualificação e quantificação dos ácidos gordos combinados presentes no lípido	41
3. Extração de polissacarídeos e análise dos monossacarídeos constituintes após hidrólise	44
4. Quantificação da atividade antioxidante total	46
5. Caracterização da biomassa total	48
Resultados	51
1. Crescimento das culturas	53
2. Qualificação e quantificação dos ácidos gordos combinados presentes no lípido	56
3. Extração de polissacarídeos e análise dos monossacarídeos constituintes após hidrólise	60
4. Quantificação da atividade antioxidante total pelo método de ABTS	62
5. Quantificação da atividade antioxidante total pelo método de DPPH	63

6. Caraterização da biomassa total	69
Discussão	71
1. Crescimento das culturas	73
2. Qualificação e quantificação dos ácidos gordos combinados presentes no lípido ...	75
3. Extração de polissacarídeos e análise dos monossacarídeos constituintes após hidrólise	78
4. Quantificação da atividade antioxidante total	80
5. Caraterização da biomassa total	83
Conclusões	85
Bibliografia	89
Anexos	105
Anexo I – Registos fotográficos das microalgas em estudo	107
Anexo II – Padrão Supelco 37 FAME Mix	109
Anexo III – Cromatograma obtido por GC dos ésteres de metilo de ácidos gordos de <i>Porphyridium purpureum</i>	111
Anexo IV – Cromatograma obtido por GC dos ésteres de metilo de ácidos gordos de <i>Chrysothila lamellosa</i>	113
Anexo V – Cromatograma obtido por HPLC dos monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos extracelulares de <i>Porphyridium purpureum</i>	115
Anexo VI – Cromatograma obtido por HPLC dos monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos extraídos da biomassa de <i>Chrysothila lamellosa</i>	117
Anexo VII – Cálculo do EC ₅₀ do extrato etanólico de <i>Porphyridium purpureum</i>	119
Anexo VIII – Espectros de absorção dos alimentos usados como referência	121

Resumo

As microalgas são microorganismos fotossintéticos, de organização celular procariótica ou eucariótica. O interesse nestes microorganismos como fonte de novos compostos tem vindo a aumentar nos últimos anos devido à diversidade de metabolitos produzidos, em especial os lípidos, polissacarídeos, pigmentos, proteínas, enzimas e toxinas.

O objectivo deste estudo foi conhecer o potencial biotecnológico de duas estirpes de microalgas existentes na Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI), *Porphyridium purpureum* ACOI/SAG 1380 e *Chrysolita lamellosa* ACOI 339. Para algumas estirpes de *Porphyridium purpureum* conhece-se já a capacidade de síntese de alguns compostos de interesse, nomeadamente polissacarídeos sulfatados, ficoeritrina e ácidos gordos ω 3 e ω 6. Em *Chrysolita lamellosa* há muito pouca informação publicada. Neste trabalho, para ambas as estirpes foram analisados: (1) o crescimento ao longo de 15 dias; (2) o perfil de ácidos gordos combinados do lípido extraído, seguido da respetiva quantificação por cromatografia gasosa (GC); (3) a produção de polissacarídeos e identificação dos monossacarídeos constituintes por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), após hidrólise; (4) o potencial antioxidante, através dos métodos espectrofotométricos ABTS e DPPH e (5) o valor da biomassa total.

Nas condições de crescimento estabelecidas, fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro, luminosidade de $21,62\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, temperatura de 23°C e borbulhamento de ar, não optimizadas para a estirpe, *Porphyridium purpureum* demonstrou um crescimento rápido, com 0,79g/L e 0,50g/L de biomassa obtida ao fim de 15 dias em reator de 20L e balão Erlenmeyer de 250mL, respetivamente. Trata-se de uma estirpe produtora de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) ω 3 e ω 6, em especial ácido araquidónico (C20:4 ω 6 - AA) e ácido eicosapentanóico (C20:5 ω 3 - EPA), presentes em quantidades significativas de 2,7 e 0,6% do total de ácidos gordos. Demonstrou também uma elevada produção de polissacarídeos extracelulares, 0,68g/L, constituídos maioritariamente por arabinose, manose e galactose. Adicionalmente apresentou uma atividade antioxidante de 9,98mg/L equivalente a ácido ascórbico, superior à da cenoura, e as análises à sua biomassa total revelaram também percentagens elevadas de hidratos de carbono e de proteína, 59,05% e 19,71% respetivamente.

Chrysotila lamellosa, em condições de cultivo idênticas, apresentou um crescimento mais lento, com 0,64g/L e 0,40g/L de biomassa obtida ao fim de 15 dias em reator de 20L e balão Erlenmeyer de 250mL. Revelou ser uma estirpe boa produtora de ácidos gordos polinsaturados ω 3, em especial ácido eicosapentanóico (C20:5 ω 3 - EPA) e ácido docosahehexanóico (C22:6 ω 3 - DHA), com percentagens de 0,6 e 6,4% do total de ácidos gordos, respetivamente. Demonstrou uma capacidade antioxidante equivalente à framboesa e a análise à sua biomassa também mostrou conter elevadas percentagens de hidratos de carbono, 41,17%, e de proteína, 11,52%.

O trabalho desenvolvido permite concluir que ambas as estirpes estudadas possuem um potencial biotecnológico interessante a nível nutricional, tanto pelo perfil de ácidos gordos polinsaturados que apresentam como pela sua atividade antioxidante e capacidade de produção de hidratos de carbono.

Palavras-chave: *Porphyridium purpureum*; *Chrysotila lamellosa*; ácidos gordos; polissacarídeos; antioxidantes.

Abstract

Microalgae are photosynthetic microorganisms with prokaryotic or eukaryotic cellular organization. The interest in these microorganisms as a source of novel compounds has increased in recent years due to the diversity of metabolites produced, in particular lipids, polysaccharides, pigments, proteins, enzymes and toxins.

The aim of this study was to understand the biotechnological potential of two strains of microalgae from the Algoteca of the University of Coimbra (ACOI), *Porphyridium purpureum* ACOI/SAG 1380 and *Chrysolita lamellosa* ACOI 339. For some strains of *Porphyridium purpureum* the ability to synthesize some compounds of interest, mainly sulphated polysaccharides, phycoerythrin and fatty acid ω 3 and ω 6 are already known. For *Chrysolita lamellosa* there is very little published information. In this work, for both strains the following aspects were analyzed: (1) growth during over 15 days; (2) the profile of combined fatty acids of the lipid extract, followed by respective quantification by gas chromatography (GC); (3) polysaccharide production and identification of monosaccharides present, by high performance liquid chromatography (HPLC), after hydrolysis; (4) the antioxidant potential by the ABTS and DPPH spectrophotometric essays, and (5) the value of the total biomass.

In the established, not optimized, growth conditions of a 16:8 hours light: dark photoperiod, light intensity of $21.62\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, room temperature of 23°C and air bubbling, *Porphyridium purpureum* demonstrated fast growth, with 0.79g/L and 0.50g/L of biomass obtained after 15 days in reactors of 20L and Erlenmeyer flask of 250mL, respectively. It is a producer of polyunsaturated fatty acids (PUFA's) ω 3 e ω 6, especially arachidonic acid (C20:4 ω 6 - AA) and eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3 - EPA), present in significant quantities of 2.7 and 0.6% of the total fatty acids. This strain also showed a good production of extracellular polysaccharides, 0.68g/L, consisting mainly of arabinose, mannose and galactose. Additionally, an antioxidant activity of 9.98mg/L equivalent to ascorbic acid was measured, greater than that of the carrot extract. Analysis of the total biomass also revealed high percentages of carbohydrates and protein, 59.05% and 19.71%, respectively.

Under identical culture conditions, *Chrysolita lamellosa* showed a growth of 0.64g/L and 0.40g/L after 15 days in 20L reactors and 250ml Erlenmeyer flasks. This strain also proved to be a good producer of polyunsaturated fatty acids ω 3, particularly

eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3 - EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 ω 3 - DHA), with ratios of 0.6 and 6.4% of total fatty acids, respectively. It demonstrated an antioxidant capacity equivalent to that of raspberry. Analysis of the total biomass value also identified 41.17% of carbohydrates and 11.52% protein.

In conclusion, the present work indicates that both strains have an interesting nutritional potential resulting from the respective profile of polyunsaturated fatty acids, the antioxidant activity displayed and the capacity for carbohydrate production.

Keywords: *Porphyridium purpureum*; *Chrysothila lamellosa*; fatty acids; polysaccharides; antioxidants.

Introdução

1. Microalgas

Microalgas são microorganismos procarióticos ou eucarióticos, fotossintéticos, que produzem hidratos de carbono, proteínas e lípidos como resultado da fotossíntese (Mostafa, 2012).

As microalgas são evolutivamente heterogéneas. Tal como as plantas, algumas algas derivam de um ancestral eucariótico (protozoário) que adquiriu uma cianobactéria fotossintética num evento de endossimbiose único. É o caso das algas verdes (Chlorophyta), vermelhas (Rhodophyta) e Glaucophyta. Outras derivam de um evento endossimbiótico secundário, em que uma alga verde ou vermelha foi adquirida por um ancestral eucariótico, como é o caso das Heterokontophyta, Cryptophyta e Prymnesiophyta (Lee, 2008; Sasso *et al.*, 2012).

Estes microorganismos são constituintes importantes de muitos ecossistemas, desde ambientes marinhos e de água doce a desertos, desde nascentes de água quente a neve e gelo (Guschina & Harwood, 2006; Mostafa, 2012). São responsáveis por mais de metade da produção primária total do mundo inteiro e são a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, sendo a fonte primária de nutrientes em massa nos sistemas aquáticos (Guschina & Harwood., 2006; Guedes & Malcata, 2012). Possuem a habilidade de fixar dióxido de carbono utilizando a energia solar de forma 10 vezes mais eficiente do que as plantas terrestres e requerem o mínimo de recursos para sobreviver sendo, por isso, considerados organismos com elevado potencial biotecnológico (Mostafa, 2012).

Estima-se que existam mais de 50.000 espécies de microalgas, contudo só cerca de 30.000 é que se encontram descritas e estudadas (Mostafa, 2012).

2. Género *Porphyridium* Nägeli

O género *Porphyridium* foi estabelecido em 1849 por Carl Nägeli, sendo a espécie holótipo *Porphyridium cruentum* (S. F. Gray) Nägeli e a espécie tipo *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) K. M. Drew & R. Ross. É um género da Família Porphyridiaceae, Ordem Porphyridiales e Filo Rhodophyta (www.algaebase.org).

Este género caracteriza-se por células de esféricas a ovóides, com cloroplasto estrelado e pirenóide central, solitárias ou agrupadas em colónias irregulares com uma matriz mucilagínosa mal definida. Na fase exponencial do crescimento possuem um diâmetro de 5-10µm e na fase estacionária de 7-16µm. A espécie distingue-se pela cor do cloroplasto que pode variar entre o azul, verde e vermelho (Sommerfeld & Nichols, 1970; www.algaebase.org).

Atualmente são reconhecidas três espécies dentro deste género: *Porphyridium aerugineum* Geitler, *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) K. M. Drew & R. Ross e *Porphyridium sordidum* Geitler. As espécies caracterizam-se por possuírem pigmentos particulares que dão aos cloroplastos das células a sua cor característica: *P. aerugineum* contém principalmente C-ficocianina e aloficocianina, possuindo o cloroplasto uma cor azul-esverdeado; *P. purpureum* possui em maior quantidade ficoeritrina, B-ficoeritrina, R-ficocianina e aloficocianina e tem um cloroplasto de cor vermelho-sangue e *P. sordidum* possui uma maior quantidade de ficocianina e menor de ficoeritrina, apresentando um cloroplasto verde-azeitona (www.algaebase.org).

2.1 *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) K.M. Drew & R. Ross

Porphyridium purpureum é uma microalga de águas salobras e salgadas, ou ambientes húmidos, nomeadamente paredes calcárias. Provavelmente está difundida pelos ambientes terrestres, salobros e marinhos (Sommerfeld & Nichols, 1970; www.algaebase.org).

As células são globosas, solitárias ou agrupadas em massas gelatinosas disformes. Cada célula possui um cloroplasto central estrelado volumoso, com um pirenóide; sobre os tilacóides encontram-se ficobilissomas esféricos contendo ficoeritrina em abundância, facto que explica a coloração vermelho-sangue; o núcleo ocupa uma posição lateral e o amido florídeo é abundante no citoplasma (Figura 1). A multiplicação faz-se por divisão vegetativa simples (Bourrelly, 1985).

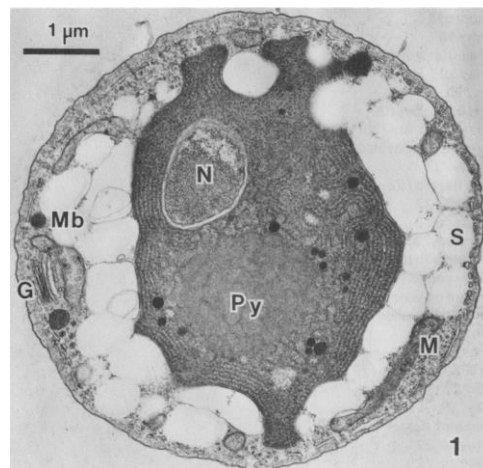


Figura 1 – *Porphyridium purpureum*. Secção transversal de uma célula observada em microscopia electrónica de transmissão, onde se pode ver o núcleo-N, o pirenóide-Py do cloroplasto, grãos de amido florídeo-S no citoplasma, para além de outros organitos celulares como corpo de Golgi-G, mitocôndria-M e microcorpos-Mb (Adaptado de Pueschel, 1990).

É uma microalga com interesse biotecnológico, que sintetiza polissacarídeos sulfatados, ficoeritrina e ácidos gordos polinsaturados, nomeadamente ácido araquidónico (C20:4 ω 6 - AA) e ácido eicosapentanoico (C20:5 ω 3 - EPA), como compostos de maior interesse (Klein *et al.*, 2012).

Os estudos com *Porphyridium purpureum* iniciaram-se nos anos 70, incidindo na ultraestrutura da célula (Chapman & Lang, 1973; Lin *et al.*, 1975), da mitose (Bronchart & Demoulin, 1977; 1980; Schornstein & Scott, 1982) e na ultraestrutura e fisiologia da espécie (Sheath *et al.*, 1979a; 1979b; 1981; Levy & Gantt, 1988, 1990). Nos anos 80 foram realizados os primeiros estudos sobre os ácidos gordos presentes nesta espécie e o possível efeito de detergentes no seu grau de saturação (Nyberg & Koskimies-Soininen, 1984a, 1984b; Nyberg, 1985), bem como estudos sobre exopolímeros (Ramus *et al.*, 1989), sequestração de metais pesados (Gekeler *et al.*, 1988) e atividade antifúngica (Kellam *et al.*, 1988). Contudo, foi a partir do final dos anos 90 que se iniciaram os estudos mais focados no potencial biotecnológico, incidindo principalmente sobre os pigmentos (Marquardt & Ried, 1992) e os lípidos (Cohen, 1990; Ohta *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1993).

Os estudos de Nyberg & Koskimies-Soininen (1984a; 1984b) e Nyberg, (1985) sobre os ácidos gordos, glicolípidos e fosfolípidos desta espécie quando cultivada em

meio de cultura com detergentes, revelaram que os ácidos gordos mais comuns são o palmítico (C16:0), o esteárico (C18:0), o linoleico (C18:2 ω 6), o araquidónico (C20:4 ω 6 - AA) e o eicosanóico (C20:0). Mostraram também que o cultivo da microalga em meio com baixas concentrações de detergentes leva a um aumento do grau de saturação dos glicolípidos e dos fosfolípidos e, o contrário acontece em concentrações mais altas contudo, não sendo este efeito linear.

Em 1990, Cohen fez um estudo sobre as condições que conduziam a elevados quantidades de ácidos gordos, em particular dos ácidos eicosapentanóico (C20:5 ω 3 - EPA) e araquidónico (C20:4 ω 6 - AA). Observou que elevadas quantidades de EPA eram obtidas em condições das quais resultam elevadas taxas de crescimento (25°C) e que elevadas quantidades de AA se obtinham em condições de baixas taxas de crescimento (30°C), com um máximo na fase estacionária. Observou também que sob condições de carência de azoto era possível obter uma mistura lipídica que podia ser separada em frações ricas em AA e EPA.

Mais tarde, Ohta *et al.* (1992) realizaram um estudo sobre a produção sustentável de AA e EPA por esta espécie, num ciclo de luz/ escuro. Obtiveram produções de 5,1mg de AA e 5,7mg de EPA por 1,0L de cultura com uma semana de cultivo. Depois, em 1993, Ohta *et al.* estudaram a alteração na composição dos ácidos gordos da espécie, em diferentes condições ambientais. As condições testadas foram temperatura, luz, arejamento e concentração de cloreto de amónio (NH₄Cl), fósforo e cloreto de sódio (NaCl) no meio de cultura. Concluíram que, em condições ótimas de crescimento, os valores de EPA eram elevados, contudo os de AA e dos ácidos gordos C18 eram baixos; o contrário ocorria em condições de limitação de crescimento.

Em 2012, Klein *et al.* exploraram processos de otimização para aumento da concentração de coenzima Q10, um agente antioxidante, na biomassa de *Porphyridium purpureum*, baseando-se na variação da densidade de fluxo de fotões que era irradiada para o reator por quatro lâmpadas fluorescentes concêntricas. O processo de cultivo foi em média escala (120L), seguido de um processo de extração automatizado (Accelerated Solvent Extraction®), que resultou num aumento da recuperação do produto comparando com o processo de extração *standard*. Desta forma obtiveram uma concentração específica de coenzima Q10 de 14 μ g/g de biomassa seca e uma concentração volumétrica de 1,96mg/L.

3. Género *Chrysofila* Anand

O género *Chrysofila* foi estabelecido em 1937 por Anand, sendo a espécie lectótipo *Chrysofila stipitata* Anand. É um género da Família Isochrysidaceae, Ordem Isochrysidales e Filo Haptophyta (www.algaebase.org).

Atualmente são reconhecidas duas espécies dentro deste género, *Chrysofila stipitata* Anand e *Chrysofila lamellosa* Anand, neste último caso o sinónimo heterotípico é *Ruttnera spectabilis* Geitler de 1942.

3.1 *Chrysofila lamellosa* P.L. Anand

Chrysofila lamellosa pertence a um género muito pouco estudado, existindo por essa razão muito pouca informação. Os únicos estudos encontrados para esta espécie foram sobre a calcificação extracelular de duas estirpes (Green & Course, 1983) e sobre a presença de esteróis (Raederstorff & Rohmer, 1984) e de cetonas de cadeia comprida (Marlowe *et al.*, 1984; Rontani *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2007).

As células móveis são assimétricas, esféricas a alongadas com aproximadamente 6 x 4µm e dois flagelos subiguais, 8-10µm e 6-8µm de comprimento (Figura 2a). Cada célula possui um único cloroplasto parietal verde-ouro com um pirenóide e um ou dois pares de tilacóides, o núcleo situado na face interna do cloroplasto e uma vesícula contendo a substância de reserva (crisolaminarina). Entre os dois flagelos é referida a presença de um haptonema reduzido (Bourrelly, 1981; Green & Course, 1983). Quando em cultura as células tornam-se não móveis, esféricas com 10-11µm de diâmetro rodeadas por uma geleia lamelada, com um único plastídeo parietal e um pequeno corpo vermelho que não está associado ao cloroplasto (seta, Figura 2b). Cada célula é coberta por uma camada de escamas orgânicas, reminiscentes, minúsculas (0,2µm) (Green & Course, 1983). As células não móveis dividem-se rapidamente formando blocos de células.

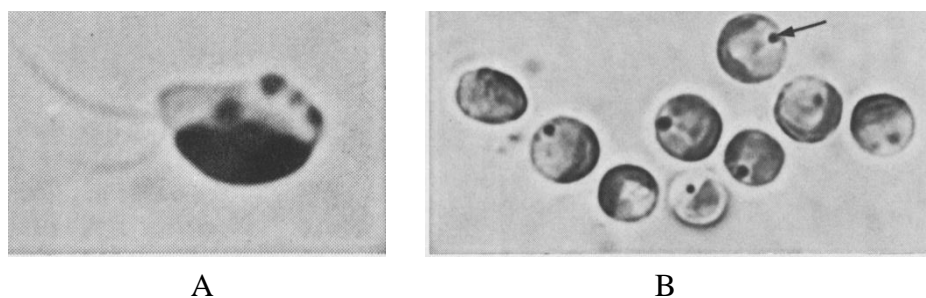


Figura 2 – Observação ao microscópio óptico de *Chrysolita lamellosa*. A) Célula móvel; B) Células não móveis (Adaptado de Green & Course, 1983).

4. Interesse biotecnológico das microalgas

O interesse nas microalgas como fonte de novos compostos tem vindo a aumentar nos últimos anos, nomeadamente com vista à obtenção de produtos para indústrias nas áreas da alimentação humana e animal, cosmética, farmacêutica e dos biocombustíveis.

Este interesse nas microalgas está relacionado com as vantagens que estes microorganismos possuem quando comparados com outras fontes de obtenção de compostos de interesse já utilizados, nomeadamente as plantas (Gouveia, 2011; Kirrolia *et al.*, 2013). As microalgas possuem uma maior eficiência na conversão de energia solar em biomassa (3-8% *versus* 0,5% nas plantas), resultando em elevadas taxas de crescimento (1-3 duplicações por dia). Possuem uma capacidade superior de sequestro de CO₂, com a possibilidade de utilização de locais marginais para cultivo, inadequadas para fins agrícolas, não competindo com os locais de produção de alimentos. O seu crescimento em meio líquido possibilita a utilização de águas salgadas ou residuais reduzindo-se desta forma a utilização de água doce, e com a vantagem das culturas poderem ser induzidas a produzir elevadas concentrações do metabolito desejado com cultivo sem necessidade de utilização de fertilizantes e/ou pesticidas.

Os metabolitos das microalgas com principal interesse são os lípidos, polissacarídeos, pigmentos, proteínas, enzimas e toxinas (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Metabolitos são os produtos finais ou intermediários do metabolismo. Os metabolitos primários estão envolvidos diretamente no crescimento, desenvolvimento e reprodução, enquanto os metabolitos secundários não estão diretamente envolvidos nestes processos,

possuindo essencialmente funções ecológicas importantes (Mostafa, 2012; Sasso *et al.*, 2012). A indução do metabolismo secundário está relacionada com condições ambientais e/ou estágios de desenvolvimento (Mostafa, 2012). Desta forma é possível desencadear o metabolismo secundário, com produção dos metabolitos secundários de interesse através da aplicação de stress externo (p. ex. carência de azoto) (Guedes *et al.*, 2011a).

Dentro das microalgas, as cianobactérias são apontadas como o grupo de organismos mais promissor na descoberta de compostos bioativos (Mostafa, 2012). Uma análise profunda realizada por Burja *et al.* (2001) aos 424 produtos naturais de cianobactérias marinhas contidos no banco de dados MarinLit mostrou que 40% são lipopeptídeos, 5,6% são aminoácidos, 4,2% ácidos gordos, 4,2% macrolídeos e 9% amidos. Os lipopeptídeos são compostos muito interessantes e extremamente ativos sendo que 85% possuem atividades bioativas. Cerca de 41% possuem atividade citotóxica, 13% anticancerígena, 12% atividade antibacteriana, 8% atividades de inibição enzimática, 4% atividade antiviral e 4% atividade antifúngica. Os restantes 18% encontram-se divididos entre outras atividades bioativas, desde promotores tumorais, herbicidas, antimicóticos, entre outros (Burja *et al.*, 2001).

A utilização das microalgas na alimentação humana data de há 2000 anos atrás pelos chineses, que usaram *Nostoc* para sobreviver durante a fome. Já é conhecido o valor nutricional de algumas microalgas em comparação com outros produtos utilizados na alimentação humana (Tabela 1) (Mostafa, 2012). Vários estudos têm demonstrado que na fase exponencial final do crescimento as microalgas contêm tipicamente 30-40% (m/m) de proteínas, 10-20% (m/m) de lípidos e 5-15% (m/m) de hidratos de carbono (Guedes & Malcata, 2012).

Microalgas para a alimentação humana já se encontram no mercado sobre as mais diversas formas, desde comprimidos a cápsulas e líquidos. Devido às suas propriedades nutricionais, podem ser usadas como suplemento alimentar ou ser uma fonte natural de corantes alimentares.

Tabela 1 – Comparação da composição geral de produtos utilizados na alimentação humana com os de algumas microalgas. Os resultados são expressos em % de matéria seca (Adaptado de Chacón-Lee & González-Mariño, 2010; Mostafa, 2012).

Produto	Proteína	Hidratos de carbono	Lípidos
Fermento	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Ovos	47	4	41
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	13-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	27	15
<i>Isochrysis galbana</i>	26	16	17
<i>Nannochloropsis spp.</i>	28	35	18
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis (Arthrospira)</i>	61-64	15	7-11
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Atualmente, as microalgas comercialmente disponíveis para alimentação humana são a *Arthrospira (Spirulina) platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* e *Aphanizomenon flos-aquae*. *Arthrospira platensis* é utilizada devido ao seu elevado conteúdo em proteína e ao seu valor nutritivo, sendo os seus maiores produtores a China e a Índia. É uma microalga que também possui benefícios ao nível da saúde: redução da hiperlipidemia e da hipertensão, proteção contra insuficiência renal, promoção do crescimento de *Lactobacillus* intestinal e supressão de níveis elevados de açúcar no sangue. *Chlorella vulgaris* também pode ser usada como um aditivo alimentar devido às suas ações de ajuste de sabor e aroma dos agentes de coloração. *Dunaliella salina* é

explorada devido ao seu elevado conteúdo em β -caroteno que pode atingir cerca de 14% do seu peso seco. O maior produtor desta microalga para alimentação humana é a empresa Cognis Nutrition and Health que a comercializa em pó como um ingrediente para suplementos alimentares e alimentos funcionais. *Aphanizomenon flos-aquae* é comercializada como sendo muito boa para a saúde em geral (Mostafa, 2012).

O cultivo de microalgas com fins comerciais tem vindo a aumentar desde os últimos 40 anos, como é o caso de *Chlorella* e *Arthrospira* para fins de alimentação saudável, *Dunaliella salina* como fonte de β -caroteno e *Haematococcus pluvialis* de astaxantina, entre outras espécies para aquacultura (*Skeletonema*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, etc.) (Guedes & Malcata, 2012).

O método de cultivo da microalga é um fator importante quando o objetivo é a comercialização. Fatores como a fisiologia da microalga, custos energéticos, disponibilidade de água, custo de nutrientes, condições ambientais (no caso de *outdoor*), especificações do produto final, entre outros, devem ser avaliados. Os sistemas de cultivo em grande escala devem ter em conta vários indicadores como a eficiência na utilização de luz, o controlo de temperatura, o stress hidrodinâmico associado, a capacidade de manter as culturas unialgais e/ou axénicas e a viabilidade de aumento de escala. A maior decisão encontra-se na escolha de fotobiorreatores fechados (PBR's) ou tanques abertos existindo vantagens e desvantagens em cada um dos casos (Guedes & Malcata, 2012).

A biotecnologia das algas como área de sucesso depende essencialmente da escolha da microalga. Esta deve possuir as propriedades específicas para as condições de cultivo que se possui e o produto de interesse que se quer obter (Otto & Gross, 2004).

5. Microalgas e lípidos

Lípidos são um grupo de compostos químicos de grande variedade estrutural que possuem uma característica comum a todos eles e que os define, a sua solubilidade em solventes hidrofóbicos (Nelson & Cox, 2004). Os lípidos das microalgas contêm glicerol, açúcares e/ou bases esterificadas de ácidos gordos saturados e/ou insaturados (Becker, 2004; Chacón-Lee & González-Mariño, 2010).

Nas microalgas os lípidos podem ser divididos em lípidos membranares e lípidos de reserva. Os lípidos membranares (com parte polar) são compostos por glicolípidos (monogalactosildiacilglicerol - MGDG e digalactosildiacilglicerol - DGDG) e glicerofosfolípidos e encontram-se nas membranas da célula. Os lípidos de reserva (neutros) são compostos por triacilgliceróis (TAG's) encontrando-se armazenados principalmente em vacúolos localizados no citoplasma da célula. O interesse biotecnológico reside essencialmente nos lípidos de reserva (Pignolet *et al.*, 2013). As microalgas acumulam muito poucos TAG's durante a fase exponencial do crescimento, mas podem produzir e armazenar quantidades substanciais durante a fase estacionária ou sob condições adversas de crescimento (Pignolet *et al.*, 2013). Em condições ótimas de crescimento, 5-20% do peso seco das microalgas é constituído por lípidos membranares. Contudo, em condições de stress as microalgas alteram a via de síntese dos lípidos o que leva à formação e acumulação de lípidos neutros, os TAG's, que chegam a compor cerca de 20-50% do peso seco da microalga. Ao contrário dos glicolípidos e dos glicerofosfolípidos encontrados nas membranas, que possuem uma função estrutural, os TAG's são uma forma de armazenamento de carbono e energia (Hu *et al.*, 2008; Liu & Benning, 2013).

O conteúdo lipídico total nas microalgas pode variar entre 1-70% do seu peso seco, havendo casos em que pode atingir até 90%, dependendo da microalga e das condições de cultivo (Tabela 2) (Spolaore *et al.*, 2006; Mata *et al.*, 2010), potencialmente possuindo uma produtividade superior à das plantas terrestres (Lim *et al.*, 2012). Além de percentagens de lípido superiores às das plantas oleaginosas, possuem a vantagem de não comprometer as terras de cultivo, caso se pretenda o seu cultivo em larga escala para a produção de biocombustíveis, por exemplo (Malcata, 2011).

A composição lipídica das microalgas depende da fase de crescimento, da composição do meio de cultura, da radiação e da temperatura (Huerlimann *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2010), existindo estudos que indicam que as microalgas produzem mais lípidos em condições desfavoráveis, de stress, do que em condições ótimas (Kirrolia *et al.*, 2013; Skjånes *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Conteúdo lipídico de várias espécies de microalgas. BS – biomassa seca (Adaptado de Mata *et al.*, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011).

Microalgas	Teor de lípido	Produtividade lipídica	Produtividade da biomassa
	% de BS	mg/L/dia	g/L/dia
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24,0-31,0	-	-
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0-75,0	-	0,02
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	0,07
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6-39,8	17,6	0,04
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0	0,036-0,041
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6-57,8	12,14	2,00-7,70
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0-22,0	44,7	0,23-1,47
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0	0,02-0,20
<i>Chlorella sp.</i>	10,0-48,0	42,1	0,02-2,5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	-	-
<i>Chlorella sp.</i>	18,0-57,0	18,7	-
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7	0,28
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0-51,1	-	10,0
<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116,0	0,22-0,34
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-	0,09
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7-71,0	-	0,12
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5-67,0	33,5	-
<i>Elipsoidion sp.</i>	27,4	-	7,70
<i>Euglena gracilis</i>	14,0-22,0	-	0,05-0,06
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0-40,0	-	0,32-1,60
<i>Monallanthus salina</i>	20,0-22,0	-	0,08
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0-56,0	30,9-76,0	0,17-0,51
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7-29,7	84,0-142,0	0,37-0,48
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0-53,0	37,6-90,0	0,17-0,43
<i>Nitzschia sp.</i>	16,0-47,0	-	-
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	40,2	0,14
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	18,0-57,0	44,8	0,003-1,9
<i>Phorphyridium cruentum</i>	9,0-60,7	34,8	0,36-1,50
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0-55,0	-	0,004-0,74
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9-18,4	35,1	0,19
<i>Skeletonema sp.</i>	13,3-31,8	27,3	0,09
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5-51,3	17,4	0,08
<i>Spirulina platensis</i>	4,0-16,0	-	0,06-4,3
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	17,4	0,08
<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6-14,7	43,4	0,30

Os ácidos gordos são componentes estruturais da maioria dos lípidos, e é nestes que reside o maior interesse biotecnológico (Mostafa, 2012). As microalgas sintetizam ácidos gordos como blocos de construção para a formação de vários tipos de lípidos (Hu *et al.*, 2008). Os ácidos gordos podem formar pequenas cadeias com 4 átomos de

carbono até longas cadeias com 24 átomos de carbono. Dependendo do número de ligações duplas presente na cadeia estes podem ser classificados como ácidos gordos saturados (SAFA's), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA's) ou ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) (www.lipidlibrary.aocs.org; Hu *et al.*, 2008).

A composição de ácidos gordos difere entre as classes de lípidos. Predominantemente os ácidos gordos saturados e monoinsaturados compreendem a fração de lípido de reserva, enquanto que os ácidos gordos polinsaturados constituem grande parte da fração dos lípidos de membrana (Pignolet *et al.*, 2013).

Estudos recentes indicam que a distribuição de ácidos gordos reflete relações filogenéticas entre os filos e as classes, podendo ser considerado um parâmetro adicional para a classificação de grupos de microalgas (Lang *et al.*, 2011; Stansell *et al.*, 2012). No entanto o perfil de ácidos gordos por si só não é um marcador útil para a distinção entre géneros e espécies (Lang *et al.*, 2011; Stansell *et al.*, 2012).

Os principais ácidos gordos encontrados nas microalgas são saturados e monoinsaturados, especialmente palmítico (C16:0) e palmitoleico (C16:1) nas Bacillariophyceae, palmítico (C16:0) e oleico (C18:1) nas Chlorophyceae, Euglenophyceae, Eustigmatophyceae e Prasinophyceae, palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) e oleico (C18:1) nas Chrysophyceae, Prymnesiophyceae e Cyanophyceae, palmítico (C16:0) e eicosenóico (C20:1) nas Cryptophyceae, palmítico (C16:0) nas Dinophyceae e Rhodophyceae e mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e palmitoleico (C16:1) nas Xanthophyceae (Hu *et al.*, 2008).

Tal como referido anteriormente, a composição em ácidos gordos das microalgas pode variar tanto quantitativamente quanto qualitativamente em resposta às condições de cultivo e ao estado fisiológico da célula. Os estímulos químicos promotores de stress com maior eficácia na síntese e acumulação de grandes quantidades de ácidos gordos são a privação de nutrientes, a salinidade e o pH do meio de cultura. Ao passo que os estímulos físicos incluem a temperatura e a intensidade luminosa. A fase de crescimento e/ou o tempo de cultivo também afectam o conteúdo de ácidos gordos (Hu *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Lv *et al.* (2010) sugere que as microalgas possuem maiores quantidades de ácidos gordos totais na fase estacionária do desenvolvimento, sendo maiores as quantidades de ácidos gordos saturados na fase exponencial e de ácidos gordos polinsaturados na fase estacionária.

Outros exemplos indicam que durante a privação de nutrientes no meio de cultura o conteúdo lipídico das células aumenta em muitas espécies de microalgas

verdes ao passo que outras reagem produzindo amido (Skjånes *et al.*, 2013). E também que baixas temperaturas induzem a produção de ácidos gordos insaturados e que a limitação de nutrientes no meio de cultura induz a produção de ácidos gordos polinsaturados, assim como baixas intensidades luminosas.

Um dos principais obstáculos na área dos lípidos e que tem complicado o seu seguimento é a dificuldade em extrair de forma eficiente o óleo das células. Muitos métodos de extração têm sido testados para tentar colmatar este problema, possuindo as suas vantagens e limitações (Tabela 3) (Mercer & Armenta, 2011).

Tabela 3 – Principais métodos de extração testados e sua eficiência na recuperação de lípidos, vantagens e limitações. SC-CO₂ – extração com dióxido de carbono supercrítico; UAE – extração assistida com ultrassons (Adaptado de Mercer & Armenta, 2011).

Método de extração	Microalgas	% Óleo recuperado	Vantagens do método	Limitações do método
Solventes / Saponificação ¹ / Transesterificação ²	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	96,1	Solventes pouco dispendiosos; resultados são reprodutíveis	Grande parte dos solventes orgânicos são inflamáveis ou tóxicos; recuperação do solvente é dispendiosa; necessárias grandes quantidades de solvente
	<i>Porphyridium cruentum</i> ¹	59,5		
<i>Botryococcus braunii</i> ²	12,1			
<i>Synechocystis</i> sp. ²	7,3			
SC-CO ₂	<i>Arthrospira maxima</i>	2,1	Processo não tóxico; fácil de operar	Elevados consumos energéticos; dificuldade de transpor para o nível industrial
	<i>Nannochloropsis</i> sp.	40,0		
	<i>Spirulina platensis</i>	25,0		
	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	77,9		
“French press”	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8,6	Fácil de usar e não envolve solventes	Necessárias quantidades elevadas de amostra; processo lento
	<i>Chlorella protothecoides</i>	21,2		
UAE	<i>Chlorella protothecoides</i>	14,9	Tempo de extração e consumo de solventes reduzidos; melhor penetração do solvente nas células	Elevados consumos energéticos; dificuldade de transpor para o nível industrial
	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	25,9		

Diferenças quantitativas e qualitativas no conteúdo lipídico das microalgas definem o seu uso final. Desta forma as microalgas, dependendo do seu conteúdo lipídico, podem ser usadas como fonte para produção de biocombustíveis ou na alimentação humana e animal (Huerlimann *et al.*, 2010).

5.1 Biocombustíveis

A sociedade humana tem vindo a ter, ao longo das últimas décadas, um apetite insaciável por energia, o que tem provocado uma dependência crítica pelos combustíveis fósseis (Malcata, 2011). Com a necessidade urgente de reduzir as emissões de carbono e com a redução das reservas de petróleo disponíveis (Amaro *et al.*, 2011), estimando-se que o consumo de petróleo seja 10^5 vezes mais rápido do que a natureza o consegue criar (Kirrolia *et al.*, 2013), o tópico bioenergia tem-se tornado um tema de vital interesse (Parmar *et al.*, 2011; Kirrolia *et al.*, 2013). Em comparação com outras formas de energia renováveis (p. ex. vento, marés e solar), os biocombustíveis permitem que a energia seja armazenada quimicamente e possuem a vantagem de poderem ser utilizados nos motores e infraestruturas já existentes (Amaro *et al.*, 2011).

Os biocombustíveis derivados de microalgas são uma das potenciais soluções, uma fonte de energia limpa, segura e que não compete com áreas de cultivo agrícolas destinadas à alimentação humana e animal (Parmar *et al.*, 2011).

O biodiesel é definido como um conjunto de ésteres monoalquílicos de ácidos gordos de cadeia longa (Amaro *et al.*, 2011; Kirrolia *et al.*, 2013), é um biocombustível em alternativa ao petróleo e atualmente produzido a partir de óleos vegetais extraídos das plantas tradicionais oleaginosas (Stansell *et al.*, 2012). É produzido através da transesterificação de triacilgliceróis (TAG's) com metanol ou outro álcool na presença de um catalisador apropriado (p. ex. NaOH) (Pignolet *et al.*, 2013). A transesterificação é uma reação de várias etapas em série, onde os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos com formação de um éster, os diglicerídeos convertidos em monoglicerídeos com formação de outro éster e por fim os monoglicerídeos são convertidos em éster e glicerol (Figura 3) (Mata *et al.*, 2010).

É descrito como uma fonte de energia bastante atrativa por várias razões. Primeiro, o biodiesel é um recurso renovável de energia que pode ser fornecido de forma sustentável, tendo em conta que as reservas de petróleo devem esgotar-se em

menos de 50 anos ao ritmo atual do consumo. Em segundo lugar, o consumo de biodiesel leva a condições ambientais favoráveis, como menores emissões de dióxido de carbono, enxofre e monóxido de carbono. A libertação de monóxido de carbono e o teor de enxofre são reduzidos em 10% e 30%, respetivamente.

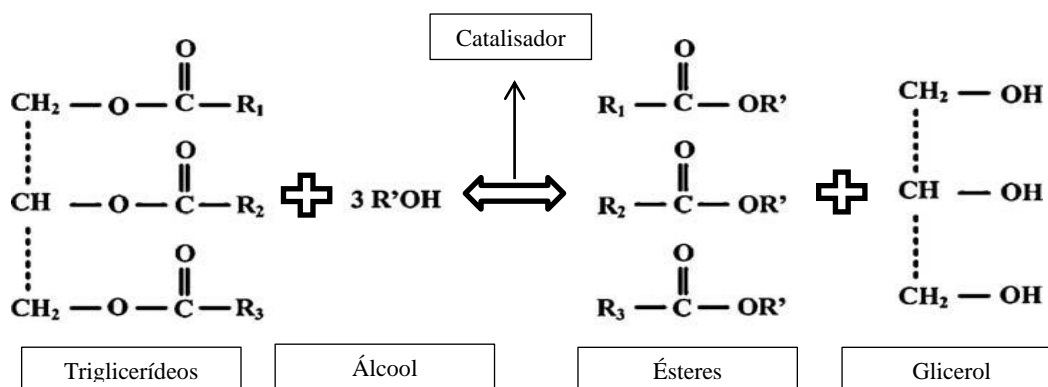


Figura 3 – Esquema da reação de transesterificação. R1, R2, R3 representam ácidos gordos de cadeia longa (Adaptado de Mata *et al.*, 2010).

É também importante o facto de o biodiesel não conter compostos aromáticos ou outras substâncias químicas que são prejudiciais para o meio ambiente e a saúde humana. Em terceiro lugar, este combustível parece ter um potencial económico significativo, uma vez que é inevitável o aumento constante dos preços dos combustíveis fósseis. E, finalmente, o biodiesel possui melhor ponto de ignição em comparação com o *diesel* sendo também de frisar a sua biodegradabilidade (Kirrolia *et al.*, 2013).

Existe um rigoroso conjunto de normas de qualidade para o biodiesel que variam de país para país. Nos Estados Unidos a legislação vigente é a emitida pela American Society for Testing Materials (ASTM) D6751 ao passo que na União Europeia é a European Standard (EN) 14214. De acordo com as normas publicadas para a União Europeia, o biodiesel obtido das microalgas possui propriedades similares ao *standard*, sendo mais estável de acordo com o ponto de ignição (Tabela 4) (Kirrolia *et al.*, 2013; www.cen.eu).

Tabela 4 – Comparação das propriedades do biodiesel obtido das microalgas, do *diesel* convencional e do biodiesel *standard* EN 14214 (Adaptado de Kirrolia *et al.*, 2013; www.cen.eu).

Propriedades	Biodiesel de microalgas	<i>Diesel</i> convencional	Biodiesel <i>standard</i> EN 14214
Densidade (Kg/L)	0,864	0,838	0,86-0,90
Viscosidade (mm ² /s a 40°C)	5,2	1,9-4,1	3,5-5,0
Ponto de ignição (°C)	115	75	Min. 101
Ponto de solidificação (°C)	-12	-50 a 10	-
Limite de filtrabilidade a frio (°C)	-11	-3,0 (Max -6,7)	-
Valor ácido (mg KOH/g)	0,374	Max. 0,5	Max. 0,5
Valor calorífico (MJ/Kg)	41	40-45	-
Proporção H/C	1,81	1,81	-

As propriedades mais importantes dos ácidos gordos que afetam as propriedades do biodiesel são o tamanho da cadeia carbonada e o número de duplas ligações (Stansell *et al.*, 2012). O perfil de ácidos gordos das microalgas, cadeias saturadas e insaturadas de ácidos gordos contendo 12-22 átomos de carbono, mostra a potencialidade destas para a produção do biodiesel (Amaro *et al.*, 2011).

Stansell *et al.*, realizaram um estudo em 2012 sobre as características do biodiesel produzido a partir das microalgas e focaram quatro propriedades principais: número de cetano, características de fluxo frio, viscosidade e estabilidade oxidativa. Segundo estes autores o número de cetano, relacionado com as propriedades de ignição dos combustíveis, aumenta com o aumento do comprimento das cadeias carbonadas e diminui com a insaturação. No caso das características de fluxo frio, o ponto de fusão aumenta quanto maiores e saturadas forem as cadeias hidrocarbonadas e diminui quanto menores e insaturadas. Segundo o autor, para evitar problemas de fluxo frio que estão relacionados com os filtros dos motores e a temperatura, considera-se ideal o biodiesel ter baixas concentrações de ácidos gordos saturados e altas concentrações de ácidos gordos insaturados. A viscosidade do biodiesel é também influenciada pelas cadeias hidrocarbonadas, aumentando com o tamanho das cadeias e diminuindo com o aumento do grau de insaturação. A estabilidade oxidativa está relacionada com a capacidade do biodiesel resistir à oxidação, aumentando a taxa de oxidação com o aumento das duplas ligações. Segundo o estudo realizado por estes autores, uma microalga boa para produção de biodiesel deve possuir elevadas concentrações de ácidos gordos monoinsaturados palmitoleico (C16:1) e oleico (C18:1) e baixas concentrações de todos

os outros tipos de ácidos gordos de forma a manter as principais características do biodiesel. Este estudo destaca que o maior desafio na produção de biodiesel a partir de microalgas é a baixa estabilidade oxidativa que estas possuem, uma vez que possuem elevadas concentrações de ácidos gordos com mais de quatro duplas ligações.

Contudo, um dos grandes problemas associado à produção de biodiesel a partir das microalgas é que microalgas com elevado conteúdo lipídico encontram-se associadas a baixas produtividades de biomassa, por exemplo *Botryococcus braunii* possui um conteúdo lipídico que pode atingir 75% do seu peso seco, contudo possui uma produtividade de biomassa de cerca de 0,02g/L/dia (Tabela 2) (Mata *et al.*, 2010).

Todos os processos existentes para a produção de biodiesel a partir de microalgas incluem uma unidade de cultivo para o crescimento das células seguindo-se a separação das células do meio de cultura utilizado e posteriormente a extração do lípido das células. Por fim o biodiesel ou outro biocombustível é produzido de forma similar nos processos e técnicas já utilizados para outras matérias-primas (Mata *et al.*, 2010).

De uma forma geral a produção de biodiesel a partir de microalgas é um processo em cadeia que se inicia com a seleção da espécie de microalga, a escolha e implementação do sistema de cultivo, a recolha e concentração da biomassa, o processamento e extração do lípido e por fim a conversão do lípido em biodiesel (Figura 4) (Mata *et al.*, 2010). Cada uma destas etapas mencionadas tem sido alvo de estudos e avanços ao longo dos últimos anos por forma a tornar este processo rentável e comercialmente disponível.

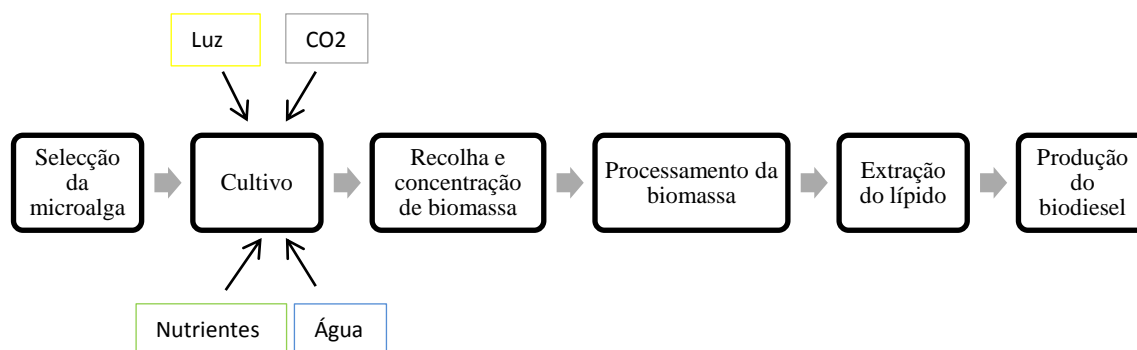


Figura 4 – Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de Mata *et al.*, 2010).

5.2 Alimentação

O uso das microalgas como fonte de alimentação humana e animal tem aumentado desde os anos 50 (Graziani *et al.*, 2013). De entre todos os ácidos gordos presentes nas microalgas os ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) $\omega 3$ e $\omega 6$ possuem particular interesse ao nível alimentar (Spolaore *et al.*, 2006).

Ácidos gordos essenciais (EFA's) são ácidos gordos polinsaturados essenciais para a sobrevivência, uma vez que estão envolvidos em processos biológicos importantes e que não são sintetizados pelo organismo humano, sendo necessária a sua obtenção através da dieta. A limitação destes ácidos gordos pode provocar sérios danos ao organismo (Das, 2006; Khozin-Goldberg *et al.*, 2011; Tvrzicka *et al.*, 2011; Skjånes *et al.*, 2013).

As duas principais famílias dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), $\omega 3$ e $\omega 6$ (Figura 5), distinguem-se pela distância a que se encontra a última ligação dupla da extremidade metilo da cadeia de acilo (Khozin-Goldberg *et al.*, 2011).

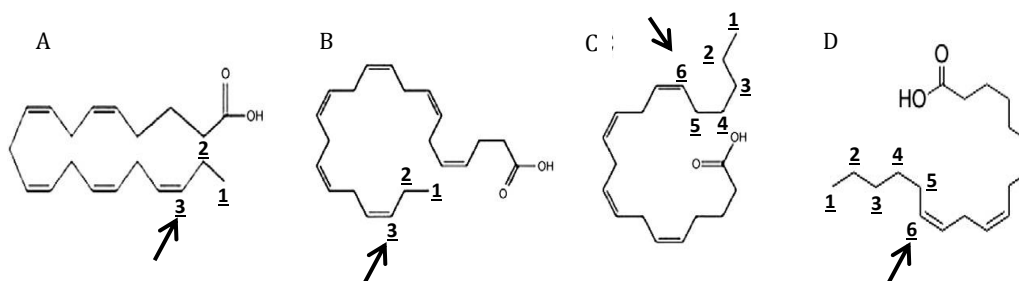


Figura 5 – Representação da estrutura química de alguns PUFA's: A - ácido eicosapentanóico (EPA) $\omega 3$; B - ácido docosahexanóico (DHA) $\omega 3$; C - ácido araquidónico (AA) $\omega 6$; D - ácido γ -linolénico (GLA) $\omega 6$. Seta representa o local onde se encontra a última ligação dupla e a distância a que esta está da extremidade metilo da cadeia de acilo, e que nos permite distinguir entre ser $\omega 3$ ou $\omega 6$ (Adaptado de Raposo *et al.*, 2013a).

São considerados ácidos gordos essenciais os ácidos linoleico (C18:2 $\omega 6$ - LA) e α -linolénico (C18:3 $\omega 3$ - ALA), estes ácidos gordos não são sintetizados pelos humanos devido à não existência das enzimas dessaturases $\delta 12$ e $\delta 15$ (Das, 2006; Gouveia *et al.*, 2010; Khozin-Goldberg *et al.*, 2011; Tvrzicka *et al.*, 2011). É depois, através do processo de dessaturação e alongação destes ácidos gordos que se obtêm os ácidos

gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA's). As principais fontes alimentares de ácido linoleico (C18:2 ω 6 - LA) são os cereais, cereais integrais, ovos, aves e óleos vegetais, e as de ácido α -linolénico (C18:3 ω 3 - ALA) a linhaça, as nozes e grande parte dos vegetais de folhas verdes (Das, 2006).

LC-PUFA's são ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa com 20-22 carbonos e 2-6 ligações duplas. LC-PUFA's ω 3 e ω 6 são também considerados por muitos autores como ácidos gordos essenciais que se devem obter através da alimentação, uma vez que os seus precursores são os ácidos gordos linoleico (C18:2 ω 6 - LA) e α -linolénico (C18:3 ω 3 - ALA) e que a capacidade das enzimas do organismo humano para fazer o processo de dessaturação e alongação destes para, em especial, ácido eicosapentanóico (C20:5 ω 3 - EPA), ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3 - DHA) e ácido araquidónico (C20:4 ω 6 - AA) é muito baixa, e não é a suficiente para uma adequada produção de LC-PUFA's essencial para a manutenção da saúde mental e cardiovascular (Khozin-Goldberg *et al.*, 2011; Mostafa, 2012).

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), em especial ω 3 e ω 6, possuem funções importantes nos tecidos onde se encontram incorporados. O ácido γ -linoleico (C18:3 ω 6 - GLA) por exemplo, possui aplicações nas áreas de terapêutica e cosmética uma vez que possui a capacidade de revitalizar a pele e desta forma retardar o envelhecimento. Os ácidos gordos linoleico (C18:2 ω 6 - LA) e α -linolénico (C18:3 ω 3 - ALA) são essenciais para a síntese de prostaglandinas na membrana celular, para o sistema imunitário e outros processos relacionados com a regeneração dos tecidos (Raposo *et al.*, 2013a). Além disso, o ácido gordo α -linolénico (C18:3 ω 3 - ALA) é já utilizado no tratamento de hiperplasias da pele como soluções tópicas. Os ácidos eicosapentanóico (C20:5 ω 3 - EPA), docosahexanóico (C22:6 ω 3 - DHA) e araquidónico (C20:4 ω 6 - AA) sabe-se possuírem inúmeras aplicações nutracêuticas e farmacológicas (Patil *et al.*, 2007). Vários estudos têm demonstrado que o consumo de ácidos gordos ω 3 e ω 6 aumentam a saúde cardíaca e reduzem a inflamação, em particular o consumo de ω 3 tem sido associado à redução do risco de desenvolvimento de cancro da mama, da próstata e do cólon (Ibañez & Cifuentes, 2012).

O ácido eicosapentanóico (C20:5 ω 3 - EPA) e o ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3 - DHA) são precursores da síntese de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e resolvinas, lípidos eicosanóides que se ligam a receptores de proteínas específicas que sinalizam respostas fisiológicas celulares como a inflamação, vasodilatação, pressão sanguínea, dor e febre, possuindo um papel muito importante na

prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, doenças oculares, artrites e fibrose cística (Fradique *et al.*, 2013; Raposo *et al.*, 2013a). O ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3 - DHA) embora seja um ácido gordo sintetizado em muito baixas quantidades, no leite materno encontra-se em grandes quantidades. É essencial na dieta das crianças, promovendo um elevado desenvolvimento do potencial cognitivo, facto que tem vindo a ser indicado em estudos que comprovam que crianças que são alimentadas com leite materno possuem uma *performance* superior, em testes que permitem avaliar o neurodesenvolvimento, em comparação com crianças alimentadas com leite em pó sem este ácido gordo. Aos recém-nascidos que são alimentados com leite artificial deve ser dado ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3 - DHA) sob a forma de aditivo. O ácido eicosapentanóico (C20:5 ω 3 - EPA) promove funções vitais nas membranas biológicas e serve de precursor a uma variedade de lípidos reguladores do metabolismo celular (Fradique *et al.*, 2013; Raposo *et al.*, 2013a). O ácido araquidónico (C20:4 ω 6 - AA) possui um papel importante na sinalização celular, como mensageiro lipídico na sinalização enzimática, e é um precursor de eicosanóides (Rezanka *et al.*, 2014).

Segundo a World Health Organization (WHO) e a União Europeia (EU), o consumo recomendado de ácido eicosapentanóico (C20:5 ω 3 - EPA) e ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3 - DHA) é de 250mg/dia contudo, atualmente, o consumo de ω 3 está abaixo deste valor (Ryckebosch *et al.*, 2014). A principal fonte destes ácidos gordos tem vindo a ser o peixe, em especial peixes gordos como o salmão e a sardinha. Vários estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de incorporar as microalgas ricas nestes ácidos gordos na alimentação humana, através de massas ou outros consumíveis (Fradique *et al.*, 2013). A literatura considera que os grupos de microalgas mais promissores na produção de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA's) ω 3 são as Glaucophyta, Chlorophyceae, Chryptophyceae, Haptophyceae, Heterokontophyta e Rhodophyta (Lang *et al.*, 2011; Ryckebosch *et al.*, 2014) (Tabela 5). Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) derivados das microalgas possuem uma maior estabilidade em comparação com os de outros alimentos já usados, devido às microalgas serem ricas em carotenóides antioxidantes e vitaminas e porque os seus lípidos se encontram bioencapsulados na parede das células (Patil *et al.*, 2007).

Tabela 5 – Frequência de PUFA's em 17 grupos taxonômicos de microalgas. Dados percentuais em relação ao número total de estirpes analisadas. DHA – ácido docosahexanóico; EPA – ácido eicosapentanóico; AA – ácido araquidónico; GLA – ácido γ -linoleico (Adaptado de Lang *et al.*, 2011).

Grupo	DHA	EPA	AA	GLA
Cyanophyceae	1,3% em 223	0,9% em 223	0,4% em 223	12,1% em 223
Glaucophyta	-----	80,0% em 15	46,7% em 15	6,7% em 15
Chlorophyceae	5,1% em 927	6,9% em 927	5,7% em 927	26,2% em 927
Trebouxiophyceae	4,3% em 253	16,6% em 253	22,9% em 253	6,3% em 253
Ulvoophyceae	4,3% em 70	22,9% em 70	12,9% em 70	7,1% em 70
Prasinophyceae	14,3% em 21	33,3% em 21	42,9% em 21	57,1% em 21
Charophyta	1,3% em 159	17,6% em 159	13,8% em 159	31,4% em 159
Rhodophyta	-----	70,5% em 78	67,9% em 75	3,8% em 78
Euglenophyta	42,7% em 131	44,3% em 131	51,1% em 131	-----
Xanthophyceae	4,9% em 81	75,3% em 81	49,4% em 81	16,1% em 81
Eustigmatophyceae	-----	88,2% em 17	41,2% em 17	5,9% em 17
Phaeophyceae	-----	58,3% em 12	91,7% em 12	16,7% em 12
Chryso-Synurophyceae	16,7% em 12	33,3% em 12	8,3% em 12	16,7% em 12
Haptophyta	84,6% em 13	61,5% em 13	7,7% em 13	-----
Cryptophyta	22,2% em 27	66,7% em 27	3,7% em 27	3,7% em 27
Dinophyta	64,3% em 14	57,1% em 14	14,3% em 14	-----

No mercado já se podem encontrar, entre outros produtos, ovos de galinha enriquecidos com ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3 - DHA) e leite de vaca com ácidos gordos ω 3 que têm origem em diferentes espécies de microalgas administradas na alimentação destes animais (Raposo *et al.*, 2013a).

6. Microalgas e hidratos de carbono

Hidratos de carbono são as biomoléculas mais abundantes na natureza e são constituídas principalmente por carbono, hidrogénio e oxigénio. Os hidratos de carbono dividem-se em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, dependendo do seu tamanho. Os monossacarídeos são aldoses ou cetonas constituídos por um reduzido número de átomos de carbono, entre 3 a 7, sendo os mais importantes as aldoses com 5 átomos de carbono (pentoses) e com 6 átomos de carbono (hexoses). Os oligossacarídeos são hidratos de carbono que resultam de ligações glicosídicas entre dois a dez monossacarídeos e os polissacarídeos são polímeros constituídos por mais de dez monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, que possuem um elevado peso molecular sendo menos solúveis em água que os dois grupos anteriores (Belitz *et al.*, 2009; Pignolet *et al.*, 2013).

Baseando-se na sua localização na célula os polissacarídeos são usualmente divididos em três grupos, polissacarídeos da parede celular, polissacarídeos intracelulares e polissacarídeos extracelulares (EPS) (Donot *et al.*, 2012; Dewapriya & Kim, 2014). Podem também ser divididos com base no seu papel fisiológico na célula em polissacarídeos estruturais, associados às paredes das células, polissacarídeos energéticos como o amido e polissacarídeos envolvidos na comunicação celular e locais de reconhecimento (Pignolet *et al.*, 2013).

Dependendo da sua composição e do seu mecanismo de biossíntese, os polissacarídeos extracelulares (EPS) podem ser divididos em homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Homopolissacarídeos são polissacarídeos sintetizados a partir de um único substrato de sacarose pela enzima sacarase. A enzima sacarase sintetiza polissacarídeos constituídos por resíduos de glucose (glucanos) ou resíduos de frutose (frutanos). Heteropolissacarídeos são polissacarídeos constituídos por múltiplos tipos de açúcares que são sintetizados pela ação combinada de diferentes tipos de enzimas glicosil-transferases (van Hijum *et al.*, 2006; Donot *et al.*, 2012; Wolter *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, várias fontes terrestre e aquáticas têm vindo a ser exploradas na busca de polissacarídeos bioativos, conhecendo-se já as suas atividades biológicas no organismo humano, incluindo atividade anticoagulante, anti-inflamatória, antiviral e anti-tumoral (Dewapriya & Kim, 2014). As plantas superiores são a principal

fonte de polissacarídeos, que incluem o amido, celulose, pectinas e galactomanano (*gums*) (Donot *et al.*, 2012).

Muitos dos polissacarídeos comercialmente disponíveis como o ágar, as carragenanas e os alginatos são extraídos de macroalgas, contudo muitas microalgas produzem polissacarídeos e alguns destes possuem características que podem possibilitar aplicações industriais e comerciais (Gouveia *et al.*, 2010), uma vez que demonstram possuir uma forte variedade estrutural e funções biológicas interessantes (Pignolet *et al.*, 2013).

Polissacarídeos no geral são produzidos por muitas microalgas e várias aplicações destes são já conhecidas (Tabela 6). Podem ser utilizados como agentes antivirais, alimentos saudáveis e antioxidantes, possuindo também propriedades anti-inflamatórias e um papel importante no sistema imunológico podendo também ser usados como lubrificantes para as articulações ósseas (Raposo *et al.*, 2013b). São polímeros interessantes para a preparação de novos produtos farmacêuticos, uma vez que possuem elevada expansibilidade em água, são biocompatíveis e são uma matéria-prima com baixo custo e amplamente disponível (Pulz & Gross, 2004; Prajapati *et al.*, 2013). O resultado de programas de *screening* para testar o efeito imunológico *in vitro* dos polissacarídeos de microalgas mostrou que polissacarídeos altamente sulfatados podem desencadear tanto a estimulação celular como humoral do sistema imunitário humano (Pulz & Gross, 2004).

Os polissacarídeos das microalgas oferecem vantagens em comparação com os polissacarídeos das plantas. As microalgas possuem a capacidade de produção de polissacarídeos em questão de dias, ao passo que nas plantas são necessários 3-6 meses, possuem uma produção eficiente de polissacarídeos utilizando a energia solar e têm ainda a possibilidade de utilização de resíduos industriais e CO₂ como substrato de carbono. Além disso os polissacarídeos extracelulares (EPS) são naturalmente excretados para o ambiente extracelular o que facilita a sua recuperação (Donot *et al.*, 2012). Possuem também boa digestibilidade global e poucas limitações no que se refere ao seu uso e aplicações (Chacón-Lee & González-Mariño, 2010).

Tabela 6 – Tipo de polissacarídeos produzidos pelas microalgas e aplicações já conhecida; EPS-polissacarídeos extracelulares, sPS-polissacarídeos extracelulares sulfatados, PS-polissacarídeos (Adaptado de Raposo *et al.*, 2013b).

Microalgas	Tipo de polissacarídeo	Açúcares principais	Aplicações
<i>Cylindrotheca closterium</i>	sPS	Xilose; glucose	
<i>Navicula salinarum</i>	sPS	Glucose; xilose	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EPS (sulfatados)	Glucose; manose	Anti-inflamatórios; imunomodulador; bio-lubrificante.
<i>Chlorella stigmatophora</i>	PS (sulfatados)	Glucose; xilose	Anti-inflamatórios; imunomodulador.
<i>Tetraselmis sp.</i>	sPS		Bio-lubrificante
<i>Isochrysis sp.</i>	sPS		Alimentação saudável; antioxidantes; anti-lipídemicos; antidiabéticos; anti-inflamatórios; imunomodulador, anti-tumoral; bio-lubrificante.
<i>Porphyridium sp.</i>	sPS	Xilose; galactose	Anti-lipídemicos; antidiabéticos; anti-lipídemicos.
<i>Porphyridium cruentum</i>	sPS	Xilose; galactose	Antioxidantes; anti-tumoral.
<i>Rhodella reticulata</i>	sPS	Xilose; galactose	
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	sPS	Manose; galactose	
<i>Gyrodinium impudicum</i>	sPS	Galactose	Anti-tumoral
<i>Aphanothece halophytica</i>	EPS	Glucose; fucose	
<i>Arthrospira platensis</i>	Cálcio sulfatada	Ramnose; frutose	Anti-tumoral

Por forma a compreender os diferentes usos e aplicações dos polissacarídeos, é necessário conhecer as características estruturais e propriedades físico-químicas destes (Raposo *et al.*, 2013b). A identificação dos açúcares constituintes dos polissacarídeos é feita por hidrólise usando ácidos minerais diluídos, seguindo-se a separação dos monossacarídeos usando diferentes técnicas de cromatografia. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear-NMR e a espectroscopia de massa são técnicas que permitem conhecer a estrutura dos polissacarídeos (Prajapati *et al.*, 2013). As propriedades físico-químicas incluem o conhecimento das propriedades reológicas e do peso molecular, parâmetros que também são relevantes para entender o comportamento e função dos polissacarídeos (Raposo *et al.*, 2013b).

Investigações estruturais em polissacarídeos são complicadas devido à vasta diversidade estrutural dos monossacarídeos seus constituintes e grupos substituintes (p.

ex. sulfato, acetato ou piruvato) e dos diferentes tipos de ligações glicosídicas. Se excluirmos o amido, os polissacarídeos extracelulares (EPS) (também conhecidos como exopolissacarídeos ou exopolímeros quando associados a proteínas) têm ganho uma atenção significativa por parte dos investigadores. Esta popularidade é explicada pela sua fácil capacidade de extração, uma vez que estes são biopolímeros produzidos pelas microalgas para o meio extracelular, não possuindo ligações covalentes com as paredes celulares sendo fáceis de isolar e são livres de proteínas e detritos celulares (Pignolet *et al.*, 2013; Dewapriya & Kim, 2014).

A biossíntese dos polissacarídeos extracelulares (EPS) pode ser dividida em três passos principais, assimilação de um substrato de carbono, síntese intracelular dos polissacarídeos e exsudação para fora da célula (Donot *et al.*, 2012). O papel fisiológico dos polissacarídeos extracelulares (EPS) não é claro, contudo alguns autores lançam a hipótese de que as microalgas secretam polissacarídeos extracelulares (EPS) funcional e estruturalmente diversos como forma de se defender, impedindo a dessecação e/ou oferecendo uma proteção mecânica que permite às células sobreviverem e desenvolverem-se em uma grande variedade de condições e ambientes (Pignolet *et al.*, 2013; Dewapriya & Kim, 2014). A produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) pelas microalgas pode também ser uma forma de controlar a atividade fotossintética. A formação de colónias de microalgas está ligada à produção de polissacarídeos por estas, a qual é catalisada por vários fatores incluindo a relação C/N. Vários estudos sugerem que o glioxilato, um estimulador do metabolismo do carbono, é capaz de inibir a fotorrespiração e aumentar a fotossíntese em plantas superiores e algumas cianobactérias. Adicionando glioxilato a microalgas como *Anabaena cylindrica* e *Cyanospira capsulate* ocorre um excesso de fluxo de carbono o que provoca uma acumulação de polissacarídeos intracelulares e libertação de polissacarídeos extracelulares solúveis (Pignolet *et al.*, 2013).

Os monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos são muito diversos e podem variar com a fase de crescimento da microalga (Gouveia *et al.*, 2010). Baixas quantidades de polissacarídeos são produzidas durante a fase de crescimento ativo e divisão celular (fase exponencial do crescimento) ao contrário da fase estacionária em que são produzidas maiores quantidades de polissacarídeos (Metting Jr, 1996). Os polissacarídeos extracelulares (EPS) das microalgas contêm principalmente D-xilose, D-glucose, D e L-galactose, metil-xilose, metil-galactose e D-ácido glucurônico (Vílchez *et al.*, 1997).

Excluindo os polissacarídeos extracelulares (EPS) de *Porphyridium* sp. e de *Arthrospira platensis* que se encontram parcialmente caracterizados e o amido que se encontra no citoplasma e cloroplastos das microalgas, a caracterização estrutural dos polissacarídeos produzidos pelas microalgas permanece escassa, mesmo os polissacarídeos da parede celular (Pignolet *et al.*, 2013).

Polissacarídeos extracelulares sulfatados sintetizados pelas microalgas são heterogêneos e estruturalmente diferentes (Raposo *et al.*, 2013b).

Porphyridium sp. é uma microalga que se encontra encapsulada dentro de um gel de polissacarídeos sulfatados. Durante o seu crescimento/cultivo o exterior do gel dissolve-se no meio de cultura ficando 50-70% dos polissacarídeos ligados à célula formando uma camada exterior que protege a microalga contra condições ambientais extremas (dessecação ou salinidade) (Pignolet *et al.*, 2013). Os polissacarídeos constituintes desta microalga possuem um peso molecular na gama dos $2-7 \times 10^6$ Da e são carregados negativamente devido à presença dos grupos de ácido glucurônico e sulfato. São compostos até dez monossacarídeos sendo os mais abundantes a xilose, a glucose e a galactose (Gloagen *et al.*, 2004; Gouveia *et al.*, 2010; Pignolet *et al.*, 2013). É de frisar que as proteínas que se encontram ligadas ao polímero representam 5,5% do seu peso seco. Os heteropolissacarídeos sulfatados produzidos por esta microalga sabe-se possuírem atividade biológica relevante com diversas aplicações, desde cosméticos como inibidor das hialuronidases, medicamentos como agente anti-alérgico, anti-inflamatório, antibacteriano e antiviral, promotores de crescimento de culturas e alimentação saudável devido a sua atividade antioxidante, hipolipidémica e hipoglicémica (Gouveia *et al.*, 2010; Pignolet *et al.*, 2013; Raposo *et al.*, 2013b; Raposo *et al.*, 2014). Há indicações de que é o grupo sulfato a fração responsável pela atividade química e biológica dos polissacarídeos de *Porphyridium* spp. (Gouveia *et al.*, 2010; Pignolet *et al.*, 2013). Uma característica destes polissacarídeos extracelulares (EPS) é o seu comportamento de fluido dinâmico que dá soluções altamente viscosas em concentrações relativamente baixas de polímero em uma ampla gama de valores de pH e temperatura, possuindo propriedades reológicas comparáveis aos polissacarídeos industriais (Pignolet *et al.*, 2013; Raposo *et al.*, 2013b).

Outro exemplo interessante é a substância polimérica que advém do extrato aquoso de *Chlorella pyrenoidosa* que possui propriedades imunoestimulantes. Já se encontra comercialmente disponível como RespondinTM, e a sua atividade pensa-se resultar do seu conteúdo em polissacarídeos (Gouveia *et al.*, 2010).

7. Microalgas e atividade antioxidante

O crescente aumento do interesse em compostos com propriedades antioxidantes nas últimas décadas deve-se ao facto destes desempenharem um papel favorável na saúde humana. Além das funções clássicas desempenhadas como a conservação de alimentos, vários estudos têm confirmado o seu potencial terapêutico, por exemplo na prevenção e controlo do crescimento de certos tumores, na menor incidência e gravidade das doenças cardiovasculares e degenerativas e no melhoramento da capacidade anti-inflamatória (Guedes *et al.*, 2011b).

A maioria dos antioxidantes naturais atualmente disponíveis são derivados de plantas terrestres, sendo as microalgas uma alternativa promissora (Goiris *et al.*, 2012). Estas, sendo organismos fotossintéticos, apresentam respostas adaptativas ao stress oxidativo pela estimulação do seu sistema de defesa antioxidante intrínseco enzimático e não enzimático que mantém controlada a concentração de espécies reativas de oxigénio (ROS), protegendo as células de danos (Mostafa, 2012; Guedes *et al.*, 2013a; Guedes *et al.*, 2013b). As espécies reativas de oxigénio como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o anião superóxido (O^{2-}) e os radicais de hidroxilo (OH^\cdot) parecem ser a causa primária da oxidação biomolecular. Estas podem causar danos na estrutura celular, contribuir para a peroxidação lipídica e para a formação de adutos de DNA que causam mutações promotoras de cancro ou morte celular. Os antioxidantes são efetivos na proteção dos organismos vivos contra os danos oxidativos provocados pelas espécies reativas de oxigénio (Sun *et al.*, 2014).

Existem vários compostos nas microalgas com características antioxidantes, ubiquinonas (Klein *et al.*, 2012), carotenóides, vitaminas C e E, florotaninos, ácidos gordos polinsaturados $\omega 3$, polissacarídeos, entre outros (Guedes *et al.*, 2013a). Contudo os de maior interesse são os carotenóides, em especial a astaxantina, o β -caroteno e a luteína. (Guedes *et al.*, 2011b). Os ubiquinonas são também antioxidantes importantes que atuam como transportadores de electrões dentro da cadeia respiratória mitocondrial das células eucarióticas. O ubiquinol é um exemplo de uma ubiquinona, é a forma reduzida da coenzima Q10, um dos antioxidantes mais efetivos para as células humanas (Klein *et al.*, 2012).

Tal como já referido anteriormente, as microalgas possuem diferentes produtividades e diferentes composições bioquímicas, dependendo da forma como são cultivadas. Deste modo, vários estudos têm sido feitos com o objetivo de determinar quais os fatores que influenciam a produção de cada um dos compostos antioxidantes (Guedes *et al.*, 2011b).

As microalgas são muito ricas em carotenóides, sendo já conhecida a forte capacidade antioxidante de alguns deles e de outros pigmentos (Tabela 7) (Guedes *et al.*, 2011b). Vários estudos demonstraram que são estes que contribuem mais significativamente para a capacidade antioxidante total das microalgas (Goiris *et al.*, 2012). Os carotenóides possuem um efeito importante no *quenching* das espécies reativas de oxigénio produzidas durante a fotossíntese (Goiris *et al.*, 2012).

Tabela 7 – Pigmentos responsáveis pelas características antioxidantes de algumas microalgas (Adaptado de Dewapriya & Kim, 2014; Raposo *et al.*, 2013a; Guedes *et al.*, 2011b).

Microalga	Composto ativo
<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina, cantaxantina e luteína
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cantaxantina e astaxantina
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína e violaxantina
<i>Chlorella protothecoides</i>	Luteína, zeaxantina e cantaxantina
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Clorofila a
<i>Arthrospira/Spirulina</i>	Ficocianina

Os carotenóides são compostos lipofílicos (Christaki *et al.*, 2012) que constituem uma classe de pigmentos terpenóides derivados de cadeias de polieno de 40 carbonos (Guedes *et al.*, 2011a). Quimicamente podem ser divididos em xantofilas (p. ex. luteína e astaxantina) e carotenos (p. ex. β -caroteno e α -caroteno) (Christaki *et al.*, 2012).

A astaxantina (Figura 6) é uma xantofila, o principal carotenóide encontrado em *Haematococcus pluvialis*. É um antioxidante mais eficaz do que as vitaminas C e E ou outros carotenóides, tendo um poder antioxidante cerca de 10 vezes superior ao do β -caroteno, luteína, zeaxantina, cantaxantina, entre outros (Lorenz & Cysewski, 2000; Christaki *et al.*, 2012). Vários estudos indicam que a astaxantina protege a pele dos efeitos da luz ultravioleta, melhora o sistema imunitário (Lorenz & Cysewski, 2000) e é eficaz na prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, ajudando na

proteção de outras doenças como aterosclerose, doenças coronárias, diabetes, doenças gastrointestinais e do fígado, assim como doenças neurodegenerativas (Christaki *et al.*, 2012). A produção de astaxantina está relacionada com stress oxidativo e a sua acumulação com o cessar do crescimento (Guedes *et al.*, 2011b). Os principais fatores que promovem stress oxidativo em *Haematococcus* e consequente produção de astaxantina são a privação de nitratos e fosfatos no meio de cultura ou a adição de cloreto de sódio ao meio, o aumento da radiação e o aumento da temperatura (Lorenz & Cysewski, 2000).

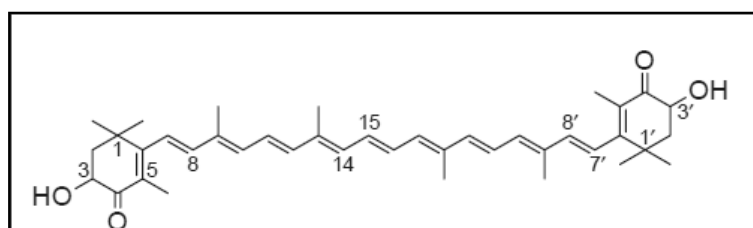
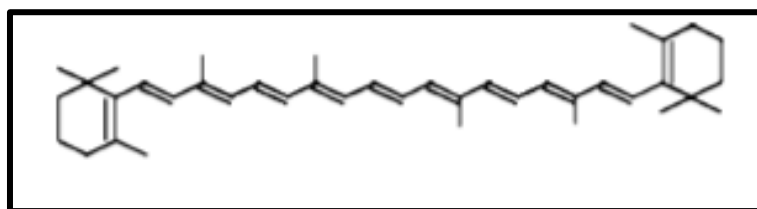


Figura 6 – Estrutura da astaxantina (Adaptado de Lorenz & Cysewski, 2000).

O β -caroteno (Figura 7) é um caroteno muito usado como corante, com aplicações a nível alimentar, farmacêutico e cosmético e também com grande capacidade antioxidante. Possui atividade de pró-vitamina A desempenhando um papel importante no organismo humano (Mostafa, 2012). Estudos demonstraram a sua capacidade de mediação de radicais livres que se encontram implicados em várias doenças, entre as quais cancro gastrointestinal e artrites (Christaki *et al.*, 2012). A maior fonte de β -caroteno natural é a microalga *Dunaliella salina*. Estima-se que o mercado anual para o β -caroteno natural seja de 10-100 toneladas por ano com um preço superior a 750€ por Kg (Mostafa, 2012). A acumulação de β -caroteno nas microalgas, em especial *Dunaliella*, depende de vários fatores, entre os quais a salinidade, a radiação, a temperatura e a carência de nutrientes (Raja *et al.*, 2007). Elevadas temperaturas e iluminação promovem uma maior acumulação de β -caroteno em *Dunaliella* (Raja *et al.*, 2007).

Figura 7 – Estrutura do β -caroteno (Adaptado de Mostafa, 2012).

A luteína (Figura 8) é também uma xantofila que estudos recentes indicam ser importante na manutenção da função visual do olho humano, sendo um antioxidante que protege a mácula do olho de reações fotoquímicas adversas (Christaki *et al.*, 2012). Em conjunto com a zeaxantina (outra xantofila) pode ajudar na prevenção das doenças degenerativas humanas, cataratas e saúde da pele (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010). Os principais fatores que afetam a quantidade de luteína produzida pelas microalgas são a radiação, o pH, a temperatura, a disponibilidade e a fonte de azoto, a salinidade, e a presença de substâncias oxidantes (potencial redox). Temperaturas mais altas favorecem a acumulação de luteína pelas microalgas, assim como níveis altos de radiação (Guedes *et al.*, 2011b).

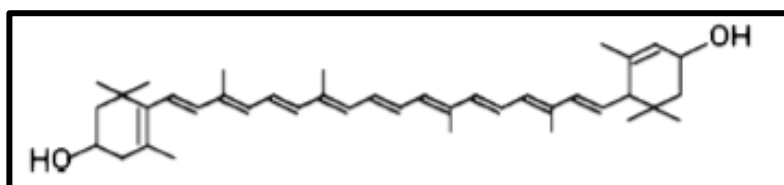


Figura 8 – Estrutura da luteína (Adaptado de Mostafa, 2012).

Já são comercializadas microalgas como fonte de carotenóides antioxidantes, como por exemplo *Haematococcus* para astaxantina e *Dunaliella* para β -caroteno (Chácon-Lee & González-Mariño, 2010; Goris *et al.*, 2012).

Os polissacarídeos sulfatados das microalgas são outros dos componentes que demonstram possuir capacidade de evitar a acumulação e atividade dos radicais livres e de espécies químicas reativas de oxigênio protegendo o sistema contra estes radicais e agentes de stress oxidativo (Tannin-Spitz *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Raposo *et al.*, 2013b; Sun *et al.*, 2014). Estudos nesta área têm revelado que polissacarídeos de menor tamanho possuem um melhor efeito antioxidante, observando-

se que o tamanho molecular dos polissacarídeos está relacionado com a sua atividade biológica (Sun *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014).

8. Objetivos

Este estudo teve como objetivo conhecer o potencial biotecnológico de duas estirpes de microalgas da Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI), *Porphyridium purpureum* ACOI/SAG 1380 e *Chrysothila lamellosa* ACOI 339. Para ambas as estirpes procedeu-se à análise e caracterização do crescimento em condições controladas; extração, identificação e quantificação dos ácidos gordos combinados que compõem o lípido; extração dos diferentes tipos de polissacarídeos e identificação dos monossacarídeos seus constituintes, após hidrólise; quantificação da atividade antioxidante total através de dois métodos de análise e, por fim, caracterização da biomassa pelo conhecimento do total de proteína, lípido, fibra bruta e extratos não azotados constituídos essencialmente por hidratos de carbono.

Material e métodos

1. Estabelecimento e crescimento das culturas

Para este estudo foram selecionadas duas estirpes da Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI) (www.acoi.ci.uc.pt), *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) K. M. Drew & R. Ross ACOI/SAG 1380 e *Chrysothila lamellosa* P. L. Anad ACOI 339.

O crescimento das culturas efetuou-se em condições autotróficas, numa sala climatizada. As culturas foram mantidas em balões de vidro Erlenmeyer de 250mL ou reatores de vidro em coluna vertical de 20L (Figura 9), sujeitas a borbulhamento de ar e a uma intensidade luminosa média de cerca de $21,62\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. As lâmpadas OSRAH Cool White L 36W/ 20 Hellweiss utilizadas foram ligadas a um temporizador regulado para um fotoperíodo de 16:8 horas de luz: escuro. A sala de cultura foi mantida a 23°C com ar condicionado.



Figura 9 – Cultivo das microalgas em estudo em balões Erlenmeyer de 250mL (A) e reatores em coluna de 20L (B), sendo as culturas de *Porphyridium purpureum* identificáveis pela coloração vermelha enquanto as de *Chrysothila lamellosa* se apresentam douradas/acastanhadas.

As culturas foram estabelecidas a partir de uma cultura-mãe com 5 dias de crescimento. Para os balões de 250mL foram iniciadas com 120mL de meio fresco e 100mL da cultura-mãe e mantidas nas condições acima descritas, durante 15 dias, em triplicado. No caso dos reatores, as culturas foram iniciadas com 1200mL de meio fresco e 1000mL da cultura-mãe, sendo de 15 em 15 dias retirados 1000mL de cultura

para análise do valor da biomassa total e adicionado meio de cultura fresco na proporção de 1,2:1.

Para o crescimento e manutenção das culturas de *Porphyridium purpureum* e de *Chrysolita lamellosa* foram utilizados os meios de cultura M6 e M5 (Tabela 8) (Schlösser, 1994). Ao longo do trabalho, após preparados, os meios de cultura foram sempre esterilizados em autoclave (Uniclave 88), durante 15 minutos, a 120°C de temperatura e 1 bar de pressão.

Tabela 8 – Composição química dos meios de cultura M5 e M6, usados para o crescimento das microalgas em estudo, sendo indicadas as quantidades requeridas para preparação de 1L de cada meio (Adaptado de Schlösser, 1994).

	Solução concentrada	M5	M6
	(g/100mL)	(mL)	(mL)
KNO₃	1,0	20	20
K₂HPO₄	0,1	20	20
MgSO₄.7H₂O	0,1	20	20
Extrato de solo		30	30
Micronutrientes		5	5
Vitamina B₁₂	5x10 ⁻⁶ g/L	1	1
Água do mar		905	450
filtrada			
Água destilada		-	455

A solução de micronutrientes indicada na tabela prepara-se em duas soluções separadas e autoclavadas que, posteriormente, depois de frias, são misturadas. A solução I consiste em: 881mL de água destilada, 1mL de ZnSO₄.7H₂O a 0,1%, 2mL de MnSO₄.4H₂O a 0,1%, 5mL de H₃BO₃ a 0,2%, 5mL de Co(NO₃)₂.6H₂O a 0,02%, 5mL de Na₂MoO₄.2H₂O a 0,02%, 1mL de CuSO₄.5H₂O a 0,0005% e 0,4g de EDTA. A solução II é preparada em 100mL de água destilada, a que se adicionam 0,7g de FeSO₄.7H₂O e 0,4g de EDTA.

O extrato de solo é preparado com terra de jardim com pouco teor de húmus, adubos ou outros agentes. Pesam-se 200g de terra para 1L de água destilada, ferve-se durante uma hora e de seguida filtra-se com recurso a filtro de papel e algodão. O

material filtrado é de seguida centrifugado e autoclavado durante 1 hora a 120°C, 1 bar em três dias seguidos.

Para todas as experiências realizadas, antes de se retirarem as amostras, as culturas foram colocadas num banho de ultrassons (Bandelin Sonorex RK100) (contendo 1-2% de detergente), com uma frequência de 35kHz e uma potência de 240W, durante 30 segundos, intermitentes, para homogeneização.

O crescimento das culturas foi estimado por pesagens da biomassa em cadinho, como se descreve a seguir, no início e no final do cultivo, em triplicado, e o peso seco da biomassa calculado pela diferença entre os pesos final e inicial do cadinho, após secagem em estufa. Procedeu-se do seguinte modo: da cultura homogeneizada, retiraram-se 10mL que se centrifugaram a 4500rpm, durante 15 minutos numa centrífuga de bancada (Heraeus Megafuge 8), sendo o “pellet” obtido lavado com água destilada para remoção dos sais do meio de cultura e colocado num cadinho previamente pesado (ver Figura 10). Os cadinhos foram colocados numa estufa (Heraeus Instruments) a 60°C, durante 24 horas, posteriormente arrefecidos num excicador, sob vácuo, durante 24 horas, sendo depois pesados em balança analítica Kern-510.

Com a finalidade de conhecer a curva de crescimento das duas espécies, ao longo de 21 dias, baseada no peso seco da biomassa iniciaram-se sete culturas em triplicado, num total de 21 balões (Figura 10). No início e após cada 3 dias, retiraram-se três réplicas de cada cultura e, de cada réplica, retiraram-se três amostras de 10mL para determinação do peso seco da biomassa. O peso seco da biomassa foi calculado de dois modos, em cadinho sem haver uma lavagem prévia da biomassa ou após filtração e lavagem da biomassa para remoção de sais (Mustafa *et al.*, 2011).

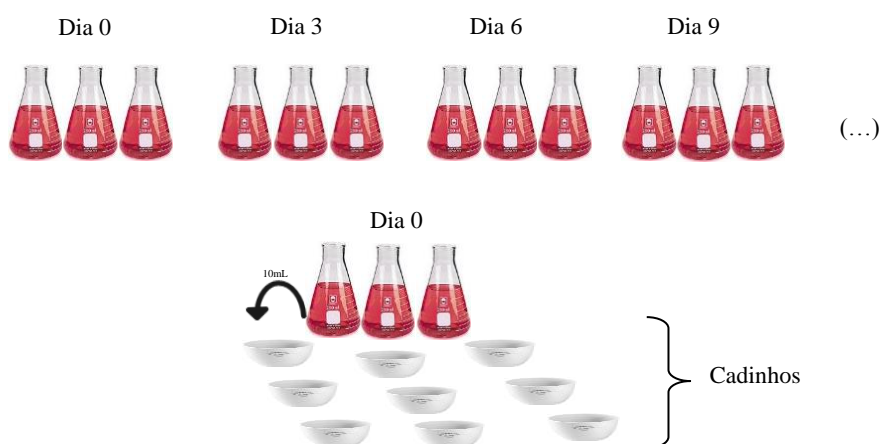


Figura 10 – Esquema exemplificativo do protocolo experimental utilizado para determinar o crescimento das duas espécies de microalgas.

No primeiro caso (Figura 10) os 10mL de amostra retirados de cada réplica eram colocados em cadinhos previamente pesados e estes colocados a secar na estufa a 60°C durante 24 horas, posteriormente arrefecidos no excicador, sob vácuo, durante 24 horas, sendo depois pesados em balança analítica, como foi referido anteriormente. O cálculo do peso seco foi obtido subtraindo o peso inicial ao peso final.

No segundo caso (Figura 11), os 10mL de amostra retirados de cada réplica eram filtrados para discos de papel Wathman GF/C 47mm, previamente secos e pesados, utilizando um sistema de filtração de Buchner, seguindo-se a lavagem do filtro com 20mL de água destilada. Os filtros eram depois colocados a secar como indicado para os cadinhos. O cálculo do peso seco foi feito subtraindo o peso inicial do filtro ao peso final.

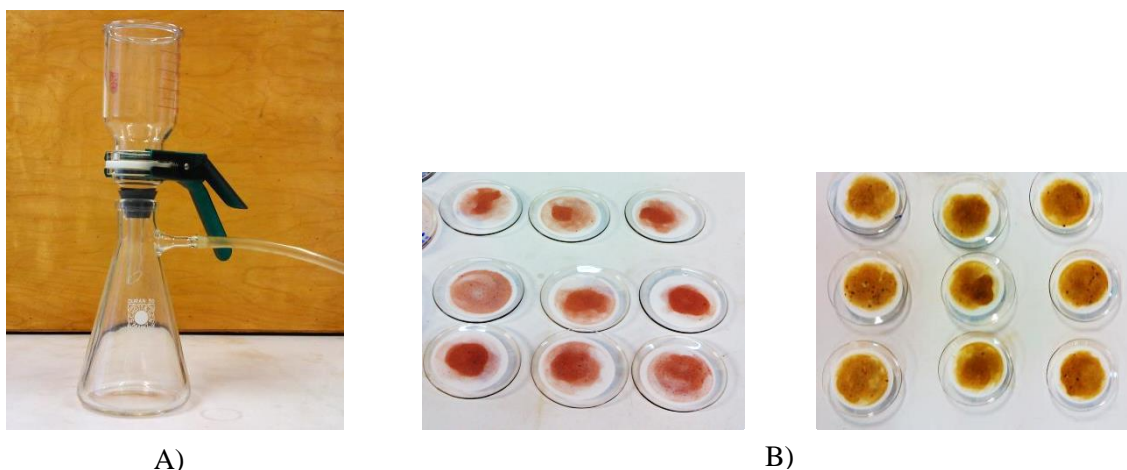


Figura 11 – Processo para obtenção de peso seco em filtros de papel. A) Sistema de filtração de Buchner com vácuo; B) Vidros de relógio contendo os filtros com a biomassa filtrada, de *Porphyridium purpureum* à esquerda e de *Chrysolita lamellosa* à direita.

Para se ter uma estimativa do número de células com que se iniciaram e finalizaram as culturas, no primeiro e último dia em que se fez o cálculo do peso seco, também foram efetuadas contagens ao hemocitómetro. Adicionalmente, em cada dia de pesagens realizaram-se observações e registos fotográficos das células, usando um microscópio óptico Leica DMLS (Anexo I).

O estudo dos compostos bioativos foi feito quando ambas as espécies se encontravam na fase estacionária do seu desenvolvimento, após um período de crescimento de 15 dias, em balões Erlenmeyer de 250mL, nas condições descritas antes. Cada cultura foi homogeneizada como descrito previamente e as células observadas ao microscópio óptico a fim de confirmar o seu bom estado fisiológico.

2. Extração, qualificação e quantificação dos ácidos gordos combinados presentes no lípido

Para o estudo dos ácidos gordos combinados presentes no lípido retiraram-se 10mL de cultura para tubos Falcon de 15mL, centrifugou-se a amostra durante 15 minutos, a 4500rpm. O sobrenadante foi descartado e o lípido extraído da biomassa (não seca) por adição de solventes orgânicos (1mL de hexano e 400 μ L de metanol) e uso de ultrassons durante 15 minutos. Os ácidos gordos combinados extraídos foram convertidos em ésteres de metilo de ácidos gordos por adição de 100 μ L de metóxido de

sódio 2M, processo denominado de transesterificação (Figura 12) e analisados por cromatografia gasosa (GC) (Lim *et al.*, 2012).

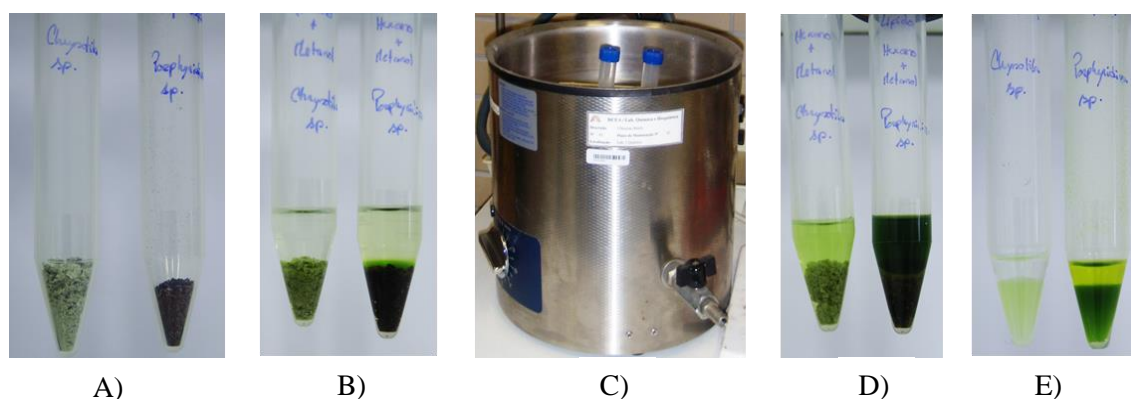


Figura 12 – Processo de extração dos ácidos gordos combinados presentes no lípido da biomassa (não seca) de *Chrysolita lamellosa* e *Porphyridium purpureum* e sua transesterificação em ésteres de metilo de ácidos gordos. A) Biomassa centrifugada; B) Biomassa (não seca) com hexano e metanol; C) Banho de ultrassons; D) Lípidos extraídos, dissolvidos nos solventes (camada superior) e restos da biomassa algal (camada inferior); E) Transesterificação, encontrando-se os ésteres de metilo dos ácidos gordos na camada superior e, na camada inferior, a fase metanólica.

A análise em cromatografia gasosa (GC) foi realizada num cromatógrafo Chrompack CP 9001 (Figura 13), equipado com um detetor de ionização de chama, um injetor do tipo divisor/não divisor e com uma coluna capilar TR_CN 100 (60m x 0,25mm de diâmetro interno x 0,20 μ m de espessura de fase estacionária). O hélio foi usado como gás de arraste com uma pressão no topo da coluna de 150kPa. A temperatura do detetor e do injetor foi de 260°C. O programa de temperatura do forno da coluna foi o seguinte: a temperatura inicial manteve-se a 90°C durante 7 minutos após a injeção, de seguida aumentaram-se 5°C/minuto até aos 220°C e assim se manteve por mais 15 minutos. A amostra (1 μ L) foi injetada usando uma seringa Hamilton em modo de injeção não divisor, durante 45 segundos.



Figura 13 – Cromatógrafo Gasoso Chrompack CP 9001.

A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção relativos (RRT) com os de um padrão autêntico de 37 ésteres de metilo de ácidos gordos (Supelco) (Anexo II). A quantificação foi feita utilizando o método do padrão interno (Lim *et al.*, 2012). Os padrões internos utilizados foram uma mistura de n-hexadecano e o pentadecanoato de metilo com concentração final de 0,03mg/mL. Foram feitas retas de calibração para cada éster de metilo de ácido gordo, para tal foram preparadas três diluições do padrão externo (1:1, 1:2 e 1:5) e injetados 150 μ L de cada com 100 μ L da mistura do padrão interno. Com base nas áreas dos picos obtidas para cada éster de metilo de ácido gordo foi construída uma reta em que no eixo dos yy se encontra o quociente da área do ácido gordo pela área do padrão interno e no eixo dos xx a concentração de ácido gordo em mg/mL ácido gordo (Figura 14). Os resultados da quantificação dos ácidos gordos presentes nas amostras das duas espécies de microalgas foram expressos em mg ácido gordo/g de biomassa (não seca).

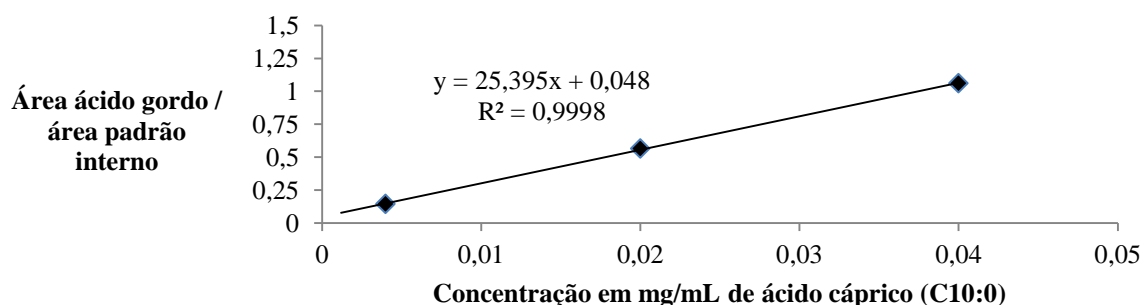


Figura 14 – Exemplo de uma recta de calibração de um éster de metilo de ácido gordo.

3. Extração de polissacarídeos e análise dos monossacarídeos constituintes após hidrólise

Para a extração dos polissacarídeos e análise dos monossacarídeos que os constituem, as microalgas foram cultivadas em balões Erlenmeyer de 250mL conforme descrito anteriormente, durante 15 dias. Ao fim desse tempo, a biomassa foi centrifugada, durante 15 minutos, a 4500rpm. O sobrenadante, contendo o meio de cultura e algumas substâncias excretadas pelas células foi armazenado e o “pellet” foi lavado com água destilada para remoção de possíveis sais presentes. De seguida colocou-se a biomassa a secar na estufa, a 60°C, durante 48-72 horas.

A biomassa seca foi inicialmente colocada numa solução de acetona: metanol (1:1) e levada ao banho de ultrassons, durante 2 horas, para extração dos pigmentos organossolúveis, isto é, para despigmentação das células. Posteriormente, a mistura foi colocada na estufa, a 70°C, até completa evaporação dos solventes (Pereira *et al.*, 2003). De seguida procedeu-se a um tratamento alcalino da amostra, a quente, de forma a eliminar os biopolímeros não sacarídeos, entre os quais proteína e nucleotídeos. A 1g da amostra adicionaram-se 150mL de NaOH 0,1M colocando-se depois em banho-maria, a 90°C, durante 3 horas (Figura 15A). Ainda a quente efetuou-se uma filtração grosseira, utilizando pano cru, seguida de uma filtração fina com filtro de fibra de vidro G0 (Figura 15B), ambas as filtrações sendo feitas com o auxílio de uma bomba de vácuo (Millipore). À solução filtrada adicionou-se etanol absoluto para precipitação dos polissacarídeos, que foram recolhidos e secos na estufa a 70°C (Figura 15C e D).

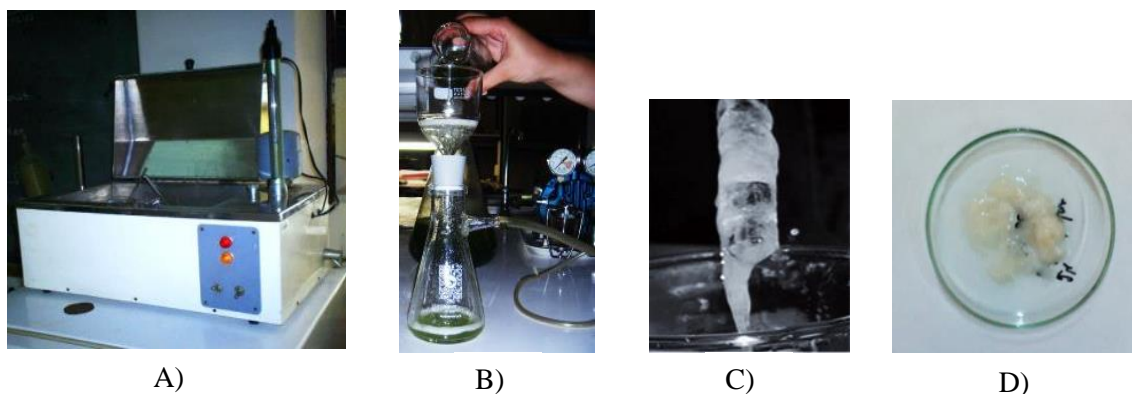


Figura 15 – Processamento desde o tratamento alcalino da amostra até à recolha dos polissacarídeos. A) Banho-maria onde ocorre o tratamento alcalino; B) Filtração fina com filtro de fibra de vidro G0; C) Precipitação e recolha dos polissacarídeos; D) Polissacarídeos obtidos.

Os polissacarídeos secos foram depois submetidos a uma hidrólise ácida com o objectivo de os quebrar em unidades monossacarídicas. Aos polissacarídeos secos adicionaram-se 0,5mL de água destilada e 0,5mL de HCl (34% v/v) e a amostra foi depois colocada em banho-maria, a 100°C, durante 2,5 horas. O hidrolisado resultante foi filtrado numa coluna de extração em fase sólida Chromabond C18 que retém as substâncias apolares na fase estacionária, deixando passar as polares (Figura 16).



Figura 16 – Filtração da amostra com coluna de extração em fase sólida Chromabond C18.

Ao material filtrado foi depois adicionado NaOH 1M para se tornar menos ácido e não danificar a coluna de separação. Após controlo do pH, o material foi filtrado com filtros Millipore de 0,45µm e analisado em sistema de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Figura 17). A cromatografia foi realizada com o equipamento de

HPLC em condições isocráticas, equipado com uma coluna Inertsil NH2 (250mm x 4,6mm), um injetor Rheodyne 7175 (20 μ L) e um detetor por índice de refração Jasco RI-830. O eluente usado foi acetonitrilo aquoso a 80% com um fluxo de 1mL/minuto, fornecido por uma bomba Jasco PU-980.



Figura 17 – Equipamento de HPLC.

No caso do sobrenadante recolhido, o processo de tratamento das amostras foi mais simples, iniciando-se na precipitação dos polissacarídeos com etanol absoluto, e prosseguindo de modo idêntico ao descrito anteriormente.

A identificação dos monossacarídeos foi feita por comparação dos tempos de retenção relativos (RRT) com padrões autênticos. Os padrões utilizados foram ramnose, ribose, xilose, fucose, arabinose, frutose, manose, glucose, galactose e maltose. De cada amostra foram feitas duas injeções, amostra concentrada e amostra diluída com água destilada 75:25.

4. Quantificação da atividade antioxidante total

Para determinar o potencial antioxidante das espécies, retiraram-se 15-30mL de cultura, com 15 dias de crescimento, para um tubo Falcon, procedeu-se à sua centrifugação, durante 15 minutos, a 4500rpm, descartou-se o sobrenadante e foi a partir do “pellet” que se prepararam os extratos. Para isso, adicionaram-se solventes orgânicos ao “pellet” (etanol, acetona ou hexano), de modo a obter um extrato com concentração final de 10mg de biomassa/mL de solvente e sujeitou-se a amostra a banho de ultrassons, durante 30 minutos. Como referência para comparação dos resultados foram

também preparados e analisados extratos de alimentos adquiridos no supermercado e conhecidos por possuírem elevado poder antioxidante, nomeadamente mirtilo, framboesa, amora, morango, uva, tomate e cenoura. Tratou-se de extratos etanólicos preparados também com uma concentração de 10mg de biomassa/mL de etanol, por maceração de um pedaço do alimento em almofariz e atuação do solvente e banho de ultrassons durante 30 minutos.

A quantificação da atividade antioxidante total foi realizada por dois métodos espectrofotométricos, o método de ABTS e o método de DPPH. Ambos são métodos químicos que se baseiam no aniquilamento do radical (ABTS^{++} ou DPPH^{\bullet}), o que se traduz na descoloração da solução. A descoloração pelo agente antioxidante é medida a 734nm no caso do ABTS ou a 515nm no caso do DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995; Guedes *et al.*, 2013a).

O radical catiónico ABTS (ABTS^{++}) concentrado foi preparado a partir de duas soluções dissolvidas em água destilada, ABTS (Sigma) 7mol/m^3 e $\text{K}_2\text{S}_8\text{O}_2$ (Merck) $2,45\text{mol/m}^3$ (Guedes *et al.*, 2013a). Após preparação, a solução ficou em repouso, à temperatura ambiente e protegida da luz, durante 16 horas para que a reação de formação do radical se completasse. De seguida foi preparada uma diluição desta solução até se obter uma leitura de absorvância, a 734nm, entre 0,680 e 0,720 de modo a ajustar com a escala do espectrofotómetro (Hitachi U-200). O ácido ascórbico (Sigma) foi usado como padrão e uma vez que se desconhecia o tipo de valores de poder antioxidante que se iriam obter nas amostras foram feitas retas de calibração para diferentes volumes de amostra (10, 50, 100, 200, 300 e $350\mu\text{L}$), em que o eixo dos yy indica a percentagem de inibição do ABTS^{++} e o eixo dos xx refere concentrações conhecidas de ácido ascórbico, expressas em g/L. A concentração de antioxidante pode variar numa escala elevada, podendo ser necessário abranger diferentes valores, daí a razão de ser de diferentes retas de calibração.

A análise dos extratos das microalgas foi realizada adicionando $350\mu\text{L}$ de extrato a 1mL de ABTS^{++} diluído e efetuando a leitura de absorvância a 734nm, após 6 minutos de reação. No caso dos alimentos usados como referência, a 1mL de ABTS^{++} foram adicionados $50\mu\text{L}$ de extrato para o mirtilo, amora, uva e morango, $100\mu\text{L}$ de extrato para a cenoura e framboesa e $350\mu\text{L}$ de extrato para o tomate. A capacidade antioxidante total foi depois expressa em percentagem de inibição (PI) de acordo com a equação $\text{PI} = ((\text{abs}_{\text{ABTS}^{++}} - \text{abs}_{\text{amostra}}) / \text{abs}_{\text{ABTS}^{++}}) \times 100$, em que abs representa o valor

registado de absorvância. Os resultados quantitativos são expressos em mg/L equivalente a ácido ascórbico.

O radical de DPPH (DPPH[•]) (Sigma) 0,06mM foi preparado em metanol (Brand-Williams *et al.*, 1995). Os extratos das microalgas e dos alimentos usados como referência foram diluídos para obtenção de quatro concentrações diferentes, 10, 7, 5 e 3mg/mL de solvente. A análise das amostras foi realizada adicionando 0,2mL de extrato a 1,8mL de DPPH[•] e efetuando a leitura a 515nm, após 15 minutos de reação, sendo o controlo feito com o solvente com o qual se preparou o extrato. Tal como no método anterior a capacidade antioxidante total foi expressa em percentagem de inibição (PI) de acordo com a equação $PI = ((abs_{DPPH^{\bullet}} - abs_{amostra}) / abs_{DPPH^{\bullet}}) \times 100$. Sempre que possível foi calculado o EC₅₀ que expressa a quantidade de extrato necessário para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH[•], expresso em mg de biomassa/mL de solvente.

Todas as análises foram realizadas em ambiente protegido da luz e para todos os extratos preparados foi registado o respectivo espectro de absorção entre 400-700nm de modo a conhecer os comprimentos de onda nos quais as amostras absorvem e poder ter uma ideia dos principais compostos que estão a ser extraídos.

5. Caraterização da biomassa total

Para a caraterização da biomassa total, as culturas utilizadas foram cultivadas nos reatores de 20L, conforme descrito anteriormente. A biomassa foi colhida por centrifugação a 4500rpm, durante 15 minutos. O “pellet” obtido foi lavado com água destilada para remoção dos sais, a biomassa seca na estufa, a 60°C, durante 48-72 horas e depois armazenada no excicador, sob vácuo, até se proceder à sua análise.

A biomassa foi caracterizada com base nos Official Methods of Analysis da AOAC International (1990), que permitem quantificar humidade, cinza, lípidos, proteína, fibra bruta e extratos não azotados (principalmente hidratos de carbono).

Nestes métodos, a humidade entende-se como a perda de peso sofrida pela amostra quando seca a 100-105°C, até o peso ser constante, o que é feito numa estufa com circulação forçada de ar. A cinza é a resíduo calcinado que se obtém após colocar a amostra numa mufla a 550°C. Para o cálculo do teor de lípido recorre-se a um extrator de Soxhlet, em que o lípido é extraído da amostra por um solvente orgânico, o hexano.

A proteína é obtida pelo método de Kjeldhal, em que é feita uma digestão com ácido para determinação do teor de azoto na amostra. O valor obtido pelo método de Kjeldhal é multiplicado por um fator recomendado pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) de acordo com o tipo de amostra que se está a tratar, sendo o fator usado 6,25. A fibra bruta, resíduo orgânico constituído por celulose, é obtida a partir da amostra seca através da hidrólise dos hidratos de carbono e das proteínas mediante um tratamento de ebulição com uma solução apropriada. Os extratos não azotados (ENA) são calculados pela diferença dos valores anteriores de acordo com a seguinte expressão: $\% \text{ENA} = 100 - (\% \text{ cinza} + \% \text{ gordura bruta} + \% \text{ proteína bruta} + \% \text{ fibra bruta})$.

As análises para caracterização da biomassa total foram realizadas pelo Laboratório de Química da Escola Superior Agrária de Coimbra.

Resultados

1. Crescimento das culturas

O crescimento das culturas foi monitorizado por dois métodos diferentes, peso seco da biomassa em cadinho, sem lavagem e peso seco da biomassa após filtração e lavagem.

O crescimento de *Porphyridium purpureum* baseado no peso seco da biomassa em cadinho sem lavagem (Figura 18), mostra um aumento gradual até ao sexto dia, ocorrendo entre o dia 6 e 9 uma ligeira diminuição que se mantém até ao dia 12 e novo aumento até ao dia 21. O crescimento inicia-se com 5,3g/L de biomassa aumentando até 6,9g/L, um aumento de 1,6g/L nos 21 dias de crescimento.

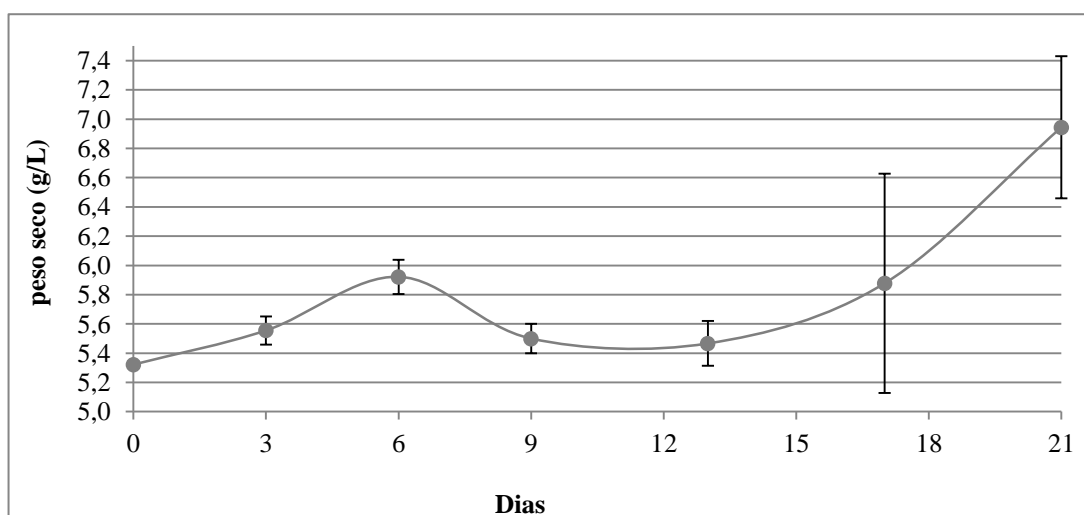


Figura 18 – Crescimento de *Porphyridium purpureum* em condições controladas de luz, temperatura, fotoperíodo e borbulhamento de ar, baseado no peso seco da biomassa em cadinho, sem lavagem.

O crescimento desta espécie baseado no peso seco da biomassa após filtração e com lavagem (Figura 19) inicia-se com 0,2g/L de biomassa e mostra uma não alteração de peso do dia 0 ao dia 6 e uma fase sensivelmente exponencial de crescimento do dia 6 até ao final dos 21 dias de estudo, finalizando com 1,0g/L de biomassa, ocorrendo nos 21 dias um aumento de 0,8g/L de biomassa.

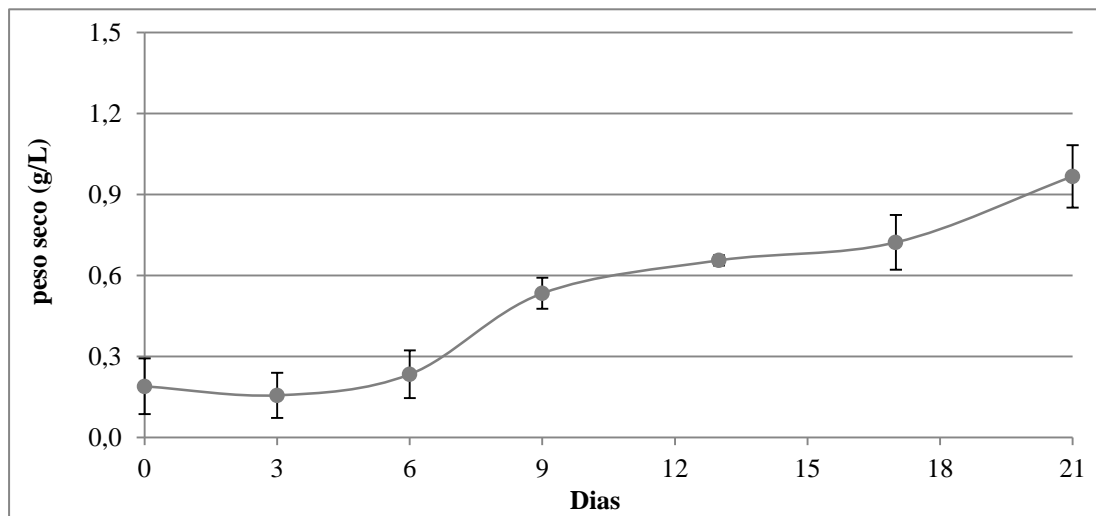


Figura 19 – Crescimento de *Porphyridium purpureum* em condições controladas de luz, temperatura, fotoperíodo e borbulhamento de ar, baseada no peso seco da biomassa após filtração e lavagem.

Em *Chrysolita lamellosa*, no primeiro caso (peso seco da biomassa em cadinho, sem lavagem) houve um aumento significativo de peso entre os dias 3 e 6, atingindo um pico máximo de 13,1g/L de biomassa no dia 6, observando-se depois uma diminuição para valores de 11,6g/L de biomassa no dia 9, e novamente um ligeiro aumento entre os dias 9 e o dia 21 que, contudo, não chega a atingir os valores do pico de dia 6 (Figura 20).

No segundo caso (peso seco da biomassa após filtração e lavagem) nota-se uma fase sensivelmente exponencial de crescimento do dia 3 ao dia 12, seguindo-se uma fase estacionária, que se prolonga até ao dia 21. O peso seco inicial foi de 0,2g/L de biomassa, aumentando até 0,7g/L obtendo-se um aumento de 0,5g/L de biomassa ao fim de 21 dias de crescimento (Figura 21).

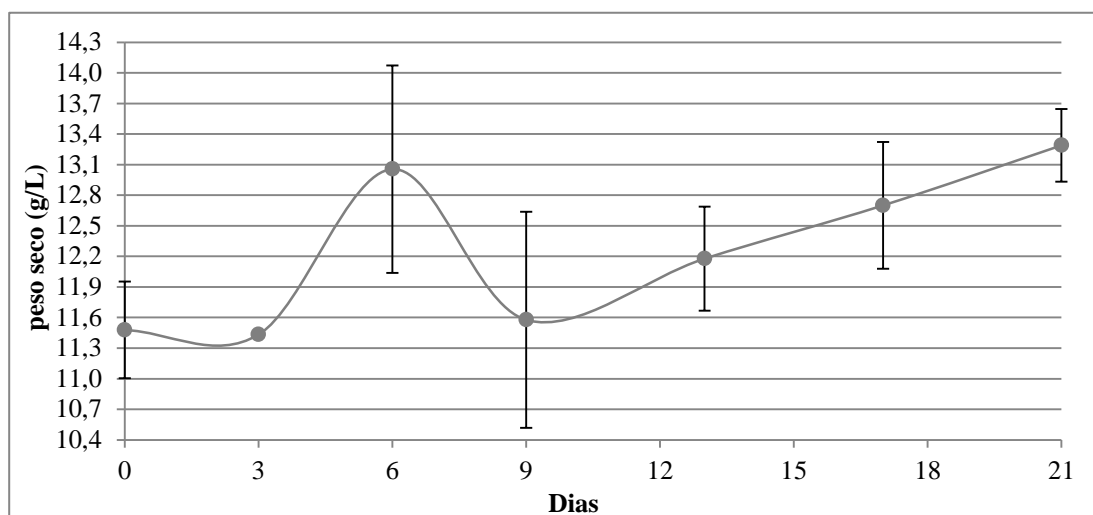


Figura 20 – Crescimento de *Chrysothila lamellosa* em condições controladas de luz, temperatura, fotoperíodo e borbulhamento de ar, baseada no peso seco da biomassa em cadinho, sem lavagem.

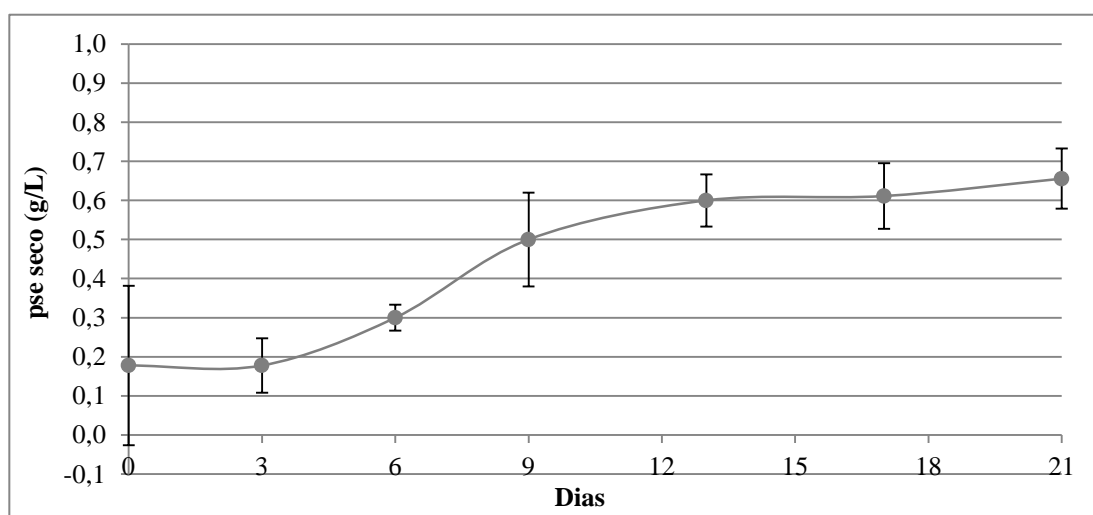


Figura 21 – Crescimento de *Chrysothila lamellosa* em condições controladas de luz, temperatura, fotoperíodo e borbulhamento de ar, baseada no peso seco da após filtração e lavagem.

O cultivo de *Porphyridium purpureum* iniciou-se com $4,0 \times 10^5$ cél/mL e finalizou com $7,1 \times 10^6$ cél/mL enquanto o de *Chrysothila lamellosa* se iniciou com $1,6 \times 10^6$ cél/mL e terminou com $9,8 \times 10^6$ cél/mL (Tabela 9).

Tabela 9 – Número de células de *Porphyridium purpureum* e *Chrysothila lamellosa* presentes por mL de cultura, no início e ao fim de 21 dias de crescimento.

Espécies	Dia 0	Dia 21
	cél/mL	cél/mL
<i>Porphyridium purpureum</i>	$4,0 \times 10^5$	$7,1 \times 10^6$
<i>Chrysothila lamellosa</i>	$1,6 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$

A produção de biomassa das duas espécies, após 15 dias de cultivo em balões Erlenmeyer de 250mL e em reatores em coluna de 20L, estimada com base no peso seco da biomassa inicial e final (Tabela 10), foi de 0,50g/L e 0,40g/L nos balões de 250mL para *Porphyridium purpureum* e *Chrysothila lamellosa* respetivamente, e de 0,79g/L e 0,64g/L nos reatores em coluna de 20L. Em ambos os sistemas de cultivo *Porphyridium purpureum* mostrou uma maior produção de biomassa ao fim dos 15 dias de crescimento.

Tabela 10 – Biomassa de *Porphyridium purpureum* e de *Chrysothila lamellosa* registada ao fim de 15 dias de cultivo em balões de 250mL e em reatores de 20L.

Espécies	Biomassa ao fim de 15 dias (g/L)	
	Balões Erlenmeyer 250mL	Reator em coluna 20L
<i>Porphyridium purpureum</i>	0,50±0,002	0,79±0,009
<i>Chrysothila lamellosa</i>	0,40±0,002	0,64±0,004

2. Qualificação e quantificação dos ácidos gordos combinados presentes no lípido

A identificação dos ácidos gordos combinados presentes no lípido nas duas espécies e respectiva quantificação foi feita através da análise dos cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa (GC) (Anexo III e IV).

Com base no padrão utilizado, em *Porphyridium purpureum* foram identificados 14 ácidos gordos (Tabela 11), dos quais 6 são ácidos gordos saturados, 3 ácidos gordos monoinsaturados e 5 ácidos gordos polinsaturados. Os ácidos gordos que existem em maior quantidade são o palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0), sendo o ácido esteárico

o mais abundante, representando 52,5% do total de ácidos gordos. *Porphyridium purpureum* também possui quantidades significativas de ácido oleico (C18:1n9c) e de ácido araquidónico (C20:4n6).

Tabela 11 – Perfil de ácidos gordos combinados obtidos da biomassa (não seca) de *Porphyridium purpureum* e respetiva quantificação em mg de ácido gordo/g de biomassa (não seca) e em percentagem (%) do total de ácidos gordos.

Ácidos gordos		Quantificação mg ácido gordo/g biomassa (não seca)	%
C16:0	ácido palmítico	0,111±0,0219	33,8
C17:0	ácido heptadecanóico	0,002±0,0002	0,5
C17:1	ácido heptadecenóico	0,005±0,0035	1,7
C18:0	ácido esteárico	0,172±0,0244	52,5
C18:1n9t	ácido elaídico	0,004±0,0032	1,2
C18:1n9c	ácido oleico	0,009±0,0048	2,7
C18:2n6c	ácido linoleico	0,004±0,0022	1,1
C20:0	ácido araquídico	0,003±0,0017	1,0
C18:3n6	ácido γ-linoleico	0,001±0,0001	0,2
C22:0	ácido beénico	0,001±0,0002	0,2
C20:4n6	ácido araquidónico	0,009±0,0036	2,7
C23:0	ácido tricosanóico	0,005±0,0038	1,6
C22:2	ácido docosadienóico	0,0005±0,000	0,1
C20:5n3	ácido eicosapentanóico	0,002±0,0019	0,6

Na espécie *Chrysothila lamellosa* (Tabela 12) foram identificados 17 ácidos gordos, dos quais 6 são ácidos gordos saturados, 3 ácidos gordos monoinsaturados e 8 ácidos gordos polinsaturados. Nesta espécie os ácidos gordos que existem em maior quantidade são os ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) representando 26,4% e 46,5% do total de ácidos gordos, respetivamente. Também se observam quantidades significativas de ácido eicosadienóico (C20:2) e de ácido docosahexanóico (C22:6n3).

Tabela 12 – Perfil de ácidos gordos combinados obtidos a partir da biomassa (não seca) de *Chrysolita lamellosa* e respetiva quantificação em mg de ácido gordo/g de biomassa (não seca) e em percentagem (%) do total de ácidos gordos.

	Ácidos gordos	Quantificação	
		mg ácido gordo/g biomassa (não seca)	%
C16:0	ácido palmítico	0,073±0,01736	26,4
C17:0	ácido heptadecanóico	0,001±0,00052	0,4
C17:1	ácido heptadecenóico	0,002±0,00033	0,6
C18:0	ácido esteárico	0,128±0,03679	46,5
C18:1n9t	ácido elaídico	0,007±0,00451	2,4
C18:1n9c	ácido oleico	0,010±0,00227	3,5
C18:2n6t	ácido linolelaídico	0,0002±0,00003	0,1
C18:2n6c	ácido linoleico	0,005±0,00103	1,6
C20:0	ácido araquídico	0,002±0,00025	0,8
C18:3n6	ácido γ-linoleico	0,004±0,00154	1,3
C18:3n3	ácido α-linolénico	0,006±0,00254	2,0
C20:2	ácido eicosadienóico	0,016±0,00000	6,0
C22:0	ácido beénico	0,001±0,00001	0,3
C20:4n6	ácido araquidónico	0,001±0,00033	0,2
C23:0	ácido tricosanóico	0,002±0,00110	0,8
C20:5n3	ácido eicosapentanóico	0,002±0,00098	0,6
C22:6n3	ácido docosahexanóico	0,018±0,00913	6,4

Analisando as quantidades de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados das duas espécies (Figura 22), verifica-se que ambas possuem um teor mais elevado de ácidos gordos saturados, resultante dos dois ácidos gordos que existem em maior quantidade (ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0)), e que são mais elevados em *Porphyridium purpureum*. Ambas as espécies possuem baixas quantidades de ácidos gordos monoinsaturados. *Chrysolita lamellosa* possui teores mais elevados de ácidos gordos polinsaturados relativamente a *Porphyridium purpureum*.

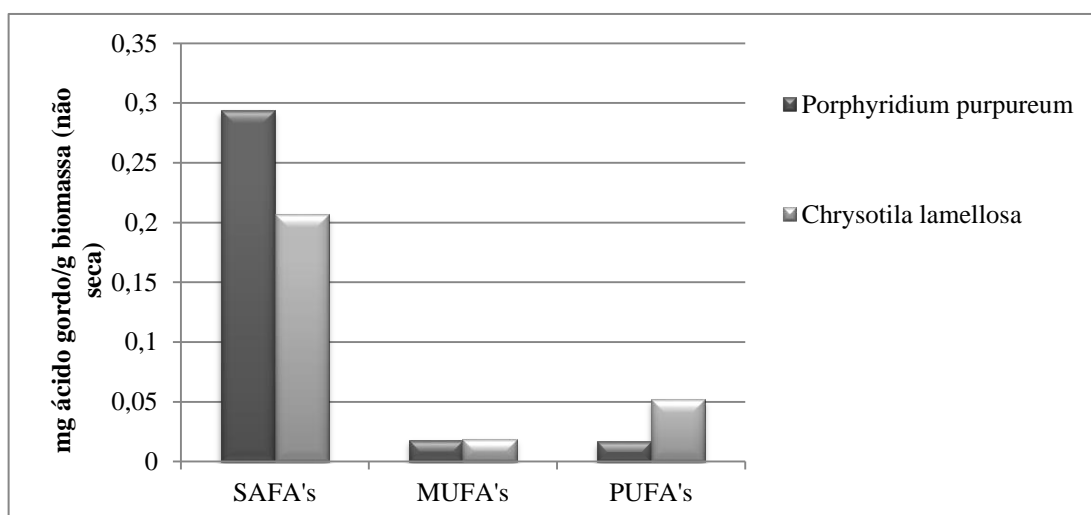


Figura 22 – Comparação do teor de ácidos gordos saturados (SAFA's), monoinsaturados (MUFA's) e polinsaturados (PUFA's) entre *Porphyridium purpureum* e *Chrysotila lamellosa*.

Uma comparação quantitativa com ênfase nos ácidos gordos polinsaturados (PUFA'S) de maior interesse a nível alimentar (Figura 23), mostrou que *Porphyridium purpureum* não possui ácido α -linoleico (C18:3 ω 3 – ALA) nem ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3 – DHA), possuindo contudo elevada quantidade de ácido araquidónico (C20:4 ω 6 – AA). *Chrysotila lamellosa* possui os cinco ácidos gordos com maior interesse a nível alimentar (ácido linoleico (C18:2 ω 6), α -linoleico (C18:3 ω 3), araquidónico (C20:4 ω 6), eicosapentanóico (C20:5 ω 3) e docosahexanóico (C22:6 ω 3)), possuindo uma elevada quantidade de ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3 – DHA). Em ambas as espécies se observam quantidades similares de ácido linoleico (C18:2 ω 6 – LA).

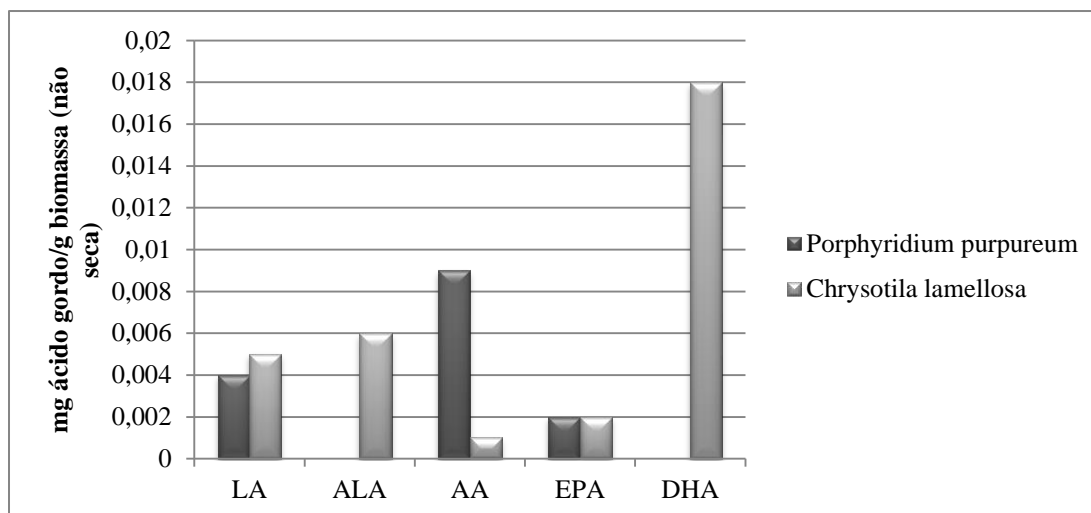


Figura 23 – Comparação do teor de ácidos gordos polinsaturados em *Porphyridium purpureum* e *Chrysolita lamellosa*. LA - ácido linoleico (C18:2 ω 6); ALA - ácido α -linoleico (C18:3 ω 3); AA - ácido araquidónico (C20:4 ω 6); EPA – ácido eicosapentanoico (C20:5 ω 3); DHA - ácido docosahexanoico (C22:6 ω 3).

3. Extração de polissacarídeos e análise dos monossacarídeos constituintes após hidrólise

Para ambas as espécies foram extraídos e quantificados os polissacarídeos que se encontram no meio de cultura (extracelulares) e os que compõem a biomassa (intracelulares e da parede), após os 15 dias de cultivo (Tabela 13).

Em *Porphyridium purpureum* obtiveram-se 0,68g/L de polissacarídeos extracelulares e 0,30g/L de polissacarídeos intracelulares e da parede ao passo que de *Chrysolita lamellosa* não se obteve polissacarídeos extracelulares e foram quantificados 0,18g/L de polissacarídeos extraídos da biomassa seca.

Tabela 13 – Polissacarídeos totais extraídos do meio de cultura (extracelular) e da biomassa (intracelular e da parede) das espécies *Porphyridium purpureum* e *Chrysothila lamellosa*, após um crescimento de 15 dias.

Microalgas	Polissacarídeos totais (g/L)	
		extracelular
<i>Porphyridium purpureum</i>	biomassa	0,30
	extracelular	0,00
<i>Chrysothila lamellosa</i>	biomassa	0,18

Estes polissacarídeos extraídos foram hidrolisados e depois analisados os monossacarídeos constituintes (Tabela 14). Em *Porphyridium purpureum* foram identificados cinco monossacarídeos, arabinose, manose e galactose nos polissacarídeos extracelulares e arabinose e manose nos polissacarídeos extraídos da biomassa. Dos polissacarídeos intracelulares e da parede de *Chrysothila lamellosa* identificou-se apenas o monossacarídeo xilose.

Tabela 14 – Monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos extraídos de *Porphyridium purpureum* e *Chrysothila lamellosa*, identificados por HPLC.

Monossacarídeos	<i>Porphyridium purpureum</i>		<i>Chrysothila lamellosa</i>
	extracelular	biomassa	biomassa
Frutose			
Glucose			
Arabinose	x	x	
Ribose			
Xilose			x
Ramnose			
Manose	x	x	
Galactose	x		

Em anexo (Anexos V e VI) encontram-se os cromatogramas obtidos por HPLC a partir dos quais foi feita a identificação dos monossacarídeos.

4. Quantificação da atividade antioxidante total pelo método de ABTS

No método de ABTS, para os extratos etanólicos das microalgas, a quantificação da atividade antioxidante total foi calculada com base na recta de calibração feita para 350 μ L de amostra (Figura 24) cujo coeficiente de determinação (R^2) é de 0,990.

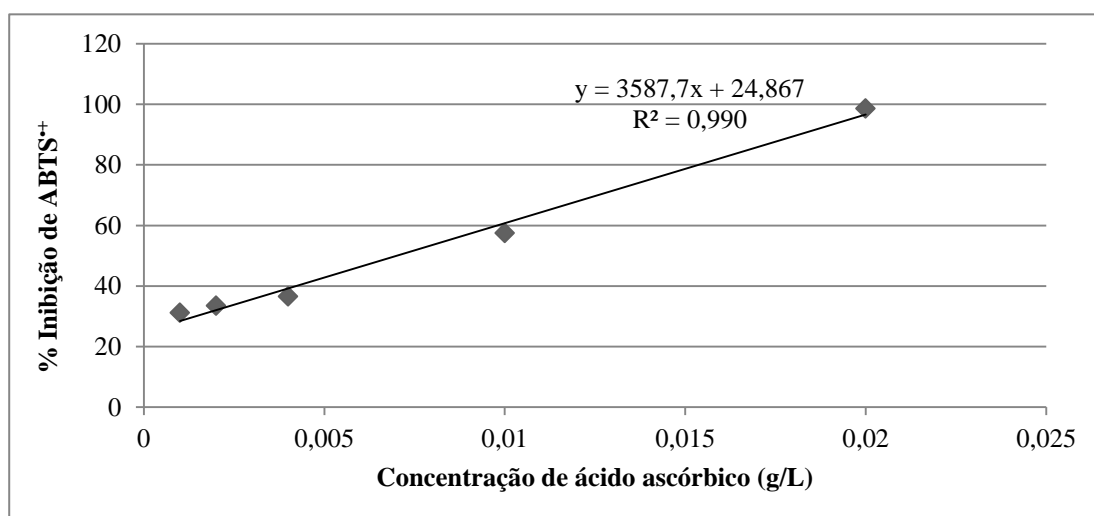


Figura 24 – Retra de calibração para 350 μ L de amostra, utilizada na quantificação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das microalgas.

No caso dos extratos etanólicos dos alimentos diferentes volumes de amostra foram utilizados. Os extratos etanólicos do mirtilo, amora, uva e morango foram analisados com 50 μ L de amostra sendo a reta utilizada para a quantificação da atividade antioxidante a de 50 μ L (R^2 de 0,995) e, no caso dos extratos etanólicos da cenoura e da framboesa foram usados 100 μ L de amostra e conseqüentemente, a reta de calibração correspondente de 100 μ L (R^2 de 0,997). A quantificação da atividade antioxidante do extrato etanólico do tomate foi calculada com a mesma recta utilizada na quantificação dos extratos das microalgas uma vez que se utilizaram 350 μ L de amostra.

A atividade antioxidante total dos extratos etanólicos das microalgas e dos alimentos foi quantificada em mg/L equivalente a ácido ascórbico (Tabela 15). O extrato etanólico de *Porphyridium purpureum* possui um valor de atividade antioxidante

de 9,98mg/L equivalente a ácido ascórbico e o de *Chrysothila lamellosa* de 12,02mg/L equivalente a ácido ascórbico. Nos alimentos, os que alcançaram maiores valores foram os extratos etanólicos do morango e da amora, 55,12 e 60,02mg/L equivalente a ácido ascórbico, respetivamente. Os que têm menores valores são os extratos etanólicos da cenoura (5,98mg/L equivalente a ácido ascórbico) e do tomate (0,44mg/L equivalente a ácido ascórbico).

Tabela 15 – Método de ABTS aplicado a extratos etanólicos com concentração de 10mg de biomassa/mL de etanol das microalgas *Porphyridium purpureum* e *Chrysothila lamellosa* e de alguns alimentos selecionados para comparação da sua atividade antioxidante.

Extratos etanólicos	mg/L equivalente a ácido ascórbico
<i>Porphyridium purpureum</i>	9,98
<i>Chrysothila lamellosa</i>	12,02
Amora	60,02
Cenoura	5,98
Framboesa	16,03
Mirtilo	26,90
Morango	55,12
Tomate	0,44
Uva	34,11

5. Quantificação da atividade antioxidante total pelo método de DPPH

Pelo método de DPPH foram analisados diferentes tipos de extratos das duas microalgas em estudo e extratos etanólicos dos alimentos usados como referência, sendo a sua atividade antioxidante apresentada como percentagem de inibição do radical DPPH[•] (Tabelas 16 e 17). Nos extratos de etanol e de acetona de *Porphyridium purpureum* a percentagem de inibição do radical DPPH[•] aumenta à medida que a concentração do extrato aumenta, obtendo-se um máximo de percentagem de inibição de 13,82 e de 11,18% respetivamente (Tabela 16). No extrato de hexano observa-se que a percentagem de inibição do radical DPPH[•] aumenta à medida que diminui a

concentração do extrato, obtendo-se o valor mais alto de percentagem de inibição (11,96%) para a concentração de 3mg/mL.

Em *Chrysotila lamellosa* para todos os extratos testados verifica-se que a percentagem de inibição do DPPH[•] aumenta à medida que diminui a concentração do extrato, obtendo-se maiores percentagens de inibição de DPPH[•] nos extratos de concentração mais baixa. O valor antioxidante mais elevado nesta espécie foi o do extrato de hexano (16,79% de inibição).

Tabela 16 – Percentagem de inibição de DPPH[•] apresentada pelos extratos de hexano, acetona e etanol de *Porphyridium purpureum* e de *Chrysotila lamellosa*.

Microalgas	Solventes	Concentração do extrato (mg/mL)	% Inibição do DPPH [•]	
<i>Porphyridium purpureum</i>	Hexano	10	7,76	
		7	9,01	
		5	11,02	
		3	11,96	
	Acetona	10	11,18	
		7	10,71	
		5	-	
		3	10,25	
		Etanol	10	13,82
			7	11,18
			5	10,25
			3	-
<i>Chrysotila lamellosa</i>	Hexano	10	9,93	
		7	12,09	
		5	16,79	
		3	-	
	Acetona	10	7,94	
		7	7,76	
		5	8,12	
		3	8,84	
		Etanol	10	6,14
			7	6,86
			5	7,40
			3	7,94

Os extratos etanólicos dos alimentos analisados por este método apresentam percentagens de inibição do DPPH* na ordem dos 12 a 58% (Tabela 17).

Tabela 17 - Percentagem de inibição de DPPH* apresentada pelos extratos etanólicos dos alimentos usados como referência.

Extratos	Concentração do extrato (mg/mL)	% Inibição do DPPH*
	10	49,79
Amora	7	39,80
	5	33,19
	3	27,85
	10	20,82
Cenoura	7	17,16
	5	14,91
	3	-
	10	26,58
Framboesa	7	21,66
	5	18,99
	3	15,61
	10	30,66
Mirtilo	7	25,60
	5	22,64
	3	17,30
	10	58,37
Morango	7	45,71
	5	40,08
	3	27,71
	10	15,47
Tomate	7	13,64
	5	12,66
	3	-
	10	31,93
Uva	7	27,85
	5	24,05
	3	21,10

Em todos os alimentos verifica-se que à medida que a concentração do extrato diminui a sua percentagem de inibição de DPPH* também diminui. O valor mais elevado de percentagem de inibição (58,37%) corresponde ao extrato do morango com concentração de 10mg/mL de etanol e o mais baixo (12,66%) ao extrato do tomate com concentração de 5mg/mL de etanol. Observando todos os alimentos na concentração de 10mg de biomassa/mL de etanol verifica-se que o que possui maior percentagem de inibição de DPPH* é o morango, seguido da amora, da uva, do mirtilo, da framboesa, da cenoura e por último, com menor percentagem de inibição do DPPH* o tomate.

Quando possível foi calculado o valor de EC₅₀, quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH (Tabela 18 e Anexo VII). Para a espécie *Porphyridium purpureum* o valor de EC₅₀ mais baixo foi obtido para o extrato etanólico (66,74mg/mL). No caso dos alimentos, os valores mais baixos foram o da amora (0,71mg/mL) e do morango (9,52mg/mL) e os mais altos os do tomate (83,50mg/mL) e da cenoura (40,46mg/mL).

Tabela 18 – Valores de EC₅₀ em mg de biomassa/mL solvente dos extratos de *Porphyridium purpureum* e dos alimentos.

Extratos	Solventes	EC ₅₀ (mg/mL)
<i>Porphyridium purpureum</i>	Acetona	320,22
	Etanol	66,74
Amora	Etanol	0,71
Cenoura	Etanol	40,46
Framboesa	Etanol	29,55
Mirtilo	Etanol	23,86
Morango	Etanol	9,52
Tomate	Etanol	83,50
Uva	Etanol	25,60

Como referido nos métodos, foram feitos os espectros de absorção de todos os extratos (Figuras 25 e 26 e Anexo VIII).

No extrato de acetona de *Porphyridium purpureum* observam-se três bandas, a 430-440nm, 450-460nm e outra nos 485-490nm (Figura 25A), e no espectro do extrato

de etanol duas bandas, uma entre os 430-440nm e a outra entre 485-490nm (Figura 25B).

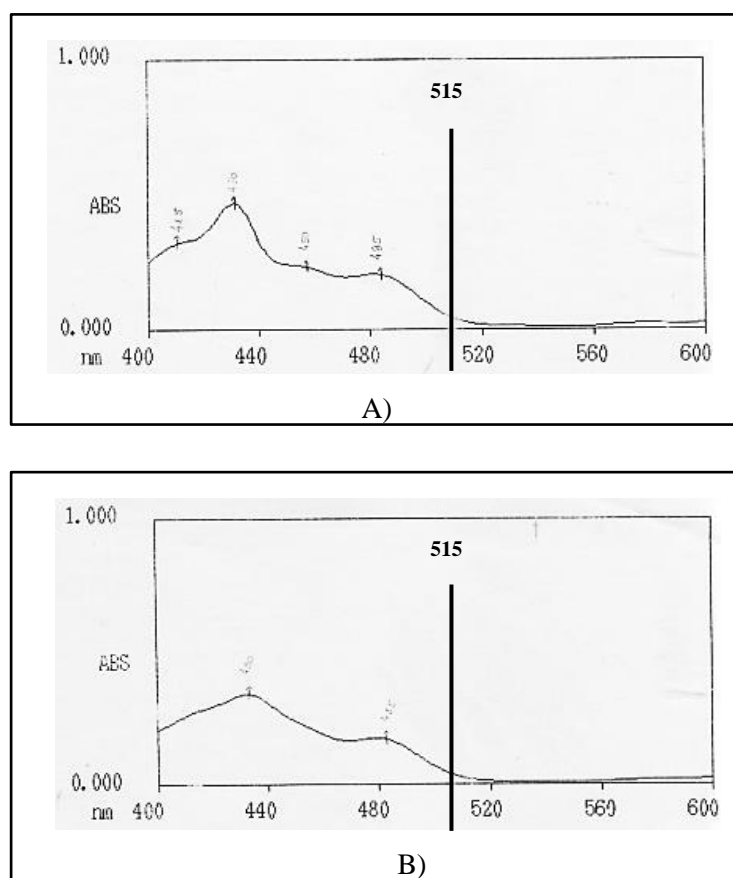


Figura 25 – Espectros de absorção dos extratos de *Porphyridium purpureum*. A) Extrato de acetona; B) Extrato de etanol.

Em *Chrysolita lamellosa* os espectros dos extratos de hexano (Figura 26A) e de acetona (Figura 26B) apresentam ambos três bandas, a 430-440nm, 450-460nm e 480-485nm enquanto o espectro do extrato de etanol (Figura 26C) apresenta duas bandas, a 440nm e a 480-490nm.

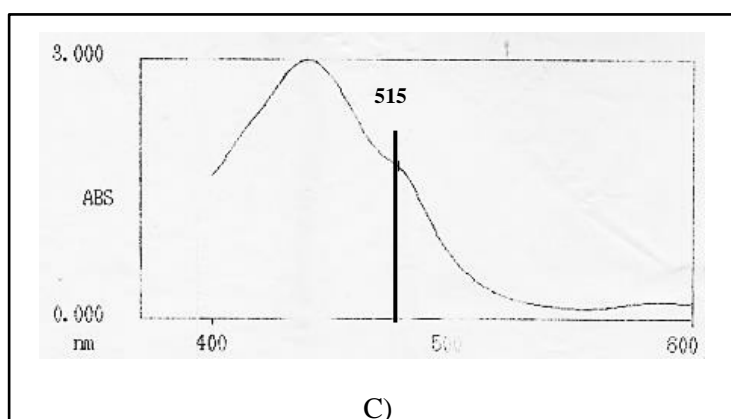
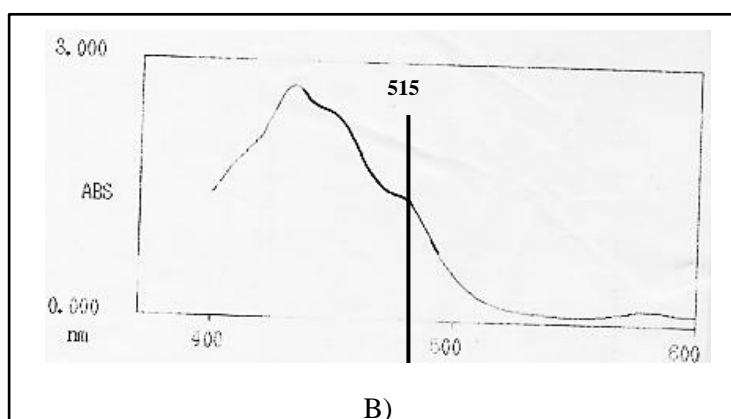
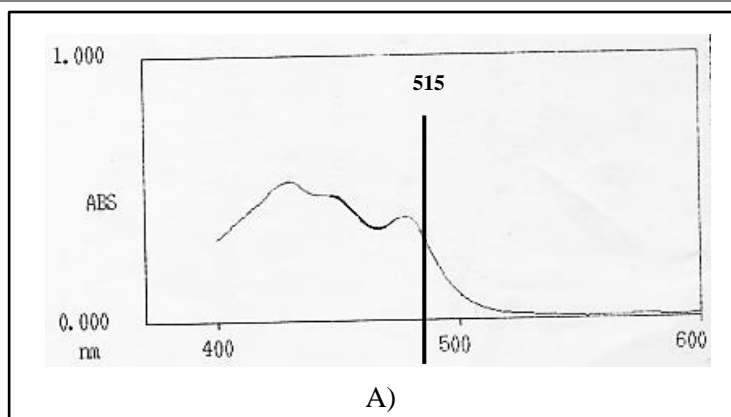


Figura 26 – Espectros de absorção dos extratos de *Chrysolita lamellosa*. A) Extrato hexano; B) Extrato de acetona; C) Extrato de etanol.

6. Caraterização da biomassa total

A análise de biomassa total das duas espécies (Tabela 19) mostra que a massa seca de *Porphyridium purpureum* possui 59,05% de hidratos de carbono, 19,71% de proteína e 1,73% de lípido; no caso de *Chrysotila lamellosa*, 41,17% correspondem a hidratos de carbono, 11,52% a proteína e 2,68% a lípido. Ambas as espécies possuem um conteúdo idêntico de fibra.

Tabela 19 – Caracterização da biomassa total de *Porphyridium purpureum* e de *Chrysotila lamellosa* (resultados em % de massa seca). E.N.A – extratos não azotados (principalmente hidratos carbono).

Microalgas	Cinza	Lípido	Fibra	Proteína	E.N.A.
<i>Porphyridium purpureum</i>	18,57	1,73	0,94	19,71	59,05
<i>Chrysotila lamellosa</i>	43,69	2,68	0,94	11,52	41,17

Discussão

1. Crescimento das culturas

Da análise das curvas de crescimento de *Porphyridium purpureum* (Figuras 18 e 19) e de *Chrysothila lamellosa* (Figuras 20 e 21) verificámos que há diferenças consoante a metodologia envolve ou não lavagem da biomassa. Quando o crescimento foi calculado com base no peso seco da biomassa sem lavagem não se obteve uma curva sigmóide típica do crescimento de microalgas em cultivo tipo “batch” (Andersen, 2005). Tratando-se de microalgas cultivadas em meios salobro ou salino, a quantidade de sal presente no meio de cultura é elevada e o facto de a biomassa não ser lavada deve provocar erros nas pesagens devido à contabilização dos sais como biomassa. As diferenças de peso entre o meio de cultura e as células é tão baixa que se pode tornar insignificante o peso das células, estando-se apenas a analisar o peso dos sais do meio de cultura. Quando a metodologia envolveu lavagem de biomassa obteve-se uma curva sigmóide típica, com diferentes fases identificáveis, uma fase de latência inicial, seguida de fases exponencial, estacionária e de declínio (Andersen, 2005; Barsanti & Gualtieri, 2006).

Da comparação das espécies observa-se que *Porphyridium purpureum* possui uma fase de latência mais longa do que *Chrysothila lamellosa*. Nesta fase o crescimento é mínimo, há uma adaptação do estado fisiológico, do metabolismo celular das células para o crescimento (Barsanti & Gualtieri, 2006). A duração desta fase está relacionada com a concentração e estado fisiológico do inóculo (Andersen, 2005), o que vai de encontro aos nossos resultados uma vez que o número de células com que se iniciou o crescimento de *Chrysothila lamellosa* foi superior (Tabela 9) e o inóculo com que se iniciou o seu cultivo encontrava-se na fase exponencial do crescimento havendo por isso células jovens (Andersen, 2005; Barsanti & Gualtieri, 2006).

A fase exponencial de *Porphyridium purpureum* foi mais curta do que a de *Chrysothila lamellosa*, *Porphyridium purpureum* demorou 3 dias a atingir o seu máximo de crescimento, ao passo que *Chrysothila lamellosa* demorou 6 dias. Esta é a fase em que a microalga se multiplica até atingir uma fase máxima do crescimento, a diferença de duração nas duas espécies indica que *Porphyridium purpureum* possui um crescimento mais rápido. Segue-se a fase estacionária em que o crescimento é mínimo permanecendo relativamente constante no seu valor máximo para ambas as espécies.

Após esta fase, numa curva de crescimento sigmóide típica, ocorre a fase de declínio em que o crescimento é negativo devido à acumulação de produtos de excreção tóxicos e ao esgotamento de nutrientes (Barsanti & Gualtieri, 2006). Esta fase não se observa na curva de *Porphyridium purpureum* e pelo contrário há um aumento do peso seco da biomassa do dia 18 para o dia 21. Uma possível explicação poderá ser o facto de esta microalga acumular grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares na fase estacionária (Jones, 1962; Arad *et al.*, 1988) e mesmo com a lavagem da biomassa haver mucilagem composta essencialmente por polissacarídeos extracelulares que fique presa no filtro e se traduza num aumento de peso após secagem. Na curva de *Chrysothila lamellosa*, a fase estacionária mantém-se não se observando a fase de declínio, no período de tempo considerado.

Quanto à produção de biomassa (Tabela 10) verifica-se que tanto no reator em coluna de 20L como no balão Erlenmeyer de 250mL a produção de biomassa ao fim dos 15 dias de cultivo foi superior em *Porphyridium purpureum*. Observa-se ainda que a produção de biomassa no reator em coluna é superior para ambas as espécies em comparação com a produção em balão Erlenmeyer, o que deve estar relacionado com as diferentes condições nos dois sistemas de cultivo, entre as quais o volume de inóculo inicial, a geometria dos reatores e o borbulhamento de ar. Mirón *et al.* (1999) fizeram uma avaliação comparativa de fotobioreatores em que afirmam que diferenças na altura do borbulhamento do gás e no tamanho das bolhas afectam a penetração da luz, a transferência de massa gás-líquido, a homogeneização e os níveis de resistência à deformação, afectando desta forma as produtividades. Vários estudos (Eriksen, 2008; Ugwu *et al.*, 2008) indicam que fotobioreatores em coluna oferecem uma homogeneização mais eficiente e maiores taxas volumétricas de transferência gasosa, resultando em produtividades superiores e conseqüentemente, maior produção de biomassa total.

Os valores de produção ao final dos 15 dias obtidos para ambas as espécies encontram-se dentro dos valores referidos na bibliografia para as microalgas (Patil *et al.*, 2007; Huerlimann *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012). Num estudo realizado por Razaghi *et al.* em 2014 com *Porphyridium cruentum* cultivado em condições de azoto variáveis, os autores obtiveram produções entre 0,04g/L e 1,22g/L de biomassa, encontrando-se dentro desta gama os valores obtidos para a estirpe estudada de *Porphyridium purpureum*. A comparação das produções de biomassa de *Chrysothila lamellosa* com

valores descritos na bibliografia não foi possível porque não se conhecem estudos de produção para esta microalga.

2. Qualificação e quantificação dos ácidos gordos combinados presentes no lípido

Dos 14 ácidos gordos identificados no lípido de *Porphyridium purpureum* (Tabela 11), os mais abundantes foram o ácido esteárico (C18:0), representando 52,5% do total de ácidos gordos e o ácido palmítico (C16:0) com 33,8%. Estes resultados diferem de outros estudos que indicam o ácido palmítico como o ácido gordo mais abundante nas Rhodophyta (Hu *et al.*, 2008; Kirrolia *et al.*, 2013). Na espécie *Porphyridium cruentum* o ácido palmítico, o ácido araquidónico (C20:4n6) e o ácido eicosapentanóico (C20:5n3) (Cohen, 1990; Otha *et al.*, 1992; Otha *et al.*, 1993; Viso & Marty, 1993; Zhukova & Aizdaicher, 1995; Ginzberg *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2000; Durmaz *et al.*, 2007; Widianingshi *et al.*, 2013) foram referidos como os ácidos gordos mais abundantes, sendo também referida a presença do ácido linoleico (C18:2n6) (Ginzberg *et al.*, 2000). As diferenças verificadas em *Porphyridium purpureum* poderão ser explicadas pela fase do crescimento em que estava a microalga. Segundo os resultados obtidos na monitorização do crescimento de *Porphyridium purpureum* as análises de quantificação de ácidos gordos foram realizadas quando a espécie se encontrava na sua fase estacionária do crescimento (15 dias), altura em que o crescimento cessa devido à limitação de nutrientes e, segundo Otha *et al.* (1993), em condições de limitação do crescimento ocorre um aumento da concentração de ácidos gordos C18.

Os valores de ácido araquidónico (C20:4n6) e ácido eicosapentanóico (C20:5n3) obtidos para *Porphyridium purpureum* foram mais baixos do que os descritos na bibliografia (Cohen, 1990; Otha *et al.*, 1992; Otha *et al.*, 1993; Viso & Marty, 1993; Zhukova & Aizdaicher, 1995; Ginzberg *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2000; Durmaz *et al.*, 2007; Widianingshi *et al.*, 2013), representando apenas 2,9% do total de ácidos gordos e 0,6% respetivamente. Esta diferença pode ser explicada pelas diferentes condições de cultivo, uma vez que a concentração de ácido eicosapentanóico (C20:5n3) de *Porphyridium purpureum* é influenciada por diferentes salinidades, concentrações de nitratos, pH e temperatura (Otha *et al.*, 1993; Nuutila *et al.*, 1997; Durmaz *et al.*, 2007)

e as condições de cultivo neste estudo não foram otimizadas nem para a produção de biomassa nem de compostos de interesse.

Contudo, as proporções entre ácido araquidónico (C20:4n6) e ácido eicosapentanóico (C20:5n3) estão de acordo com o referido na bibliografia, sendo conhecido que outras estirpes de *Porphyridium purpureum* possuem maiores quantidades de ácido araquidónico e menores quantidades de ácido eicosapentanóico na fase estacionária do crescimento (Cohen, 1990; Nuutila *et al.*, 1997).

Do total de ácidos gordos identificados, *Porphyridium purpureum* possui elevadas quantidades de ácidos gordos saturados (SAFA's), resultante das elevadas quantidades dos ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), e baixas quantidades de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA's) e polinsaturados (PUFA's). Estes resultados são diferentes do referido na bibliografia uma vez que, segundo Lv *et al.* (2010), as microalgas possuem maiores quantidades de ácidos gordos saturados (SAFA's) na fase exponencial do crescimento e maiores quantidades de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) na fase estacionária. As análises dos ácidos gordos de *Porphyridium purpureum* foram realizadas na fase estacionária do crescimento logo seria de prever uma maior quantidade de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), o que não se verificou. Estas diferenças entre os resultados obtidos para *Porphyridium purpureum* e a bibliografia também podem estar relacionados com erros na estimativa das fases de crescimento, podendo as análises ter sido realizadas no início da fase estacionária ou na transição da fase exponencial para a fase estacionária.

Nas microalgas pertencentes ao filo Haptophyta no qual se inclui *Chrysothila lamellosa*, os ácidos gordos mais abundantes que têm sido referidos são o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico (C16:1) e o ácido oleico (C18:1n9c) (Hu *et al.*, 2008). Em *Chrysothilla lamellosa* ACOI foram identificados 17 ácidos gordos (Tabela 12), sendo os mais abundantes o ácido palmítico, representando 26,4% do total de ácidos gordos e o ácido esteárico (C18:0) com 46,5%, não se tendo identificado ácido palmitoléico e o ácido oleico apenas representando 3,5% do total de ácidos gordos. Obtiveram-se também quantidades significativas de ácido eicosadienóico (C20:2) e ácido docosahexanóico (C22:6n3).

Apenas num estudo realizado por Viso & Marty (1993) se encontrou referência a uma estirpe de *Chrysothila lamellosa* na qual foram identificados 19 ácidos gordos, dos quais 10 também foram encontrados em *Chrysothila lamellosa* ACOI. Nesse estudo os ácidos gordos mais abundantes foram o ácido mirístico (C14:0), o ácido palmítico

(C16:0) e o ácido oleico (C18:1n9c), resultados diferentes dos obtidos em *Chrysothila lamellosa* ACOI na qual não se identificou ácido mirístico e os ácidos mais abundantes foram o ácido palmítico e o ácido esteárico (C18:0), como referido antes.

O género *Pavlova*, também representante do filo Haptophyta, tem sido amplamente estudado devido à sua capacidade de acumulação de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) em especial ácido eicosapentaóico (C20:5n3) e ácido docosahexanóico (C22:6n3), sendo utilizado frequentemente em aquacultura (Guedes *et al.*, 2010). Da comparação dos resultados obtidos para *Chrysothila lamellosa* ACOI com estudos realizados em *Pavlova* (Guedes *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012) observam-se semelhanças. O ácido gordo mais abundante em *Pavlova* é o palmítico (C16:0), também um dos mais abundantes em *Chrysothila lamellosa* ACOI. De igual modo, as quantidades de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), em ambos os casos, são superiores à de monoinsaturados (MUFA's).

Com efeito, da análise do total de ácidos gordos saturados (SAFA's), monoinsaturados (MUFA's) e polinsaturados (PUFA's) observou-se que *Chrysothila lamellosa* ACOI possui quantidades elevadas de ácidos gordos saturados (SAFA's), resultante da abundância do ácido palmítico (C16:0) e do ácido esteárico (C18:0), menores teores de polinsaturados (PUFA's) e muito pouca quantidade de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA's). Resultados semelhantes quanto aos ácidos gordos saturados (SAFA's) foram observados no estudo de Viso e Marty (1993), contudo no que se refere aos outros dois tipos aqueles autores obtiveram quantidades mais elevadas de monoinsaturados (MUFA's) do que de polinsaturados (PUFA's). Isto poderá ser explicado pela abundância do ácido oleico (C18:1n9c) detetado naquele estudo.

Em relação aos ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), em específico os ácidos eicosapentaóico (C20:5n3) e docosahexanóico (C22:6n3) observa-se que *Chrysothila lamellosa* ACOI possui quantidades superiores de ácido docosahexanóico do que de eicosapentaóico, representando 6,4% do total de ácidos gordos e 0,6%, respetivamente. Resultados idênticos foram obtidos no estudo de Viso e Marty (1993), ao passo que resultados contrários são obtidos para o género *Pavlova* (Guedes *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012).

Segundo Hu *et al.*, (2008) a composição em ácidos gordos das microalgas pode variar tanto quantitativamente como qualitativamente em resposta às condições de cultivo e ao estado fisiológico das células, o que pode explicar as diferenças de resultados obtidas tanto para *Porphyridium purpureum* como para *Chrysothila lamellosa*

em relação à bibliografia disponível. Variações da estirpe, condições de cultivo, desenho experimental e método de extração e análise de lípido tornam as comparações quantitativas dos ácidos gordos muito difíceis (Lim *et al.*, 2012; Ryckebosch *et al.*, 2014). A extração, identificação e quantificação dos ésteres de metilo dos ácidos gordos para ambas as espécies com base em biomassa não seca pode também ser uma explicação para as diferenças obtidas com outros estudos (Cohen, 1990; Otha *et al.*, 1992; Otha *et al.*, 1993; Viso & Marty, 1993; Ginzberg *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2000; Durmaz *et al.*, 2007).

Comparando os nossos resultados de quantificação com outro estudo no qual se utilizou a biomassa não seca para extração e quantificação dos ácidos gordos (Lim *et al.*, 2012), os valores obtidos encontram-se dentro dos referidos no estudo.

Do ponto de vista biotecnológico podemos antever que nenhuma das espécies estudadas apresenta um perfil de ácidos gordos ideal para produção de biodiesel, nas condições em que foram estudadas, uma vez que possuem elevadas percentagens de ácidos gordos saturados (SAFA's), percentagens relativamente elevadas de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) e muito baixas percentagens de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA's). Segundo um estudo realizado por Stansell *et al.*, (2012) uma boa microalga para produção de biodiesel deve conter elevadas concentrações de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA's) (ácido palmitoleico (C16:1) e ácido oleico (C18:1n9c) e baixas concentrações de todos os outros tipos de ácidos gordos. Contudo ambas as microalgas são potencialmente interessantes a nível nutricional uma vez que possuem quantidades significativas de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) ω 3 e ω 6, em especial os ácidos araquidónico (C20:4n6), eicosapentanoico (C20:5n3) e docosahexanoico (C22:6n3).

3. Extração de polissacarídeos e análise dos monossacarídeos constituintes após hidrólise

Das duas microalgas em estudo, *Porphyridium purpureum* foi a que teve maior produção de polissacarídeos totais, obtendo-se 0,68g/L de polissacarídeos extracelulares e 0,30g/L de polissacarídeos extraídos da biomassa, valores superiores aos referidos na bibliografia. You & Barnett (2004) estudaram o efeito da luz no crescimento e produção de polissacarídeos extracelulares de *Porphyridium cruentum* e obtiveram produções

entre 0,18-0,95 g/L, enquanto que Jones (1962) obteve produções de polissacarídeos extracelulares de 0,12-0,16g/L também para *Porphyridium cruentum*.

No caso de *Chrysochloa lamellosa* apenas se obtiveram polissacarídeos da biomassa. Não foi encontrada nenhuma referência sobre polissacarídeos / monossacarídeos nesta espécie, apenas num outro representante das Haptophyta, *Isochrysis galbana*, em que a produção de polissacarídeos foi de 0,025g/L (Guillard & Wangersky, 1958), valor muito inferior ao obtido para *Chrysochloa lamellosa* (0,18g/L).

A produção de polissacarídeos está relacionada com as condições de cultivo e a fase de crescimento da microalga. Os principais fatores associados ao cultivo são a luz e a concentração de azoto no meio de cultura (Arad *et al.*, 1988; You & Barnett, 2004). Baixas quantidades de polissacarídeos são produzidas durante a fase de crescimento activo e divisão celular (fase exponencial) ao contrário da fase estacionária em que são produzidas maiores quantidades de polissacarídeos (Metting Jr, 1996).

Após hidrólise dos polissacarídeos foram identificados os monossacarídeos constituintes, em *Porphyridium purpureum* tendo sido identificados arabinose, manose e galactose nos polissacarídeos extracelulares e apenas arabinose e manose nos obtidos da biomassa. Nos polissacarídeos extracelulares de *Porphyridium cruentum* e *Porphyridium* sp. têm sido referidos pelo menos dez monossacarídeos, sendo os mais abundantes a xilose, glucose e galactose (Percival & Foile, 1979; Geresh *et al.*, 2002a; Geresh *et al.*, 2002b; Geresh *et al.*, 2009; Gloagen *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009; Gouveia *et al.*, 2010; Pignolet *et al.*, 2013). Outros autores também identificaram quantidades significativas de manose e ramnose (Geresh & Arad, 1991), manose, arabinose e ribose (Arad & Levy-Ontman, 2010) e manose, ramnose e arabinose (Etshola *et al.*, 1998).

Um estudo mais recente realizado por Raposo *et al.* (2014) em que foi estudada a influência do sulfato na composição e nas propriedades antivirais e antibacterianas dos polissacarídeos extracelulares de duas estirpes de *Porphyridium cruentum* revelou uma composição de monossacarídeos diferente, indicando como mais abundantes a galactose, a glucose e a arabinose e baixas quantidades de manose, fucose, xilose e ramnose.

Como monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos extraídos da biomassa de *Chrysochloa lamellosa* apenas se identificou a xilose. Pouca informação sobre polissacarídeos e monossacarídeos de microalgas do grupo das Haptophyta é encontrada. Em 2010, Yu *et al.* realizaram um estudo sobre a composição química e

compostos bioativos de uma estirpe de *Isochrysis galbana* do Taiwan, a análise dos monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos produzidos revelou como mais abundantes galactose, glucose, manose e xilose e, em menores quantidades, ramnose e arabinose.

Os monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos são muito diversos e podem variar com a fase de crescimento da microalga (Gouveia *et al.*, 2010). O método de extração dos polissacarídeos e o processo de hidrólise são também fatores que influenciam os resultados.

4. Quantificação da atividade antioxidante total

Os métodos ABTS e DPPH foram escolhidos para avaliação da capacidade antioxidante dos extratos das microalgas em estudo uma vez que são os mais adequados para avaliar a atividade antioxidante de alimentos, em especial frutas frescas e vegetais (Thaipong *et al.*, 2006; Walker & Everette, 2009). DPPH é também muito usado para determinar a atividade antioxidante de compostos fenólicos e de extratos de plantas naturais (Shalaby & Shanab, 2013). Ambos os métodos determinam a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (Prior *et al.*, 2005; Kedare & Singh, 2011).

Sabe-se que os carotenóides são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante das microalgas (Goiris *et al.*, 2012), contudo não podemos afirmar que são estes os compostos responsáveis pela atividade antioxidante demonstrada por *Porphyridium purpureum* e *Chrysolita lamellosa* uma vez que não foi feita a análise do seu conteúdo em carotenóides. Outros compostos poderão estar envolvidos, entre os quais enzimas, compostos fenólicos (Goiris *et al.*, 2012), ubiquinonas (Klein *et al.*, 2012), vitaminas C e E, florotaninos, ácidos gordos polinsaturados e polissacarídeos (Guedes *et al.*, 2013a).

Pelo método de ABTS apenas foi possível determinar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos, uma vez que o hexano e a acetona não eram solúveis na solução de ABTS^{•+}. A insolubilidade do hexano e da acetona na solução de ABTS^{•+} deve-se ao facto de a solução ter sido preparada com água destilada, o que segundo Guedes *et al.* (2013a) é uma solução do radical (ABTS^{•+}) bastante estável durante, pelo menos, 16 horas. Por este método, o extrato etanólico de *Chrysolita lamellosa* apresentou atividade

antioxidante de 12,02mg/L equivalente a ácido ascórbico, superior ao do extrato de *Porphyridium purpureum* que foi de 9,98mg/L equivalente a ácido ascórbico.

A comparação destes resultados com outros estudos é difícil uma vez que cada grupo de investigadores apresenta os resultados em unidades diferentes. Por exemplo, Goiris *et al.*, (2012) expressam os resultados do método de ABTS em μmol equivalente a Trolox/g biomassa seca enquanto Guedes *et al.* (2013b) fazem em mg/L equivalente a ácido ascórbico/ μg clorofila a. O padrão recomendado pelo método de ABTS original é o Trolox, contudo foi utilizado o ácido ascórbico por disponibilidade do mesmo, também é o mais usado na indústria alimentar, porque os resultados são reprodutíveis, a preparação da solução é fácil e a solução final exhibe uma elevada estabilidade (Guedes *et al.*, 2013a). Sendo difícil a comparação com outros estudos optou-se pela comparação dos valores obtidos com os de alguns alimentos conhecidos pelo seu elevado teor antioxidante, tendo-se concluído que o extrato etanólico de *Porphyridium purpureum* possui uma atividade antioxidante superior ao extrato de cenoura cujo valor é de 5,98mg/L equivalente a ácido ascórbico, e que o extrato de *Chrysothilla lamellosa* apresenta atividade antioxidante próxima do extrato de framboesa, cujo valor é de 16,03mg/L equivalente a ácido ascórbico.

O método de DPPH não se revelou eficiente para alguns dos extratos em estudo. Nos extratos de *Chrysothilla lamellosa* (hexano, acetona e etanol) e no extrato de hexano de *Porphyridium purpureum* observou-se que à medida que a concentração do extrato diminuía a sua capacidade para inibir o DPPH^{*} aumentava (Tabela 15), quando se esperaria que acontecesse o contrário. Alguns estudos já tinham mencionado este problema (Marxen *et al.*, 2007; Jaime *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2011) que está relacionado com a sobreposição dos espectros de absorção no visível dos extratos com o DPPH, a 515nm (Prior *et al.*, 2005). Feita a leitura dos espectros de absorção dos extratos observou-se que tal acontecia com os de *Chrysothilla lamellosa* (Figura 26), contudo o mesmo não se verificou para o extrato de hexano de *Porphyridium purpureum*. O espectro deste extrato não se sobrepõe ao DPPH a 515nm, pelo contrário entre 400-600nm não é detetada qualquer absorção e, no entanto, apresentou capacidade de inibição de DPPH que aumentava à medida que a concentração do extrato diminuía. Tratando-se de um solvente apolar supõe-se que os compostos presentes no extrato sejam solúveis em solventes apolares e que não possuam cor, o que explica o espectro de absorção obtido, não explicando contudo, a interferência que faz com o DPPH. Não

foi encontrado nenhum estudo que mencionasse um problema parecido, o que leva a supor que se possa tratar de um erro e aponta para a necessidade de repetição dos testes.

Embora nos extratos de *Chrysothila lamellosa* o método de DPPH não se tenha revelado eficiente é de frisar que em todas as concentrações houve inibição do DPPH[•] o que pode indicar que o extrato possui atividade antioxidante embora esta não possa ser quantificada por este método.

Os resultados dos extratos de etanol e acetona de *Porphyridium purpureum* demonstram que o extrato etanólico é o que possui percentagem de inibição de DPPH[•] superior, traduzindo-se num valor de EC₅₀ menor (66,74mg/mL). Neste caso podemos supor que os compostos responsáveis pela elevada atividade antioxidante sejam as substâncias solúveis em etanol, por exemplo alguns carotenóides (xantofilas) e ácidos gordos (Marxen *et al.*, 2007). Comparando com os valores de EC₅₀ dos alimentos, o extrato etanólico de *Porphyridium purpureum* possui um valor inferior ao extrato etanólico do tomate (83,50mg/mL) indicando, portanto, uma maior capacidade para reduzir o DPPH em 50%.

Estudos do género em *Porphyridium* têm sido realizados focando-se em compostos específicos. O de Tannin-Spitz *et al.* (2005) focou-se na capacidade dos polissacarídeos sulfatados de *Porphyridium* inibirem a auto-oxidação do ácido linoleico pelos métodos TBA (ácido tiobarbitúrico) e FOX (oxidação ferrosa), tendo sido obtidos 45% de inibição pelo método TBA, com 10mg/mL de polissacarídeos, *versus* 45% e 87% de inibição, com 2 e 10mg/mL de polissacarídeos, respetivamente, pelo método FOX. Klein *et al.* (2012) focaram-se na otimização da produção de ubiquinonas por *Porphyridium purpureum*, em específico na Coenzima Q₁₀, um potente antioxidante.

Tanto quanto foi possível apurar este é o primeiro estudo de atividade antioxidante em *Chrysothila lamellosa*. Sabe-se que as microalgas do filo Haptophyta são ricas em fucoxantina, um carotenóide conhecido por possuir elevada atividade antioxidante (Goiris *et al.*, 2012). Sun *et al.*, (2014) realizaram um estudo com *Pavlova viridis* e *Sarcinochrysis marina* demonstrando a capacidade antioxidante de polissacarídeos degradados nestas algas.

Marxen *et al.*, (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos metanólicos de várias microalgas pelo método de DPPH, apresentando resultados de EC₅₀ por g de extrato. Estes autores obtiveram para *Isochrysis galbana* (Haptophyta) valores de EC₅₀ entre 0,977-1,288g extrato e para *Porphyridium purpureum* valores entre 0,992-5,234g extrato, verificando que *Isochrysis galbana* possui maior capacidade

antioxidante do que *Porphyridium purpureum*. Xia *et al.* (2013) realizaram um estudo sobre a produção, caracterização e atividade antioxidante pelo método de DPPH de fucoxantina obtida da diatomácea *Odontella aurita* e obtiveram percentagens de inibição de DPPH[•] entre 15-70% dependendo da concentração de fucoxantina (0,02-0,2mg/mL). Também Shanab *et al.*, (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos aquosos de várias espécies de cianobacterias e obtiveram percentagens de inibição de DPPH[•] entre 50-75%.

No presente estudo, utilizando o método de DPPH, não foi possível saber qual das duas microalgas possuía maior atividade antioxidante, devido à não eficácia deste método para *Chrysolita lamellosa*. Contudo, pelo método de ABTS, verificou-se que *Chrysolita lamellosa* possuía maior atividade antioxidante do que *Porphyridium purpureum*.

Vários fatores influenciam a avaliação da capacidade antioxidante de uma microalga, nomeadamente as condições de cultivo e a fase do crescimento em que são extraídos os compostos para determinação dessa capacidade (Guedes *et al.*, 2011c; Shanab *et al.*, 2012).

5. Caraterização da biomassa total

A caracterização da biomassa de *Porphyridium purpureum* (Tabela 19) mostrou que a biomassa seca desta microalga possui como principal componente hidratos de carbono compondo 59,05% da biomassa seca, sendo 19,71% de proteína e apenas 1,73% de lípido. Os resultados obtidos vão de encontro aos estudos realizados para *Porphyridium cruentum*, em que se verificam maiores quantidades de hidratos de carbono e menores de lípido (Durmaz *et al.*, 2007; Ginzberg *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2000). Contudo, comparando valores de percentagem de biomassa seca, os obtidos para *Porphyridium purpureum* são relativamente mais baixos do que os referidos na bibliografia. A biomassa de *Phorphyridium cruentum* é referenciada como sendo representada por 32-65% de hidratos de carbono, 15-39% de proteína e 7-14% de lípido (Durmaz *et al.*, 2007; Ginzberg *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2000; Chácon-Lee & Gonzalez-Mariño, 2010). A diferença de valores pode ser explicada pelas diferentes condições de cultivo em especial da luz e temperatura que segundo Durmaz *et al.* (2007) fazem variar a composição química da biomassa.

A biomassa de *Chrysothila lamellosa* apresentou 41,17% de hidratos de carbono, 11,52% de proteína e 2,68% de lípido. Comparando *Chrysothila lamellosa* com uma outra espécie estudada pertencente às Haptophyta, *Isochrysis galbana*, verifica-se que a biomassa desta espécie é composta essencialmente por proteína (26,99%), e percentagens idênticas de hidratos de carbono (16,98%) e lípido (17,16%) (Tokusoglu & Ünal, 2003).

Em ambas as espécies, *Porphyridium purpureum* e *Chrysothila lamellosa*, verifica-se uma elevada percentagem de extratos não azotados (E.N.A.) constituídos essencialmente por hidratos de carbono e uma baixa percentagem de lípido. Tendo sido as duas espécies analisadas na fase estacionária do seu crescimento, segundo Lv *et al.* (2010) maior concentração de lípido seria de esperar, contudo o contrário é indicado por Metting Jr (1996) que diz que nesta fase há maior produção de polissacarídeos. Ambos os resultados podem ser explicados pelo uso que o metabolismo das células dá ao carbono disponível. Segundo Hermann-Krauss *et al.* (2013) uma elevada produção de hidratos de carbono implica uma menor produção de lípido uma vez que o carbono disponível é utilizado na síntese de hidratos de carbono e não de lípido. Outra explicação para as diferenças de resultados obtidas pelos autores, são os diferentes métodos usados na avaliação de cada parâmetro que podem ser mais ou menos eficazes na análise do composto (Laurens *et al.*, 2012). Por exemplo, Fuente *et al.* (2000), fez a avaliação do total de lípido determinado por extração com solventes em Soxhlet contudo utilizou uma mistura de clorofórmio:metanol, em vez do hexano usado no presente estudo e obteve uma percentagem de lípido para *Porphyridium cruentum* de 6,53%, superior à obtida para *Porphyridium purpureum*.

Comparando a composição química (hidratos de carbono, proteína e lípido) da biomassa das duas espécies envolvidas no estudo com a de alimentos comuns entre os quais: fermento com 38% hidratos de carbono, 39% proteína e 1% lípido; carne com 1% hidratos de carbono, 43% proteína e 34% lípido; ovo com 4% hidratos de carbono, 47% proteína e 41% lípido; leite com 38% hidratos de carbono, 26% de proteína e 28% de lípido; arroz com 77% hidratos de carbono, 8% de proteína e 2% de lípido e a soja com 30% hidratos de carbono, 37% de proteína e 20% de lípido (Chácon-Lee & González-Mariño, 2010) verifica-se que tanto *Porphyridium purpureum* como *Chrysothila lamellosa* possuem valores parecidos com os obtidos para o arroz com a diferença de que as microalgas possuem percentagens superiores de proteína.

Conclusões

Este estudo permitiu concluir que ambas as estirpes ACOI possuem um potencial biotecnológico interessante.

Porphyridium purpureum ACOI/SAG 1380 demonstrou ser uma espécie com crescimento rápido, demorando três dias desde o início da fase exponencial até atingir o seu valor máximo de crescimento, e com um significativo valor de produção de biomassa de 0,79g/L em reator de 20L e de 0,50g/L em balão Erlenmeyer de 250mL, após 15 dias de cultivo. Na fase estacionária do crescimento é uma estirpe que produz ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) ω 3 e ω 6, em especial o ácido araquidónico (C20:4 ω 6) e o ácido eicosapentanóico (C20:5 ω 3), demonstrando também uma elevada produção de polissacarídeos extracelulares (0,68g/L). O seu extrato etanólico mostrou atividade antioxidante superior ao extrato etanólico da cenoura e as análises à sua biomassa revelaram um teor elevado de hidratos de carbono, 59,05% e 19,71% de proteína.

Chrysothila lamellosa ACOI 339 apresentou um crescimento mais lento, demorando seis dias desde o início da fase exponencial até atingir o seu valor máximo de crescimento, contudo apresenta uma boa produção de biomassa de 0,64g/L em reator de 20L e 0,40g/L em balão Erlenmeyer, após 15 dias de cultivo. Na fase estacionária do crescimento também se verificou que esta espécie é produtora de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's) ω 3, em especial o ácido eicosapentanóico (C20:5 ω 3) e o ácido docosahexanóico (C22:6 ω 3). O extrato demonstrou capacidade antioxidante equivalente ao extrato da framboesa e a análise à sua biomassa revelou 41,17% de hidratos de carbono e 11,52% de proteína.

É de mencionar ainda que o cultivo e a análise destas espécies não foram realizados em condições ótimas de crescimento, sendo de prever resultados mais interessantes após otimização do seu cultivo.

Futuramente, será interessante otimizar o cultivo de ambas as estirpes e a produção dos compostos de interesse, por forma a confirmar o potencial nutricional e se poder considerar a sua incorporação na alimentação humana e/ ou animal.

Bibliografia

Amaro, H.M., Guedes, A.C. & Malcata, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88, 3402-3410.

Andersen, R.A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, USA.

AOAC International (1990). Chapter III – Plants *In: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15ª edição. Washington DC. Association of Official Analytical Chemists.

Arad, S.M., Friedman, O.D. & Rotem, A. (1988). Effect of nitrogen on polysaccharide production in a *Porphyridium* sp.. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2411-2414.

Arad, S.M. & Levy-Ontman, O. (2010). Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 358-364.

Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2006). *Algae – Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor and Francis Group, USA.

Becker, W. (2004). Microalgae in Human and Animal Nutrition *In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, A. Richmond (Ed.). Blackwell Publishing Ltd. Pp. 312-364.

Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. 4ª edição. Springer.

Bourrelly, P. (1981). Les algues d'eau douce – Tome II: Les algues jaunes et brunes, Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées. Société Nouvelle des Éditions Boubée, Paris.

Bourrelly, P. (1985). Les algues d'eau douce – Tome III: Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. Société Nouvelle des Éditions Boubée, Paris.

Brand-Williams, W., Cuvielier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.

Bronchart, R. & Demoulin, V. (1977). Unusual mitosis in the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nature*, 268, 80-81.

- Bronchart, R. & Demoulin, V. (1980). Reevaluation of mitosis in the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nature*, 283, 409-410.
- Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G. & Wright, P.C. (2001). Marine cyanobacteria – a prolific source of natural compounds. *Tetrahedron*, 57, 9347-9377.
- CEN (2009). *European Committee for Standardization*. World-wide electronic publication, Brussels. <http://www.cen.eu>; searched on 6 June 2013.
- Chácon-Lee, T.L. & González-Mariño, G.E. (2010). Microalgae for “healthy” foods – possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9.
- Chapman, R.L. & Lang, N.J. (1973). Virus-like particles and nuclear inclusions in the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross. *Journal of Phycology*, 9, 117-122.
- Chen, B., You, W., Huang, J., Yu, Y. & Chen, W. (2010). Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.26, 833-840.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I. & Florou-Paneri, P. (2012). Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 5-11.
- Cohen, Z. (1990). The production potential of eicosapentanoic and arachidonic acids by the red microalgae *Porphyridium cruentum*. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 67, 916-920.
- Das, U.N. (2006). Essential fatty acids – a review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, 467-482.
- Dewapriya, P. & Kim, S. (2014). Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. *Food Research International*, 56, 115-125.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C. & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951-962.

Durmaz, Y., Monteiro, M., Bandarra, N., Gökpinar, S. & Isik, O. (2007). The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga, *Porphyridium cruentum*. *Journal of Phycology*, 19, 223-227.

Eriksen, N.T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30, 1525-1536.

Eteshola, E., Karpasas, M., Arad, S.M. & Gottlieb, M. (1998). Red microalga exopolysaccharides: 2. Study of rheology, morphology and thermal gelation of aqueous preparations. *Acta Polymerica*, 49, 549-556.

Fernández-Sevilla, J.M., Fernández, F.G.A. & Grima, E.M. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 27-40.

Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M. & Raymundo, A. (2013). *Isochrysis galbana* and *Dicronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT – Food Science and Technology*, 50, 312-319.

Fuentes, M.M.R., Fernández, G.G.A., Pérez, J.A.S. & Guerrero, J.L.G. (2000). Biomass nutriente profile of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70, 345-353.

Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E. & Zenk, M.H. (1988) Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology*, 150, 197-202.

Geresh, S., Adin, I., Yarmolinsky, E. & Karpasas, M. (2002b). Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 50, 183-189.

Geresh, S. & Arad, S.M. (1991). The extracellular polysaccharides of the red microalgae: chemistry and rheology. *Bioresource Technology*, 38, 195-201.

Geresh, S., Arad, S.M., Levy-Ontman, O., Zhang, W., Tekoah, Y. & Glaser, R. (2009). Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp.. *Carbohydrate Research*, 344, 343-349.

- Geresh, S., Mamontov, A. & Weinstein, J. (2002a). Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50, 179-187.
- Ginzberg, A., Cohen, M., Sod-Moriah, U., Shany, S., Rosenshtrauch, A. & Arad, S. (2000). Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *Journal of Applied Phycology*, 12, 325-330.
- Gloaguen, V., Ruiz, G., Morvan, H., Mouradi-Givemaud, A., Maes, E., Krausz, P. & Strecker, G. (2004). The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydrate Research*, 339, 97-103.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., Brabander, J.D. & Cooman, L.D. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1477-1486.
- Gouveia, L. (2011). *Microalgae as feedstock for biofuels*. Springer, London.
- Gouveia, L., Marques, A.E., Sousa, J.M., Moura, P. & Bandarra, N.M. (2010). Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7, 21-37.
- Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M.A., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G. & Pollio, A. (2013). Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food & Function*, 4, 144-152.
- Green, J.C. & Course, P.A. (1983). Extracellular calcification in *Chrysothila lamellosa* (Prymnesiophyceae). *British Phycological Journal*, 18, 367-382.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Gião, M.S. & Malcata, F.X. (2013a). Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry*, 138, 638-643.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. & Malcata, F.X. (2011a). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9, 625-644.

- Guedes, A.C., Amaro, H.M. & Malcata, F.X. (2011b). Microalgae as sources of high added-value compounds – a brief review of recent work. *Biotechnology Progress*, 27, 597-613.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Pereira, R.D. & Malcata, F.X. (2011c). Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biotechnology Progress*, 27, 1218-1224.
- Guedes, A.C., Gião, M.S., Seabra, R., Ferreira, A.C.S., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P. & Malcata, F.X. (2013b). Evaluation of antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Marine Drugs*, 11, 1256-1270.
- Guedes, A.C. & Malcata, F.X. (2012). Nutritional value and uses of microalgae in Aquaculture *In: Aquaculture*, Z.A. Muchlisin (Ed.). InTech. Pp. 59-78.
- Guedes, A.C., Meireles, L.A., Amaro, H.M. & Malcata, F.X. (2010). Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 791-801.
- Guillard, R.R.L. & Wangersky, P.J. (1958). The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. *Limnology and Oceanography*, 3, 449-454.
- Guschina, I.A. & Harwood, J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45, 160-186.
- Hermann-Krauss, C., Koller, M., Muhr, A., Fasl, H., Stelzer, F. & Braunegg, G. (2013). Archeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co- and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. *Archea*, 1-10.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54, 621-639.
- Huerlimann, R., Nys, R. & Heimann, K. (2010). Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of Tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and Bioengineering*, 107, 245-257.
- Ibañez, E. & Cifuentes, A. (2012). Benefits of using algae as a natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 703-709.

Jaime, L., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Santoyo, S., Suarez, S., Ibáñez, E. & Señorans, F.J. (2010). Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematacoccus pluviialis* microalgae. *LWT Food Science and Technology*, 43, 105-112.

J.L. Harwood in Harwood, J.L. & Weselake, R.J. (2013). *LipidLibrary*. World-wide electronic publication, American Oil Chemists' Society (AOCS), United States of America. <http://lipidlibrary.aocs.org>; searched on 21 May 2013.

Jones, R.F. (1962). Extracellular mucilage of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 60, 61-64.

Kedare, S.B. & Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food and Science Technology*, 48, 412-422.

Kellam, S.J., Cannel, R.J.P., Owsianka, A.M. & Walker, J.M. (1988). Results of a large-scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal*, 23, 45-47.

Khozin-Goldberg, I., Iskandarow, U. & Cohen, Z. (2011). LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 905-915.

Kirrolia, A., Bishnoi, N.R. & Singh, R. (2013). Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 20, 642-656.

Klein, B.C., Walter, C., Lange, H.A. & Buchholz, R. (2012). Microalgae as natural sources for antioxidative compounds. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1133-1139.

Lang, I., Hodac, L., Friedl, T. & Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology*, 11.

Laurens, L.M.L., Dempster, T.A., Jones, H.D.T., Wolfrum, E.J., Wychen, S.V., McAllister, J.S.P., Recenberger, M., Parchert, K.J. & Gloe, L.M. (2012). Algal biomass constituent analysis: method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries. *Analytical Chemistry*, 84, 1879-1887.

- Lee, R.E. (2008). *Phycology*. 4ª edição. Cambridge University Press, Colorado State University, USA.
- Levy, I. & Gantt, E. (1988). Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): growth, photosynthesis and phycobilisomes. *Journal of Phycology*, 24, 452-458.
- Levy, I. & Gantt, E. (1990). Development of photosynthetic activity in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 26, 62-68.
- Lim, D.K.Y., Garg, S., Timmins, M. Zhang, E.S.B., Thomas-Hall, S.R., Schuhmann, H., Li, Y. & Schenk, P.M. (2012). Isolation and evaluation of oil-producing microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *PLoS ONE*, 7, 1-13.
- Lin, H.P., Sommerfeld, M.R. & Swafford, J.R. (1975). Light and electron microscope observations on motile cells of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 11, 452-457.
- Liu, B. & Benning, C. (2013). Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion on Biotechnology*, 24, 300-309.
- Lorenz, R.T. & Cysewski, G.R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *TIBTECH*, 18, 160-167.
- Lv, X., Zou, L., Sun, B., Wang, J. & Sun, M. (2010). Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 391, 73-83.
- Malcata, F.X. (2011.) Microalgae and biofuels: A promising partnership. *Trends in Biotechnology*, 29.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.
- Marlowe, I.T., Brassell, S.C., Eglinton, G. & Green, J.C. (1984). Long chain unsaturated ketones and esters in living algae and marine sediments. *Organic Geochemistry*, 6, 135-141.

- Marquardt, J. & Ried, A. (1992). Fractionation of thylakoid membranes from *Porphyridium purpureum* using the detergent N-Lauryl- β -Iminodipropionate. A study on the chlorophyll-protein and pigment compositions of the membrane-intrinsic antenna complexes of a red alga. *Planta*, 187, 372-380.
- Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A. & Hansen, U. (2007). Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, 7, 2080-2095.
- Mercer, P. & Armenta, R.E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 133, 539-547.
- Metting JR, F.B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 477-489.
- M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2013). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 13 May 2013.
- Mirón, A.S., Gómez, A.C., Camacho, F.G., Grima, E.M. & Chisti, Y. (1999). Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, 70, 249-270.
- Mostafa, A.S.M. (2012). Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications *In: Plant Science*, N.K. Dhal and S.C. Sahu (Eds.). InTech. Pp. 275-314.
- Müller, L., Fröhlich, K. & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129, 139-148.
- Mustafa, N.R., Winter, W., Iren, F. & Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6, 715-742.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4^o edição. Freeman & Company, W.H..

- Nuutila, A.M., Aura, A., Kiesvaara, M. & Kauppinen, V. (1997). The effect of salinity, nitrate concentration, pH and temperature on eicosapentaenoic acid (EPA) production by the red unicellular alga *Porphyridium purpureum*. *Journal of Biotechnology*, 55, 55-63.
- Nyberg, H. (1985). The influence of ionic detergents on the phospholipids fatty acid compositions of *Porphyridium purpureum*. *Phytochemistry*, 24, 435-440.
- Nyberg, H. & Koskimies-Soininen, K. (1984a). The glycolipid acids of *Porphyridium purpureum* cultured in the presence of detergents. *Phytochemistry*, 23, 751-757.
- Nyberg, H. & Koskimies-Soininen, K. (1984b). The phospholipids fatty acids of *Porphyridium purpureum* cultured in the presence of Triton X-100 and Sodium Desoxycholate. *Phytochemistry*, 23, 2489-2495.
- Ohta, S., Chang, T., Aozasa, O., Ikegami, N. & Miyata, H. (1993). Alterations in fatty acid composition of marine red alga *Porphyridium purpureum* by environmental factors. *Botanica Marina*, 36, 103-107.
- Ohta, S., Chang, T., Aozasa, O., Kondo, M. & Miyata, H. (1992). Sustained production of arachidonic and eicosapentaenoic acids by the red alga *Porphyridium purpureum* cultured in a light/dark cycle. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 74, 398-402.
- Otto, P. & Gross, W. (2004). Valuable compounds from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6, 635-648.
- Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A. & Gnansonou, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, 102, 10163-10172.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Gjermund, V. & Gislerod, H.R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15, 1-9.
- Pereira, L., Sousa, A., Coelho, H., Amado, A.M. & Ribeiro-Claro, P.J.A. (2003). Use of FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, 20, 223-228.

- Percival, E. & Foyle, R.A.J. (1979). The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. *Carbohydrate Research*, 72, 165-176.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E. & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water research*, 45, 11-36.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C. & Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40, 781-796.
- Prajapati, V.D., Jani, G.K., Moradiya, N.G. & Randeria, N.P. (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1685-1699.
- Prior, R.L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Pueschel, C.M. (1990). Cell structure In: *Biology of the red algae*, K.M. Cole & R.G. Sheath (Eds.). Cambridge University Press. Pp.7-9.
- Pulz, O. & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635-648.
- Raederstorff, D. & Rohmer, M. (1984). Sterols of the unicellular algae *Nematochryopsis roscoffensis* and *Chrysothila lamellosa*: isolation of (24E)-24-n-propylidenecholesterol and 24-n-propylcholesterol. *Phytochemistry*, 23, 2835-2838.
- Raja, R., Hemaiswarya, S. & Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 517-523.
- Ramus, J., Kenney, B.E. & Shaughnessy, E.J. (1989). Drag reducing properties of microalgal exopolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 550-557.
- Raposo, M.F.J., Morais, R.M.S.C. & Morais, A.M.M.B. (2013a). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, 93, 479-486.

- Raposo, M.F.J., Morais, R.M.S.C. & Morais, A.M.M.B. (2013b). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs*, 11, 233-252.
- Raposo, M.F.J., Morais, A.M.M.B. & Morais, R.M.S.C. (2014). Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Life Science*, 101, 56-63.
- Razaghi, A., Godhe, A. & Albers, E. (2014). Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*. *Central European Journal of Biology*, 9, 156-162.
- Rezanka, T., Lukayský, J., Nedbalova, L. & Sigler, K. (2014). Production of structured triacylglycerols from microalgae. *Phytochemistry*, 104, 95-104.
- Rontani, J., Beker, B. & Volkman, J.K. (2004). Long-chain alkenones and related compounds in the benthic haptophyte *Chrysothila lamellosa* Anand HAP 17. *Phytochemistry*, 65, 117-126.
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K. & Foubert, I. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food chemistry*, 160, 393-400.
- Sasso, S., Pohnert, G., Lohr, M., Mittag, M. & Hrtweck, C. (2012). Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 761-785.
- Schlösser, U.G. (1994). SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen – Catalogue of Strains. *Botanica Acta*, 107, 111-186.
- Schorstein, K.L. & Scott, J. (1982). Ultrastructure of cell division in the unicellular red alga *Porphyridium purpureum*. *Canadian Journal of Botany*, 60, 85-97.
- Shalaby, E.A. & Shanab, M.M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42, 556-564.

- Shanab, S.M.M., Mostafa, S.S.M., Shalaby, E.A. & Mahmoud, G.I. (2012). Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 608-615.
- Sheath, R.G., Hellebust, J.A. & Sawa, T. (1979a). Floridean starch metabolism of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) I. Changes during ageing of batch culture. *Phycology*, 18, 149-163.
- Sheath, R.G., Hellebust, J.A. & Sawa, T. (1979b). Floridean starch metabolism of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) II. Changes during the cell cycle. *Phycology*, 18, 185-190.
- Sheath, R.G., Hellebust, J.A. & Sawa, T. (1981). Floridean starch metabolism of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) III. Effects of darkness and metabolic inhibitors. *Phycology*, 20, 22-31.
- Skjånes, K., Rebours, C. & Lindblad, P. (2013). Potential of green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33, 172-215.
- Sommerfeld, M.R. & Nichols, H.W. (1970). Comparative studies in the genus *Porphyridium*. *Journal of Phycology*, 6, 67-78.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.
- Stansell, G.R., Gray, V.M. & Sym, S.D. (2012). Microalgae fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology*, 24, 791-801
- Sun, Q., Chu, G., Liu, G., Li, S. & Wang, X. (2007). Calibration of alkenone unsaturation index with growth temperature for a lacustrine species, *Chrysothila lamellosa* (Haptophyceae). *Organic Geochemistry*, 38, 1226-1234.
- Sun, L., Wang, L., Li, J. & Liu, H. (2014). Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from two marine Chrysophyta. *Food Chemistry*, 160, 1-7.
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q. & Ma, C. (2009). Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 42-47.

- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S. & Arad, S. (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalgae *Porphyridium* sp.. *Journal of Applied Phycology*, 17, 215-222.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- Tokusoglu, Ö. & Ünal, M.K. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Food Chemistry and Toxicology*, 4, 1144-1148.
- Tvrzicka, E., Kremmyda, L., Stankova, B. & Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical papers of the Medical Faculty of Palacký University, Olomouc, Czech Republic*, 155.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H. & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99, 4021-4028.
- van Hijum, S.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L. & van Geel-Schutten, I.G.H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 157-176.
- Varfolomeev, S. D. & Wasserman, L. A. (2011). Microalgae as a source of biofuel, food, fodder, and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49, 789-807.
- Vílchez, C., Garbayo, I., Lobato, M.V. & Veja, J.M. (1997). Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 562-572.
- Viso, A. & Marty, J. (1993). Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry*, 34, 1521-1533.
- Walker, R.B. & Everette, J.D. (2009). Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1156-1161.

Widianingsih, Hartati, R., Endrawati, H. & Mamujaja, J. (2013). Fatty acid composition of marine microalgae in Indonesia. *Journal of Tropical Biology and Conservation*, 10, 75-82.

Wolter, A., Hager, A.S., Zannini, E., Galle, S., Gänzle, M.G., Waters, D.M. & Arendt, E.K. (2014). Evaluation of exopolysaccharide producing *Weissella cibaria* MG1 strain for the production of sourdough from various flours. *Food Microbiology*, 37, 44-50.

Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q. & Zhang, C. (2013). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs*, 11, 2667-2681.

You, T. & Barnett, S.M. (2004). Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*, 19, 251-258.

Yu, C., Chen, H., Chen, M., Chang, Y., Chien, S., Kuo, Y., Yang, F., Wu, S., Chen, J., Yu, H. & Chao, L.K. (2010). Chemical composition and bioactivities of the marine alga *Isochrysis galbana* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 12, 1941-1944.

Zhukova, N.V. & Aizdaicher, N.A. (1995). Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39, 351-356

Anexos

Anexo I - Registos fotográficos das microalgas em estudo

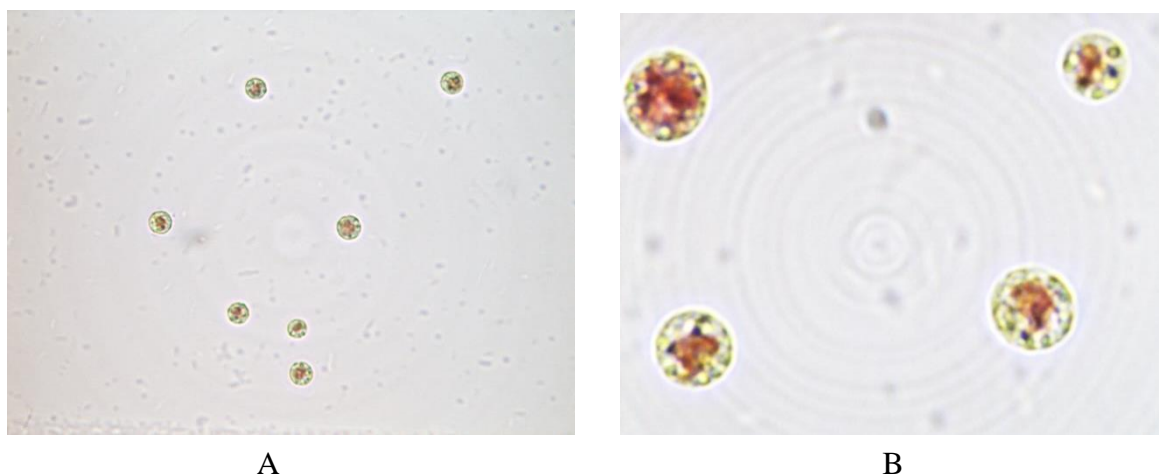


Figura I – Células de *Porphyridium purpureum* ACOI/SAG 1380. A) Ampliação 800x; B) Ampliação 2000x.

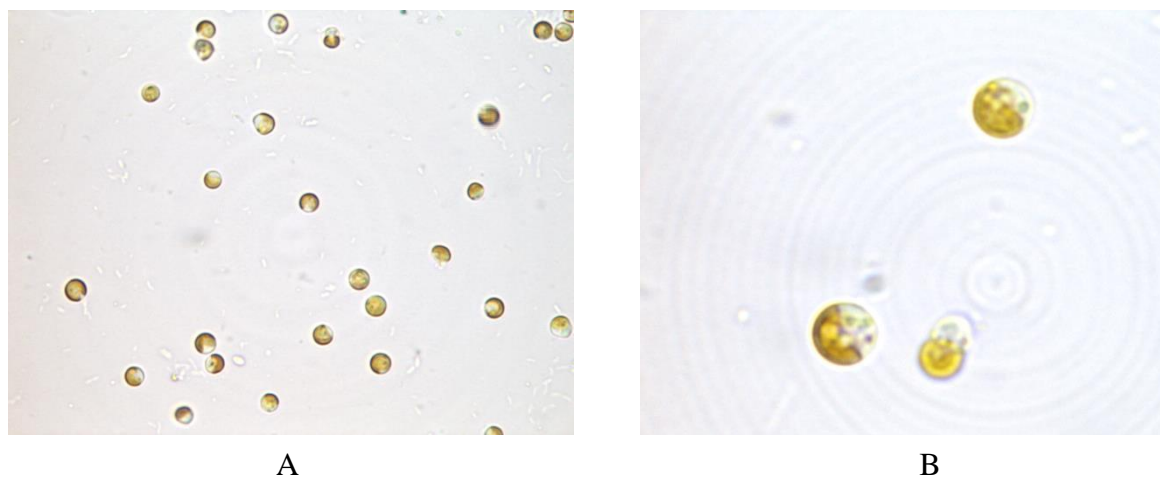


Figura II – Células de *Chrysotila lamellosa* ACOI 339. A) Ampliação 800x; B) Ampliação 2000x.

Anexo II – Padrão Supelco 37 FAME Mix

1. Ácido butanóico (C4:0)
2. Ácido capríco (C6:0)
3. Ácido caprílico (C8:0)
4. Ácido cáprico (C10:0)
5. Ácido undecanóico (C11:0)
6. Ácido láurico (C12:0)
7. Ácido tridecanóico (C13:0)
8. Ácido mirístico (C14:0)
9. Ácido miristoleico (C14:1)
10. Ácido pentadecanóico (C15:0)
11. Ácido 10-pentadecenoico (C15:1)
12. Ácido palmítico (C16:0)
13. Ácido palmitoleico (C16:1)
14. Ácido heptadecanóico (C17:0)
15. Ácido 10-heptadecenoico (C17:1)
16. Ácido esteárico (C18:0)
17. Ácido elaídico (C18:1n9t)
18. Ácido oleico (C18:1n9c)
19. Ácido linoleáidico (C18:2n6t)
20. Ácido linoleico (C18:2n6c)
21. Ácido araquídico/eicosanóico (C20:0)
22. Ácido γ -linoleico (C18:3n6)
23. Ácido 11-eicosenoico (C20:1)
24. Ácido linoléico (C18:3n3)
25. Ácido heneicosanóico (C21:0)
26. Ácido eicosadienoico (C20:2)
27. Ácido behênico (C22:0)
28. Ácido 8,11,14-eicosatrienoico (C20:3n6)
29. Ácido erúico (C22:1n9)
30. Ácido 11,14,17-eicosatrienoico (C20:3n3)
31. Ácido araquidónico (C20:4n6)
32. Ácido tricosenóico (C23:0)
33. Ácido 13,16-docosadienoico (C22:2)
34. Ácido lignocérico (C24:0)
35. Ácido eicosapentanoico (C20:5n3)
36. Ácido nervónico (C24:1)
37. Ácido docosahexanoico (C22:6n3)

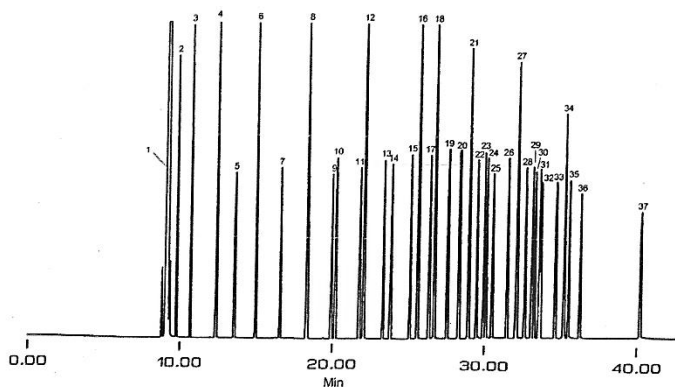


Figura III – Descrição do perfil de ácidos gordos do padrão Supelco 37 FAME Mix

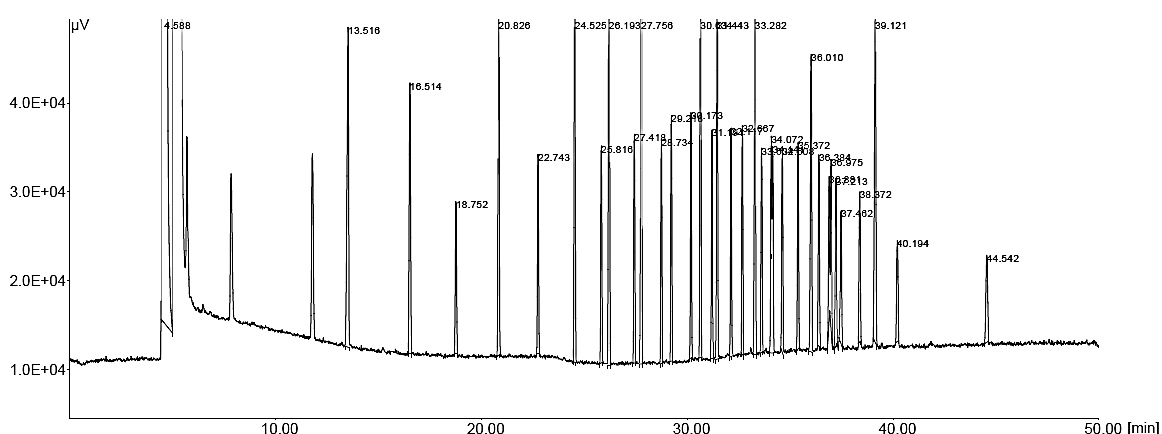
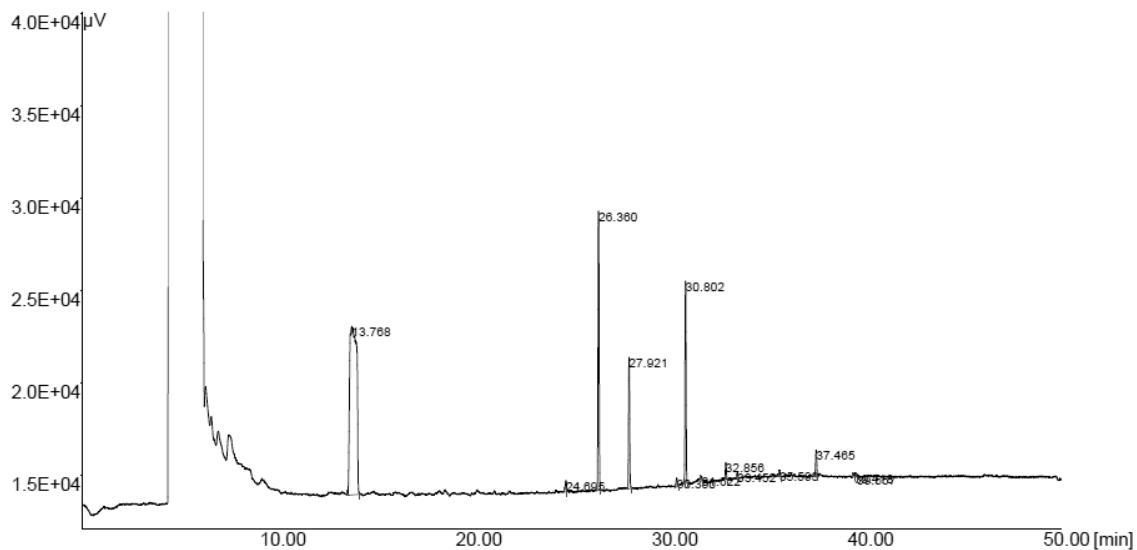


Figura IV – Cromatograma obtido por GC do padrão Supelco 37 FAME Mix

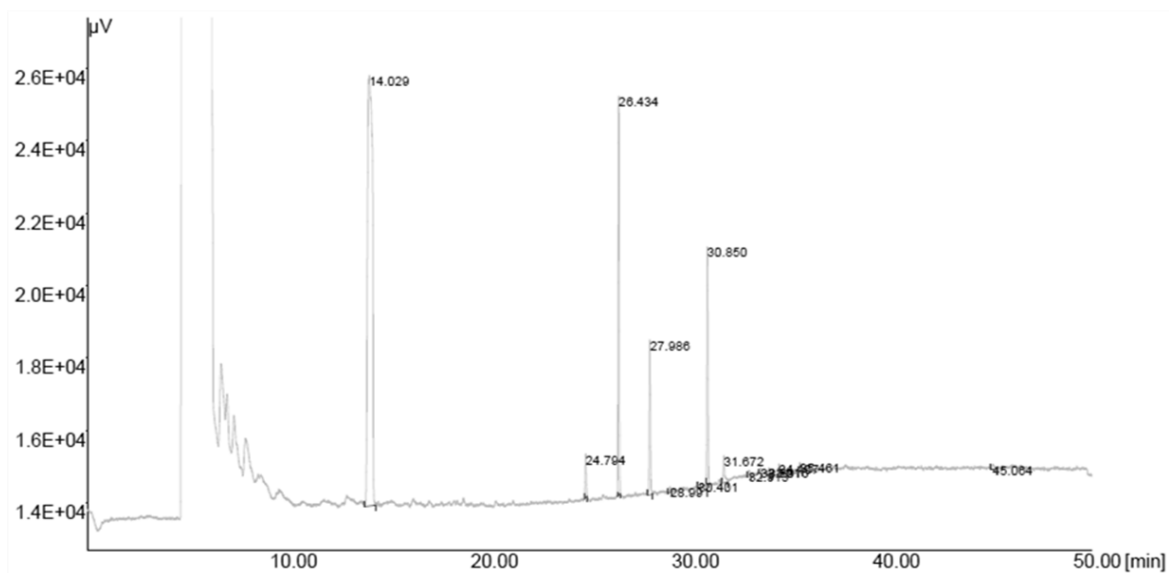
Anexo III – Cromatograma obtido por GC dos ésteres de metilo de ácidos gordos de *Porphyridium purpureum*



#	Name	RT	Area [µV.Sec]	%Area
1		13.768	216550.097	65.123
2		24.695	2403.634	0.723
3		26.360	46956.854	14.121
4		27.921	22056.705	6.633
5		30.350	1687.507	0.507
6		30.802	32109.226	9.656
7		31.622	527.473	0.159
8		32.856	2536.408	0.763
9		33.452	772.627	0.232
10		35.593	912.510	0.274
11		37.465	4980.042	1.498
12		39.418	718.571	0.216
13		39.557	311.770	0.094

Total Area of Peak = 332523.423 [µV.Sec]

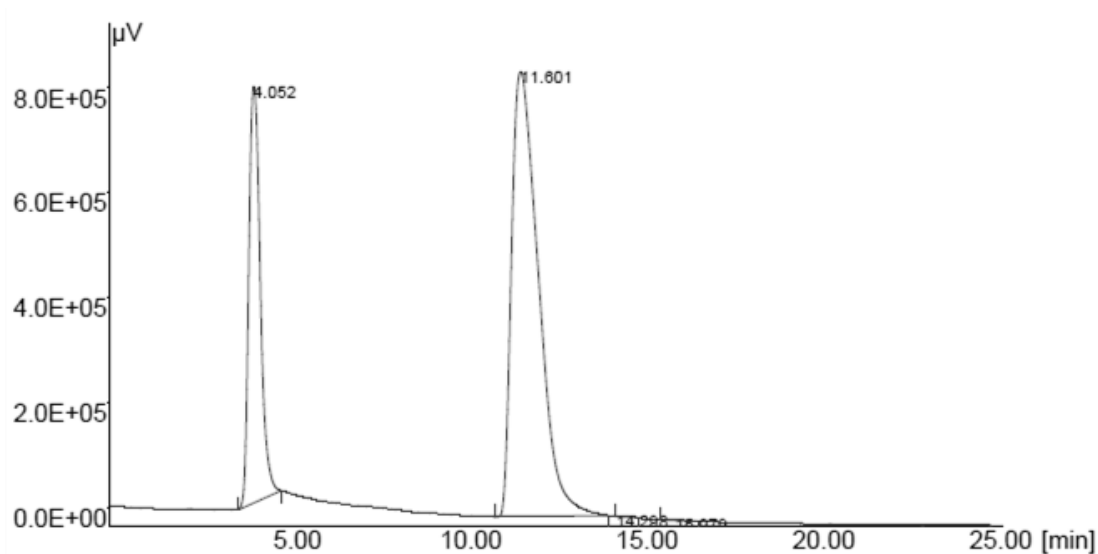
Anexo IV – Cromatograma obtido por GC dos ésteres de metilo de ácidos gordos de *Chrysotila lamellosa*



#	Name	RT	Area [µV.Sec]	%Area
1		14.029	188943.838	72.141
2		24.794	3268.658	1.248
3		26.434	31305.179	11.953
4		27.986	12740.065	4.864
5		28.991	237.948	0.091
6		30.401	306.217	0.117
7		30.850	18291.940	6.984
8		31.672	3004.275	1.147
9		32.913	383.472	0.146
10		33.501	371.443	0.142
11		33.916	813.892	0.311
12		34.407	540.243	0.206
13		35.461	1018.612	0.389
14		45.064	682.478	0.261

Total Area of Peak = 261908.261 [µV.Sec]

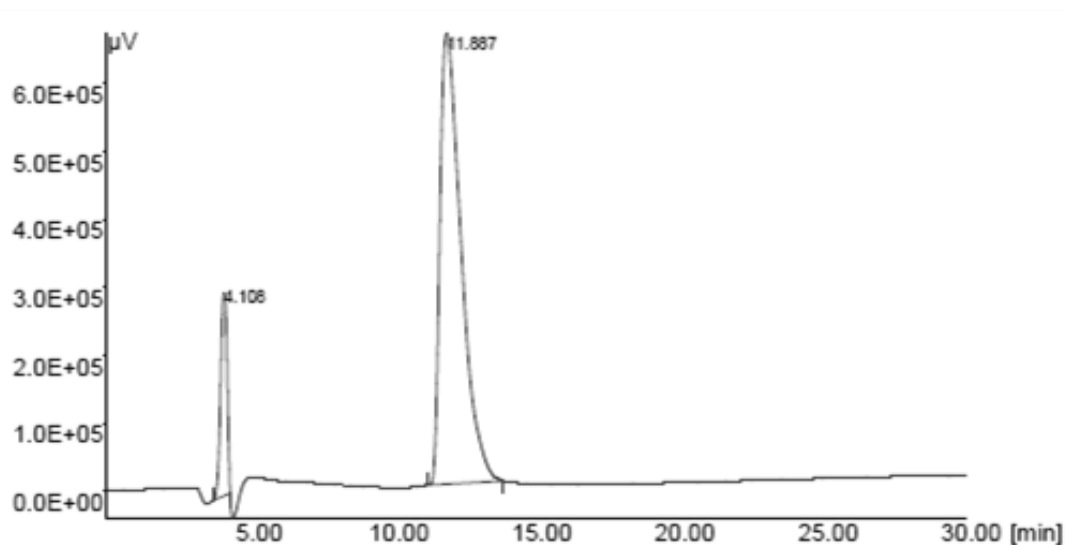
Anexo V – Cromatograma obtido por HPLC dos monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos extracelulares de *Porphyridium purpureum*



#	Name	RT	Area [µV.Sec]	Quantity
1		4.052	17150681.467	0.000
2		11.601	43838560.280	0.000
3		14.298	28737.138	0.000
4		15.979	36569.754	0.000

Total Area of Peak = 61054548.639 [µV.Sec]

Anexo VI - Cromatograma obtido por HPLC dos monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos extraídos da biomassa de *Chrysothila lamellosa*



#	Name	RT	Area[μV.Sec]	Quantity
1		4.108	4384907.942	0.000
2		11.887	33399058.651	0.000

Total Area of Peak = 37783966.593 [μV.Sec]

Anexo VII - Cálculo do EC₅₀ do extrato etanólico de *Porphyridium purpureum*

Absorvância inicial DPPH (515nm) = 0,644

Tabela I – Leitura das diferentes diluições do extrato etanólico de *Porphyridium purpureum* em espectrofotómetro com comprimento de onda 515nm.

Concentração extrato (mg/mL)	Abs (515nm)
10	0,555
7	0,572
5	0,578
3	-

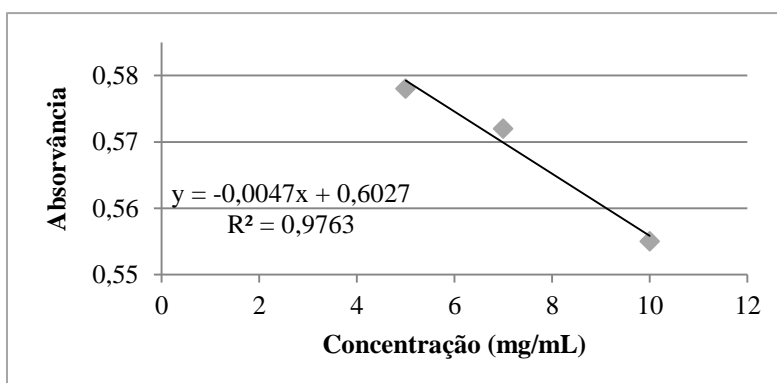


Figura V – Gráfico com os valores da leitura de absorvância das várias diluições do extrato e respetiva equação da reta.

Absorvância do controlo = 0,578

Cálculo do EC₅₀:

$$y = -ax + b$$

Onde:

y = absorvância inicial do controlo / 2

x = EC₅₀ (mg/mL)

Assim:

$$y = -0,0047x + 0,6027$$

$$0,578/2 = -0,0047x + 0,6027$$

$$x = 66,74 \text{ mg/mL}$$

Anexo VIII – Espectros de absorção dos alimentos usados como referência

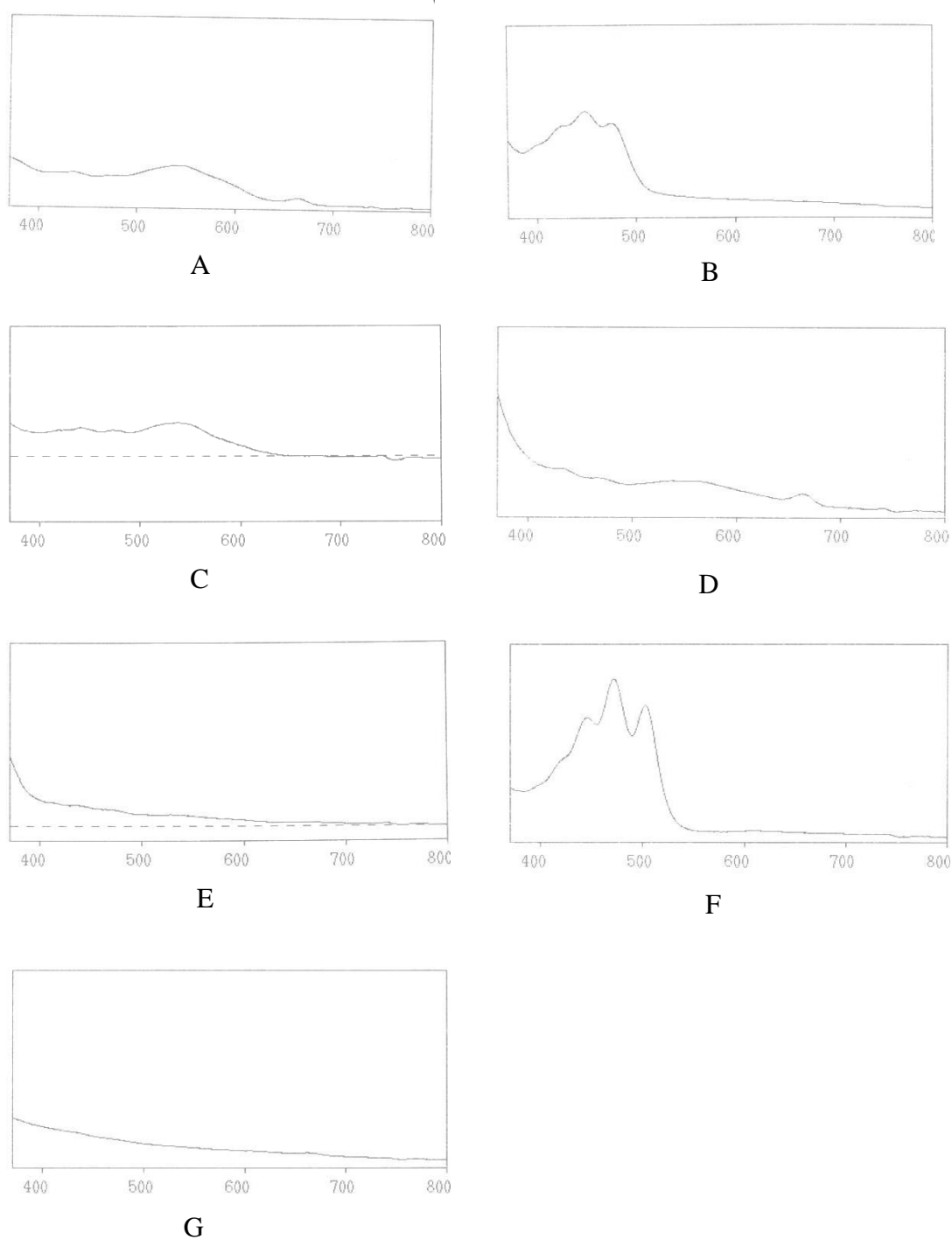


Figura VI – Espectros de absorção dos alimentos usados como referência. A) amora; B) cenoura; C) framboesa; D) mirtilo; E) morango; F) tomate; G) uva.