



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Identificação e Análise do Potencial Antifúngico dos Polissacarídeos das Algas *Saccharina latissima* e *Laminaria ochroleuca*

Cristela Ribeiro Coutinho Pires

2016



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Identificação e Análise do Potencial Antifúngico dos Polissacarídeos das Algas *Saccharina latissima* e *Laminaria ochroleuca*

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Leonel Pereira (Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Isabel Sousa Pinto (Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e CIIMAR).

Cristela Ribeiro Coutinho Pires

2016

**«Ao meu padrinho,
pelo coração de pai e alma de criança,
pelas risadas descontroladas e sonhos intangíveis,
por ter para sempre em mim muito de ti.»**

Agradecimentos

No culminar de uma etapa tão importante da minha vida, queria aproveitar para agradecer a todas as pessoas que me incentivaram e apoiaram durante este percurso em especial durante a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de deixar o meu eterno agradecimento ao Professor Doutor Leonel Pereira, pelo seu fascínio pela ciência e pelo ensino e pela forma como o transmite aos seus alunos. Pela sua inesgotável compreensão, pelo apoio incondicional e por todo o trabalho e paciência que teve comigo durante o decorrer desta tese. Acima de tudo, por me ter feito sempre ver ‘a luz ao fundo do túnel’. A ele o meu mais sincero agradecimento, respeito e admiração.

À Professora Doutora Isabel Sousa Pinto, por me ter dado a oportunidade de realizar a minha tese em parceria com o CIIMAR, junto da sua equipa de trabalho, pela disponibilidade, paciência e compreensão durante todos os percalços desta etapa, o meu sincero agradecimento.

A Isabel Azevedo e à Patrícia Oliveira, por terem sido incansáveis e por estarem sempre disponíveis a ajudar, por todos os conselhos, dicas e ajuda com todos os problemas que surgiram e acima de tudo pela amizade e compreensão, agradeço-vos imenso por tudo.

À Catarina Guedes e à Helena Amaro por me terem ajudado com os processos de extração, por me disponibilizarem o laboratório e também pela alegria e boa disposição com que sempre me presentearam.

Ao Professor Paulo Ribeiro-Claro pela ajuda com a realização do método FTIR.

Ao João Marques, um obrigada especial por toda a paciência e pela amizade.

Agradeço também à Professora Doutora Teresa Gonçalves por me ter dado a oportunidade de realizar os ensaios antifúngicos junto da sua maravilhosa equipa de trabalho e pela ajuda que me prestou durante o decorrer dos trabalhos.

E à Doutora Chantal Fernandes pela paciência e dedicação e por todos os conselhos e dicas de boas práticas laboratoriais, sem dúvida que serão de extrema importância para o futuro. Agradeço também o carinho, amizade e compreensão de ambas.

Aliás, agradeço a toda a equipa do MMYRG por me terem acolhido de forma tão carinhosa e por terem sido todos extremamente prestáveis e carinhosos comigo durante a minha breve passagem pelo laboratório.

Aos meus irmãos, ao Óscar, pela ajuda, pelo apoio, pela amizade e por acreditares em mim e apostares no meu futuro, porque tu nunca perdes, para vocês aquele abraço apertado.

A todos os meus amigos por tudo o que aturaram de mim e por ainda assim me apoiarem e acreditarem em mim. À Rita por toda a terapia.

Ao Eugénio, pelo apoio incondicional, pela paciência, pelo carinho, pela amizade e pela busca constante de soluções para os meus problemas, por teres sido o meu grande pilar durante todo este processo e por seres para sempre alguém muito importante na minha vida, para ti, não há agradecimento suficiente.

Por último, queria agradecer aos meus pais, por todos os sacrifícios, por acreditarem em mim e pelo amor incondicional com que nos dedicam as vossas vidas, não há palavras ou gestos para agradecer o suficiente.

Desejo por fim agradecer a todos aqueles que não tive oportunidade de mencionar mas que de uma forma ou de outra me ajudaram e apoiaram durante a realização deste trabalho.

A todos muito obrigada!

Índice

Resumo	X
Abstract	XII
Introdução	1
Interesse económico	3
As algas na alimentação	4
Cosmética e Cosmecêutica	6
Farmacêutica e Medicina	6
Algas na agri-horticultura	7
Algas em Portugal	8
Cultivo	9
<i>Aquacultura e IMTA</i>	10
Algas Castanhas – Phaeophyceae	12
<i>Saccharina latissima</i>	16
Ciclo de vida e Crescimento	16
Aplicações	17
<i>Laminaria ochroleuca</i>	18
Ciclo de vida e Crescimento	18
Aplicações	20
Polissacarídeos	20
<i>Laminarina</i>	21
<i>Fuoidana</i>	22

<i>Alginatos</i>	24
Análise por Espectroscopia Vibracional -FTIR	25
Materiais e Métodos	27
Recolha de Biomassa Algal	29
<i>Praia da Terra Nova – Laminaria ochroleuca</i>	29
<i>Praia da Pedra Alta – Saccharina latissima</i>	29
Extração	30
<i>Extração Sequencial - ES</i>	30
Extração em hexano	31
Extração em metanol	31
Extração Aquosa	32
<i>Extração Alcalina - EA</i>	33
Extração em Metanol:Acetona	33
Extração em Hidróxido de Sódio	33
<i>Precipitação por Cálcio</i>	34
Análise dos Polissacarídeos através FTIR	35
Ensaio antifúngicos	35
Extratos algais e atividade antifúngica	35
Preparação dos extratos de algais	35
Espécies e estirpes de fungos	36
<i>Ensaio de Micro-diluição</i>	37
Preparação do inóculo de fungos	37
Inoculação do agente antifúngico	38
<i>Ensaio de difusão em disco</i>	39
Preparação dos discos	39
Cultivo	40

<i>Obtenção do ciclo de vida</i>	40
Gametófitos	40
Esporófitos jovens	41
Esporófitos adultos	43
<i>Meios de cultivo</i>	43
<i>Montagem do sistema de cultivo</i>	44
<i>Cultivo de Esporófitos jovens e Esporófitos adultos</i>	45
Resultados	49
<i>Recolha de Biomassa Algal</i>	51
<i>Métodos de Extração</i>	52
<i>Identificação dos Polissacarídeos através de espectroscopia Vibracional – FTIR</i>	53
<i>Atividade antifúngica</i>	57
<i>Difusão em disco</i>	58
<i>Ensaio de Micro-diluição</i>	58
<i>Ensaio de Cultivo</i>	61
Obtenção de Gametófito	61
Esporófitos jovens	62
Esporófitos adultos	63
Discussão	67
<i>Espécies de Interesse e obtenção da Biomassa</i>	69
<i>Extração de polissacarídeos</i>	70
<i>Espectros FTIR</i>	71
<i>Atividade antifúngica</i>	72
<i>Cultivo</i>	73
Referências Bibliográficas	81

Resumo

Os *kelps*, ou algas castanhas, são macroalgas marinhas com especial interesse económico devido à sua exploração na alimentação e extração de ficocolóides (Alginatos) muito utilizados nas mais variadas indústrias. No entanto o desenvolvimento biotecnológico tem vindo a explorar potenciais produtos de interesse a partir de recursos marinhos o que revelou nas algas uma enorme variedade de compostos metabólicos com interesse nas mais variadas áreas. Sendo as algas um grupo de seres vivos extremamente resiliente a condições adversas, os seus compostos metabólicos apresentam bioatividades muito interessantes para aplicação nas mais diversas áreas industriais. Por sua vez, os polissacarídeos sulfatados - dos quais os ficocolóides (Alginatos e Ácido Algínico), Fucoidana e Laminarina - são os principais metabolitos dos *kelps* representando cerca de 30% da sua constituição. E estudos anteriores demonstram propriedades muito interessantes para aplicação destes compostos na área da saúde.

Este trabalho é focado nos polissacarídeos sulfatados de duas espécies de *kelps* com especial interesse, *Saccharina latissima* e *Laminaria ochroleuca*, visando a identificação e caracterização dos mesmos. Para tal foram utilizados diferentes processos de extração para avaliar o melhor método para obtenção dos polissacarídeos de interesse, utilizando espectroscopia vibracional - *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) – para análise dos constituintes dos extratos obtidos. E posteriormente, foi testada a bioatividade antifúngica dos mesmos em leveduras.

Os métodos de extração utilizados foram o Método Sequencial (MS), utilizado para separação dos diversos constituintes das algas, entre eles os polissacarídeos na última fase do processo; e um método de Extração Alcalino (EA) por Hidróxido de Sódio (NaOH), utilizado na indústria para extração de alginatos. Foram testados para ambos os métodos dois tipos de precipitação: Etanol e Cloreto de Cálcio (CaCl₂). Todos os métodos foram testados para ambas as espécies *S.latissima* e *L.ochroleuca*. O extrato conseguido por EA não foi precipitável com CaCl₂. Os restantes extratos foram analisados por FTIR-ATR, tendo sido possível determinar a sua constituição, foram ainda analisadas amostras de biomassa algal destas espécies por FTIR utilizadas como

controle. Os extratos conseguidos por EA não apresentavam uma boa afinidade no isolamento dos polissacarídeos de interesse em nenhuma das espécies e comparados com os espectros padrão obtidos diretamente da biomassa algal, a sua constituição era completamente diferente da dessas amostras, como tal estes não foram usados para análise da bioatividade. Os restantes extratos foram testados em ensaios antifúngicos sendo que apenas o extrato conseguido por ES a partir de *L.ochroleuca* é que apresentou uma boa atividade antifúngica na estirpe de *Candida glabrata* com um MIC visível de 25µg/mL.

As necessidades do mercado de comercialização de algas levou à necessidade de desenvolvimento de técnicas de cultivo. Recentemente a aquacultura multitrófica integrada (IMTA) apresenta-se como uma potencial forma sustentável para o cultivo de algas, contudo nem todas as espécies de algas apresentam o melhor *fitness* de produtividade nestas condições. Para estudar a forma mais rentável para produção dos polissacarídeos de interesse foram ainda realizados alguns ensaios para o cultivo nestas duas espécies. Efetuaram-se técnicas de libertação dos esporos para obtenção da geração gametofítica, alguns ensaios de cultura das diversas fases do ciclo de vida, em que foram testados meios de cultivo com concentrações de nutrientes representantes dos encontrados nos diferentes meios de produção existentes entre os quais o IMTA. Embora os ensaios de cultivo tenham apresentado um grande desafio e não tenha sido possível a obtenção de biomassa suficiente para a extração de polissacarídeos, é de salientar a importância da continuação deste trabalho uma vez que a constituição dos mesmos é variável nas diversas fases do ciclo de vida e pode mesmo variar consoante a concentração de nutrientes a que estão sujeitos sendo portanto interessante na determinação do método de cultivo destas espécies com vista à extração destes polissacarídeos.

Palavras-Chave: Macroalgas, kelps, *Saccharina latissima*, *Laminaria ochroleuca*, polissacarídeos sulfatados, FTIR, antifúngicos, antioxidantes, extração, cultivo.

Abstract

Brown algae, so called kelps, are marine macroalgae with a special economical interest due to their interest as food and as a source of phycocolloids (Alginates) used in a wide range of industries. Nevertheless, biotechnological development has led to the exploration of potential marine derived products, which revealed on algae an outrageous variety of metabolic compounds with interest in all fields of industries. Algae are extremely resilient to adverse conditions, so their metabolic compounds show an incredible range of bioactivities applicable in a wide range of industries. Sulphated polysaccharides - of which phycocolloids (Alginates and Alginic Acid), Fucooidan and Laminaran – are the main metabolites in kelps, representing about 30% of their constitution. Prior studies shown very interesting applications of these compounds on human health.

This study is focused on sulphated polysaccharides from two kelp species of interest, *Saccharina latissima* e *Laminaria ochroleuca*, aiming the identification of these polysaccharides. To do so we used different extraction processes to assess the best extraction method to obtain the polysaccharides of interest, using Vibrational spectroscopy by Fourier Transform Infra-Red (FTIR) technic we were able to analyze the extract components and identify our polysaccharides of interest. Proceeding, we used those extracts to evaluate their antifungal capacity in yeast.

The extraction methods used were Sequential method (ES), commonly used for the extraction of the different compounds of algae, including polysaccharides on the last step of the process; and Alkali extraction method (EA) with Sodium hydroxide (NaOH), both methods were subjected to two different precipitation agents: Ethanol and Calcium Chloride (CaCl₂). All methods were repeated several times in both species *S. latissima* e *L. ochroleuca*. EA extract could not be precipitated with CaCl₂. All other extracts were submitted to FTIR-ATR analysis, it was possible to determinate their polysaccharide constitution for each extract and then compared with the spectra obtain from raw material from both species. The extracts obtained by EA didn't show a good isolation of

the polysaccharides in neither of the species therefore were excluded from antifungal analysis. All other extracts were tested as antifungal in four different yeast species, but only ES from *L. ochroleuca* has shown a good antifungal activity with a MIC seen at 25µg/mL.

The emergent needs of the algae market led to the development of aquaculture methodology. Recently, Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) has shown great potential on sustainable cultivation of algae, but not all species present the best productivity fitness on these conditions. To study the most profitable technique for the production of these polysaccharides of interest, some essays were made on cultivation of these species. Techniques for obtaining the gametophyte phase of the species were conducted, some essays on the cultivation of the different life stages were performed, in which different levels of nutrients were tested to simulate the different cultivation systems, including IMTA. However, some struggles have been verified on the capacity to maintain the exponential growth on laboratorial conditions to obtain enough biomass for polysaccharides extraction. It is important to highlight the urge of optimization for growth conditions, once the concentration and characterization of polysaccharides is different in the different life cycle phases and it is dependent on nutrients available during production.

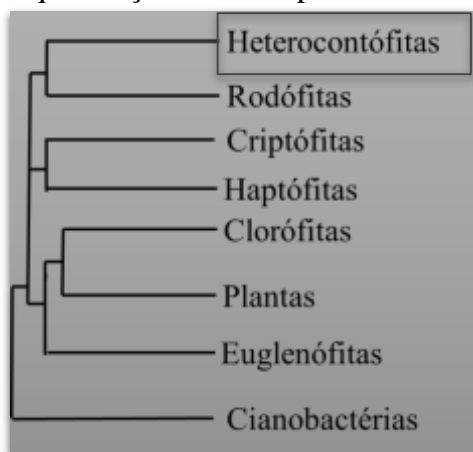
Keywords: Seaweeds, *kelps*, *Saccharina latissima*, *Laminaria ochroleuca*, sulphated polysaccharides, FTIR, antifungal, antioxidant, extraction, cultivation.

Introdução

Como sabemos, mais de 70% da superfície do nosso planeta é coberta por água, sendo, as algas, os produtores primários de todos os ecossistemas marinhos. Estas são responsáveis por cerca de 80% do oxigênio presente na nossa atmosfera, desde as microalgas, presentes no fitoplâncton, à imensa variedade de macroalgas encontradas nos ecossistemas costeiros e nas florestas de *kelps* (Algas castanhas da classe Phaeophyceae) existentes por todo o oceano.

O termo 'alga' é possivelmente dos mais vastos termos de classificação filogenética existentes caracterizando todas as espécies fotossintéticas eucarióticas e protistas para além das plantas. No entanto é importante compreendermos que as diferentes linhagens filogenéticas de algas divergiram entre si há muitos milhões de anos. Assim, temos que, os principais Filos de algas considerados são: Chlorophyta (algas verdes) que são aquelas que se encontram filogeneticamente mais próximas das plantas terrestres, Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorarachniophyta, Euglenophyta, Glaucocystophyta, Heterokonta (onde integram as macroalgas castanhas), Haptophyta, Cryptophyta e os dinoflagelados (pertencentes ao grupo Alveolata), como vemos na Figura 1.

Figura 1 - Esquemática da filogenia das algas e evolução para plantas terrestres, a partir da sequência de ADN plastidial.



Na prática classificamos as algas em dois diferentes grupos: as micro (visíveis somente a microscópio ou à lupa) e as macroalgas (perfeitamente visíveis a olho nu, pelo menos em uma das fases do seu ciclo de vida), mas esta classificação é meramente empírica uma vez que dentro do mesmo filo, como por exemplo Heterokonta, encontramos espécies que podem atingir os 65m de comprimento, como é o caso do *Macrocystis* spp. e espécies microscópicas com cerca de 1-5 μm como é o caso da *Pelagomonas* spp.. A classificação filogenética

das algas prende-se essencialmente com as características morfológicas das células e com o ciclo de vida do indivíduo.

Olhando directamente para as macroalgas: Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Heterokontophyta (ou Ochrophyta), sendo que as macroalgas deste filo pertencem à classe Phaeophyceae (algas castanhas); as principais características que as distinguem são o ciclo de vida e os pigmentos fotossintéticos que as caracterizam. (Tabela 1).

Tabela 1 - Características distintivas das Macroalgas, pigmentos fotossintéticos e ciclos biológicos

	Chlorophyta	Rhodophyta	Heterokontophyta
Clorofilas	a, b	a,d	a,c
Carotenóides	β -caroteno, luteína, neoxantina, violoxantina, zeaxantina	β -caroteno, luteína, zeaxantina	β -caroteno, fucoxantina, violoxantina
Ciclo de Vida	Ciclo Digenético Isomórfico	C. Digenético Heteromórfico, C. Trigenético Isomórfico	C. Digenético Isomórfico, C.Monogenético Diplonte, C. Digenético Heteromórfico

Fonte: (Pereira & Neto 2015)

Contudo, não são apenas estes os caracteres que divergem nos diferentes grupos de algas, mas em vez, com esta diversidade em características fundamentais como o ciclo de vida e os próprios pigmentos fotossintéticos, é de esperar que seja afetada, não só a morfologia, mas todos os constituintes presentes nos organismos, incluindo os metabolitos das mesmas.

A diferença nos compostos base do metabolismo destes seres vivos permite-nos compreender que invariavelmente os compostos resultantes do metabolismo das algas dos diferentes grupos serão bastante diversos e é esta diversidade que faz das algas uma rica fonte de potenciais compostos bioativos com interesse nas mais diversas áreas (S. M. Cardoso et al. 2014; Lee 2008).

No entanto, as diferenças estruturais e metabólicas das algas vão muito além das características filogenéticas, variando ainda a sua constituição inter e intra específica devido à variação dos fatores bióticos e abióticos a que estão sujeitas. As algas têm capacidade de produzir diversos e complexos compostos como compostos fenólicos, lípidos, proteínas, vitaminas e polissacarídeos em resposta a esses fatores e de modo a assegurar a sua estabilidade no ecossistema. Assim sendo, a natureza destes compostos varia especificamente e a sua incidência é estritamente condicionado por fatores externos.

Interesse económico

Durante as últimas décadas verificou-se uma explosão do interesse global na exploração de algas marinhas, tanto micro como macroalgas, como uma fonte sibilina de potenciais produtos naturais. Exploradas principalmente a nível tecnológico, devido ao seu potencial como geradores de biocombustível e ainda, mais recentemente, tem sido concedida uma especial atenção à exploração leiga destes organismos registada há séculos para várias finalidades, desde utilização como biofertilizantes (muito popular na região Minhota de Portugal), à alimentação e à utilização das mesmas em medicinas ancestrais e tradicionais de diversas culturas. Estas utilidades reconhecidas comumente desencadearam um rastilho no interesse da comunidade científica e tecnológica que hoje tenta compreender, caracterizar, valorizar e extrair os produtos naturais advenientes destes organismos para utilizar nas mais diversas áreas, desde sector agri-horticultural, à indústria farmacêutica, cosmética e nutracêutica enquanto produtos de valor acrescentado.

Na última década, assistimos à introdução da mais variada gama de produtos à base de algas no mercado e do crescente interesse da população pelas suas potencialidades, crescendo, assim, a necessidade da compreensão da diversidade e complexidade química e estrutural dos compostos que estão por trás das bioatividades detectadas. Verifica-se um significativo avanço no conhecimento da riqueza química e taxonómica destes bioprodutos, no entanto, denota-se também uma urgência no melhor entendimento dos processos biológicos de desenvolvimento e estratégias de sobrevivência das algas que levam à formação destes metabolitos. Este conhecimento da biologia básica e da ecologia dos indivíduos é crucial para o desenvolvimento da biotecnologia algal adequada à manipulação da produção destes compostos de interesse (Dagmar B. Stangel, 2015).

As algas na alimentação

As algas foram primeiramente exploradas pelo Homem enquanto fonte de alimento. Existem vestígios arqueológicos que datam de há mais de 10,000anos, que comprovam o consumo de algas por comunidades ancestrais. Na história mais recente, verificamos o consumo de algas essencialmente em países de cultura Asiática, mas também por países como a França, Irlanda, Reino Unido, Noruega, alguns países africanos e das Américas, pela sua geografia intrinsecamente ligada aos recursos marinhos. Sabemos que o consumo de algas não era devido à sua popularidade gustativa, mas que na maioria dos casos a sua introdução na gastronomia se deu por necessidade, como é o caso da França e do Reino Unido que vendo dizimados os seus campos de cultivo durante a I Guerra Mundial se virão obrigados a recorrer às algas para conseguir os hidratos de carbono necessários à sua subsistência (Venugopal, 2011).

Na atualidade, a popularidade crescente do consumo de algas deve-se essencialmente à globalização da gastronomia Asiática. Ao contrário dos países ocidentais, nas culturas orientais o seu consumo não se deve meramente a fenómenos de escassez de recursos, o consumo de algas está desde sempre intrínseco na base da sua gastronomia sendo estes os maiores produtores e consumidores de algas para fins comerciais, primeiramente direcionado à alimentação.

Dentro da cultura Asiática destaca-se o Japão, como maior consumidor de algas *per capita*, representando estas 10-15% da dieta dos Japoneses, dada assim uma especial atenção devido à associação desta base alimentar com a baixa incidência de doenças cardiovasculares, doenças da tiroide, obesidade, cancro e doenças de foro mental, relativamente às culturas ocidentais (Fitzgerald, Gallagher et al., 2011) (Venugopal, 2011).

No sector alimentar, continua a imperar o consumo de macroalgas. As espécies de macroalgas mais comercializadas a nível mundial são pertencentes aos géneros: *Ulva* (*Chlorophyta*), *Porphyra* (*Rhodophyta*) e *Undaria*, *Laminaria* e *Saccharina* (*Phaeophyceae*) (Pereira, 2011). Estas espécies são consideradas nutricionalmente como superalimentos, por serem extremamente ricas em sais minerais, iodo, proteínas e hidratos de carbono de cadeia longa que funcionam como fibras alimentares, uma vez pobres em

lípidos, são bastante recomendadas em dietas de emagrecimento. Na Tabela 2 podemos ver os nomes comerciais de algumas das espécies mais comercializadas a nível mundial.

Tabela 2 - Algas usadas na alimentação e respetivos nomes comerciais.

Espécie	Nome comercial
<i>Ascophyllum nodosum</i>	‘Egg wrack’
<i>Laminaria digitata</i>	‘Kombu’
<i>Laminaria saccharina</i>	‘Kombu’ doce / ‘Kombu’ real
<i>Himanthalia elongata</i>	Esparguete do mar
<i>Undaria pinnatifida</i>	‘Wakame’
<i>Porphyra sp.</i>	‘Nori’
<i>Palmaria palmata</i>	Dulse
<i>Chondrus crispus</i>	Musgo Irlandês
<i>Ulva lactuca</i>	Alface-do-mar / ‘Nori’ verde
<i>Enteromorpha (Ulva) intestinalis</i>	Erva-do-mar

Fonte: (Venugopal 2011)

As microalgas são também utilizadas na alimentação há séculos, principalmente em países como China, Chad e México. As espécies mais apreciadas são as Cianobactérias: *Nostoc*, *Spirulina* e *Aphanizomenon*, normalmente associadas a fenómenos de ‘Blooms’ de algas provocados por excesso de nutrientes no meio. No entanto, o consumo destas algas tem levantado algumas questões de saúde, precisamente porque os ‘blooms’ algais são, maioritariamente, derivados de poluição das águas, assim, uma vez que são espécies bioacumuladoras de metais pesados e outros componentes tóxicos o

seu consumo pode apresentar riscos para a saúde. Existem vários produtos alimentares à base destas microalgas, alguns dos quais apresentaram contaminação por bactérias. Para evitar estes problemas, atualmente, estes produtos são produzidos a partir de culturas fechadas de microalgas.

As espécies acima referidas são comercializadas na forma desidratada. Mas existem também imensos produtos alimentares à base de extratos algais, como suplementos nutricionais.

Cosmética e Cosmecêutica

Em cosmética as algas ganham cada vez mais popularidade. A sua utilização em tratamentos de beleza e saúde remontam às medicinas tradicionais asiáticas, mas hoje em dia ganham cada vez mais força e o desenvolvimento de novos produtos à base de extratos algais está em voga. A introdução do conceito de cosmecêutica assenta na fusão da cosmética com a farmacêutica dando origem produtos cosméticos que possuem na sua composição compostos bioativos. A exploração dos compostos bioativos das algas e a sua extração para aplicação em produtos cosméticos garantiu a sua entrada neste novo mercado (Guedes, AC,et al., 2013) .

Propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anti tumorais, antissépticas anti-bióticas, promovem o sistema circulatório (sanguíneo e linfático) e eliminação de toxinas bem como o equilíbrio isotónico da pele devido ao alto teor salino e iodino das algas (Bedoux et al., 2014). Estas conferem ainda proteção contra radiação UV-B e UV-A devido à sua constituição em fenóis e carotenoides, próprios para a proteção contra estes agentes a que as próprias estão expostas. E ainda as suas propriedades como agentes emulsionantes, espessantes e gelificantes conferidas pelos polissacarídeos sulfatados, garantem, também, um especial interesse para aplicação em loções, géis, cremes, etc. (Dragmar B. Stengel et al., 2015).

Farmacêutica e Medicina

Algumas características das algas são já bem reconhecidas, como as suas propriedades ficocolóides há muito exploradas quer na indústria farmacêutica quer na medicina e até na própria ciência. No entanto é a natureza química da sua imensa variabilidade de compostos que atrai, cada vez mais o interesse para o desenvolvimento da biotecnologia para a identificação e análise de possíveis bioatividades desses mesmo compostos enquanto promotores de saúde e possíveis novas drogas (Kang et al. 2015). Nas últimas

décadas o desenvolvimento de técnicas de análise e métodos de caracterização permitiram identificar uma série de compostos com bioatividades interessantes na área da saúde tais como: a) Compostos fenólicos; b) pigmentos; c) proteínas e outros peptídeos; d) lípidos; e) compostos halogenados e f) polissacarídeos (Stengel & Walker 2015). As suas bioatividades variam desde as capacidades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antidiabéticos, anti-inflamatórios e com potencial para a formação de biomateriais (géis de celulose, géis de alginatos) (Pielesz et al. 2011).

Para efeitos do presente trabalho, que se foca essencialmente nas bioatividades dos polissacarídeos das algas castanhas, estudos anteriores demonstram as suas capacidades enquanto antifúngicos, antibacterianos (Kang et al. 2015), antivirais (Jiao et al. 2012), antioxidantes, (Matanjun et al. 2008) antidiabéticos, anti-inflamatórios (Park et al. 2011; Pangestuti & Kim 2011), anti tumorais (Choosawad et al. 2005), promotores de saúde entre outros (Stengel et al. 2011).

Algas na agri-horticultura

A utilização de algas em aquacultura, para alimento para animais (peixes, moluscos e crustáceos) em cultura já é uma prática recorrente, particularmente de microalgas, como diatomáceas, e algas verdes. Estas são utilizadas não só para alimentação dos seres vivos em cultura, como também enquanto corantes (devido aos seus carotenoides), o que atribui uma coloração mais ‘saudável’ aos mesmos (McHugh & (Fao) 2003).

Estudos demonstram uma melhoria na qualidade dos produtos, uma vez que as algas enquanto seres autotróficos, têm a capacidade melhorar a qualidade do sistema, fixando os compostos inorgânicos, normalmente excedentes, em aquacultura intensiva, que acabam por ter efeitos tóxicos nos seres vivos heterotróficos presentes. No entanto, o excesso de nutrientes leva muitas vezes à ocorrência de ‘blooms’ de microalgas que pode ter impactos negativos tanto na aquacultura como no sistema envolvente em aquaculturas de regime aberto. Outro problema apresentado prende-se com a capacidade de acumulação de metais pesados pelas algas, como vimos anteriormente, estes compostos são bioacumuláveis ao longo de toda a cadeia alimentar, afetando não só os produtos da aquacultura como aqueles que os consomem (Lobban, Wynne 1981).

A utilização de macroalgas em aquacultura integrada, revela-se um potencial substituto, no entanto a rentabilização do cultivo é um fator de peso neste aspeto. A sua utilização como alimento para animais está em desenvolvimento, no entanto, apresenta

mais rentabilidade uma cultura integrada em que as algas sejam também um produto final de interesse comercial (McHugh & (Fao) 2003).

Ambas macro- e microalgas são utilizadas também como alimento de animais terrestres – como porcos, vacas, galinhas, entre outros, - maioritariamente, como aditivos, devido ao seu valor nutricional, especialmente sais minerais, iodo e carotenoides. Os polissacarídeos extraídos de macroalgas - alginatos e carragenanas- são também utilizados como aditivos para ração animal, especialmente ração húmida, sendo responsáveis pelas características gelificantes que estes produtos apresentam.

A sua utilização como fertilizantes é também muito reconhecida, utilizada há séculos, em que eram recolhidas as algas e utilizadas como fertilizante após processos rudimentares de recolha e secagem, como ainda hoje se verifica em Portugal, principalmente na zona Minho, como falaremos mais adiante. A biotecnologia começou mais recentemente a debruçar sobre os compostos de interesse para a horticultura e já existe no mercado uma grande variedade de aditivos à base de compostos extraídos de algas. Enquanto fertilizantes, é de salientar a riqueza das algas em fito-hormonas e outros compostos com função hormonal como esteróis, polissacarídeos e péptidos (Kahn et al., 2009) (Craigie et al., 2008).

Algas em Portugal

Portugal, sendo um país de área costeira extremamente prevalente não tem como hábito o consumo de algas, contudo a ‘apanha’ de algas na nossa costa é uma prática bastante reconhecida, principalmente na zona Minho do país, essencialmente algas castanhas e vermelhas conhecidas como sargaço, a sua finalidade é essencialmente a utilização das mesmas enquanto fertilizantes – campos de masseira – tornando a agricultura local, uma espécie de agricultura biológica única no mundo, nestes campos não são utilizados quaisquer fertilizantes químicos.

A ‘apanha de Sargaço’ sempre foi, para a região norte do país uma fonte de rendimento das populações costeiras - os conhecidos Sargaceiros – tendo-se tornado esta prática enraizada na nossa cultura, o ritual da ‘apanha do sargaço’, os instrumentos rudimentares utilizados na altura e até os trajes usados pelos sargaceiros, são, hoje em dia, parte do património cultural. Este era utilizado não só para fertilização dos campos, eram também vendidos para fins industriais como para a indústria dos ficocolóides.

Figura 2 - Campo de masseira, Póvoa-do-Varzim.



A prática do cultivo de campos de masseira (Figura 2) remonta ao século XVII, originalmente utilizada por monges do mosteiro de Tibães, Braga. No entanto, no século XIX, esta técnica foi adotada por toda a zona litoral entre os rios Ave e Cávado devido à sua grande extensão de terreno arenoso e aos ventos fortes provenientes do Norte, que dificultavam a fixação das populações naquela zona e a fixação de campos de cultivo.

Esta técnica, que consiste em rebaixar o nível do campo de cultivo, retirando a camada de areia superficial, mantendo-o protegido a toda a volta pelas colunas de areia, onde começaram, mais tarde, a ser plantadas vinhas. Aproveitando os recursos naturais locais, os populares começaram a utilizar as algas, extremamente abundantes na altura – mares de sargaço - que se acumulavam na costa, principalmente durante o Inverno, para fertilizar estes campos.

Esta prática é ainda hoje utilizada e representa uma parte do património cultural das freguesias entre Póvoa de Varzim e Esposende, sendo mesmo uma das principais atrações turísticas do turismo rural da região.

Cultivo

O vasto consumo verificado na população Asiática foi, também, o principal fator que levou ao desenvolvimento biotecnológico de técnicas de cultivo de algas, para fazer face às necessidades de forma sustentável, pois não seria possível garantir a suplementação do mercado pela simples recolha dos recursos naturais. Embora as algas se apresentem como um produto de recursos inestimáveis, a sua comercialização sustentável é um verdadeiro desafio. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO) são recolhidos anualmente mais de 1 milhão de toneladas de algas em habitat selvagem, o que demonstra só por si a insustentabilidade desta prática. O impacto destas práticas não se encerra pela diminuição da população de algas mas sendo estas a base dos ecossistemas marinhos o seu desbaste provoca perdas imensas na biodiversidade (Sivertsen K, 1997).

Como tal, a aplicação de técnicas de cultivo tornou-se uma prioridade na área da biotecnologia. Segundo o relatório da FAO de 2014, estima-se que a produção anual de algas rondava os 23,8 milhões de toneladas em 2012 e com um aumento estimado para 26,1 milhões de toneladas para 2013. Até essa data o maior produtor de algas a nível mundial era a China com uma produção média anual de 13,5 milhões de toneladas, sendo que a maioria *kelps*, não só para alimentação como para extração de alginatos. A produção de carragenófitas também aumentou na Indonésia até então. Contudo, desastres como o de Fukushima no Japão levou a quebras consideráveis na produção de algas na região especialmente *Nori*. No entanto, as estimativas apontam para um crescimento gradual do cultivo de algas, intimamente associada ao aumento da produção de peixes não só na Ásia como em todo o mundo.

Aquacultura e IMTA

A cultura de algas – aquacultura-, tomou assim a sua posição na indústria e tem vindo ao longo dos anos a desenvolver-se, com novas técnicas que passam pelo cultivo em estruturas fechadas – fotobiorreatores- para microalgas à aquacultura em tanques ou lagos, até às *Seaweed farms*, que consistem exatamente em ‘viveiros’ de algas, podendo ser encontradas em ecossistemas abertos como em mar-alto ou junto à costa. Estas *Seaweed farms* são as principais abastecedoras do mercado de macroalgas especialmente viradas para a alimentação em países asiáticos e são a principal forma de cultivo na China.

Contudo o desenvolvimento biotecnológico tem vindo a desenvolver técnicas de cultivo com vista à rentabilização e melhoramento da qualidade dos produtos marinhos e como tal, nas últimas décadas surge o conceito de Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA), que consiste no cultivo conjunto de vários elementos de uma cadeia trófica de um ecossistema marinho. (Chopin et al., 2008)

Figura 4 - Elementos da cadeia trófica para criação de um sistema de aquacultura multitrófica integrada (IMTA).

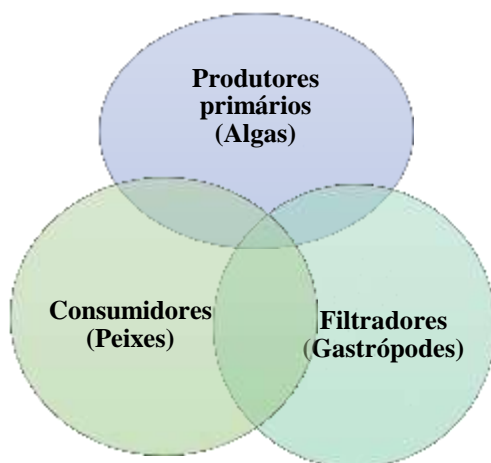
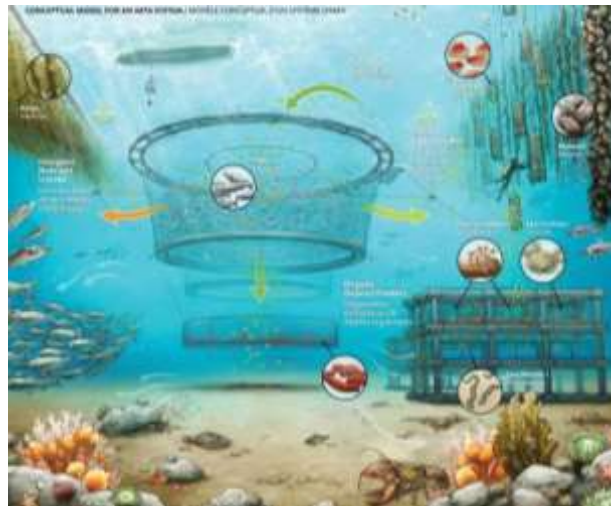


Figura 3 - Esquema de possível sistema de Aquacultura Multitrófica Integrada – IMTA.



Fonte: (Canada.ca, 2013)

Sendo as Macroalgas, não só a base da cadeia alimentar de grande parte da comunidade marinha, estas têm também um papel crucial na criação de um ecossistema propício à maternidade das mais diversas espécies de peixes e outros seres marinhos como crustáceos e bivalves, sendo fundamental no desenvolvimento das espécies com interesse de cultivo mas também na sua proliferação, conferindo alimento e refúgio. Por sua vez, as microalgas têm também um papel fundamental na alimentação e sustentação das fases larvares, sendo o fitoplâncton a sua base alimentar. Assim, a presença de algas em aquacultura apresenta benefícios de alto valor acrescentado capazes de criar um autêntico bioma natural à escala industrial.

Para além deste sistema ideológico de produtividade de várias espécies em conjunto, verifica-se também um aumento significativo na qualidade dos produtos de aquacultura integrada (Troell 2008). Uma vez que as algas têm a capacidade de fixar o dióxido de carbono e produzir oxigénio, os problemas com o empobrecimento do meio em oxigénio e acidificação por aumento do dióxido de carbono, que afeta incondicionalmente a saúde dos peixes e dos outros seres vivos em produção a grande escala, é solucionada pela introdução destas no sistema de cultivo. No entanto a uma escala in-

dustrial é necessário ter em conta o *fitness* de produtividade das espécies de algas a cultivar, ou seja, espécies de algas cujo metabolismo não permita a fixação rápida e eficaz de grandes quantidades de nutrientes não são propícias (ou rentáveis) para sistemas de aquacultura multitrófica integrada (Abreu et al. 2011).

Nutrientes

As algas enquanto seres vivos compositores necessitam fixar dióxido de carbono (CO_2), compostos azotados (NO_3^- e NH_4^+) para produzirem matéria orgânica, sendo os nitratos e amónia os principais elementos do seu metabolismo. Outros nutrientes limitantes para o crescimento das algas são os fosfatos (PO_4^{3-}), embora em concentrações menores, a sua presença é crucial para o desenvolvimento destas (I-chao 1968).

Os nitratos são originados naturalmente pela excreção de matéria orgânica de animais bem como os fosfatos. Por sua vez a amónia é produzida por seres vivos decompositores (Ahnn et al. 2002).

Ao integrar seres vivos heterotróficos em aquacultura de algas, podemos garantir a constante renovação dos nutrientes necessários ao crescimento das algas e o contrário é também benéfico pelas razões acima citadas (Chopin 2013). Segundo Chopin et al, (1999), a relação entre as concentrações destes diferentes nutrientes – Nitratos e Fosfatos – é extremamente importante no cultivo de algas e a capacidade das mesmas de remoção destes compostos determina se estas são boas candidatas ao cultivo em aquacultura multitrófica integrada, ou não (Buck & Buchholz 2005).

Assim, a integração de espécies com interesse económico em sistemas IMTA tem que ser avaliada consoante a sua capacidade de remoção de nutrientes do meio. Sabe-se que num sistema IMTA (Rui Pereira 2008; Handá et al. 2013).

Algas Castanhas – *Phaeophyceae*

As algas castanhas são macroalgas pertencentes à classe *Phaeophyceae* do filo Heterokontophyta (ou Ochrophyta). Também conhecidas como kelps, são as algas responsáveis pela formação de florestas marinhas, criando um ecossistema propício à floreação de vida. Sendo base da cadeia alimentar e conferindo abrigo e proteção em águas com profundidades até aos 80m.

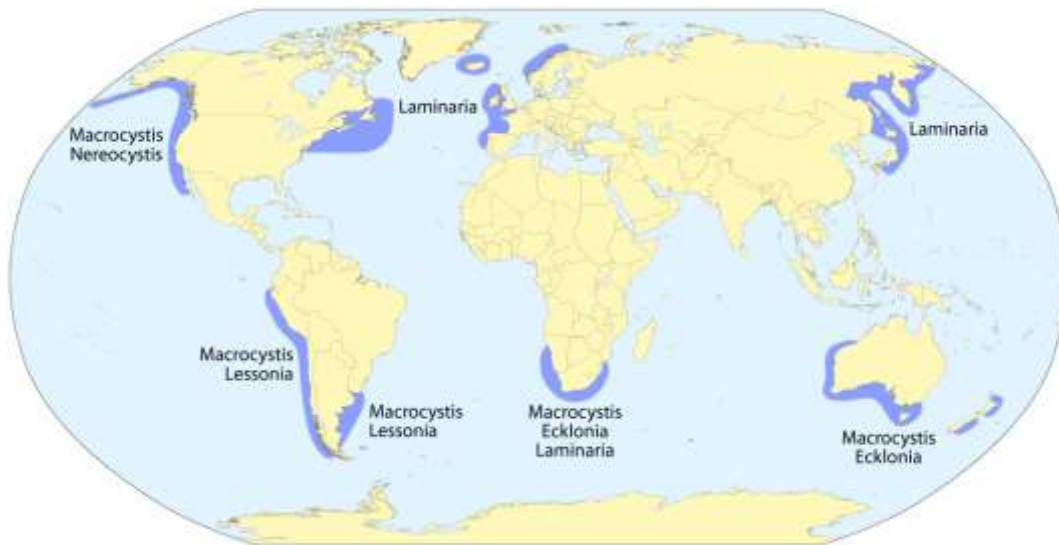


Imagem 1- Distribuição de florestas de kelps a nível mundial.

Estas algas são praticamente todas exclusivas de *habitats* marinhos, existindo apenas 4 gêneros com espécies de água doce. As espécies marinhas crescem essencialmente na região sublitoral e no cordão intertidal são dominantes em águas frias, nomeadamente em todo o hemisfério Norte, embora a diversidade de espécies de *Phaeophyceae* não seja superior à variedade de espécies de *Rhodophytaceae* nesta região, o número de indivíduos e a sua predominância é claramente superior. No entanto, na região dos trópicos a sua prevalência é muito mais baixa, sendo o **Mar de Sargasso** do Atlântico o único lugar onde se encontra uma vasta quantidade de *Phaeophyceae* nesta região.

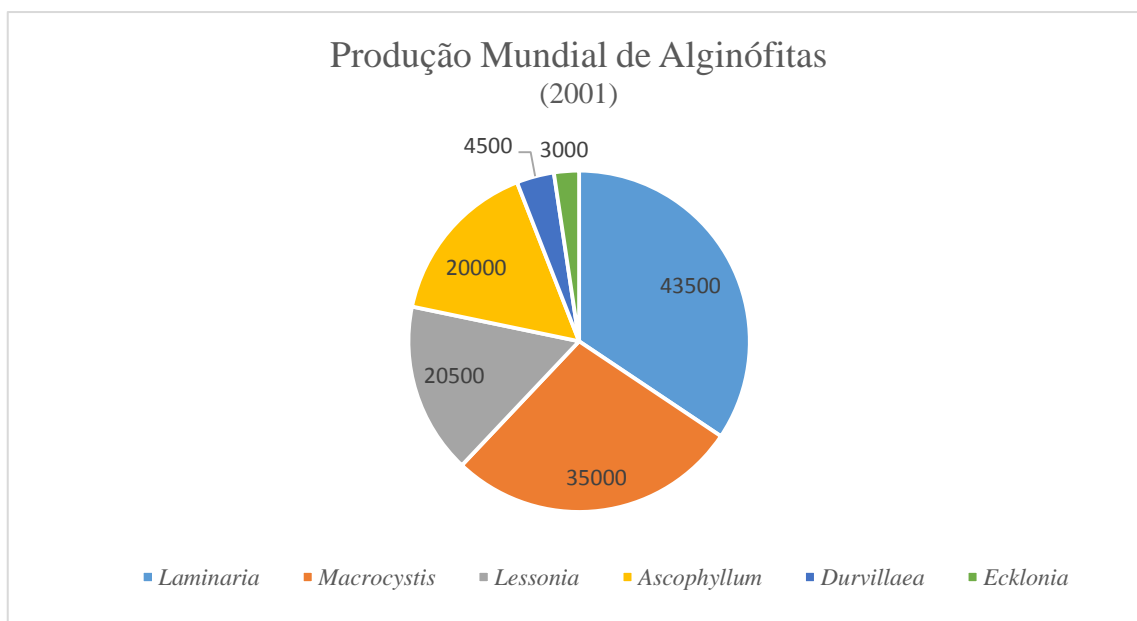
Como vimos, as algas castanhas (Heterokontophytas), são o grupo de macroalgas que se encontra filogeneticamente mais afastado das plantas terrestres (Bhattacharya and Medlin, 1998). Aparentemente, *Phaeophyceae* é uma linhagem ancestral, com certa de 150 milhões de anos (Medlin et al., 1997), e aparentemente evoluíram a partir de um organismo pertencente à classe *Phaeothamniophyceae* (Bailey et al., 1998). Fósseis similares à *Cutleria* com cerca de 25 milhões de anos foram encontrados em depósitos Miocénicos algas e ainda das ordens Laminariales e Fucales datando de há cerca de 16 a 20 milhões de anos. A caracterização filogenética de *Phaeophyceae* através da sequenciação de ADN ribossomal e da proteína rubisco demonstrou que a ordem mais ancestral é a Dictyotales e a mais recente Laminariales (Draisma et al., 2001)

A coloração das algas castanhas varia do verde-oliva ou castanho-esverdeado até ao castanho-escuro, embora cada espécie apresente uma coloração característica esta varia também individualmente devido a fatores abióticos, como stress, altura do ano, senescência e até mesmo com as fases do ciclo de vida. Estas tonalidades são principalmente derivadas da quantidade de carotenoides, principalmente da fucoxantina (principal responsável pela coloração acastanhada) presentes nos cloroplastos, estes possuem também outros carotenoides, β -caroteno e violoxantina, e clorofila a, c_1 e c_2 e ainda taninos. Normalmente, os cloroplastos apresentam duas membranas no seu retículo endoplasmático (ER), que se apresenta contínua com a membrana exterior do envelope nuclear (Lobban & Harrison 1997).

A estrutura celular das *Phaeophyceae* caracteriza-se especialmente pelas grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares que cercam o protoplasto. As suas paredes são constituídas por duas camadas constituídas por um esqueleto estrutural de celulose e um conteúdo amorfo composto essencialmente por ácido algínico e fucoidana, sendo o ácido algínico o principal constituinte da mucilagem e também da cutícula (Evans and Holligan, 1972). Outra estrutura de particular importância nas *Phaeophyceae* é o pirenóide onde se acumulam substâncias de reserva, como Laminarina e Manitol (R. Lee 2008). As quantidades relativas destes compostos varia entre espécies, diferentes partes da alga, podendo também variar devido a factores ambientais (I-chao 1968; Matsson 2013 Sogn Andersen et al. 2011).

As algas castanhas são utilizadas comumente não só na alimentação, como especialmente para extração de ficocolóides dos quais o Ácido algínico na forma de alginatos, sendo por este motivo apelidades de alginófitas. Dentro das algas castanhas os géneros que apresentam maior interesse comercial são: *Laminaria* (das quais *L.hyperborea*, *L. digitata* e *Saccharina latissima* – ou *L.saccharina*), *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Macrocystis* e *Sargassum* (Figura 5).

Figura 5 - Produção de algas castanhas (Alginófitas) a nível mundial em 2001.



Os dados são apresentados em toneladas de peso seco (PS). *Fonte:* McHugh & (Fao) 2003.

São o grupo de algas mais comercializadas por todo o mundo e têm ganho cada vez mais consideração pelas bioatividades dos compostos que apresentam e pelos seus benefícios na alimentação (Rioux 2010).

Uma das espécies de maior importância é a *Saccharina latissima*, ou *Laminaria saccharina*, intensamente cultivada para fins alimentares, distingue-se por um ligeiro trago adocicado, devido à sua elevada quantidade de polissacarídeos o que a torna também uma das principais fontes para extração de ficocolóides, principalmente em países do hemisfério Norte.

A incidência desta espécie em Portugal é cada vez menor, como tal, é de interesse para o cultivo de algas em Portugal a suplementação ou substituição do cultivo desta espécie por uma mais adaptada e mais incidente nas nossas costas. Para tal efeito foi selecionada para análise uma outra espécie de Laminariaceae – *Laminaria ochroleuca* -, com uma distribuição muito mais generalizada pela costa portuguesa e com características equivalentes e interesse económico e biotecnológico para a realização deste estudo.

Saccharina latissima

Saccharina latissima é uma alga castanha, pertencente ao filo Heterokontophyta (ou Ochrophyta), classe *Phaeophyceae*, ordem Laminariales e família das Laminariáceas, da autoridade de Linnaeus caracterizada por C.E. Lane, C. Mayes, Druehl e G.W. Saunderson, anteriormente designada como *Laminaria saccharina*, comumente conhecida como Kombu-real, *kelp* doce, Cinto-do-mar ou Rabeiro (Pereira & Neto 2015).

A lâmina é inteira, ondulada por toda a sua margem e na região central, o estipe é curto e com um pequeno diâmetro. Com dimensões que chegam a atingir os 3 m de comprimento e 50 centím de largura da lâmina (esporófito adulto). É uma alga de águas frias, encontrada na zona sublitoral até uma profundidade de 30 m, com distribuição desde o polo Norte até ao mar Báltico, encontra-se na costa Norte da Europa, ilhas Britânicas, Gronelândia, Islândia e costa Norte Americana desde Alasca até à costa Californiana (Figura 6), o seu range limita-se às temperaturas aquáticas entre os 0 e os 15 °C, sendo que os gametófitos desta espécie não conseguem atingir a maturação com temperaturas superiores a 15 °C (Matsson 2013).

Em Portugal, esta espécie encontra o seu limite Sul na zona da Póvoa de Varzim (COI - Phycological Digital Collection nº: 2554 (1958-08-30)), mas vem sendo cada vez menos abundante nestas zonas, estando esse limite a deslocar-se mais para Norte devido ao aquecimento das águas.

Ciclo de vida e Crescimento

A *Saccharina latissima* apresenta um ciclo de vida digenético haplodiplonte heteromórfico caracterizado por duas fases: **gametofítica** e **esporofítica**, sendo a primeira uma fase **microscópica**, visível a olho nu quando os zoósporos estão encerrados nos

Figura 6 - Distribuição *S. latissima* no NE Atlântico e Mediterrâneo.



Fonte: UK Marine SAC (adaptado),
acedido em 15-09-2015.

soros que se aglomeram no centro da lâmina do esporófito fértil, e a segunda **macroscópica**, correspondente a macroalga conhecida como *kelp* (Sogn Andersen et al. 2011; Pereira & Neto 2015).

O esporófito maduro torna-se fértil no Outono sendo visível na lâmina os soros contendo os gametófitos que são libertados na Primavera. Os gametófitos femininos quando libertados produzem moléculas que atraem os gametófitos masculinos, ocorrendo a fecundação e formando-se o esporófito jovem que pode crescer 2 a 3 m num ano. Embora o indivíduo tenha uma longevidade de cerca de 3 a 5 anos, atinge a maturidade e torna-se fértil entre 1 e 2 anos.

Durante as estações frias – Dezembro a Junho- a taxa de crescimento dos esporófitos é de cerca de 1cm/dia. Durante as estações quentes a taxa de crescimento decresce, podendo esta estar associada com a limitação de nutrientes no meio (Sjøtun, 1993). As variações do crescimento durante as estações do ano criam no estipe uma diferença de camadas, formando anéis de crescimento, como acontece em algumas árvores (Schiener et al. 2015; Dring & Island 1975).

Aplicações

A *S. latissima* é, como vimos, das espécies mais comercializadas em todo o mundo, sendo a principal espécie cultivada em países como a Noruega. Extremamente apreciada na alimentação, como outras espécies de Laminaria, o seu valor nutricional é já conhecido e o seu conteúdo em polissacarídeos de cadeia longa que funcionam como fibras, é muito recomendado para dietas de emagrecimento, contudo esta espécie é das mais apreciadas devido ao seu paladar ligeiramente adocicado, que lhe deu origem ao nome *Saccharina* (Ledesma-Hernandez & Herrero 2014). É das mais utilizadas na extração de ácido algínico e alginatos (McHugh & (Fao) 2003).

Há séculos que é utilizada na medicina tradicional chinesa e asiática para tratamentos cutâneos, limpeza e purificação da pele, lamas adelgaçantes e até em obstetrícia, eram utilizadas bandas de *Saccharina* seca sobre a barriga da grávida para dilatar o cérvix (Starin and Borden, 1984)

Laminaria ochroleuca

Laminaria ochroleuca também pertencente ao filo Heterokontophyta (ou Ochrophyta), classe *Phaeophyceae*, ordem Laminariales e família das Laminariáceas, foi caracterizada por Bachelot de la Pylaie em 1824 (Dol & Terr n.d.). É conhecida como Kombu-Atlântico, Folha-de-carriola, Fitas ou Taborrão (Pereira & Neto 2015).

Apresenta uma coloração castanho-amarelado de aspeto lustroso, embora seja bastante parecida com a *Laminaria hyperborea* distinguem-se facilmente, pela característica coloração amarelada da zona da união da lâmina com o estipe. A lâmina é dividida em numerosas fitas, o que não se verifica em espécies de cultivo que apresentam uma lâmina inteira ou pouco recortada. O estipe é cilíndrico com um diâmetro considerável e extremamente flexível. Raramente apresentam epífitas na lâmina e nunca no estipe. Os rizoides unem-se formando uma base cónica bem sólida com espessura que pode atingir até 18cm de diâmetro sempre bem fixa ao substrato, por norma rochoso. Com um comprimento médio de 1,5 m embora possa atingir os 2 m. A *L. ochroleuca* apesar de ser uma espécie perene perde renova a lâmina anualmente.

Encontra-se ao longo de toda a zona intertidal, é uma espécie bastante prevalente nas costas portuguesas. Facilmente reconhecida pela coloração amarelada e o estipe sendo tão consistente consegue manter-se ereto, sendo muitas vezes visível fora de água, na linha de baixa-mar. Embora em alguns locais esta espécie possa ser encontrada em águas mais profundas, a ocorrência é rara.

A sua distribuição geográfica vai desde Atlântico Norte, por toda a costa Este das Ilhas Britânicas até à região de África equatorial, muito comum em toda a zona Atlântica do Mediterrâneo por todo o estreito de Messina e na Macaronésia (Figura 7).

Figura 7 - Distribuição *L. ochroleuca* no NE Atlântico e Mediterrâneo.



Fonte: UK Marine SAC (Adaptado), acedido em 15-09-2015.

. Ciclo de vida e Crescimento

Tal como *S. latissima*, também a *Laminaria ochroleuca* apresenta um ciclo de vida digenético haplodiplonte heteromórfico com fases **gametofítica** e **esporofítica** (Figura 8).

Figura 8 - Ciclo de vida da *Laminaria ochroleuca*.



a) Esquematisação do ciclo; b) Esporófito adulto (recruta) obtido em cultivo; c) Esporófito jovem (observado à lupa binocular); d) Gametófito masculino (acima) e gametófito feminino (abaixo) (M.O. amp.40x)

O crescimento dos esporófitos dá-se durante as estações Inverno-Primavera. Durante Verão o crescimento da lâmina reduz, no início de Outono, o esporófito atinge maturidade entra em período fértil e produz esporos, que encerram os zoósporos, visíveis no centro da lâmina (Lüning et al., 2000; Pereira et al. 2011).

A *L. ochroleuca* sendo uma espécie de climas mais quentes, os seus limites de temperatura estão entre os 4 °C e os 25 °C (Pereira et al. 2011). A profundidade a que esta espécie pode ser encontrada varia consideravelmente, consoante a temperatura e a luminosidade podendo atingir profundidades de 35 m (Birkett et al., 1998; Pereira et al. 2011; Luis & Isabel 2002).

Aplicações

Embora a *L. ochroleuca* seja uma espécie menos utilizada que outras espécies de Laminaria, como *S. latissima*, *L. hyperborea* e *L. digitata*, este facto é especialmente devido à sua distribuição geográfica. Assim, os principais países que recolhem e produzem esta espécie são França, e Espanha.

Embora não seja muito frequente a sua utilização na alimentação esta espécie pode substituir qualquer Laminaria e o seu conteúdo nutricional é bastante próximo do da *Saccharina*. É também utilizada na extração de ficocolóides: Alginatos e Fucoídano. Embora não seja uma espécie preferencial (Chopin 2013).

A sua aplicação é verificada essencialmente na área da cosmética, para extração de ficocolóides (S. M. Cardoso et al. 2014). Os seus extratos demonstraram atividade analgésica no sistema nervosa central segundo e como agente anti envelhecimento, demonstrando proteção Da estrutura de ADN contra radiação UV (Vazquez-Freire, et al. 1994). Vários estudos comprovam também a sua atividade antimicrobiana, antifúngica e antibacteriana (Oumaskour et al. 2012) e ainda anti-inflamatória, utilizada em terapêuticas por aplicação tópica. Devido a estas propriedades e às suas propriedades reológicas, os extratos de *L. ochroleuca* são utilizados em produtos cosméticos de países como Alemanha, Reino- Unido, França e Espanha. Como outras Laminárias a sua capacidade antibacteriana antifúngica e antioxidantes têm sido estudadas (Oumaskour et al. 2012; Heffernan et al. 2015).

Polissacarídeos

Os principais polissacarídeos de interesse nas algas castanhas são: alginatos e polissacarídeos sulfatados como fucoídanas e laminarinas. Estes são conhecidos como ficocolóides pelas suas características hidrocolóides – dispersão microscópica através da solução líquida formando géis (Venugopal 2011).

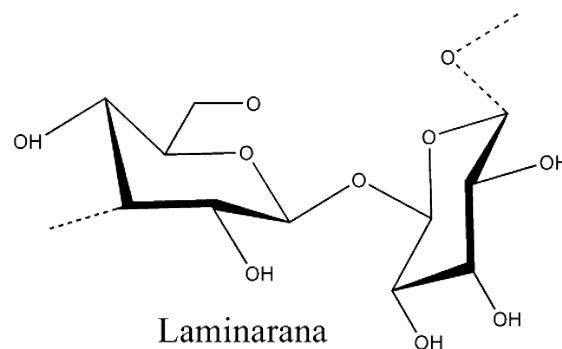
As características e concentrações destes são extremamente variáveis de espécie para espécie e no próprio indivíduo a sua concentração está dependente das necessidades de crescimento do indivíduo. Segundo Percival and MacDowell (1967), a variação sazonal dos polissacarídeos em espécies de Laminaria ocorre da seguinte forma:

- Durante a fase de divisão celular o principal produto da fotossíntese é o manitol, os restantes hidratos de carbono encontram-se em concentrações reduzidas;
- Durante o crescimento e alargamento celular, aumenta a concentração de alginatos – normalmente ácido algínico associado a sais – e laminarina.
- Nos finais de Verão a concentração de laminarina e manitol atingem os máximos de concentração enquanto ácido algínico, fucoidana e celulose atingem o mínimo.
- Durante a formação de esporos e períodos em que o metabolismo supera a taxa de fotossíntese existe um aumento da concentração de alginatos e fucoidana e uma diminuição da concentração de laminarina e manitol.

Laminarina

Ao contrário de outros polissacarídeos das algas a Laminarina não possui propriedades hidrocolóides. É um glucano de baixo peso molecular, composto por monómeros de D-glucose com ligações em $\beta(1,3)$ e ramificações em $\beta(1,6)$ no interior das cadeias (Rioux et al.2010).Estes polissacarídeos estão presentes na forma solúvel e insolúvel, sendo a primeira completamente solubilizada em água fria e a segunda forma apenas solúvel em água quente (Chevolot et al. 2001). Está presente na célula enquanto substância de reserva encerrada no pirenoide.

Figura 9 - Estrutura química bidimensional da molécula de Laminarina.



Fonte: A partir de ChemDraw Ultra©.

A Laminarina parece ser formada a partir de manitol, pois o aumento da concentração de manitol leva ao aumento da concentração de laminarina, contudo, em condi-

ções de diminuição da concentração de nutrientes, diminuição da luminosidade ou diminuição da temperatura a produção de manitol diminui no entanto a concentração de laminarina aumenta, o que demonstra que esta tem função de reserva (Percival and MacDowell 1967).

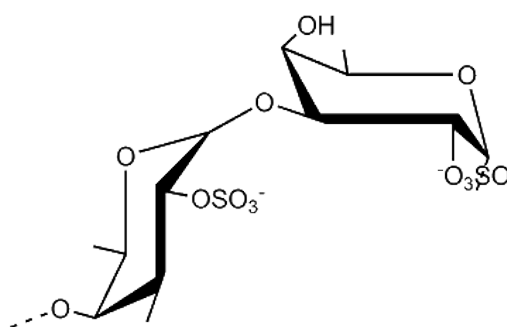
Apresenta efeitos benéficos para o sistema imunitário e propriedades antivirais, como a fucoïdana, é utilizada em suplementos alimentares devido a estas características (Kraan 2012).

Fucoïdana

A Fucoïdana é o fucano característico das algas castanhas, isolada e caracterizada pela primeira vez por Kylin em 1913. Os fucanos são polissacarídeos sulfatados compostos por uma estrutura dorsal de fucoses, contudo, vários estudos têm sido feitos numa tentativa de caracterizar a sua estrutura, mas a sua caracterização está longe de ser concensual.

primeiros estudos da caracterização da estrutura da fucoïdana datam de 1950 (Ale, Mikkelsen, et al. 2011) em que mostram a ligações (1→2) aos resíduos 4-o-sulfato das fucopiranoses. Contudo, tem sido reportada a existência de fucoses ligadas na posição 4' dos grupos sulfato nos resíduos de fucose da cadeia principal. Foi ainda reportada a existência de ramificações a cada 2-3 resíduos de fucose.

Figura 10 - Estrutura química bidimensional da molécula de fucoïdana.



Fucoïdana

Fonte: A partir de ChemDraw Ultra©.

Sabe-se, no entanto, que as estruturas dos fucanos diferem entre as diferentes espécies de algas e podem mesmo variar dentro da mesma espécie. Dada a

heterogenidade estrutural destes entre espécies, as condições de extracção utilizadas para obtenção destes compostos ditam o isolamento das diferentes formas dos fucanos, sendo assim necessária a caracterização estrutural do composto conseguido em determinada espécie com determinado método de extracção. Os fucanos têm sido classificados em dois diferentes grupos: o primeiro, caracteriza os fucanos presentes em espécies como *Saccharina latissima*, *Laminaria digitata*, *Analiplus japonicus*, *Cladosiphon okamuranus* e *Chorda filum*, estes compostos por cadeias centrais de resíduos de α -L-fucopiranosose ligados em (1 \rightarrow 3); o segundo grupo inclui fucanas isoladas de *Ascophyllum nodosum* e espécies de *Fucus*, que por sua vez, apresentam cadeias centrais compostas por repetições de resíduos de α -L-fucopiranosose ligados nas posições (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4). Contudo, outros estudos apontam para a existência de estruturas mais complexas, algumas delas com estruturas ramificadas. Muitos fucanos extraídos de algas castanhas apresentam ainda ligações a monossacarídeos como glucoses, galactoses, xiloses e manoses e ainda a ácidos urónicos e grupos acetil (Tabela 3) (Jiao, 2011).

Tabela 3 -Algumas estruturas representativas de fucoïdanas de algas castanhas.

Espécie	Estrutura da Fucoïdana	Referencia
<i>Analiplus japonicus</i>	3(4Fucp) e 1(2Fucp)por cada dez resíduos (1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp(2/4SO ₃ ⁻)	Bilan et al., 2007
<i>Ascophyllum nodosum</i>	(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp e alguns (1 \rightarrow 4)- α -L-Fucp com (1 \rightarrow 3)- α -L-(2 e/ou4Fucp)	Marais et al., 2001
<i>Saccharina latissima</i>	(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp(4SO ₃ ⁻) e (1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp(4SO ₃ ⁻) ou(2Fucp)	Usov et al., 1998

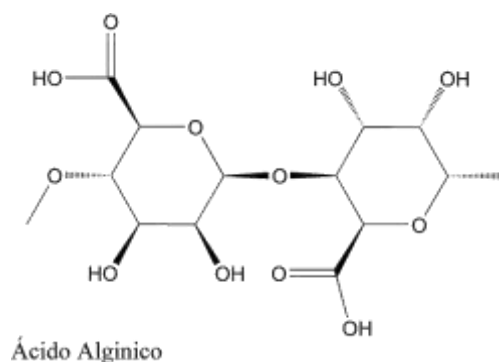
Fonte: 'Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae.' Jiao et al., 2011

Estudos revelam actividade da fucoïdana como antiviral, inclusive no tratamento de HIV, herpes e poliovirus (Kraan 2012). Também foram identificadas actividades anti-bacterianas, antifúngicas (Pielesz et al. 2011) e até mesmo anti-cancerigenas (Ale, Maruyama, et al. 2011).

Alginatos

O alginato é o polissacarídeo mais importante em termos económicos, devido às suas características de ficolóide. Os ficolóides são polissacarídeos de cadeia longa constituintes da parede celular que em solução têm tendência a formar soluções colóidais (propriedade reológica que define um estado intermédio entre uma solução e uma suspensão), o que lhes confere um especial interesse na sua utilização enquanto gelificantes, emulsionantes e espessantes, com interesse para as mais variedades vertentes da indústria (Venugopal 2011).

Figura 11 - Estrutura química bidimensional do Ácido algínico, composto base de todos os alginatos.



Fonte: A partir de ChemDraw Ultra©.

O ácido algínico foi descoberto em 1883, por um farmacêutico britânico E.C.C.Stanford que apelidou o composto de alginato. No entanto, o termo alginato, refere-se ao composto extraído normalmente associado a sais minerais como sódio, cálcio ou potássio. Assim, os principais alginatos utilizados na indústria alimentar como aditivos naturais estão já referenciados com os seguintes códigos:

- Ácido algínico – E400
- Alginato de sódio – E401
- Alginato de potássio – E402
- Alginato de amónia – E403
- Alginato de cálcio – E404
- Alginato de propilenoglicol – E405

Quimicamente, o ácido algínico é constituído por blocos de ácido β -D-manurónico e ácido α -L-gulurónico. Estes formam blocos de regiões homopoliméricas e regiões alternadas na constituição do polissacarídeo. O ácido polimanurónico possui uma estrutura similar à da celulose formando uma cadeia linear flexível, enquanto o ácido poligulurónico forma um polímero de estrutura rígida provocada por ligações iónicas com catiões divalentes, conhecido como «caixa de ovo». As concentrações dos blocos de ácido manurónico e ácido gulurónico, variam consoante a espécie, estação de colheita e parte da alga de onde são extraídos e é o rácio entre estes dois blocos (rácio M/G) que conferem variação à elasticidade da molécula, assim sendo, é de especial interesse o estudo do rácio M/G para o a utilização do ácido algino na indústria.(Sakugawa et al. 2004)

Como temos vindo a falar, o ácido algínico e alginatos são utilizados em todas as indústrias desde: industria do papel e tintas. A estabilizador de suspenções, espessante ou gelificante em alimentos, produtos cosméticos ou farmacêuticos: Cerveja, iogurtes, gelados, champôs, cremes, loções, compressas, etc. (S. Cardoso et al. 2014)

Na saúde os alginatos demonstram redução de absorção de colesterol, promove cicatrização de feridas e queimaduras e ainda propriedades anti-cancerígenas por inibição do crescimento de células tumorais (Laurienzo 2010; Kraan 2012). São também utilizados no tratamento de problemas gastrointestinais (Kraan 2012)

Análise por Espectroscopia Vibracional -FTIR

A análise de amostras por FTIR consiste numa técnica de espectroscopia vibracional, utilizando infravermelhos – *Fourier Transform Infra-Red*, FTIR. Esta técnica consiste essencialmente em fazer incidir sobre uma determinada amostra um feixe de luz correspondente ao espectro de infravermelhos, cujo número de onda é maior e a frequência menor do que o espectro de luz visível, o que permite, e registar a sua reflectância após a incidência da luz na amostra. Estes registos são nos transmitidos em picos de reflectância a determinado número de onda do espectro, picos que são característicos de cada um dos grupos livres das moléculas da amostra, funcionando como autenticas impressões digitais na deteção da sua presença (Pereira & Ribeiro-claro 1993). Assim, uma vez conhecida a estrutura dos compostos característicos das algas e conhecidos os seus padrões de reflectância do espectro de IR, a espectrofotoscopia apresenta-se uma

técnica rápida e eficaz na caracterização dos compostos de uma determinada amostra. A técnica de FTIR, pode ser utilizada para material em qualquer fase física, sólida líquida ou gasosa, para o nosso caso pode ser utilizada em biomassa seca e triturada o que foi tornando este processo mais rápido e eficiente (Chopin and Whalen, 1993).

A técnica desenvolvida por Pereira, Ribeiro Claro e os seus colaboradores (2003, 2006, 2009, 2013), baseada na técnica de FTIR-ATR (Reflectância Total Atenuada), veio permitir a identificação dos polissacarídeos e outros compostos das algas através desta técnica não invasiva e sem necessidade de purificação dos compostos (Tabela 4).

Tabela 4 – Bandas do espectro características dos Polissacarídeos de Algas Castanhas.

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo caracterizado	Polissacarídeo	Referência
808	Ácido manurónico (uni.)	Ácido algínico	Mackie (1971)
787	Ácido gulurónico	Ácido algínico	Mackie (1971)
1320 e 1290	Rácio M/G	Ácido algínico	Filipov e Kohn (1971)
1030/1080	M/G > 1	Álginato de cálcio	Sakugawa (2004)
1010/1025	M/G < 1	Álginato de magnésio	Sakugawa (2004)
1025	Grupos –OH do Á. gulurónico	Ácido algínico	Pereira (2013)
1220/1260 1210/1280 1195/1237	Grupos éster-sulfato (S=O)	Fucoidana e outros polissacarídeos sulfatados	Pereira (2013)
1239/1247	S=O	Fucoidana e outros PS	Pereira (2013)
1037/1071	C-O associado a um grupo C-O-SO ₃	Heterofucanos	Pereira (2013)
820/850	C-O-S	Laminarina	Pereira (2013)

Fonte: ‘Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed with Potential use in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries’(Adaptado); L. Pereira e P. Ribeiro Claro (2013).

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

Recolha de Biomassa Algal

Para a obtenção de biomassa, procedeu-se à recolha de uma amostra de vários indivíduos adultos de cada espécie. As recolhas foram efetuadas no final do Verão (mês de Setembro) durante períodos de baixa-mar com os menores níveis de maré possíveis. No entanto, uma vez que as duas espécies são difíceis de encontrar na mesma praia, na nossa costa, procedemos a duas amostragens em duas praias diferentes uma para cada espécie.

Praia da Terra Nova – *Laminaria ochroleuca*

A praia de Vila-Chã, em Mindelo, pertencente ao concelho da Póvoa de Varzim, apresenta um extenso areal com um cordão rochoso que se estende praticamente por toda a costa. A existência deste cordão rochoso permite a formação de imensas zonas de poças na zona intertidal, dando origem assim a um ecossistema extremamente rico em macroalgas.

Nesta zona predominam espécies de *kelps*, sendo que a *Laminaria ochroleuca* é das de mais predominantes, encontrando-se nas poças de maré, perfeitamente distinguível pela sua típica coloração castanho-amarelado do talo. Procedeu-se, assim, à identificação e recolha de uma amostragem significativa de 6 exemplares, colhidos em diferentes pontos da praia. A colheita foi efetuada em baixa-mar, com uma maré a 0,85 m de altura na zona intertidal.

Praia da Pedra Alta – *Saccharina latissima*

A cerca de 40km a Norte da praia da Terra Nova, encontra-se a praia da Pedra Alta, em Castelo-de-Neiva, pertencente ao concelho de Viana-do-Castelo. Esta praia está situada numa baía delimitada por dois pontões de construção humana, o seu areal é extenso, o pontão a Norte chega a ter 80 m de extensão mar-a-dentro, proporcionando uma zona de águas mais calmas.

Aqui se define o limite Sul da distribuição geográfica da *Saccharina latissima*, não tendo sido encontrado qualquer espécime a sul desta praia. Foi então efetuada uma amostragem de 6 indivíduos em 6 pontos de colheita, relativamente mais próximos, pois, embora, tenham sido recolhidos durante a baixa-mar com uma maré de 0,78 m, os exemplares da espécie eram bastante escassos e maioritariamente encontrados junto ao pontão, já no limite da zona intertidal, mais afastados da costa.

Extração

Após a recolha no campo, procedeu-se à limpeza das impurezas e epibiontes/epífitas, fazendo uma lavagem das algas com água salgada corrente, em seguida passou-se por água salgada autoclavada para retirar possíveis impurezas transportadas na própria água. Em seguida as algas foram devidamente limpas com papel, retirando excesso de humidade. Uma vez que os espécimes adultos recolhidos teriam que posteriormente ser triturados e a amostra deveria ser homogeneizada para as diferentes estruturas da alga (rizoma, estipe e lâmina), procedeu-se ao corte das mesmas em fragmentos mais pequenos. Em seguida, foram colocadas numa estufa sem arejamento a 40 °C durante 72 h.

Após a secagem, procedeu-se, então, à moagem das amostras, para tal, e com o objetivo de garantir a homogeneização da amostra foram trituradas porções das várias estruturas e dos vários espécimes em conjunto recorrendo a um ‘moinho de café’ devidamente limpo e desinfetado com álcool. Após a moagem, toda a biomassa pulverizada obtida foi colocada num recipiente e agitada para garantir uniformidade das amostras em extração. Este processo foi feito para cada uma das espécies de interesse resultando em duas amostras homogeneizadas, cada uma com 6 espécimes. Para cada extração efetuada foi retirada 1g de biomassa.

Extração sequencial em Macroalgas

A extração sequencial consiste num processo em que são extraídos os diversos componentes de forma sequencial consoante a natureza química dos mesmos (Figura 12).

Figura 12 - Esquema da extração sequencial de compostos.



Na primeira etapa da extração, concretamente dita, extrai-se os compostos apolares com recurso a hexano, na segunda é utilizado metanol para extrair compostos polares, a terceira é aquosa que permite hidrolisar os polissacarídeos na solução aquosa e em seguida precipitá-los com etanol.

Extração em hexano

Inicialmente adicionou-se 20mL de hexano às 1 g de amostra num *gobeleto*, mantendo numa placa de agitação durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após decorrido esse tempo, é usada a filtração a vácuo com o auxílio de filtros de sílica em funil com porosidade de 15-40 μm acoplados num quitasato. Sob vácuo, o conteúdo do *gobeleto* foi vertido para o filtro, o solvente foi recuperado para um recipiente e guardado e a amostra inicial retida no filtro de sílica totalmente seca. A amostragem seca (sem resíduos do solvente) foi recuperada facilmente do filtro de sílica sem perdas significativas. O processo foi repetido três vezes, até a solução ficar translúcida.

Este processo serve para retirar da nossa amostra os compostos apolares, demonstrando estes quimicamente uma grande afinidade e solubilidade em reagentes com a mesma natureza apolar, neste caso o n-Hexano (Chopin, 2010), o facto de se verificar uma descoloração do extrato indica a remoção dos pigmentos de natureza apolar, quando a solução obtida se torna translúcida indica que o solvente já não é capaz de extrair mais substâncias apolares da amostra.

No final, o total da solução de hexano que foi reservada desde o início e ao longo do processo, uma vez que não era do nosso interesse utilizar os compostos apolares, este extrato foi simplesmente reservado e congelado, para possível utilização posterior.

Extração em metanol

De seguida executou-se o mesmo método com Metanol, também se efetuaram três repetição para garantir a eficácia do solvente na extração dos compostos polares. O me-

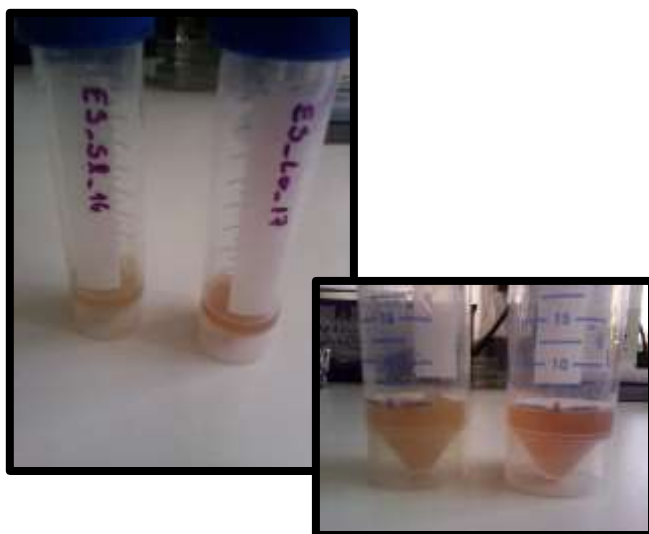
tanol vai por sua vez proceder à remoção dos compostos polares, solúveis em solventes orgânicos de características polares como é o caso do metanol (Chopin, 2010). A amostra seguiu para a próxima extração e a solução de metanol obtida no processo foi também armazenada e congelada, sendo que ainda não tem os compostos pretendidos.

Extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos

A próxima extração é a aquosa. A extração aquosa vai permitir a remoção dos compostos de natureza coloidal e hidrossolúveis presentes na amostra, entre os quais os nossos polissacarídeos de interesse. Neste caso o solvente é a água destilada (100mL/g de biomassa inicial), colocou-se a amostra em água destilada a 100 °C, por 2 h.

Posteriormente, a solução foi filtrada a quente com os filtros de sílica referidos anteriormente. O que ficou retido no filtro de sílica passou a ser um resíduo não aproveitado.

Figura 13 - Extrato de Polissacarídeos obtido por Extração Sequencial (ES).



Apenas a solução aquosa recuperada no quitasato tem interesse. Essa solução aquosa é rica em polissacarídeos para os isolar procedeu-se à precipitação com recurso a etanol (96-100%). Após arrefecer a solução foi adicionado etanol a uma proporção 1:1. A precipitação dos polissacarídeos é visível imediatamente, passamos a ter duas fases, a **fase líquida** (etanol + solução aquosa) e **fase sólida** em suspensão (polissacarídeos). Verificamos que idealmente a solução deveria arrefecer até temperaturas inferiores a

40 °C e o etanol refrigerado, a -4 °C, para uma precipitação mais rápida e mais densa de polissacarídeos, para recuperar o máximo possível de polissacarídeos presentes na suspensão, deixou-se repousar a solução por 24 h a 4 °C.

Os Polissacarídeos em suspensão foram recuperados por centrifugação, a solução (sobrenadante) foi rejeitada e o precipitado (polissacarídeos) (Figura 13) foi seco numa estufa a 60 °C por 72 h e posteriormente liofilizado pelo mesmo período.

Extração Alcalina

Ao contrário do método de extração sequencial este método não é utilizado para a separação dos diferentes compostos, é sim um método específico para polissacarídeos, mais concretamente ficocolóides e é utilizado na Indústria (Hoagland and Lieb, 1915). Neste método em vez da sequencial remoção dos diferentes compostos, procede-se apenas a uma pré-lavagem da biomassa com Metanol:Acetona para dissolução do conteúdo celular e remoção de compostos sem interesse. A utilização de Hidróxido de Sódio (NaOH) é também utilizada na produção de celulose, permitindo a sua purificação.

Extração em Metanol:Acetona

Num *gobelet*, a amostra de 1 grama de biomassa algal foi tratada com uma solução de metanol (100%) e acetona (100%) a uma concentração de [1:1] 20mL de cada por 20min, com agitação à temperatura ambiente. A solução foi separada da biomassa restante tal como no MES, através de um filtro de porosidade 15-40 µm associado a um funil, ligado a um quitazato, sob vácuo. A solução obtida foi armazenada e biomassa retida no filtro foi recuperada para dar continuidade ao processo. Esta extração foi repetida também 3 vezes para garantir a extração de compostos que não são interessantes para o estudo em questão mas que poderiam interferir com a afinidade do método na extração dos polissacarídeos.

Extração em Hidróxido de Sódio e precipitação dos polissacarídeos

Procedeu-se ao tratamento da amostra com uma solução de 150 mL de Hidróxido de Sódio - NaOH (1M), Aqueceu-se a solução até 80/85 °C e manteve-se a essa temperatura, com agitação regular, utilizando uma vareta de vidro, durante 4 h. A solução foi, então, filtrada duas vezes, utilizando um tecido e pelo mesmo processo utilizado anteriormente, este processo foi efetuado a quente e sob vácuo. A solução resultante foi colo-

cada num balão de vidro (especial para evaporador rotativo) e colocado no evaporador rotativo submergiu-se a solução no banho-maria a 40 °C com rotação, até reduzir o volume para 1/3 do volume inicial.

A precipitação dos polissacarídeos foi feita tal como em MES, adicionando etanol 96%, a -4 °C, até perfazer o dobro do volume da solução inicial. A precipitação dos polissacarídeos é verificada de imediato no entanto não é tão evidente como em MES, foi também deixado em repouso por 24 h e após esse período foi centrifugado e retirado o sobrenadante. O precipitado foi tratado da mesma forma que no MES, seco em estufa, a 60 °C e liofilizado em seguida.

Precipitação por Cálcio

Existem vários trabalhos em que foi utilizado cálcio para precipitar polissacarídeos das algas, tanto na forma de cloreto de cálcio (CaCl_2) como carbonato de cálcio (CaCO_3), alguns referem este método como sendo mais afinado para extração de algina-tos.

Foi, portanto, testado em ambos os métodos de extração, a adição de cloreto de cálcio para precipitação dos polissacarídeos, ou seja, o processo de extração foi exatamente igual até à precipitação, na vez de utilizar etanol, foi adicionado cloreto de cálcio diretamente na solução do extrato a uma concentração de 2% (Balboa et al., 2013).

Figura 14 - Imagens do processo de extração.



Todas as amostras foram em seguida congeladas (-80 °C) e liofilizadas por 72 h garantindo a total remoção total da hidratação. Os extratos foram devidamente pesados, aquando húmidos, após extrair o sobrenadante e ainda após a liofilização, para ser possível determinar a percentagem de extrato conseguido por unidade grama de biomassa algal.

Análise dos Polissacarídeos através FTIR

Uma vez secas e liofilizadas as amostras seguiram para análise de conteúdo dos extratos, com colaboração do professor Paulo Ribeiro Claro da Universidade de Aveiro e da sua equipa. As amostras foram analisadas por espectroscopia vibracional através da técnica de Fourier com Reflectância Total Atenuada – FTIR-ATR.

Como foi referido, estas análises podem ser feitas em material biológico sem necessidade de extração dos compostos de interesse. Como veremos nos espectros obtidos diretamente de biomassa algal das duas espécies de interesse utilizados, para comparar com os resultados dos extratos.

Foram, então, analisadas três amostras de cada um dos métodos de extração para cada espécie e consequentemente comparados com os espectros conseguidos em amostras de biomassa algal de cada espécie.

Ensaio antifúngicos

Extratos algais e atividade antifúngica

Para testar a bioatividade como antifúngicos dos extratos algais conseguidos foram utilizados dois métodos standardizados para a microbiologia clínica para seleção e preparação de agentes antifúngicos definidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, atualmente NCCLS). Os métodos testados foram o método de microdiluição em caldo para determinação da suscetibilidade de leveduras aos agentes antifúngicos, M27-A3 (CLSI, 2008) e o método de difusão em disco para antifúngicos, M44-A para determinação da concentração mínima inibitória (MIC);

Preparação dos extratos de algais

Uma vez que o objetivo deste trabalho é determinar a bioatividade dos polissacarídeos extraídos, foram utilizados apenas os extratos referentes a estes e foram selecio-

nados aqueles que apresentavam uma melhor qualificação desses mesmos em FTIR. Assim sendo selecionamos os extratos conseguidos através do método de extração sequencial com precipitação alcoólica ou precipitados com cloreto de cálcio em ambas as espécies, identificados como representado na Tabela 5.

Tabela 5 - Classificação dos extratos utilizados para análise de bioatividades antifúngica.

Código	Tipo de Extração	Espécie
ES_SL	Extração Sequencial c/ etanol	<i>Saccharina latissima</i>
ES_LO	Extração Sequencial c/ etanol	<i>Laminaria ochroleuca</i>
Ca+_SL	Extração Sequencial c/ CaCl	<i>Saccharina latissima</i>
Ca+_LO	Extração Sequencial c/ CaCl	<i>Laminaria ochroleuca</i>

Estes extratos foram ressuspensos em água ultrapura Milli-Q, para obter uma concentração final de 10g/L em 10mL. Contudo estes extratos não são facilmente solúveis, como tal, procedeu-se à utilização de ultrassons submetendo impulsos de 50 hz de 10 segundos de duração, seguidos de 10 segundos de pausa por um período de 2 minutos, tendo especial em manter a temperatura das amostras abaixo dos 20 °C. Este processo permitiu a total dissolução de todos os extratos, permitindo assegurar a integridade da estrutura dos polissacarídeos (Ansari et al. 2012).

Após a ressuspensão dos extratos estes foram diluídos para as concentrações *stock* desejadas: 5 g/L, 2 g/L, 1 g/L e 0,1 g/L, assim ao adicionar-mos 20 µL deste stock a um volume final de 200 µL, obtêm-se as concentrações a testar: 500 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL e 10µg/mL respetivamente.

Espécies e estirpes de fungos

A bioatividade antifúngica dos extratos foi testada para quatro espécies de leveduras do Género *Cândida*: *Candida albicans* YP0037, *Candida glabrata* YP0852, *Candida parapsilosis* YP0002 e *Candida krusei*, fornecidas pelo laboratório MMYRG, pertencente ao CNC.

Estas estirpes provêm de colónias conseguidas a partir de amostragem clínica, posteriormente identificadas, isoladas e armazenadas em meio Sabouraud com glicerol (para manter a integridade das células durante o processo de congelamento) a -80 °C.

Antes da inoculação, foram feitas subculturas dos fungos em meio de dextrose de batata agar (PDA) para assegurar a viabilidade das colónias e garantir a pureza das culturas. São seguidamente incubadas a 35 °C.

Para garantir que as culturas de fungos se encontram biologicamente mais ativas e com uma taxa de reprodução ótima, foram repicadas novamente para novas placas de meio de extrato de levedura e dextrose peptona (YPD) e incubados por apenas 24 h a 35 °C.

Ensaio de Micro-diluição

Preparação do inóculo de fungos

É preparado o inóculo suspendendo algumas colónias (cerca de 5 colónias com cerca de 1mm de diâmetro, selecionando-se as mais isoladas) da cultura de cada espécie de *Candida* após as 24 h de incubação, numa solução salina estéril de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85%. À qual se irá ajustar a densidade ótica para 0.5 MacFarland, utilizando para tal um espectrofotómetro Macfarland, que faz a leitura a um número de onda pré-definido de 530 nm, antes da leitura a suspensão tem de ser uniformizada, vortexando durante 15 s o inóculo antes de proceder à leitura. A esta densidade ótica sabemos por definição que a nossa suspensão tem ente 1×10^6 e 5×10^6 células por mL.

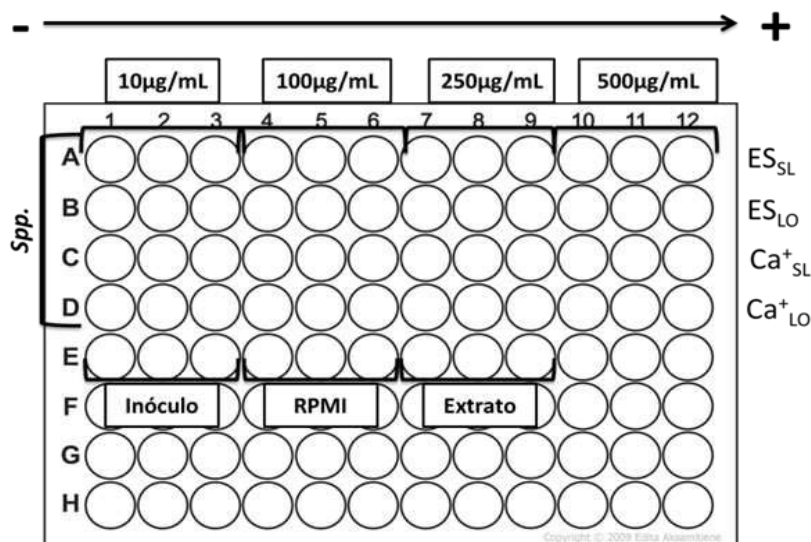
Contudo, o inóculo a utilizar para testar o poder antifúngico dos nossos compostos deverá ter uma concentração inicial de cerca de 5×10^2 a 2.5×10^3 células por mL. Para tal, procedemos à diluição do inóculo, fazendo duas diluições sequenciais, a primeira de 1:100 e desta diluímos novamente 1:20 em RPMI 1640 – como recomendado pelos métodos de referência, o RPMI 1640 utilizado foi tamponizado com MOPS[3-(N-morpholino)] e continha uma concentração final de glucose de 2%.

Inoculação do agente antifúngico

Numa microplaca de 96 poços foram incubados em triplicado 180µL de inóculo do fungo recentemente preparado com 20µL do extrato algal à concentração a testar, pre-dispostos

como indicado na Figura 15. Como controlo de crescimento foi feito um triplicado de 180 µL de inóculo do fungo em RPMI e acrescentou-se os próximos 20 µL de água ultrapura MilliQ (sem agente antifúngico) em cada poço, como controlos de contaminação, fizemos triplicados do próprio meio de cultura RPMI 1640 para garantir que não estaria contaminado, fazendo um triplicado de 200 µL deste em cada poço, por fim, ainda para garantir que não havia contaminação externa dos extratos algais, foram também inoculados 20 µL em 180 µL de RPMI em triplicado para cada uma das concentrações de cada um dos extratos. Incubar por 24 h a 30 °C, sem agitação.

Figura 15 - Representação da microplaca e do esquema utilizado para análise da bioatividade.



Em cima, a indicação da concentração, iniciando da mais pequena para a maior e contendo três réplicas de cada concentração. Do lado esquerdo temos a indicação da espécie ou estirpe de fungos a utilizar. Do lado direito temos a indicação de qual o extrato que será testado ao longo da linha. Por último em baixo (linha E) temos os controlos em triplicado – controlo só contendo inóculo, controlo só contendo RPMI e controlo só contendo extrato, na realidade foi realizado um controlo para cada concentração de cada extrato utilizado.

Após o período de incubação o crescimento das leveduras foi visualmente observado e depois ressuspendido o conteúdo de cada poço e a microplaca foi lida no espectrofotômetro *Spectramax M5 Microplate Reader*® com um número de onda de 600 nm e uma agitação inicial de 30 s.

Ensaio de difusão em disco

Preparação dos discos

Inicialmente foram preparados os discos com o agente antifúngico. Para cada diferente extrato testaram-se as mesmas concentrações que foram testadas no ensaio anterior.

Utilizando discos de papel de filtro com 20 mm de diâmetro, embebidos em 20 µL da solução de extrato à concentração desejada.

Segundo a norma o inóculo deve ser preparado de forma idêntica ao método de micro-diluição, como tal, foi utilizado o mesmo inóculo inicial para os dois métodos.

Preferencialmente até 15 min após a preparação da suspensão de bactérias, mergulhar uma zaragatoa na suspensão, deve rodar-se a zaragatoa quando mergulhada na suspensão e seguidamente pressionada contra a parede do tubo para retirar o excesso de solução. Seguidamente espalha-se na placa de petri de meio agar Mueller-Hinton com 2% de Glucose e 0.5 µg/mL de corante Azul-de-metileno (as placas devem estar devidamente hidratadas mas sem excesso de humidade), espalhar uniformemente o inóculo do fungo por toda a placa.

Seguidamente são colocados os discos com o agente antifúngico, estes devem estar devidamente secos a quando da aplicação na placa e devem ser colocados o mais afastado possível um dos outros e dos limites da placa, com uma pinça colocar o disco e pressionar levemente para que esta adira ao meio agar para que o agente se difunda pelo meio. Incubar em seguida, a 35 °C por 24 h. Após esse período é feita a leitura visual do resultado, quando existe inibição do crescimento verifica-se um halo em torno do disco, caso não haja inibição o crescimento das leveduras é uniforme.

Cultivo

Foram feitos alguns ensaios para o cultivo das espécies de interesse – *Saccharina latissima* e *Laminaria ochroleuca*. O objetivo seria a obtenção de biomassa algal para extração de polissacarídeos para determinar a variação da composição em polissacarídeos. Os primeiros ensaios feitos tinham em vista a comparação das seguintes variáveis:

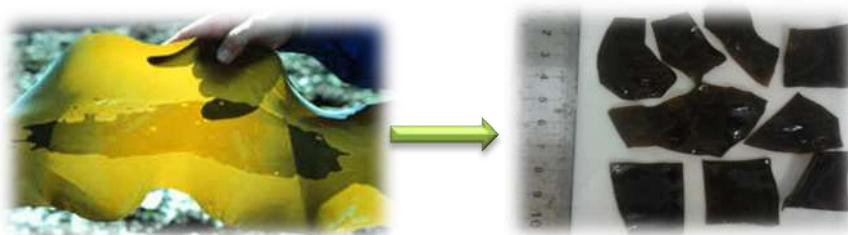
1. Caracterização das diferentes espécies – *S. latissima* e *L. ochroleuca*
2. Fase de crescimento – esporófitos jovens, esporófitos adultos, gametófitos;
3. Meio de cultivo – disponibilidade de nutrientes;

Obtenção do ciclo de vida

Gametófitos

Para a obtenção das diversas fases do ciclo de vida procedeu-se à recolha de exemplares de esporófitos adultos férteis em *habitat* natural. Os indivíduos adultos quando férteis adquirem uma tonalidade mais escura no centro da lâmina (Figura 16) que é provocada pelos soros que encerram os esporos.

Figura 16 - Fotografia de de *Saccharina latissima*



a) um indivíduo adulto com soros visíveis na lâmina; b) cortes realizados nas porções de lâminas contendo soros;

Após a recolha, cortou-se estas zonas férteis em pequenas porções. Fez-se a desinfeção do material biológico, através de passagens sucessivas por betadine a 5% e água do mar autoclavada e posteriormente, submeteu-se a um banho de ultrassons para eliminar possíveis epífitas.

Esses quadrados foram medidos para calcular a densidade de esporos por unidade de área usando a câmara de *Neubauer*. Após a desinfecção secou-se o material biológico com papel científico e colocou-se no frio, a 4 °C, no escuro, durante 24 h.

Passadas as 24 h, procede-se à reidratação com água do mar autoclavada (a.C.), deixa-se repousar por 1 h agitando ocasionalmente.

Este processo de desidratação e reidratação leva à libertação dos esporos. Seguidamente, filtrou-se a suspensão (com uma rede de 30 µ de diâmetro dos poros) para isolar os esporos libertados.

Após a libertação dos esporos, determina-mos a sua densidade, utilizando para isso a câmara de *Neubauer*, onde se coloca uma gota do isolado e determina a densidade por extrapolação da concentração na área da câmara. A concentração foi ajustada para 250000 esporos/mL, adicionando meio para diluir a concentração.

Foram colocados em cultura para que ocorresse germinação. Procedeu-se para isso a uma incubação por 7 dias em meio de cultura PES (Provasoli 1968), arejado e com $<30 \mu\text{mol} \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa (o mais constante possível por toda a área da câmara) e temperatura entre 10 e 12 °C (Dring & Island 1975).

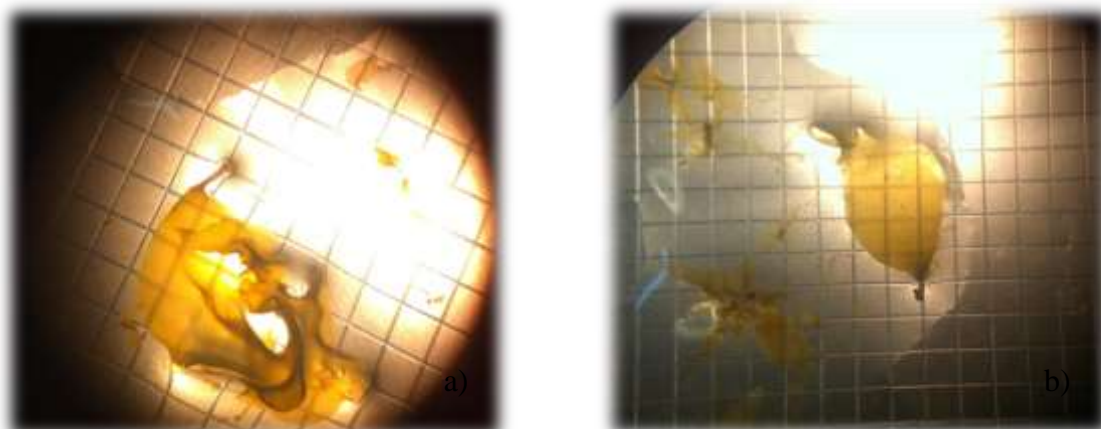
Os esporos obtidos darão origem aos gametófitos, normalmente equipercual (50/50) entre gametófitos femininos e gametófitos masculinos. Determinou-se a percentagem de germinação ao fim de 3 dias por observação a Microscópio ótico (MO).

Ao fim de 7 dias passou-se para cultura em balões com meio nutritivo e arejamento, com uma intensidade luminosa de $<30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 12 °C, com arejamento. Nesta fase, para manter o crescimento vegetativo da geração gametófito e evitar que exista fertilização dos gametófitos manteve-se a cultura sobre luz vermelha (RL) (Lüning, 1988).

Esporófitos jovens

Para promover o crescimento dos gametófitos e a sua fertilização podemos utilizar (se necessário) LED's de luz azul (BL), sendo que esta tem o efeito de acelerar o crescimento e reprodução dos gametófitos (Han & Kain (Jones) 1996) (Cuijuan 2005). Foi, então, utilizada a luz azul para obtenção da geração esporófito.

Figura 17 – Esporófitos jovens;



a) *S. latissima*; b) *L. ochroleuca*; Observação à lupa.

Assim, para favorecer a fertilização e crescimento dos esporófitos foram passados para balões de 4/5L com meio PES (Provasoli 1968), foi ainda aumentada a intensidade luminosa, para cerca de $20\text{-}30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $12 \text{ }^\circ\text{C}$, com arejamento controlado.

Para efeitos deste trabalho foram utilizados espécimes de culturas anteriores, obtidas em cultivo por fertilização de gametófitos.

Figura 18 – Culturas de esporófitos jovens de *S. latissima* e *L. ochroleuca*.



Obtidos através de libertação de esporos de indivíduos selvagens e germinados em laboratório, pela equipa do LBC, pertencente ao CIIMAR.

Esporófitos adultos

Os esporófitos adultos poderiam ser conseguidos a partir do crescimento destes esporófitos obtidos na fase anterior, mas para acelerar o protocolo, foram recolhidos esporófitos jovens/adultos, também chamados em cultura de recrutas, com cerca de 10 cm de comprimento (Figura 19).

Figura 19 – Esporófitos adultos (recrutas) de *L. ochroleuca*.



Obtidos do cultivo em tanques de aquacultura na estação da Foz do Douro, do grupo LBC, do CIIMAR.

Para efeitos deste trabalho foram utilizados apenas espécimes de *Laminaria ochroleuca*. Estes espécimes foram recolhidos de aquacultura em tanques, conseguidas através de inoculação de cordas com gametófitos e mantidas pelo grupo LBC do CIIMAR. Foram selecionados indivíduos com o comprimento pretendido e mais ou menos com as mesmas características e foram retirados das cordas de modo a não danificar o estipe, posteriormente foram limpos e transferidos para aclimação.

Meios de cultivo

Pretendia-se a simulação três métodos de cultivo utilizados atualmente para produção de algas: a) cultura em meio natural; b) aquacultura; c) sistema de aquacultura integrada (IMTA). Para tal, foram utilizados três diferentes meios, com concentrações de nitratos (N) e fosfatos (F) conhecidas (Tabela 5) (Pereira et al. 2008).

- a) Água do mar sem adição de nutrientes - **meio SW**
- b) Simulação de aquacultura em regime semi-intensivo com algum tratamento dos efluentes – **meio B**
- c) Simulação de aquacultura em regime intensivo sem tratamento de efluentes – **meio C**

Tabela 6 - Concentração de Nutrientes nos meios de cultivo.

Meio	Réplicas	Concentração de Nutrientes (mM)				
		NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻	TN	N:P
SW	3x	s/ad	s/ad	s/ad	s/ad	s/ad
B	3x	50	250	30	300	1:10
C	3x	150	450	60	600	1:10

s/ad – sem adição; (NO₃⁻) – Nitratos; (NH₄⁺) – Amónia; (PO₄³⁻) – Fosfatos; TN – Azoto total; N:P – rácio entre a concentração de Nitrogénio e Fosfatos. *Fonte:* (Abreu et al. 2011; Rui Pereira 2008).

Os meios foram preparados em água-do-mar autoclavada (para esporófitos jovens) e água-do-mar desinfetada com lixívia e neutralizada (para os esporófitos adultos).

Posteriormente foram adicionados: nitrato de sódio (NaNO₃), Cloreto de amónia (NH₄Cl), Fosfato de sódio (HNa₂O₄P.2 h₂O) para obter as concentrações de nutrientes desejadas. Após a preparação dos meios, estes eram refrigerados até uma temperatura máxima de 16 °C e era controlado o pH (7.8-8) e salinidade (35‰) dos mesmos, antes de serem utilizados.

Montagem do sistema de cultivo

Para a validação dos nossos resultados foram efetuadas três réplicas de cada cultura. A biomassa algal foi selecionada e aclimatizada em meio PES durante 1 semana antes de iniciar o cultivo. Para garantir a validade do ensaio foram mantidos constantes fatores de variação como: intensidade luminosa - 30-60 µmol.m⁻².s⁻¹, tipo de radiação – luz fluorescente, fotoperíodo – 12:12, temperatura – 12 °C e intensidade da oxigenação do meio – regulada de forma a permitir a circulação da biomassa algal.

Cultivo de Esporófitos jovens e Esporófitos adultos

Após o período de aclimação procedeu-se à preparação da biomassa, a concentração da biomassa pelo volume de meio foi extrapolada a partir de estudos de densidade tendo em conta o volume e o condicionamento da biomassa na intensidade luminosa do meio. Foram utilizadas 2 g de biomassa de esporófitos jovens para um volume de 1L de meio e cerca de 5 g de esporófitos adultos para um volume de 2 L de meio. A necessidade de um crescimento exponencial para obtenção de biomassa suficiente para análise, requeria que não fosse retirada qualquer biomassa durante o processo de crescimento pois a biomassa retirada primeiramente não teria as mesmas características e composição que aquela retirada no final e a reposição da biomassa inicial não permitia obter biomassa suficiente para análise. Assim, a biomassa era apenas pesada uma vez por semana sem retirar o excesso.

Para os esporófitos jovens a biomassa algal foi apenas pesada – 2 g por réplica – enquanto para os esporófitos adultos (recrutadas), para cada réplica, foram selecionados 3 exemplares, cujo peso total correspondesse ao peso desejado (5 g), e foram pesados e medidos e identificados individualmente. A biomassa algal foi colocada num Erlenmeyer, com uma rolha e uma cânula de vidro ligada a um filtro (evitar entrada de contaminantes), ao qual foi adicionado o volume de meio correspondente. Foram acrescentados um controlo de cada meio, sem biomassa, para controlar o crescimento de possíveis contaminantes. Tínhamos, assim, um total de 12 amostras por estágio por espécie. O controlo permite avaliar o consumo de nutrientes por outros possíveis microrganismos contaminantes.

Após a preparação das amostras estas eram transferidas para uma câmara «fito-clima» com temperatura controlada (12 °C) e uma luminosidade entre 30-60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, uma vez que a luminosidade na câmara não era constante por toda a sua área, foi necessário manter um sistema de rotatividade entre amostras. As réplicas eram também ligadas a um sistema de circulação de ar, é necessário salientar a importância de todo o sistema estar ligado a um compressor que permita o arrefecimento do ar que entra no sistema, assim como a diminuição da condensação de água nos tubos de ar que levam ao entupimento dos filtros. A intensidade do fluxo de ar deve também ser controlada de modo a permitir a circulação da biomassa, sem que seja demasiado violenta o que pode levar à degradação das algas devido aos choques entre si e com as paredes do sistema. (

Figura 20).

Figura 20 - Esquematização e foto de montagem do sistema de cultivo.

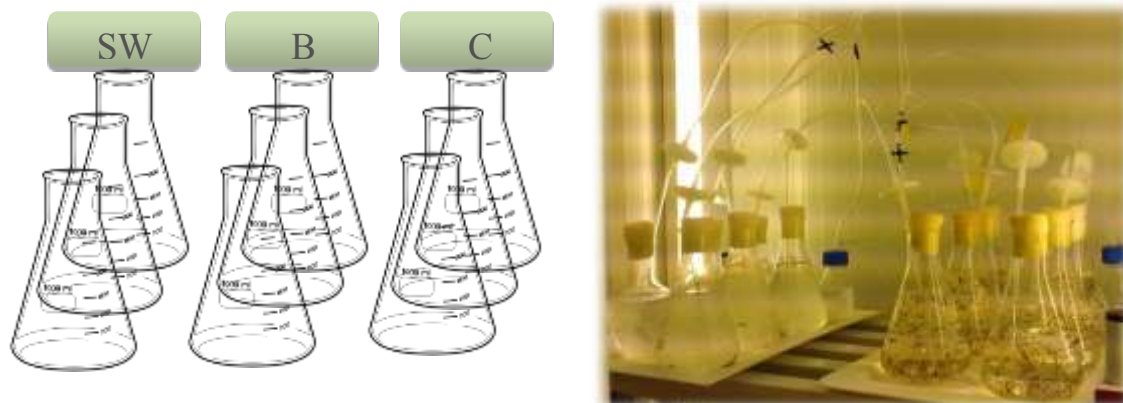


Imagem de cultivo de esporófitos jovens de *Laminaria ochroleuca*.

Durante a preparação das culturas, foram retiradas amostras de água por cada cultura para análise de nitratos e fosfatos (N:P), controlo de pH e salinidade. Processo que foi repetido ao fim de 12 e 24 h e uma vez por semana (depois da mudança de meio) repetiu-se o mesmo processo para avaliar o consumo de nutrientes das algas e a sua evolução com a adaptação ao meio.

Uma vez por semana era retirada a biomassa, a quando da mudança de meio, para pesagem. Após a pesagem era reposta novamente com meio renovado.

No final do cultivo, após 21 dias retiramos toda a biomassa que foi pesada para registar o peso húmido (PH) obtido. Secamos numa estufa a 40 °C por 48 h e após esse período foi registado o Peso Seco (PS) obtido.

Resultados

Resultados

Recolha de Biomassa Algal

Para a recolha foram recolhidos indivíduos selvagens e em ‘bom estado’, ou seja, inteiros, saudáveis, com poucas/nenhumas epífitas e poucos sinais de predação -, retirados do estrato cuidadosamente para não danificar as estruturas dos rizoides. Após a lavagem e limpeza, foram medidos e pesados e o seu peso foi registado, tanto peso húmido como o peso seco (Tabela 7).

Tabela 7 - Dados de Recolha das algas.

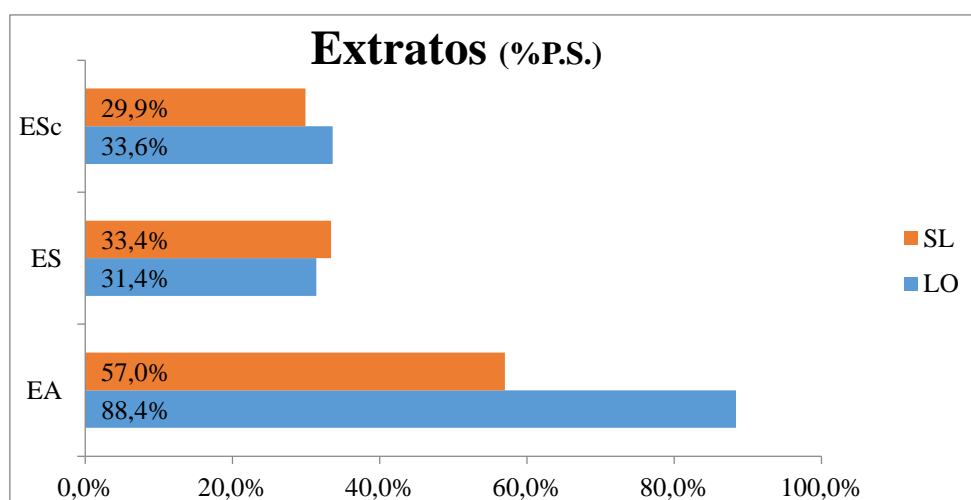
Espécie	<i>Laminaria ochroleuca</i>				<i>Saccharina latissima</i>			
Local	Praia Nova (Vila Chã, Minde- lo)				Praia Pedra Alta (Castelo de Neiva)			
Data	04.09.2015				12.09.2015			
Hora	13 h54				9 h13			
Maré	0.85m				0.78m			
T°	12 °C				10 °C			
Salinidade	35%-38%				32%-36%			
pH	7.8(média)				8.0(média)			
Recolha	N°	Comp. (m)	P.H. (g)	P.S. (g)	N°	Comp. (m)	P.H. (g)	P.S. (g)
	1	0,870	557,7 0	87,3 2	1	0,805	98,84	26,20
	2	0,670	263,4 7	43,1 3	2	0,525	32,21	5,68
	3	0,915	415,2 6	63,8 6	3	0,815	22,30	2,87
	4	0,530	230,8 0	35,7 5	4	0,430	13,73	1,83
	5	0,615	194,0 2	34,3 3	5	0,595	47,62	11,03
	6	0,520	206,2 5	26,5 3	6	0,700	29,70	5,31

P.H.-peso húmido;P.S.-peso seco.

Métodos de Extração

Foram testados 4 métodos de extração (Figura 21), dos quais automaticamente se excluiu o método de extração alcalina precipitado com cloreto de cálcio, pois ao adicionar-se o cloreto de cálcio na solução alcalina este reage de imediato com o hidróxido de sódio formando um sal (cloreto de sódio - NaCl) que se deposita não permitindo a extração dos polissacarídeos.

Figura 21- Percentagem média do peso seco dos extractos obtidos com os diferentes métodos de extração, em relação à biomassa de alga inicial.



SL – *Saccharina latissima*; LO – *Laminaria ochroleuca*; ES – Método de Extração Sequencial; ESc – Extração Sequencial precipitado com Cloreto de Cálcio; EA – Extração Alcalina.

Em termos de percentagem de precipitado relativamente ao peso seco da alga utilizado para extração, o método alcalino apresentou quantidades bastante superiores em relação a ambos os processos do método sequencial. A quantidade de extrato conseguido em *Laminaria ochroleuca* superou em média os 88% do peso da biomassa, enquanto em *Saccharina latissima* rondava em média os 57%, uma vez que a utilização de cloreto de cálcio é feita para permitir o melhor isolamento dos polissacarídeos, não seria de esperar um aumento do extrato conseguido mas sim uma maior especificidade do método, o que não se verificou.

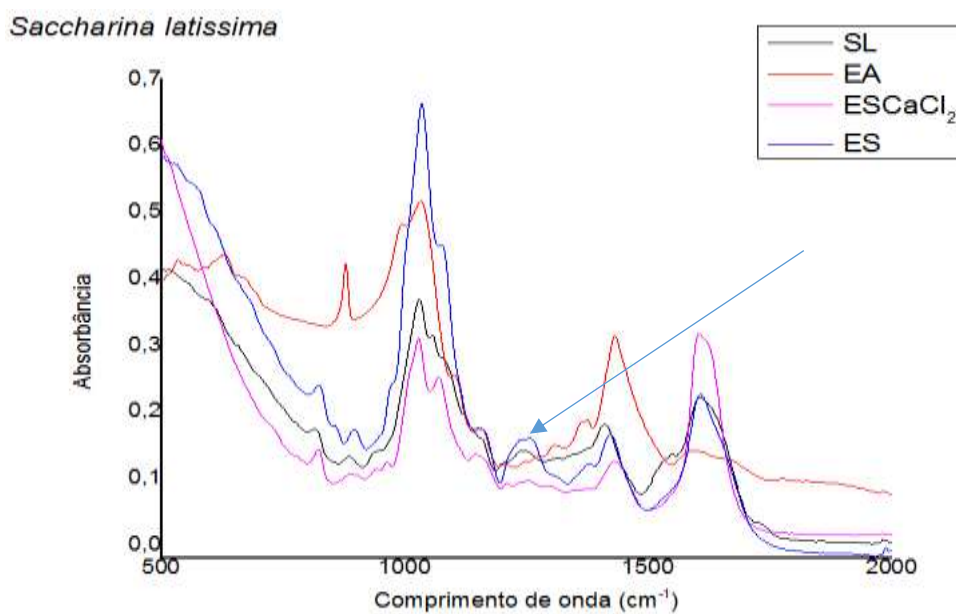
Entre as extrações conseguidas pelo método sequencial, a quantidade de extrato conseguida com os diferentes agentes precipitantes não apresenta uma diferença muito significativa, rondando os 30% do peso da biomassa algal em ambos os processos e para ambas as espécies. Estes dados compactuam com dados apresentados na bibliografia, sendo que a percentagem de polissacarídeos nas Laminaria à volta dos 30%-50% do peso da alga. A realização da espectroscopia por FTIR permitiu verificar qual a constituição destes extratos.

Identificação dos Polissacarídeos através de espectroscopia Vibracional – FTIR

Através da normalização dos dados obtidos por FTIR-ATR conseguimos definir os espectros para cada uma das amostras e comparar a sua constituição e relação ao da biomassa algal. Os picos de reflectância a comprimentos de onda definidos indicam-nos a presença de determinados grupos livres (-R) – grupos funcionais - característicos dos compostos presentes na amostra, os quais foram anteriormente definidos para polissacarídeos presentes em algas. Assim temos que para as algas castanhas, os polissacarídeos de interesse são os Alginatos, a Fucoídano e a Laminarina. Em FTIR verificamos a presença destes compostos através dos picos presentes a número de onda conhecidos para os grupos funcionais característicos destes compostos, os quais estão representados

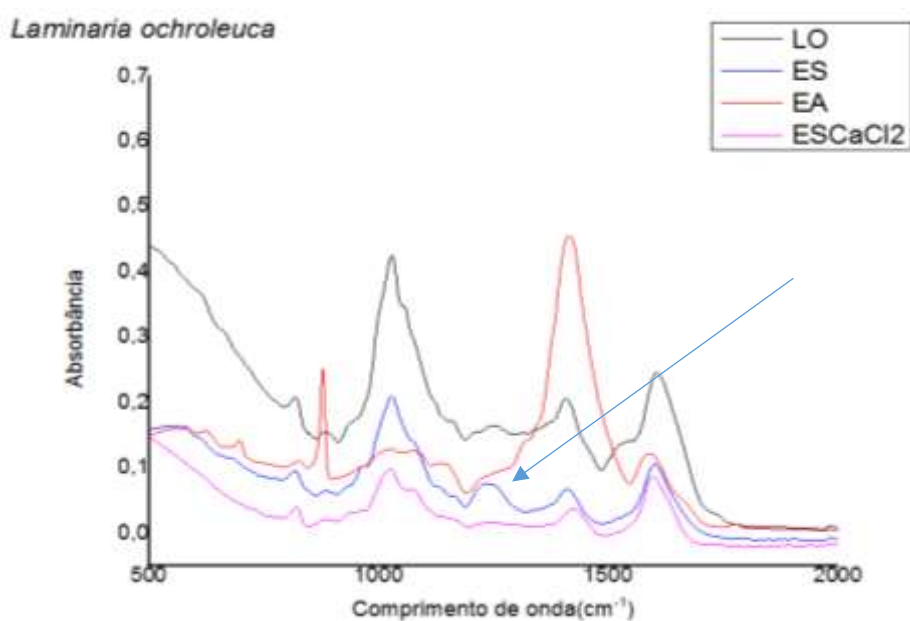
A técnica desenvolvida por Pereira, Ribeiro Claro e os seus colaboradores (2003, 2006, 2009, 2013), baseada na técnica de FTIR-ATR (Reflectância Total Atenuada), veio permitir a identificação dos polissacarídeos e outros compostos das algas através desta técnica não invasiva e sem necessidade de purificação dos compostos (Tabela 4).

Figura 22 - Espectros FTIR-ATR Para A espécie *Saccharina latissima* obtidos dos diferentes extratos testados;



EA- extração alcalina; ESCaCl₂- extração sequencial precipitada com Cloreto de Cálcio; ES- extração sequencial (com etanol); em que SL- é o espectro obtido de uma amostra de alga na íntegra.

Figura 23 - Espectros FTIR-ATR Para A espécie *Laminaria ochroleuca*, obtidos dos diferentes extratos testados;



EA- extração alcalina; ESCaCl₂- extração sequencial precipitada com Cloreto de Cálcio; ES- extração sequencial (com etanol); em que LO – é o espectro obtido de um amostra de alga na íntegra.

Os espectros foram tratados de modo a apenas a zona onde ocorrem picos indicadores da presença de polissacarídeos tenha sido selecionada, o que permite uma maior nitidez na análise dos mesmos. Numa primeira análise, nota-se uma falta de eficácia na remoção dos compostos de interesse pelo **método de extração alcalino (EA)** em ambas as espécies, o que nos indica que os extratos têm uma grande quantidade de outros compostos que não os polissacarídeos de interesse. Como tal estes extratos foram excluídos da fase de análise da atividade antifúngica, pois poderíamos estar a ter resultados provocados por outro tipo de compostos que não os polissacarídeos sulfatados.

Em seguida, podemos verificar a presença dos polissacarídeos de interesse através da presença dos picos que os caracterizam.

Tabela 8 - Identificação de polissacarídeos sulfatados (PS).

	Bandas (c.o.)	S. latissima				L. ochroleuca				Grupo
		SL	EA	ES	ECa	LO	EA	ES	ECa	
Alginatos	1030/1080	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	M/G > 1
	1010/1025	s	s	s	s	s	s	s	s	M/G < 1
	808	-	-	-	-	-	-	-	-	M (uni.)
	787	-	-	-	-	-	-	-	-	G(uni.)
	1320 - 1290	-	+	-	-	-	-	-	-	M/G
Fucoidana*	1239/1247	+	-	+++	-	+	s	+++	-	S=O
	1210/1280	-	-	-	-	+	+/-	+	-	S=O
	1195/1237	-	-	-	-	-	-	-	-	S=O
	1239/1247	+	+	+	-	+	+/-	+	-	S=O
	1037/1071	++	++	+++	++	+++	++	+++	++	C-O
Laminarina	820/850	++	-	++	++	++	d	++	++	C-O-S

+++ , forte presença; ++ , média presença; + , presença; - , ausência de picos de concentração nas bandas correspondentes aos grupos livres dos polissacarídeos nos diferentes extratos. S, banda crescente; d, banda descendente; SL – amostra bruta de S.latissima; LO - amostra bruta de L.ochroleuca; EA – Extrato obtido por extração Alcalina; ES - Extrato obtido por extração Sequencial; ECa - Extrato obtido por extração Sequencial precipitado com CaCl₂. *Fonte:* (Adaptado de Chopin et al. 1999, Pereira et al. 2009)

O facto de não os espectros não terem apresentado as bandas relativas às unidades de ácido gulurónico e manurónico é um bom sinal, pois tal poderia representar uma degradação dos polissacarídeos de interesse, ou pouca precisão na extração dos mesmos. Na extração alcalina, a especificidade das bandas obtidas não aparenta grande eficácia do método. Por sua vez, o **método de extração sequencial (ES)** apresenta bandas muito semelhantes com as das **amostras brutas**, no entanto verifica-se uma maior frequência do espectro da espécie em bruto no caso da *Laminaria ochroleuca* (**LO**) do que para o seu extrato por método sequencial (**ES_LO**), enquanto na *Saccharina latissima* o extrato bruto (**SL**) em menor frequência que o extrato sequencial (**ES_SL**).

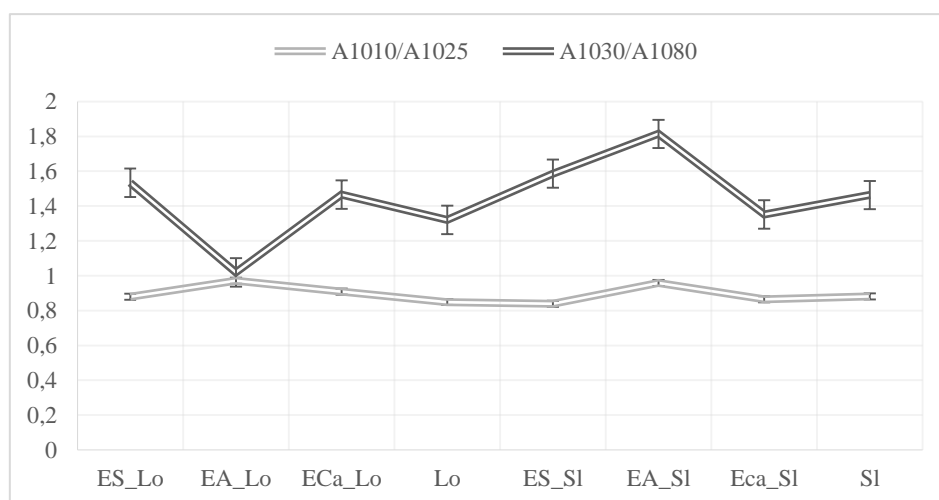
A banda correspondente à presença de Laminarina apresenta um pico bastante nítido embora não muito alto em todos os ensaios exceto naqueles obtidos por EA, consistente para ambas as espécies.

Existe uma banda alargada entre os 1000-1100 cm^{-1} que apresenta um pico elevado em todos os ensaios, esta banda compreende grupos ativos do ácido algínico e de fucoidana, o que nos demonstra uma elevada presença destes compostos (Sakugawa et al. 2004; Pereira & Ribeiro-claro 1993). No entanto a banda entre os 1220-1260 correspondente à presença do grupo S=O da fucoidana, pois está associada a um pico de reflectância que engloba também as bandas correspondentes ao rácio dos diferentes componentes dos alginatos (M/G).

O pico de absorção caracterizado por Camara e colaboradores (2011) como pertencente aos heterofucanos: S=O (1239–1247 cm^{-1}), é visível nitidamente apenas nas amostras de material bruto e extratos por método sequencial (ES) em ambas as espécies; C-O associado a grupo C-O-SO₃ (1239–1247 cm^{-1}) está presente em todos os extratos, embora seja difícil definir se pertence aos grupos dos heterofucanos ou aos grupos de M/G definidos por Sakugawa (2004).

Segundo o mesmo trabalho de Sakugawa (2004) a determinação do rácio entre os blocos M/G seria possível determinar a concentração de Alginato de Cálcio (1030/1080) e Alginato de Magnésio (1010/1025). No seguinte gráfico é possível ver a razão dada pelas bandas de reflectância dos mesmos.

Tabela 9 – Razão entre concentração de Alginato de Magnésio ($_{1010/1025}$) e Alginato de Cálcio ($_{1030/1080}$)



Outros picos de reflectância são observados em comprimentos de onda de 1420 cm^{-1} , $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ que poderão pertencer aos grupos livres do amido III e II respectivamente de proteínas (Souza et al. 2012).

Atividade antifúngica

Como referido anteriormente, apenas os extratos obtidos por extração sequencial foram utilizados. Os extratos provenientes do método alcalino apresentavam uma constituição bastante diferente da conseguida com material bruto, e a sua caracterização por FTIR não foi muito clara, em relação àqueles obtidos por método sequencial.

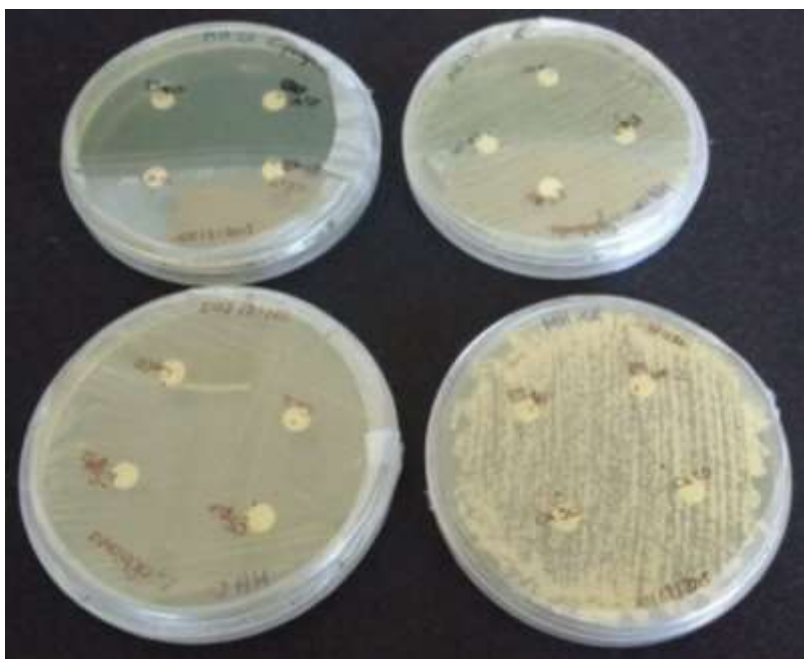
Foram então testados quatro extratos (Tabela 5) em quatro estirpes de leveduras: *Candida albicans* YP0037, *Candida glabrata* YP0852, *Candida parapsilosis* YP0002 e *Candida krusei* YP0008.

Os métodos de análise da capacidade antifúngica testados foram baseados nos métodos clínicos para determinação da concentração mínima inibitória – MIC: Ensaio de micro-diluição do agente antifúngico e Ensaio de difusão em disco.

Difusão em disco

Nos ensaios de difusão em disco os dados foram inconclusivos, embora não tenha havido qualquer inibição da atividade dos fungos este facto pode ser devido às propriedades dos polissacarídeos, não ocorrendo a difusão dos mesmos pelo gel de agarose, ou não apresentarem realmente atividade antifúngica. Para confirmar, procedeu-se aos ensaios de micro-diluição.

Figura 24 - Fotografia tirada às placas de petri encubadas com os extratos durante 24 h.

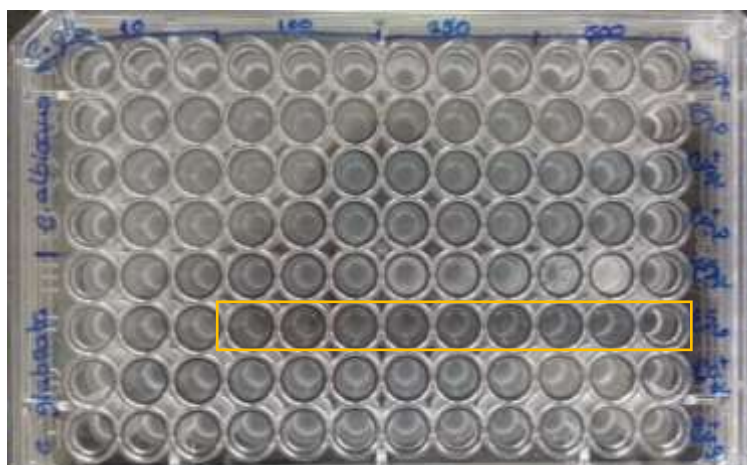


Cada placa foi encubada com um disco embebido com uma concentração final de 500 μ g/mL de cada um dos extratos. Como podemos verificar as estirpes de leveduras cresceram normalmente não é observável qualquer efeito inibitório por parte dos extratos.

Ensaio de Micro-diluição

Foram testados os mesmos extratos a concentrações decrescentes. Inicialmente 500 μ g/mL >250 μ g/mL >100 μ g/mL >10 μ g/mL, estas concentrações permitiriam uma rápida aproximação aos valores do MIC por serem bastante dispersos. A intenção era encontrar o intervalo em que a inibição fosse flagrante e a partir daí diminuição do intervalo entre as concentrações para determinação do MIC.

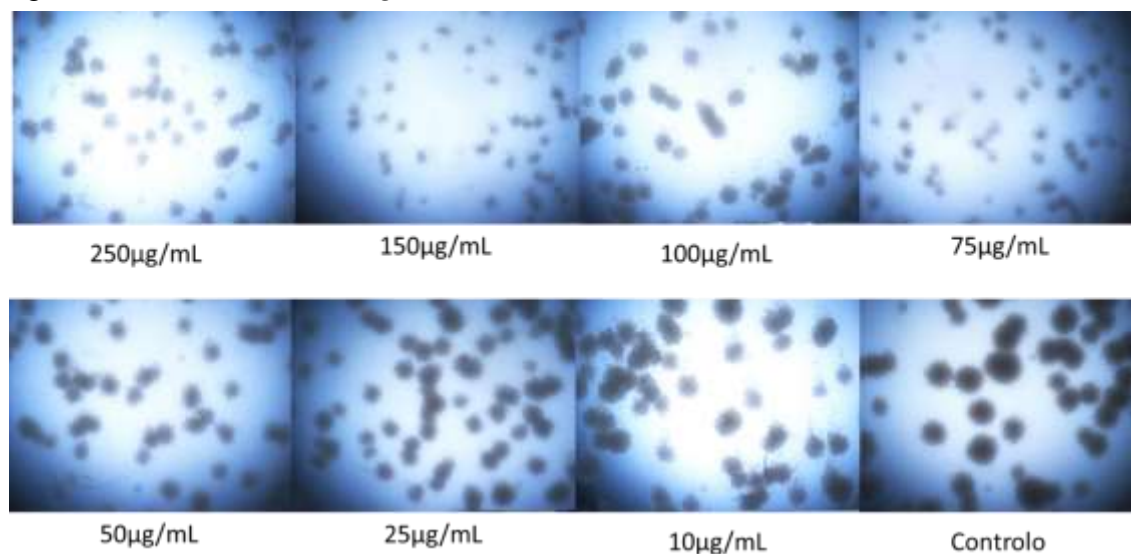
Figura 25 – Resultados do ensaio de Microdiluição.



Leitura visual dos resultados de *C. albicans* e *C. glabrata* para concentrações testadas de 10 <100 <250 <500 µg/mL em triplicado para cada extrato. Verifica-se inibição de crescimento no tratamento de ES_LO em *C. glabrata* pela diminuição da turbidez do meio, nítida nos poços de crescimento acima realçados.

Após ter sido verificada inibição do crescimento de *C. glabrata* em concentrações de >100 µg/mL pelo extrato obtido de extração sequencial de *Lochroleuca* (ES_LO) (Tabela 5), foram testadas, para este extrato, concentrações entre os 100 µg/mL e os 10 µg/mL. Assim testaram-se concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 150 µg/mL, em que a concentração de 150 µg/mL foi para garantir que havia inibição nestes poços.

Figura 26 – Tratamento de *C.glabrata* com o extrato ES_LO.



Observação em MO dos poços do ensaio de microdiluição, às 24 h de crescimento (com ampliação 400x).As concentrações indicadas abaixo de cada imagem indicam a concentração do extrato no poço respectivo à foto. A última imagem à esquerda foi obtida a partir do controle de *C.glabrata*, não tendo sido sujeito a tratamento com agente antifúngico.

A inibição de crescimento é feita em comparação com o controle. Assim na Figura 26 é clara a inibição do crescimento em todos os tratamentos com concentração acima dos 25µg/mL, podemos então considerar esta como a concentração mínima inibitória – MIC - para este extrato (Tabela 10).

Tabela 10 - Atividade Antifúngica dos Extratos e valor MIC

Tratamento	Levedura				
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>
<i>S. latissima</i>	ES	-	-	-	-
	Ca ⁺	-	-	-	-
<i>L. ochroleuca</i>	ES	-	>25µg/L	-	v
	Ca ⁺	-	-	-	-

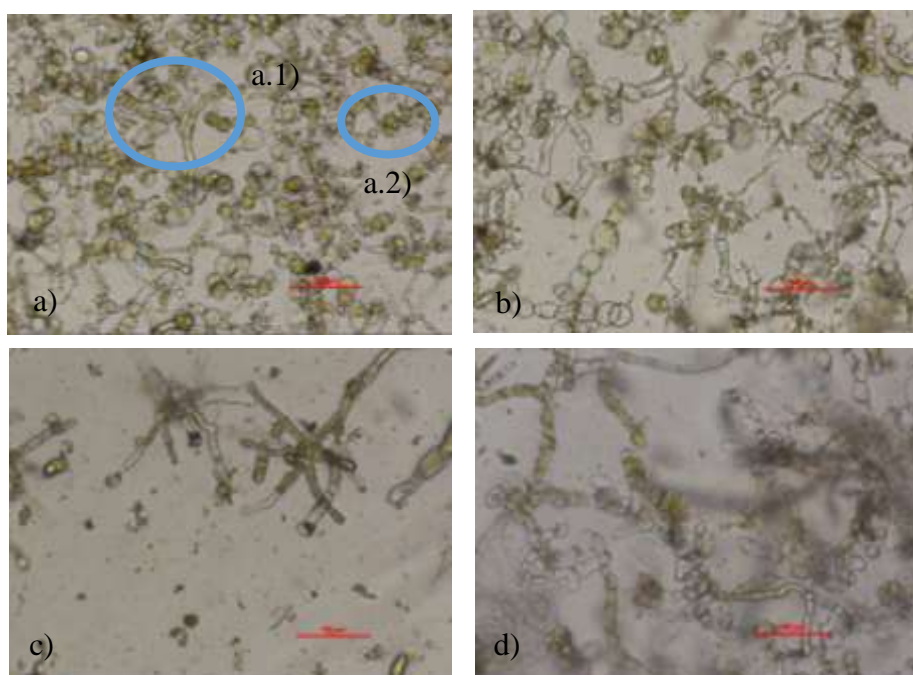
>25µg/L -concentração mínima inibitória – MIC; v – atividade vestigial; - sem inibição.

Em alguns ensaios foi observada inibição do crescimento de *Candida krusei* tratada com ES_LO, no entanto, estes resultados não foram claros. como tal, consideramos uma atividade vestigial.

Ensaio de Cultivo

Obtenção de Gametófito

Figura 27 – Observações em M dos gametófitos obtidos por libertação dos esporos;



a) e b) *L.ochroleuca*; c) e d) *S.latissima*. Em *L.ochroleuca* são distinguíveis os gametófitos masculinos (a.1) e femininos (a.2).

A quantidade de gametófitos germinados a partir de *L. ochroleuca* foi muito superior à obtida em *S. latissima*. A densidade de biomassa obtida em ambas as espécies não foi suficiente para cultivo, como tal, não foram efetuados ensaios de cultivo para este estágio do ciclo de vida.

Os gametófitos que foram sujeitos a luz fluorescente reproduziram-se formando esporófitos como vimos na

Figura 17.

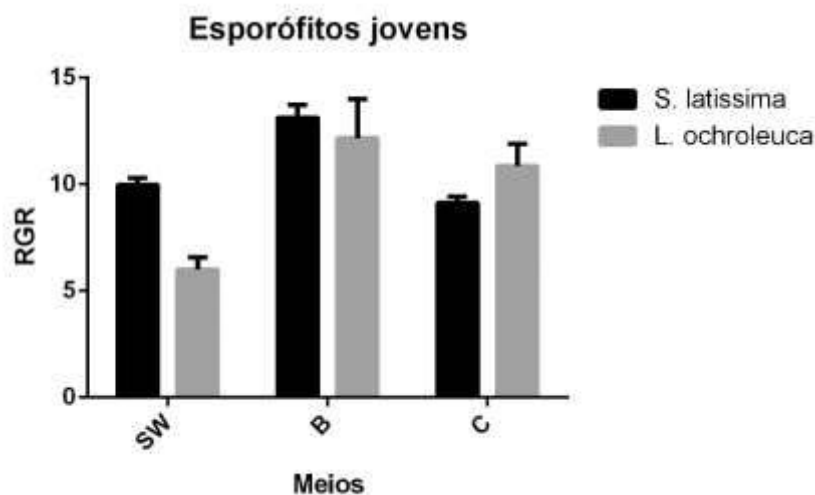
Esporófitos jovens

Os ensaios de cultivo de esporófitos jovens foi feito a partir de stocks anteriores. Estes cultivos representaram um desafio uma vez que pequenas variações no sistema a uma escala laboratorial e em sistema fechado têm um impacto bastante considerável. Assim, dos cultivos efetuados os dados obtidos foram muitas vezes inconclusivos. Em esporófitos jovens foram efetuados alguns ensaios com as duas espécies dos quais obtivemos alguma significância de dados até aos 15 dias de cultivo, que nos permitiram uma pequena análise da performance das duas espécies. Para efetuar a análise foi calculada taxa de crescimento relativo pela fórmula:

$$RGR = \frac{\ln W_f - \ln W_i}{T} \times 100$$

Em que W_f - corresponde ao peso final da biomassa; W_i - corresponde ao peso inicial e T - ao tempo, neste caso número de dias de cultivo.

Figura 28 – Gráfico de comparação da taxa de crescimento relativo entre as duas espécies para os vários meios testados.



Os resultados obtidos demonstram um aumento da taxa de crescimento relativa (RGR) de ambas as espécies com o enriquecimento do meio em nutrientes (SW para B) no entanto o meio com uma maior concentração de nutrientes regista uma diminuição da RGR (B para C). Fazendo uma análise estatística (ANOVA de duas vias com comparação múltipla dos dados e análise de significância através de um teste Tukey, $p < 0,05$), verifica-se uma diferença significativa entre as duas espécies a crescer em meio SW (

Tabela 11).

Tabela 11 - Taxa de crescimento relativo (RGR) dos esporófitos jovens.

	<i>S. latissima</i>	<i>L. ochroleuca</i>
SW	9,98±0,33 ^a	6,00±0,57 ^b
B	13,13±0,60 ^c	12,17±1,82 ^c
C	9,13±0,29 ^d	10,86±1,05 ^d

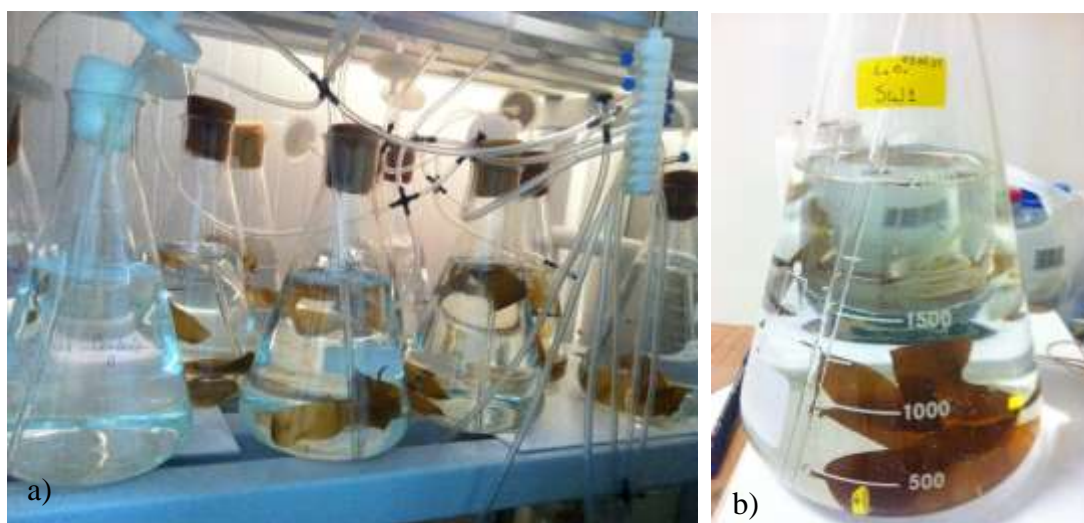
Os valores representam a média ± desvio padrão dos valores da taxa relativa de crescimento de cada réplica para cada meio testado. Na mesma linha, valores com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$)

Assim, aparentemente *L. ochroleuca* aparenta um crescimento preferencial em ambos os meios ricos em nutrientes, enquanto que a *S. latissima* tem uma RGR menor no meio com mais nutrientes do que em meio natural, sem adição de nutrientes.

Esporófitos adultos

Para representação do estágio adulto da geração esporofítica foram selecionados indivíduos recrutados com cerca de 8-9 meses a partir de cultivo. Só foram efetuados ensaios de crescimento nesta fase para *L. ochroleuca* pois não foi possível obter indivíduos de *S. latissima* no mesmo estágio.

Figura 29 – Imagens do cultivo de esporófitos adultos;



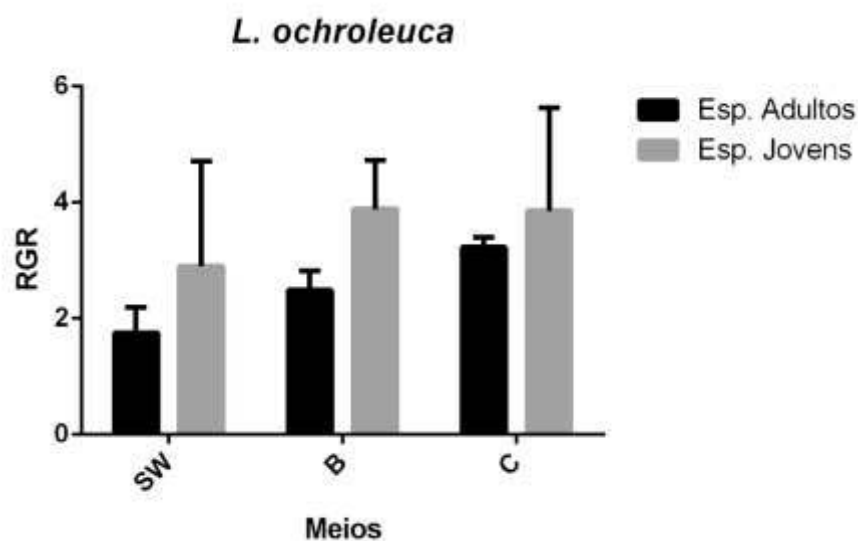
a) sistema de circulação de ar, extremamente importante no controlo do fluxo para circulação da bio-massa; b) Marcação dos indivíduos adultos, pesados e medidos individualmente.

Tabela 12 - Taxa de crescimento relativo (RGR) entre esporófitos jovens e adultos de *L.ochroleuca* num ensaio de 21dias.

	Esporófitos Adultos	Esporófitos Jovens
SW	1,75±0,44 ^a	2,90±1,74 ^b
B	2,49±0,46 ^c	3,89±0,97 ^d
C	3,23±0,38 ^e	3,86±1,72 ^d

Os valores representam a média ± desvio padrão dos valores da taxa relativa de crescimento de cada réplica para cada meio testado (teste de Tukey, $p < 0,05$)

Figura 30 - Gráfico de comparação da taxa de crescimento relativo (RGR), entre estágios do ciclo de vida num ensaio que durou 21 dias;



Na análise estatística dos nossos dados (Tabela 12) observamos uma diferença significativa no comportamento dos dois estágios do ciclo de vida. Mas o comportamento em relação ao meio de cultivo parece ser diferente, sendo que os esporófitos adultos cresceram melhor no meio com maior concentração de nutrientes (Figura 30).

Discussão

Discussão

Espécies de Interesse e obtenção da Biomassa

O interesse dos polissacarídeos obtidos das algas é há muito reconhecido pelas suas imensas aplicações e as suas aplicações na área da saúde têm sido cada vez mais exploradas (Venugopal 2011). As espécies foram selecionadas pelo interesse económico que apresentam e pela sua riqueza em polissacarídeos sulfatados de interesse.

A *Saccharina latissima* é uma das espécies mais exploradas para a obtenção de polissacarídeos. A *Laminaria ochroleuca* embora menos comercializada a nível mundial (Pereira & Neto 2015), em Portugal tem sido muito utilizada pelos seus compostos e pelo seu possível interesse para cultivo em IMTA (Cardoso et al. 2014; Hadley et al. 2015).

A recolha em campo dos exemplares foi feita no final do Verão, nesta fase os indivíduos encontravam-se no pico da sua maturação esperando-se assim uma maior concentração de polissacarídeos, sendo estes compostos estruturais e de reserva (Lee 2008; Schiener et al. 2015).

Idealmente, as duas espécies deveriam ser recolhidas no mesmo local, no entanto, a espécie *Saccharina latissima* tem uma predominância muito baixa na costa portuguesa, de facto, o seu limite de distribuição a Sul tem recuado para Norte ao longo dos anos, provavelmente devido às alterações climáticas e aumento da temperatura das águas (Raybaud et al. 2013; Oppliger et al. 2012). Embora existam registos da sua presença, em praias da Póvoa-do-Varzim (**COI - Phycological Digital Collection nº: 2554 (1958-08-30)**), a sua presença nessa zona é, hoje em dia, rara ou mesmo inexistente ao longo da zona intertidal, encontrando-se apenas pontualmente mais afastada da costa, na zona subtidal. Os primeiros espécimes foram encontrados a Norte da foz do rio Neiva, zona Minho Litoral no distrito de Viana-do-Castelo. O que representa a uma diminuição da distribuição desta espécie na costa portuguesa de cerca de 30 km em menos de 15 anos. Uma vez que, no mesmo local não se encontravam as duas espécies de interesse, ambas foram recolhidas em locais diferentes. A *Laminaria ochroleuca* é uma espécie bastante prevalente na costa portuguesa, sendo uma espécie de baixa profundidade, é possível encontrá-la facilmente na zona intertidal, no entanto, parece ter preferência por

zonas ‘abrigadas’ por rochas, pequenas baías e por substrato denso, como as rochas ou substratos coralinos. O fato de não estar presente na praia da Pedra-Alta, pode estar relacionado com a intervenção humana na zona, que invariavelmente teve grande impacto nas comunidades locais principalmente as da zona intertidal. Embora seja uma zona, abrigada, entre dois paredões, o substrato no local é muito arenoso, devido ao efeito dos paredões provocando o deslocamento de areias de Norte para Sul. No paredão Norte é onde se encontra, mais facilmente *Saccharina latissima*, mas apenas no final da zona intertidal início da zona subtidal, ou seja, esta nunca ou muito raramente está fora de água.

Extração de polissacarídeos

Alguns estudos comparam vários métodos de extração e demonstram haver uma variação nos compostos obtidos consoante o método utilizado (Ale, Mikkelsen, et al. 2011). O método de extração sequencial (ES) realizado neste trabalho foi adaptado a partir do método correntemente utilizado por L. Pereira e colaboradores para a extração e separação dos compostos algais consoante a sua natureza química. O objetivo deste trabalho era a extração de polissacarídeos tornando os restantes estratos de valor obsoleto para o efeito. No entanto, a extração sequencial dos compostos permite uma limpeza faseada do material biológico, podendo assim permitir a remoção antecipada de compostos que poderiam contaminar os precipitados do extrato de polissacarídeos. Através da análise do espectro FTIR (

A técnica desenvolvida por Pereira, Ribeiro Claro e os seus colaboradores (2003, 2006, 2009, 2013), baseada na técnica de FTIR-ATR (Reflectância Total Atenuada), veio permitir a identificação dos polissacarídeos e outros compostos das algas através desta técnica não invasiva e sem necessidade de purificação dos compostos (Tabela 4).

Figura 22 e

Figura 23) podemos concluir que este objetivo foi atingido, uma vez que os espectros se apresentam mais nítidos que aqueles obtidos com o método de extração alcalina. Este pode representar também uma vantagem para estudos posteriores em que possam ser testados os restantes extratos, uma vez que permitem o isolamento de outros compostos que segundo a bibliografia apresentam também interessantes bioatividades.

O método de extração alcalina foi adaptado de estudos posteriores que apresentaram uma boa afinidade da utilização de solventes alcalinos para a extração de polissacarídeos de algas como os Alginatos e Fucoïdanas, principalmente (Carneiro et al. 2012). Foram também testados dois agentes precipitantes; a) o etanol que provou melhor performance na precipitação quando utilizado a baixas temperaturas (-4°C). b) e o Cloreto de Cálcio, referido como um precipitante preferencial para os polissacarídeos sulfatados (Carneiro et al. 2012). No entanto, o CaCl_2 na EA não resultou enquanto precipitante, possivelmente por se ter ligado ao solvente realizando um processo de saponificação e precipitando sal (NaCl) no extrato não atuando na precipitação dos polissacarídeos (Lehninger 2004). Já com a ES o CaCl_2 apresentou-se como bom agente precipitante, embora não tão eficaz quanto o etanol, uma vez que se verificam concentrações menores dos polissacarídeos de interesse.

Espectros FTIR

O desenvolvimento de tecnologias como a do FTIR vem permitir a análise rápida e eficiente da composição química de amostras. É possível, através da avaliação dos espectros notar as várias diferenças entre os extratos testados e através da comparação de um espectro obtido através da biomassa das duas espécies, comparar os extratos com a composição da alga inteira. Os espectros obtidos para o método EA são muito pouco rigorosos, apresentando um espectro de difícil leitura e conseqüentemente difícil detecção com rigor da presença dos polissacarídeos de interesse.

Esta técnica assenta na leitura das impressões digitais dos grupos livres (ou grupos funcionais, -R) dos compostos, assim sendo, é necessário conhecer a estrutura química dos compostos que estamos a testar e os seus grupos funcionais. A equipa de L. Pereira e P. Ribeiro Claro têm vindo nos últimos anos a desenvolver esta técnica de análise e os padrões correspondentes aos compostos das algas, o que facilita a leitura destes dados. No entanto, é necessário ter em atenção a variabilidade dos compostos como a Fucoídana entre as diferentes espécies de algas castanhas (Ale, Mikkelsen, et al. 2011), pois estas alterações estruturais irão alterar os grupos livres da molécula e como tal a sua identificação através desta técnica fica comprometida.

Foi-nos possível identificar a presença de todos os polissacarídeos de interesse Alginatos, Fucoídana e Laminarina em ambas as espécies para o método de extração sequencial, quer precipitados com etanol ou com cloreto de cálcio, embora alguns dos grupos funcionais da fucoídana, como é o caso dos éster-sulfato (S=O) não tenham sido observados nos extratos ES precipitados com CaCl₂, este facto pode estar relacionado com a ligação do agente precipitante aos polissacarídeos sulfatados, mascarando assim alguns grupos funcionais.

Esta ligação poderia também explicar a menor ou ausente bioatividade destes extratos nos ensaios de atividade antifúngica testados.

Atividade antifúngica

Para os ensaios de atividade antifúngica, para uma maior viabilidade na atribuição das atividades antifúngicas testadas aos polissacarídeos sulfatados foram excluídos os extratos obtidos por EA, pois poderiam ter na sua constituição outros compostos com atividade antifúngica que não os compostos de interesse e facilmente induziriam em erro para a determinação do potencial destes.

Nos ensaios em disco não se verificou qualquer atividade antifúngica, nem mesmo para o extrato ES de *L.o.* que demonstrou atividade no ensaio de micro-diluição. Este facto pode ser devido à densidade dos polissacarídeos que podem não se ter dissolvido no meio agar. Uma vez que foram observadas algumas dificuldades na dissolução dos extratos em água é possível que a sua dissolução num meio sólido não se verifique.

Dos extratos testados só os extratos ES obtidos de *Laminaria ochroleuca* é que apresentaram atividade antifúngica contra uma das estirpes de leveduras testadas *Can-*

didia glabrata com um MIC de 25µg/mL, esta concentração é bastante baixa uma vez que está bastante perto do MIC determinado para antifúngicos como o fluconazol - 8-32µg/mL (segundo CLSI).

O facto de o extrato ES precipitado com CaCl₂ não ter apresentado atividade pode ser devido a; a) menor concentração de polissacarídeos (espectro FTIR apresenta bandas de reflectância mais baixas); b) à ausência de grupos funcionais da fucoídiana (como os grupos éster-sulfato dos heterofucanos).

Contudo, a diferença entre os extratos das duas espécies também é notada, uma vez que apenas os extratos ES obtidos de *L.o.* têm atividade e aqueles obtidos de *S.l.* não. No entanto, esta diferença não é justificada pelos dados obtidos por FTIR, uma vez que o extrato de *S.l.* apresenta a mesma caracterização dos polissacarídeos e até apresenta concentrações mais elevadas dos mesmos. No entanto, sabemos que existe uma grande variabilidade das estruturas das fucoídanas entre espécies diferentes (Ale, Mikkelsen, et al. 2011).

Cultivo

O cultivo das espécies de algas é o melhor método para obtenção dos seus biocompostos, pois permite-nos identificar e manipular a melhor forma para os produzir. A qualidade e quantidade de polissacarídeos presentes nas algas dependem de uma variabilidade de fatores (Schiener et al. 2015).

Nesta fase o conhecimento da biologia fundamental das espécies com que estamos a trabalhar é crucial para a manipulação do seu crescimento de modo a otimizar a produção dos compostos (Matsson 2013; Sogn Andersen et al. 2011)

Foram efetuados alguns ensaios de cultivo no sentido de determinar qual o método de cultivo e a melhor fase do ciclo de vida das algas em que estas espécies conseguiriam produzir e acumular mais polissacarídeos, ou seja, qual seria o método de cultivo mais propício para cultura de algas visando à extração destes polissacarídeos. Foram testados meios com concentrações de nutrientes equivalentes às encontradas em alguns

tipos de produção de algas a nível industrial: a) meio selvagem; b) aquacultura; e c) IMTA.

Dos ensaios efetuados conseguimos apenas determinar um crescimento preferencial no meios B, uma tendente divergência na preferência nutricional entre as duas espécies, aparentemente a *S. latissima* cresce melhor em meios com menor concentração de nutrientes que a *L. ochroleuca* e o contrário também é observado, no meio mais rico a *L.o.* cresce mais que *S. latissima*. Olhando para a distribuição geográfica de ambas as espécies, não é difícil compreender estas observações uma vez que a *L.o.* sendo uma espécie que se encontra mais perto da costa e com uma temperatura limitante mais elevada, entende-se que esta esteja habituada a concentrações de nutrientes mais elevada.

No entanto, estes estudos foram ainda pouco conclusivos e não foi possível a obtenção de biomassa suficiente para extração de polissacarídeos.

Os ensaios de cultivo apresentaram-se um desafio em termos de variantes que limitam o crescimento das nossas espécies em cultivo. As algas castanhas, sobretudo *kelps*, não são algas cujo crescimento seja oportunista, ou seja, a sua taxa de crescimento é relativamente baixa em comparação com outras espécies de algas, sobretudo microalgas, e outros seres oportunistas, como bactérias e fungos.

Durante as suas primeiras fases de crescimento, algas são extremamente sensíveis às variações externas, tais como: intensidade da luz, variações de temperatura, níveis de oxigenação e fenómenos de competição. Assim, em cultivos de pequena escala como os que foram realizados torna-se difícil a manutenção dos cultivos e é necessário uma sensibilidade apurada para a correção de pequenas variáveis que podem interferir com o crescimento das espécies.

É para tal necessário a continuação da otimização destes métodos de cultivo, de forma a avaliar não só a produtividade das algas para estes métodos de cultivo mas também para determinar qual a melhor forma (método de cultivo/estágio do ciclo de vida) para obter maiores concentrações de biocompostos de interesse, no caso, polissacarídeos sulfatados.

Conclusão

Conclusão

A exploração de compostos naturais com possíveis aplicações para a saúde é o principal motor da biotecnologia e os recursos marinhos apresentam-se como uma verdadeira fonte inexplorada de novos recursos. O particular interesse das algas nesta área deve-se à sua diversidade, à diversidade de compostos que delas advêm e ao seu potencial enquanto fonte bio-sustentável desses mesmos produtos.

Neste âmbito, o trabalho realizado permitiu a definição de um processo de abordagem para a exploração destes compostos a partir de algas castanhas *Phaeophyceae*. Abordagem esta que consiste num processo contínuo em que todas as etapas efetuadas estavam intrinsecamente dependentes das anteriores.

A utilização da espectroscopia por FTIR permitiu uma análise simples mas sistemática da robustez dos métodos de extração testados para extração dos polissacarídeos sulfatados que pretendíamos extrair, poupando tempo e recursos na avaliação de extratos que não nos permitiriam atribuir as suas atividades aos compostos que pretendíamos caracterizar.

Nos ensaios de bioatividade este trabalho veio revelar elevado poder antifúngico de polissacarídeos (provavelmente fucoïdanas) de *Laminaria ochroleuca* em *Candida glabrata*, uma estirpe de leveduras, mesmo a concentrações muito baixas.

É portanto de grande interesse continuar a testar estes extratos noutras estirpes de leveduras e até em estirpes de fungos dermatófitos dada a possível aplicação destes compostos em géis, como as bandas de alginatos utilizadas no tratamento de lesões cutâneas.

Existe uma variedade de testes que poderiam ser realizados em seguimento a este projeto para testar diferentes bioatividades para os extratos obtidos, tais como:

- Capacidade antioxidante - utilizando as técnicas de DPPH ou FRAPassay;
- Antibacterianos - a ser realizados pelas mesmas metodologias que foram utilizadas para os ensaios antifúngicos, utilizando estirpes bacterianas gram-positivas e gram-negativas;
- E ainda testes anti-inflamatórios, anti tumorais, antidiabéticos, entre outros.

A caracterização da composição química destes compostos aparenta ser um passo importante a seguir para que seja possível caracterizar as diferenças destes compostos entre as duas espécies. Seria ainda interessante determinar se é realmente a fucoídano que atribui ao extrato ES_LO a atividade antifúngica e se for o caso, verificar se existe uma diferença estrutural entre a fucoídano presente em *Laminaria ochroleuca* daquela presente em *Saccharina latissima*, esta determinação seria possível por cristalografia ou cromatografia, como HPLC, muito utilizada em estudos anteriores.

A única fase independente deste projeto foi a fase de cultivos, que não deixa de estar em linha de seguimento com o processo de desenvolvimento tecnológico, a partir do momento que se identifica um composto de interesse é necessário definir a melhor fonte possível para a sua obtenção, e é neste seguimento que os ensaios de cultivo, embora preliminares, surgem. É no entanto necessário a otimização dos mesmos, garantindo a menor variabilidade possível do sistema para viabilidade dos experimentos. Além dos ensaios para avaliação de nutrientes seria também interessante o estudo de outras variáveis que irão influenciar a composição das algas em polissacarídeos, tais como, fotoperíodo, tipos de luz (infravermelhos e luz azul) nas diferentes fases do ciclo de vida.

Podemos concluir que a *Laminaria ochroleuca* se distinguiu neste trabalho pelo interessante poder antifúngico apresentado. No entanto, muito trabalho resta ainda por realizar e comprovando a variabilidade de todas as etapas efetuadas, não devemos descartar o hipotético interesse destes extratos de *Saccharina latissima* em outras bioatividades possíveis.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Abreu, M.H. et al., 2011. *IMTA with Gracilaria vermiculophylla: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system*. *Aquaculture*, 312, pp.77–87.
- Ale, M.T., Maruyama, H., et al., 2011. *Fucoidan from Sargassum sp. and Fucus vesiculosus reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(3), pp.331–336.
- Ale, M.T., Mikkelsen, J.D. & Meyer, A.S., 2011. *Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds*. *Marine Drugs*, 9(10), pp.2106–2130.
- Ansari, S.A. et al., 2012. *Evaluation of Rheological Properties and Swelling Behaviour of Sonicated Scleroglucan Samples*. *Molecules*, 17(12), pp.2283–2297.
- Buck, B.H. & Buchholz, C.M., 2005. *Response of offshore cultivated Laminaria saccharina to hydrodynamic forcing in the North Sea*. *Aquaculture*, 250(3-4), pp.674–691.
- Cardoso, S. et al., 2014. *Bioproducts from Seaweeds: A Review with Special Focus on the Iberian Peninsula*. *Current Organic Chemistry*, 18(7), pp.896–917.
- Carneiro, J.G. et al., 2012. *Otimização do processo de extração dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas como ferramenta de processo biotecnológico*. VII CONNEPI.
- Choosawad, D., Leggat, U. & Dechsukhum, C., 2005. *Anti-tumour activities of fucoidan from the aquatic plant Utricularia aurea Lour.* *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(3), pp.799–807.
- Cuijuan, S.H.I., 2005. *Effects of blue light on gametophyte development of Laminaria japonica (Laminariales, Phaeophyta)*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 23(3), pp.323–329.

- Draisma, S. G. A., Prud'homme van Reine, W. F., Stam, W. T. & Olsen, J. L., 2001. *A reassessment of phylogenetic relationships within the phaeophyceae based on rubisco large subunit and ribosomal DNA sequences*. *Journal of Phycology* , 37, pp.586–603.
- Balboa E. M., Rivas S., Moure A., Domínguez H., Parajó J. C., 2013. *Simultaneous Extraction and Depolymerization of Fucoidan from Sargassum muticum in Aqueous Media*. *Marine Drugs*, 11(11), pp. 4612–4627.
- Figueroa, F. L., Korbee, N., Coba, F. D. L., Gil Jerez, C., Bonomi Barufi, J., Güenaga, L., Pinchetti, J., Abreu, M., Pereira, R., & Sousa-Pinto, I., 2011. *Valorización de la biomasa de macroalgas en acuicultura multitrófica integrada (AMTI): aplicaciones en cosmética y nutracéutica (fotoprotectores y antioxidantes)*. *Acuicultura Multitrófica*, pp.111–137.
- Guedes, AC, Amaro, HM, Sousa-Pinto, I, Malcata, FX. 2013. *Chapter 10 - Applications of spent biomass. Biofuels from Algae*. Elsevier, pp 205-235.
- Gómez-Ordóñez E. and Rupérez P, 2011. *FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds*. *Food Hydrocolloids*, 25(6), pp. 1514–1520,.
- Hadley, S., Wild-allen, K. & Johnson, C., 2015. *Modeling macroalgae growth and nutrient dynamics for integrated multi-trophic aquaculture*. , pp.901–916.
- Han, T. & Kain (Jones), J.M., 1996. *Effect of photon irradiance and photoperiod on young sporophytes of four species of the Laminariales*. *European Journal of Phycology*, 31(3), pp.233–240.
- Handå, A. et al., 2013. *Seasonal- and depth-dependent growth of cultivated kelp (Saccharina latissima) in close proximity to salmon (Salmo salar) aquaculture in Norway*. *Aquaculture*, 414-415, pp.191–201.
- Heffernan, N. et al., 2015. *Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (Laminaria digitata , Fucus serratus , Gracilaria gracilis and Codium fragile)*. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), pp.519–530.

- Izquierdo, J., Perez-Ruzafa, I., Gallardo, T., 2002. *Effect of temperature and photon fluence rate on gametophytes and young sporophytes of Laminaria ochroleuca pylaie*. Helgoland Marine Research 55, 285–292
- I-chao, S., 1968. *Nutritional requirements for gametogenesis in Laminaria saccharina (L.) Lamouroux*. Tese de Doutorado, Universidade de Newfoundland.
- Jiao, G. et al., 2012. *Properties of polysaccharides in several seaweeds from Atlantic Canada and their potential anti-influenza viral activities*. Journal of Ocean University of China, 11(2), pp.205–212.
- Kang, H., Seo, C.H. & Park, Y., 2015. *The Effects of Marine Carbohydrates and Glycosylated Compounds on Human Health*. International Journal of Molecular Sciences, 16(3), pp.6018–6056.
- Ledesma-Hernandez, B. & Herrero, M., 2014. *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*.
- Lee, R., 2008. *Basic characteristics of the algae*. In *Phycology*. Colorado State University, USA: Cambridge University Press.
- Lehninger, 2004. *Biochemistry*.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J., 1997. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press.
- Lüning K., Dring M. J., 1975. *Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of Laminaria saccharina grown in blue and red light*. Marine Biology, 29(3), pp.195–200.
- Matanjan, P. et al., 2008. *Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo*. Journal of Applied Phycology, 20(4), pp.367–373.
- Matsson, S., 2013. *Optimal physical and chemical environment for vegetative gametophyte culture of Saccharina latissima - with emphasis on nutrient composition and light quality*. Thesis of Master, Norwegian University of Science and Technology .
- McHugh, D.J., (FAO) 2003. *A guide to the seaweed industry*, FAO fisheries technical

paper 441. ISBN 92-5-104958-0.

- Mendes, M, Pereira, R, Sousa Pinto, I, Carvalho, AP, Gomes, AM. 2013. *Antimicrobial activity and lipid profile of seaweed extracts from the North Portuguese Coast*. International Food Research Journal, 20(6), pp. 3337-3345
- Oppliger, L.V. et al., 2012. *Temperature effects on gametophyte life-history traits and geographic distribution of two cryptic kelp species*. PLoS One, 7(6): e39289.
- Oumaskour, K. et al., 2012. *Screening of antibacterial and antifungal activities in green and brown algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco)*. African Journal of Biotechnology, 11(104), pp. 16831-16837.
- Pangestuti, R. & Kim, S.-K., 2011. *Neuroprotective effects of marine algae*. Marine drugs, 9(5), pp.803–18.
- Park, H.Y. et al., 2011. *Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- κ B, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells*. Food and Chemical Toxicology, 49(8), pp.1745–1752.
- Pereira, L. & Neto, J.M., 2015. *Marine Algae Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology*. ISBN 9781466581678.
- Pereira, L., 2015. *Seaweed Flora of the European North Atlantic and Mediterranean*. Springer Handbook of Marine Biotechnology, Kim, Se-Kwon (Ed.), 6, pp. 65_178.
- Pereira, L. & Ribeiro-claro, P.J.A., 2015. *Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed with Potential Use in Food , Pharmaceutical and Cosmetic Industries*. Marine Algae Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology, 228_250.
- Pereira, R. et al., 2008. *Nitrogen uptake by gametophytes of Porphyra dioica (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions*. European Journal of Phycology, 43(1), pp.107–118.
- Pereira, T.R. et al., 2011. *Temperature effects on the microscopic haploid stage development of Laminaria ochroleuca and Sacchoriza polyschides , kelps with contrasting life histories. , CBM, 52, pp.395–403.*

- Pielesz, A., Machnicka, A. & Sarna, E., 2011. *Antibacterial Activity and Scanning Electron Microscopy (Sem) Examination of Alginate-Based Films and Wound Dressings*. Ecological Chemistry and Engineering S-Chemia I Inzynieria Ekologiczna S, 18(2), pp.197–210.
- Raybaud, V. et al., 2013. *Decline in Kelp in West Europe and Climate*. PloS one, 8(6), p.e66044.
- Reida G.K., Chopin T., Robinson S.M.C., Azevedo P., Quinton M., Belyea E., 2013. *Weight ratios of the kelps, Alaria esculenta and Saccharina latissima, required to sequester dissolved inorganic nutrients and supply oxygen for Atlantic salmon, Salmo salar, in Integrated Multi-Trophic Aquaculture systems*. Aquaculture, 408-409, pp.34-46.
- Rioux, L., 2010. *Évaluation de l'activité biologique de polysaccharides extraits de saccharina résumé*. Thèse Ph.D., Université Laval Québec.
- Sakugawa K., Ikeda A., Takemura A., and Ono H.. *Simplified method for estimation of composition of alginates by FTIR*. Journal of Applied Polymer Science, vol. 93, no. 3, pp. 1372–1377, 2004.
- Schiener, P. et al., 2015. *The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species Laminaria digitata , Laminaria hyperborea , Saccharina latissima and Alaria esculenta*. Journal of Applied Phycology, 27(1), pp.363–373.
- Sogn Andersen, G. et al., 2011. *Seasonal Patterns of Sporophyte Growth, Fertility, Fouling, and Mortality of Saccharina latissima in Skagerrak, Norway: Implications for Forest Recovery*. Journal of Marine Biology, pp.1–8.
- Stengel, D.B., Connan, S. & Popper, Z. a., 2011. *Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application*. Biotechnology Advances, 29(5), pp.483–501.
- Stengel, D.B. & Walker, J.M., (Ed.), 2015. *Natural Products From Marine Algae. Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, Springer. ISBN 978-1-4939-2684-8.
- Troell, M., 2008. *Integrated mariculture : its role in future aquaculture development*.

FAO: Fisheries Proceedings., 11, pp. 323–325., (2006).

Venugopal, V., 2011. *Marine Polysaccharides: Food Applications*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(2), pp. 181-186.