



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Crescimento, extração e caracterização de polissacarídeos e  
determinação da atividade antioxidante em *Pectodictyon*  
*cubicum* Taft ACOI 1651

Joana Dias Ferreira

---

2015





# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Crescimento, extração e caracterização de polissacarídeos e determinação da atividade antioxidante em *Pectodictyon* *cubicum* Taft ACOI 1651

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

Joana Dias Ferreira

---

2015



## Agradecimentos

No final desta etapa não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Lília Maria Antunes dos Santos, orientadora neste trabalho, por me ter dado a oportunidade de conhecer de perto a Algoteca, por toda a orientação científica, apoio e ensinamento prestados.

Ao Professor Doutor Jorge Manuel Tavares Branco Varejão, coorientador neste trabalho, pela disponibilidade e todo o apoio na sua realização.

Às minhas colegas de laboratório, Mariana, Clara e Raquel por toda a ajuda e paciência ao longo deste trabalho, por todos os bons momentos e por me ajudarem a crescer cientificamente.

À D. Isabel Matos e á D. Isabel Benedito por toda a ajuda e boa disposição no dia-a-dia do laboratório.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Química da Escola Superior Agrária de Coimbra pela disponibilidade e ajuda prestada.

Aos meus pais, sem os quais não teria sido possível ter chegado aqui, obrigado pelo esforço que fizeram e incentivo que me deram.

Ao Carlos, pelo amor, compreensão e muita paciência ao longo deste percurso e por nunca me deixar desistir.



## Índice

Resumo.....	V
Abstract .....	VII
1.Introdução .....	1
1.1. As microalgas e o seu interesse comercial .....	3
1.2.Pectodictyon cubicum Taft, 1945.....	4
1.3.Mucilagens em microalgas.....	5
1.3.1.Estudos efetuados em microalgas.....	7
1.4.Metodologias de extração de polissacarídeos .....	11
1.5.Condições para a otimização da produção de mucilagem.....	12
1.6.Atividade antioxidante em microalgas .....	13
1.7.Objetivos do trabalho .....	15
2.Materiais e métodos .....	17
2.1.Material de estudo, condições de cultivo e avaliação do crescimento .....	19
2.2.Extração dos polissacarídeos e análise da sua composição em monossacarídeos.....	22
2.2.1.Hidrólise dos polissacarídeos .....	23
2.2.2.Análise dos hidrolisados por cromatografia líquida.....	24
2.3.Atividade antioxidante .....	25
3.Resultados .....	29
3.1.Crescimento de Pectodictyon cubicum .....	31
3.2.Extração de polissacarídeos e a sua composição em monossacarídeos .....	32
3.3.Atividade antioxidante .....	34
4.Discussão.....	39
4.1.Crescimento de Pectodictyon cubicum .....	41
4.2.Produção, extração de polissacarídeos e a sua composição em monossacarídeos .....	42
4.3.Atividade antioxidante .....	44
5.Conclusões .....	47
6.Bibliografia .....	51
7.Anexos.....	63



## Resumo

As microalgas são organismos unicelulares e multicelulares, fotossintéticos, de sistemas marinhos e de água doce, estando também presentes em ambientes terrestres e que representam uma grande variedade de espécies, vivendo numa ampla gama de condições ambientais. Começam a ser vistas como uma fonte de matéria-prima a ter em conta para os mais variados ramos da indústria.

O objetivo deste trabalho foi conhecer o potencial biotecnológico de *Pectodictyon cubicum* Taft, uma estirpe pertencente à Algoteca de Coimbra (ACOI) com o número de referência ACOI 1651, no que diz respeito à produção de polissacarídeos e à sua capacidade antioxidante.

O crescimento de *Pectodictyon cubicum* foi monitorizado durante 31 dias, em meio de cultura M7, com borbulhamento de ar, a uma temperatura ambiente de 23°C, uma intensidade luminosa média de  $21,62\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e um fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro, tendo sido obtida uma biomassa total final de 3,20g/L.

No estudo dos polissacarídeos testaram-se dois tempos diferentes de crescimento da cultura, 15 dias e 1 mês. Para a análise do conteúdo em monossacarídeos, após cada tempo de cultivo, procedeu-se a uma extração alcalina dos polissacarídeos, seguida de hidrólise ácida, sendo obtida uma solução que foi analisada em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A comparação dos cromatogramas resultantes com padrões de monossacarídeos com valor de retenção conhecidos permitiu identificar monossacarídeos como ramnose, galactose e arabinose, sendo este o monossacarídeo presente em maior quantidade, 94,80% ao fim de 15 dias de cultivo e 91,00% após 1 mês, obtendo-se diferentes quantidades de monossacarídeos consoante o tempo de crescimento.

O potencial antioxidante foi testado através de dois métodos, ABTS e DPPH. Pelo método de ABTS, o valor da atividade antioxidante do extrato após crescimento de 1 mês (4,85mg/L equivalente a ácido ascórbico) foi menor que o do extrato obtido após 15 dias (7,85mg/L equivalente a ácido ascórbico), valores que estão próximos do valor de atividade antioxidante da cenoura (5,98mg/L equivalente a ácido ascórbico). Para o método de DPPH foram também realizados ensaios após crescimento de 15 dias e de 1 mês, tendo sido obtidos valores de  $EC_{50}$  muito superiores aos valores obtidos pelos extratos dos alimentos usados como referência.

*Pectodictyon cubicum* ACOI 1651 demonstrou ter um crescimento celular lento nas condições de cultivo definidas, assim como uma elevada produção de polissacarídeos nos dois tempos de cultivo, sendo que no cultivo de 1 mês essa produção é maior. A composição em monossacarídeos verificou-se ser semelhante à da goma-arábica, podendo esta estirpe ter potencial biotecnológico associado á indústria alimentar para finalidades espessantes, gelificantes e emulsionantes.

Palavras-chave: *Pectodictyon cubicum*; crescimento; polissacarídeos; monossacarídeos; atividade antioxidante;

## Abstract

Microalgae are unicellular and multicellular photosynthetic organisms from marine and freshwater systems, also present in terrestrial environments, representing a wide range of species living in a wide range of environmental conditions. They are now seen as a source of raw material to take into account for various branches of industry.

The objective of this study was to understand the biotechnological potential of *Pectodictyon cubicum* Taft, a strain belonging to the Algoteca of Coimbra (ACOI) with reference number ACOI 1651, regarding the production of polysaccharides and its antioxidant capacity.

Growth of *Pectodictyon cubicum* was monitored for 31 days in culture medium M7, with air bubbling, at room temperature of 23°C, an average light intensity of 21.62  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a photoperiod of 16h:8h light/dark, a total final biomass of 3.200g/L being obtained.

In the study of polysaccharides two different times of growth were tested, 15 days and one month. The content in monosaccharides after each cultivation time was determined by proceeding to an alkaline extraction of polysaccharides followed by acidic hydrolysis and analysis of the obtained solution in high pressure liquid chromatography. Comparing the chromatograms from the sample with monosaccharide standards of known retention time values, the monosaccharides identified were rhamnose, galactose and arabinose, this one being the most abundant, with 94.80 and 91.00 of relative % after 15 days and 1 month of cultivation, respectively and different amounts of monosaccharides obtained, depending on the cultivation time.

The antioxidant activity was tested by two methods, ABTS and DPPH. For the ABTS method, the values of the antioxidant activity after 1 month of growth (4.85mg/L equivalent ascorbic acid) was lower than after 15 days (7.85mg/L equivalent to ascorbic acid), these values being close to those of carrot (5.98mg/L equivalent to ascorbic acid). The DPPH assay was also performed after 15 days and 1 month of culture, with obtained  $\text{EC}_{50}$  values higher than the reference values.

*Pectodictyon cubicum* ACOI 1651 showed a slow cell growth in the established growth conditions, as well as a high production of polysaccharides in both times of cultivation considered. The composition in monosaccharides appears to be similar to

Arabic gum, indicating a biotechnological potential of this strain associated to the food industry for purposes of thickening, gelling and emulsification.

Keywords: *Pectodictyon cubicum*; growth; polysaccharides; monosaccharides; antioxidant activity

# **1.Introdução**



## 1.1. As microalgas e o seu interesse comercial

As microalgas são organismos unicelulares e multicelulares fotossintéticos de sistemas marinhos e água doce (Pignolet *et al.*, 2013), mas capazes de viver numa ampla gama de condições ambientais. É estimado que existam mais de 50 000 espécies, mas apenas cerca de 30 000 foram descritas (Andersen, 2005).

As microalgas começam a ser vistas como uma fonte de matéria-prima a ter em conta para os mais variados ramos da indústria. Relativamente às plantas superiores, as culturas de microalgas apresentam inúmeras vantagens, uma vez que possuem maior eficiência fotossintética, o que permite um crescimento mais rápido e uma maior produção de biomassa por área de cultivo. Além disso, as culturas de microalgas permitem colheitas diárias, ao longo de todo o ano, em vez de colheitas sazonais e o seu cultivo pode ser feito em condições climatológicas e de solo que não competem com as culturas tradicionais, como desertos e solos contaminados ou pouco produtivos. Podem ainda ser cultivadas em águas marinhas e salobras ou em efluentes industriais e aproveitando o CO<sub>2</sub> libertado por essas indústrias (Scragg *et al.*, 2003; Chisti, 2007).

Os primeiros relatos sobre a utilização de microalgas datam de há 2000 anos atrás, pelos chineses, que se alimentavam de *Nostoc* nos períodos mais difíceis (Priyadarshani & Rath, 2012). Várias populações indígenas utilizavam, há centenas de anos, como fonte de alimento, algas como *Nostoc*, *Arthrospira* (*Spirulina*) e *Aphanizomenon*, mas o cultivo de microalgas tem poucos anos. O desenvolvimento da biotecnologia microalgal efetivamente só teve início a partir da metade do século passado (Jensen *et al.*, 2001). Na década de 50, o aumento da população mundial e a consequente falta de proteínas, levou à procura de novas alternativas como fonte de proteínas, sendo a biomassa algal uma boa candidata. Ao mesmo tempo, a procura de substâncias bioativas, como antibióticos, nessas mesmas algas, também se iniciou (Borowitzka, 1995).

A cultura comercial em larga escala começou nos anos 60, no Japão, com o cultivo de *Chlorella* e, posteriormente, com o cultivo e colheita de *Arthrospira* num lago no México. Na década seguinte já haveria cerca de 46 cultivos em larga escala na Ásia produzindo mais de 1000kg de microalgas por mês, principalmente *Chlorella* (Spolaore *et al.*, 2006). A produção comercial de *Dunaliella salina*, como fonte de  $\beta$ -caroteno, tornou-se a 3ª maior indústria microalgal, quando as instalações de produção se estabeleceram na Austrália, em 1986. Mais recentemente iniciou-se a produção de

*Haematococcus pluvialis*, para extração de astaxantina, nos Estados Unidos e na Índia (Pulz & Gross, 2004).

Várias espécies são já utilizadas para diversas aplicações na indústria, *Arthrospira* é usada na alimentação humana devido ao seu conteúdo proteico, excelente valor nutritivo e pelo facto de ter possíveis efeitos benéficos na saúde: alívio da hiperlipidémia, supressão da hipertensão, proteção contra falhas renais, promoção de crescimento da bactéria intestinal e supressão da glucose no sangue. Na indústria farmacêutica esta microalga é muito usada na produção de nutracêuticos. *Chlorella* é das microalgas mais produzidas na indústria devido a sua produção de lípidos com potencial para biodiesel. A substância mais importante produzida por esta microalga é o  $\beta$ -1,3-glucano, que é um imunoestimulador ativo que reduz os lípidos do sangue. Esta microalga também pode ser usada como aditivo alimentar para ajustar o sabor dos alimentos. *Dunaliella salina* é explorada pelo seu conteúdo em  $\beta$ -caroteno e pode ser usada na dieta humana, como suplemento alimentar. Num curto período de tempo, cerca de 30 anos, a indústria biotecnológica das microalgas cresceu e diversificou-se significativamente. Em 2006 o mercado de biomassa algal produzia cerca de 5000 toneladas de biomassa seca por ano (Spolaore *et al.*, 2006).

As microalgas também possuem vantagens em comparação com as macroalgas, pois podem crescer em biorreatores, em condições controladas, e começam a ser usadas como matéria-prima para a indústria alimentar, farmacêutica, cosmética. Devido ao progresso biotecnológico e à produção em larga escala nestes últimos anos, as microalgas representam uma das mais promissoras fontes de biomateriais para aplicação industrial (Park *et al.*, 2011).

## **1.2. *Pectodictyon cubicum* Taft, 1945**

De acordo com Algaebase (<http://www.algaebase.org>) a microalga *Pectodictyon cubicum* Taft pertence ao filo Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordem Chlamydomonadales, família Sphaerodictyaceae e género *Pectodictyon*. Segundo Lang e seus colaboradores (1987) foi encontrada em vários locais tais como Estados Unidos, Canadá, América do Sul e Europa.

Em 1945, Taft fez a primeira descrição da espécie, observando oito células, que formavam cenóbios ocos onde cada célula se encontrava no canto de um cubo delimitado por cordões gelatinosos produzidos e ligados às células. Verificou também

que quando as células produziam autósporos e os cenóbios resultantes permaneciam ligados formavam-se colónias compostas (Figura 1).

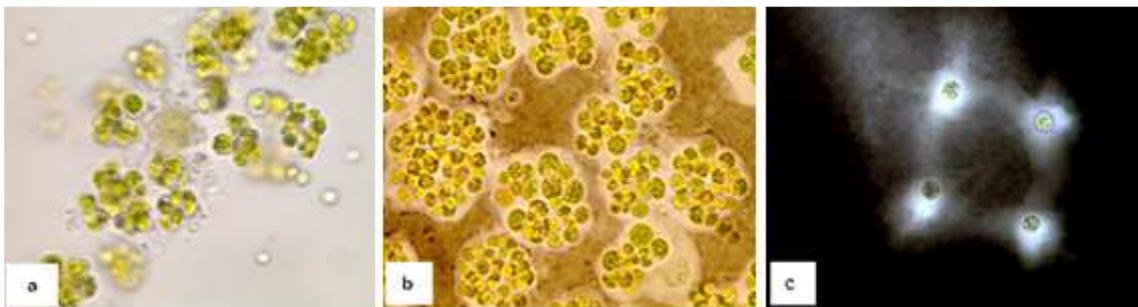


Figura 1. Observação de *Pectodictyon cubicum*, ao microscópio ótico, com ampliação de 400X, sem tinta-da-china (a) e com tinta-da-china para evidenciar a mucilagem envolvente (b, c).

Após o estudo de material fresco e material preservado, Taft (1945) interpretou o desenvolvimento em *Pectodictyon cubicum* como “cada protoplasto sofre três divisões sucessivas em planos perpendiculares entre si resultando num grupo de oito autósporos colocados em dois planos, cada um com quatro autósporos cada”. Verificou a separação das células através da formação de material gelatinoso à sua volta, sendo que essa “gelatinização de determinadas áreas da parede celular aumenta a separação e resulta em cordões gelatinosos que unem as células formando um cubo”.

Em 1987, Lang e os seus colaboradores estudaram *Pectodictyon cubicum* ao microscópio eletrónico e verificaram que a parede celular apresentava duas camadas, uma espessa, interior, granuloso-fibrilhar, presumivelmente de celulose e uma fina, trilaminar, exterior, semelhante à esporopolenina, presente em muitas *Chlorococcales*. Descreveram ainda uma matriz mucilaginosa por fora da célula que poderia parecer um pouco fibrilhar, homogénea ou em camadas e as células interfásicas, com um único cloroplasto em forma de taça e com um pirenóide rodeado por uma ou duas placas grandes de amido. Os autores mostraram ainda que a divisão celular ocorria por um sulco de clivagem o qual seguia um caminho delineado por segmentos de retículo endoplasmático e por indistintos microtúbulos do ficoplasto.

### 1.3. Mucilagens em microalgas

Os hidratos de carbono são normalmente divididos em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos são poli-aldeídos ou cetonas geralmente com uma cadeia de carbono não ramificada, sendo exemplos a glucose, a

frutose e a galactose. Os oligossacarídeos são obtidos a partir de ligações glicosídicas entre dois e dez monossacarídeos enquanto os polissacarídeos são constituídos por monossacarídeos em número superior a 10 (Belitz *et al.*, 2009).

As fontes principais de polissacarídeos para uso industrial têm sido as plantas superiores (amido, celulose, pectina, galactomananas e gomas) e as macroalgas (carragenanas, agar e alginatos, genericamente conhecidos por ficocolóides). O uso destas fontes de polissacarídeos tem algumas desvantagens, como a sazonalidade de oferta da matéria-prima e a flutuação dos preços de mercado, devido a mudanças políticas ou constrangimentos ambientais, bem como a heterogeneidade das propriedades químicas e físicas resultantes das variações das condições de crescimento e dos métodos de extração (Eteshola *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2003; Pulz & Gross, 2004).

Tal como as macroalgas, as microalgas sintetizam diversos polissacarídeos que constituem a sua parede celular. A parede celular de muitas algas consiste numa fase cristalina incorporada numa matriz, sendo esta fase cristalina geralmente composta por celulose, xilanas ou mananas. Os polissacarídeos descobertos na parede celular variam com o género e espécie de microalga, bem como com a fase de crescimento. Estudos indicam que são sintetizados em vesículas no complexo de Golgi durante a fase exponencial de crescimento e depois transportadas para a membrana celular onde se fundem a esta, e são libertados por exocitose na fase estacionária (Myklestad, 1995; Tsekos, 1999).

As mucilagens das microalgas têm sido vagamente definidas ao longo dos anos. O'Colla (1962), por exemplo, definiu as mucilagens como uma classe de polissacarídeos solúveis que mostra uma grande diversidade na sua estrutura molecular e que são constituintes da parede celular, sendo consideradas parte da célula e seus produtos fisiológicos. Os componentes dominantes da mucilagem algal são polissacarídeos, mas foram também identificados proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, vírus e micróbios. A natureza e a proporção relativa de polissacarídeos e proteínas são os principais fatores de interação que podem influenciar a formação de uma matriz de mucilagem e as suas propriedades funcionais (Metaxatos *et al.*, 2003).

Os polissacarídeos que constituem parte da mucilagem são polímeros naturais e recentemente considerados como uma importante fonte de novos compostos bioativos para suprimir as necessidades do mundo atual (Goo *et al.*, 2013). Podem apresentar-se na forma de cápsula gelatinosa, baínha ou mucilagem, que envolve as células ou as

colônias de células, permanecendo junto destas ou sendo libertados e difundidos para o meio ambiente, como exopolissacarídeos solúveis (EPS), quer metabolicamente quer por degradação natural e ou mecânica. Apenas as mucilagens e as cápsulas apresentam grandes quantidades de polissacarídeos, as baínhas, quando presentes, representam uma pequena fração do peso seco das microalgas (Ascencio *et al.*, 2004; Richert *et al.*, 2005).

Os polissacarídeos são a principal fonte de carbono orgânico libertado pelas algas e armazenado para a cadeia alimentar, tendo grande importância ecológica. Os monossacarídeos constituintes são extremamente variáveis tanto em composição como em estereoquímica (Giroldo & Vieira, 2002; Prajapati *et al.*, 2013). Em diatomáceas, a produção de polissacarídeos é predominante no seu crescimento e uma parte crítica do seu sucesso biológico (Hoagland *et al.*, 1993).

No aspeto fisiológico, a presença de uma camada de EPS à volta da célula poderá estar envolvida na proteção da célula para reduzir a penetração desnecessária de iões. Estes EPS também podem estar envolvidos na captura e retenção de água envolvente, em ambientes extremos (Goo *et al.*, 2013). São caracterizados por terem altos valores de viscosidade e um comportamento plástico e, dependendo das suas características químicas, podem ter várias utilizações (De Philipps *et al.*, 2000): polímeros que mostrem grandes concentrações de cargas negativas nas macromoléculas podem ser usados como agentes quelantes para a remoção de metais pesados das massas de água ou para a lixiviação de metais valiosos de resíduos sólidos industriais; polímeros caracterizados pela presença de grupos hidrofóbicos, em conjunto com os típicos grupos hidrofílicos dos polissacarídeos, podem interessar como agentes emulsionantes.

Dado que os hidratos de carbono são produtos que se estão a tornar escassos e caros a um ritmo rápido, o uso de microalgas como fonte sustentável destes poderá ser uma possível solução, necessitando de uma melhor exploração, uma vez que os polissacarídeos podem representar uma grande fração da biomassa microalgal (Draaisma *et al.*, 2013).

### **1.3.1. Estudos efetuados em microalgas**

Várias cianobactérias produzem grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares na forma de baínhas e cápsulas (Huang *et al.*, 1998; De Philipps *et al.*,

2001). Por exemplo, num estudo de Helm e seus colaboradores (2000), em laboratório, culturas de *Nostoc sphaeroides* libertaram cerca de 1200mg/L de polissacarídeo, enquanto entre 300 a 600mg de polissacarídeo puro foram isolados de 1,5L de meio de uma cultura de *Nostoc commune* DRH-1.

Outros autores (Becker, 2007; Harun *et al.*, 2010) fazem referência a percentagem de polissacarídeos por peso seco de algumas estirpes de diversos grupos algais (Tabela 1), em que se destacam *Spirogyra* sp. e *Porphyridium cruentum*.

Tabela 1. Teor em polissacarídeos presente em diversas espécies de microalgas (adaptado de Becker, 2007; Harun *et al.*, 2010).

Classe	Espécie	Polissacarídeos (% em peso seco de biomassa)
Chlorophyceae	<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21-52
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
	<i>Chlorella vulgaris</i>	12-17
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26
	<i>Dunaliella bioculata</i>	4
	<i>Dunaliella salina</i>	32
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	27
	<i>Tetraselmis maculata</i>	15
	<i>Spirogyra</i> sp.	33-64
Euglenophyceae	<i>Euglena gracilis</i>	14-18
Rhodophyceae	<i>Porphyridium cruentum</i>	40-57
Cyanophyceae	<i>Spirulina platensis</i>	8-15
	<i>Spirulina maxima</i>	13-16
	<i>Synechococcus</i> sp.	8-15
	<i>Anabaena cylindrica</i>	25-30
	<i>Arthrospira maxima</i>	13-16
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	23
Prymnesiophyceae	<i>Isochrysis galbana</i>	17
	<i>Prymnesium parvum</i>	25-33
Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis</i> spp.	36

O conteúdo em polissacarídeos das microalgas e a sua composição dependem do meio de crescimento e da idade das culturas, bem como variam entre espécies e estirpes

(Bafana, 2013). Podem ser encontrados açúcares como arabinose, xilose, manose, galactose e glucose ou açúcares menos comuns como ramnose, fucose e ácido urónico.

Em *Phaeocystis* sp. foram caracterizados açúcares como manose, ramnose, arabinose, galactose, xilose, glucose e fucose (Aluwihare & Repeta., 1999), enquanto em *Porphyridium* sp. foram encontrados, pelo menos, 10 açúcares diferentes entre os quais xilose, glucose e galactose em maior abundância (Singh *et al.*, 2000). Segundo Giroldo e seus colaboradores (2005). Em *Cryptomonas pirenoidosa* estão presentes açúcares como ramnose, fucose, xilose, manose, galactose e glucose. Estudos em *Porphyridium cruentum* revelaram um heteropolímero composto por xilose, glucose e galactose em maiores quantidades e manose, arabinose e ribose em pequenas quantidades (Arad & Levy-Ontman, 2010). Em duas espécies de *Cryptomonas* (*Cryptomonas tetrapyrenoidosa* e *Cryptomonas obovata*), através de análise em HPLC, foram encontrados açúcares como ramnose, fucose, xilose, manose, galactose e glucose (Giroldo & Vieira, 2002; Giroldo *et al.*, 2005). Na clorófito *Scenedesmus acuminatus* foi detetada a presença de grandes quantidades de manose (76 %), associada a percentagens menores de arabinose (9%), fucose (3,5%), galactose (2,5%), ramnose (2,5%), xilose (3%), ácido galacturónico (3%) e ácido glucurónico (9%) (Lombardi *et al.*, 2005). Raposo e seus colaboradores (2013), sintetizaram na forma de tabela os diferentes tipos de polissacarídeos, incluindo sulfatados e os principais açúcares encontrados em várias espécies de microalgas (Tabela 2).

O interesse no potencial biotecnológico de polissacarídeos naturais tem aumentado devido ao interesse da indústria na substituição de produtos sintéticos por produtos naturais e os polissacarídeos de microalgas, sendo os menos estudados, representam um desafio emocionante (Arad & Levy-Ontman, 2010). Os exopolissacarídeos de microalgas estão a ser objeto de estudos estruturais, bem como da sua função biológica. Por exemplo, estudos feitos em *Gyrodinium impudicum* mostram que os seus exopolissacarídeos sulfatados têm actividade imunoestimulante e antiviral (Yim *et al.*, 2004), enquanto polissacarídeos sulfatados de *Porphyridium* sp. revelaram ter grande potencial contra o vírus *Herpes simplex* e em *Varicella zoster* (Huleihel *et al.*, 2001). Em *Haematococcus pluvialis* os exopolissacarídeos obtidos e purificados mostraram também ter actividade imunoestimulante (Park *et al.*, 2011). Os polissacarídeos das cianobactérias atuam como agentes de proteção contra a desidratação devido à sua capacidade em captar e acumular água, criando uma baínha

gelatinosa à volta das células que regula a quantidade de água em períodos de dessecação, protegendo as células dos raios U.V. (De Philipps *et al.*, 2000).

Os polissacarídeos assumem um potencial em aplicações industriais, podendo ser utilizados na indústria alimentar como agentes espessantes, indústria cosmética e têxtil. Têm a capacidade de modificar as propriedades da água e ainda o sequestro de iões metálicos na indústria farmacêutica. Estão também envolvidos em processos de quelação de metais devido à presença de açúcares carregados negativamente, podendo evitar o contacto direto das células com metais pesados (Silipo *et al.*, 2010).

Os resultados de programas de *rastreio* de polissacarídeos de microalgas para testarem efeitos imunológicos *in vitro*, mostraram que polissacarídeos altamente sulfatados podem desencadear a estimulação celular do sistema imunitário humano. Frações de polissacarídeos eficazes foram encontradas maioritariamente em cianobactérias, mas compostos extraídos de rodófitas e clorófitas mostraram também grande eficiência (Pulz & Gross, 2004).

Tabela 2. Tipo de polissacarídeos e principais açúcares encontrados em várias espécies de microalgas (adaptado de Raposo *et al.*, 2013). EPS-exopolissacarídeos; sPS, polissacarídeos sulfatados; PS, polissacarídeos.

Microalga/Cyanobacteria	Grupo	Tipo de polissacarídeo	Açúcares principais
<i>Cylindrotheca closterium</i>	Diatomáceas	sPS	xilose, glucose
<i>Navicula salinarum</i>			glucose, xilose
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>		EPS (sulfatados)	glucose, manose
<i>Nitzschia closterium</i>			-
<i>Chaetoceros</i> sp.			-
<i>Amphora</i> sp.			-
<i>Chlorella stigmatophora</i>	Clorófitas	PS (sulfatados)	glucose, xilose
<i>Chlorella</i> sp.		sPS	-
<i>Ankistrodesmus angustus</i>		EPS	
<i>Tetraselmis</i> sp.	Prasinofíceas (Chlorophyta)	sPS	-
<i>Isochrysis</i> sp.	Primnesiofíceas (Haptophyta)		
<i>Porphyridium</i> sp.	Rodófitas	sPS	xilose, galactose
<i>P. cruentum</i>			xilose, galactose
<i>Rhodella reticulata</i>			xilose, galactose
<i>Aphanothece halophytica</i>	Cianófitas	EPS	glucose, fucose
<i>Arthrospira platensis</i>		sPS	ramnose, fructose

#### **1.4. Metodologias de extração de polissacarídeos**

As várias metodologias de extração de polissacarídeos envolvem etapas como a eliminação de impurezas e a precipitação por solventes químicos (pré-tratamento alcalino, hidrólise ácida).

De acordo com Zheng e seus colaboradores (2009), o pré-tratamento alcalino é um dos métodos químicos mais utilizados em plantas, sendo utilizadas várias bases como hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio e hidróxido de potássio, entre outras. É basicamente um processo de deslignificação das paredes, no qual uma parte significativa de hemiceluloses é também solubilizada. O tratamento alcalino do material lignocelulósico leva ao decréscimo do grau de polimerização e cristalinidade, à ruptura da estrutura da lenhina e separação das ligações estruturais entre a lenhina e os hidratos de carbono. A efetividade do tratamento alcalino varia dependendo do substrato e das condições de tratamento. O tempo de tratamento pode ser de horas ou dias, sendo mais longo que outros processos de pré tratamento. Uma desvantagem significativa deste processo é a conversão alcalina em sais irrecuperáveis e/ou a incorporação de sais na biomassa durante as reações, daí que as quantidades de sal sejam um desafio para este tipo de tratamento.

Ainda segundo os mesmos autores, ácidos como  $H_2SO_4$  e  $HCl$  têm sido utilizados no tratamento de matérias lignocelulósicos, pois são agentes poderosos na hidrólise da celulose, contudo os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos sendo necessários reatores resistentes a corrosão. A hidrólise com ácido diluído foi desenvolvida com sucesso no pré-tratamento destes materiais. Por exemplo o pré-tratamento com ácido sulfúrico consegue alcançar altas taxas de reação e melhora significativamente a hidrólise da celulose. Com uma temperatura moderada, a sacarificação direta é de baixo rendimento devido à decomposição dos açúcares. Por outro lado altas temperaturas são favoráveis à hidrólise da celulose.

Na extração de polissacarídeos em microalgas o maior obstáculo é a dificuldade em quebrar a parede celular rígida das microalgas, daí um dos passos mais importantes ser o pré-tratamento/extração (Zhao *et al.*, 2013). Dos poucos estudos ainda realizados destaca-se o de Templeton e seus colaboradores (2012), que verificaram que a biomassa microalgal difere da biomassa das plantas, pois na sua composição não existe lenhina e tem um alto teor em proteínas e lípidos, o que sugere que não só diferentes monossacarídeos estejam presentes antes da hidrólise, como outros subprodutos possam interferir na separação e quantificação em cromatografia.

## 1.5. Condições para a otimização da produção de mucilagem

As condições de cultivo das microalgas são fatores importantes que influenciam o seu metabolismo, direcionando para a síntese de compostos de interesse específicos (Morais *et al.*, 2015). Estudos realizados em *Porphyridium cruentum* concluem que a taxa de crescimento e a produção de polissacarídeos são afetadas pelas condições ambientais. Um importante fator de crescimento é a luz e tem sido bastante investigado em termos de densidade do fluxo de fótons. De acordo com a teoria de Emerson e Brody, a luz pode reduzir o período de crescimento necessário para ser alcançada a fase estacionária. O nível e qualidade de luz desempenham um papel chave no crescimento das células e na produção de polissacarídeos (Liqin & Changhai, 2008). Hongmei e seus colaboradores (2014) realizaram um estudo em *Nostoc* sp. onde avaliaram a influência da intensidade da luz na composição dos polissacarídeos, verificando não existir influência na composição dos monossacarídeos que constituem o polissacarídeo.

Em muitas espécies a taxa de produção de polissacarídeos aumenta com a deficiência em nutrientes no meio, como consequência do carbono assimilado (Girollo *et al.*, 2005). Segundo Smith & Underwood (2000), desde que não haja divisão celular em condições de privação de azoto, o carbono assimilado por via da fotossíntese seria direcionado para a produção e liberação de polissacarídeo. A privação de azoto simularia a fase estacionária de crescimento das células, quando a liberação de hidratos de carbono é aumentada.

Apesar das diferenças na composição de muitas espécies refletirem diferenças genéticas podem, por vezes, ser atribuídas às condições de cultivo. Alguns estudos mostram que a composição das microalgas pode mudar quando cultivadas em diferentes condições ou colhidas em diferentes estados de crescimento (Brown *et al.*, 1993). Na fase estacionária culturas de *Pavlova lutheri*, *Isochrysis* sp. e *Nannochloropsis oculata* contêm aproximadamente duas a quatro vezes mais hidratos de carbono do que culturas na fase logarítmica. Vários investigadores indicam nos seus estudos que a composição em açúcares das microalgas pode diferir entre a fase logarítmica e a fase estacionária, mas que estas diferenças são específicas (Chu *et al.*, 1982; Whyte, 1987).

## 1.6. Atividade antioxidante em microalgas

Antioxidantes são compostos que inibem ou atrasam a oxidação de outras moléculas, inibindo a iniciação ou propagação das reações em cadeia de oxidação (Velioglu *et al.*, 1998). Existem dois tipos de antioxidantes, os sintéticos e os naturais. Dentro dos antioxidantes sintéticos, os mais usados na preservação dos alimentos são BHA (butilhidroxianisol), BHT (di-t-butil metilfenol) que segundo alguns relatórios podem ser tóxicos. Estes fatores levaram a uma maior consciência por parte dos consumidores sobre a utilização destes antioxidantes como aditivos alimentares (Moure *et al.*, 2001).

Apesar de custos de produção mais elevados, na última década o interesse em compostos com propriedades antioxidantes provenientes de fontes naturais tem aumentado, pois revelam uma importante contribuição na manutenção da saúde. Evidências recolhidas em vários estudos suportam a importância dos antioxidantes no controlo da prevenção e crescimento de certos tumores assim como na incidência de outras doenças. Assim, o crescimento do mercado dos antioxidantes de fontes de baixo custo e menos convencionais justifica cada vez mais estudos (Guedes *et al.*, 2013b). Deste modo, o interesse na capacidade antioxidante dos compostos ativos das microalgas tem crescido, especialmente no mercado de alimentos funcionais/nutracêuticos, bebidas e em aplicações farmacêuticas para a terapia de doenças associadas a oxidação celular (Pulz & Gross, 2004).

Exemplo de potentes antioxidantes biológicos são os carotenóides. Estes são compostos orgânicos polinsaturados que se dividem em carotenos, como licopeno e  $\beta$ -caroteno e em xantofilas como luteína, zeaxantina e astaxantina (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2014). Desempenham um papel muito importante na eliminação de espécies reativas de oxigénio (ROS) geradas durante a fotossíntese, sendo também capazes de reduzir a incidência e gravidade de doenças cardiovasculares e degenerativas (Goiris *et al.*, 2012). Em microalgas foram já descritos vários compostos com atividade antioxidante, como  $\beta$ -caroteno em *Spirulina platensis* (Mendiola *et al.*, 2007) e em *Dunaliella salina* (León *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2006), luteína em *Muriellopsis* sp. (Del Campo *et al.*, 2000), luteína e astaxantina em *Chlorella zofingensis* (Del Campo *et al.*, 2004) e astaxantina e  $\beta$ -caroteno em *Haematococcus pluvialis* (Jaime *et al.*, 2010).

Por serem seres fototróficos, as microalgas estão expostas a altos níveis de oxigénio e *stress* de radicais (Pulz & Gross, 2004) e uma vez que algumas são ricas em carotenóides, estes parecem contribuir significativamente para a sua atividade

antioxidante (Goiris *et al.*, 2012). Para além destes compostos, outros com atividade antioxidante, como lípidos insaturados e polissacarídeos foram encontrados na biomassa de microalgas, com potenciais aplicações na alimentação, em cosmética e medicina (Morais *et al.*, 2015).

Algumas microalgas são já cultivadas para uso comercial como fonte de carotenóides, nomeadamente *Haematococcus* sp. e *Dunaliella* sp. para a produção de astaxantina e  $\beta$ -caroteno, respetivamente, que são utilizados como aditivos em alimentos, cosméticos e suplementos alimentares (Pulz & Gross, 2004; Spolaore *et al.*, 2006).

## **1.7.Objetivos do trabalho**

Este trabalho teve como objetivo conhecer o potencial biotecnológico de uma estirpe de *Pectodictyon cubicum* Taft pertencente à Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI), com o número de referência ACOI 1651, no respeitante à produção e tipo de polissacarídeos e à sua capacidade antioxidante. Para isso procedeu-se à avaliação do seu crescimento, em condições controladas, à extração dos polissacarídeos e determinação da sua composição em monossacarídeos e, para avaliar a atividade antioxidante total, foram utilizados dois métodos envolvendo a capacidade de aniquilação de radicais livres.



## **2.Materiais e métodos**



## 2.1. Material de estudo, condições de cultivo e avaliação do crescimento

Neste estudo foi utilizada a microalga *Pectodictyon cubicum* Taft, pertencente à Algoteca da Universidade de Coimbra, com o número de referência ACOI 1651, alga que foi inicialmente colhida num tanque do Jardim Botânico de Coimbra por L. Santos, em 2003, e isolada e identificada por M. F. Santos no mesmo ano.

Iniciaram-se culturas unialgais em balão Erlenmeyer de 300mL com 100mL de cultura e 100mL de meio aquoso M7 (Tabela 3). Após 15 dias fez-se o aumento de escala para um balão Erlenmeyer de 500mL, usando 200mL de meio e igual volume de cultura. Após 15 dias fez-se novo aumento de escala para um balão de 2L com 800mL de cultura e o mesmo de meio. No final de outros 15 dias, a 1,6L de cultura adicionou-se 1L de meio de cultura M7. Para cada experiência, tanto para a extração de polissacarídeos como para a determinação da atividade antioxidante, foi sempre utilizada uma cultura com 15 dias de crescimento.

Tabela 3. Composição química do meio de cultura líquido M7 (em <http://acoi.ci.uc.pt/>), adaptado de Schlösser (1994) com as quantidades necessárias para a preparação de 1L. A descrição e o modo de preparação dos extratos encontram-se em anexo (Anexo I).

Composição	Solução stock (%)	M <sub>7</sub> (mL)
KNO <sub>3</sub>	1	10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2	5
CaSO <sub>4</sub>	Solução saturada	10
Extrato de solo	-	20
Extrato de <i>Sphagnum</i>	-	10
Água destilada	-	930
Micronutrientes	-	5

A solução de micronutrientes prepara-se em duas soluções separadas e autoclavadas que, posteriormente, depois de frias, são misturadas. A solução I consiste em: 881mL de água destilada, 1mL de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,1%, 2mL de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O a 0,1%, 5mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 0,2%, 5mL de Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O a 0,02%, 5mL de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O a 0,02%, 1mL de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a 0,0005% e 0,4g de EDTA. A solução

II é preparada em 100mL de água destilada, a que se adicionam 0,7g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,4g de EDTA.

Para a extração dos polissacarídeos o tempo de crescimento de *Pectodictyon cubicum* foi de 15 dias e de 1 mês, utilizando 3 réplicas e reatores de 3L, cada réplica sendo preparada com 1L de meio de cultura M7 e 500mL de cultura. As culturas foram sujeitas a borbulhamento de ar, uma temperatura de 23°C e mantidas sob uma intensidade luminosa média de  $21,62\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 2). As lâmpadas utilizadas OSRAH Cool White L 36W/ 20 Hellweiss foram ligadas a um temporizador regulado para um fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro.



Figura 2. Réplicas da cultura de *Pectodictyon cubicum* em crescimento numa câmara de cultura climatizada, sujeitas a borbulhamento de ar, 23°C de temperatura ambiente, uma intensidade luminosa média de  $21,62\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e um fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro.

O crescimento foi estimado por dois métodos: peso seco da biomassa em caixas de Petri e peso seco após filtração e lavagem da biomassa. Foram colocadas a crescer 9 culturas, com 3 réplicas cada uma, num total de 27 balões Erlenmeyers de 250mL, durante 31 dias, nas condições anteriormente referidas (Figura 3).



Figura 3. Culturas de *Pectodictyon cubicum* em crescimento durante 31 dias sob intensidade luminosa de  $21,62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $23^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro e borbulhamento de ar para determinação da sua curva de crescimento.

No primeiro dia, de 3 em 3 dias e depois passando a intervalos de 4 dias foram recolhidas 3 amostras de 20mL de cada réplica, colocadas em caixa de Petri e secas em estufa Heraeus Instruments a  $60^\circ\text{C}$ . Para estimar o crescimento pelo método do peso seco após filtração e lavagem da biomassa, foram retirados 10mL de cultura de cada uma das réplicas, nos intervalos de tempo antes referidos, filtrados num sistema de filtração Buchner, com bomba de vácuo Millipore, usando filtros Whatman GF/C 47mm (Figura 4), seguindo-se a lavagem dos mesmos com 10mL de água destilada e sua colocação em caixa de Petri para secarem nas mesmas condições do primeiro método.

Para cada dia e para cada método, as caixas de Petri foram pesadas numa balança analítica Kern-510 antes da colocação das amostras e depois de saírem da estufa. Para uma estimativa da densidade celular no início da cultura foram efetuadas contagens em hemocitómetro Tiefe Depth Profondeur. Em cada dia de pesagem, as culturas foram observadas, utilizando um microscópio ótico Leica DMLS. O peso seco foi calculado subtraindo o peso final ao peso inicial de cada réplica. Posteriormente construiu-se uma curva de crescimento para cada método, com a finalidade de comparar ambos os métodos, usando-se as médias de cada réplica e a média entre réplicas e respetivos desvios padrões.



Figura 4. Sistema de filtração Buchner e bomba de vácuo Millipore utilizados para filtração e lavagem da biomassa.

## 2.2.Extração dos polissacarídeos e análise da sua composição em monossacarídeos

Para a extração dos polissacarídeos de *Pectodictyon cubicum* Taft, 1L de biomassa foi retirado após os 15 dias e 1 mês de crescimento das culturas e colocado em estufa a 60°C, até secar totalmente. De seguida, a biomassa seca foi removida por raspagem e colocada num tubo Falcon com uma solução de acetona e metanol (1:1) e levada a um banho de ultrassons a 35kHz, durante 2 horas, para rotura da parede celular, despigmentação da biomassa e remoção de pigmentos organossolúveis (Figura 5.a). Em seguida a biomassa foi colocada de novo na estufa para evaporação dos solventes (Figura 5.b).



Figura 5. a) Biomassa seca com os solventes metanol e acetona (1:1) em ultrassons. b) Cadinhos com a biomassa seca depois de sujeita a banho de ultrassons e secagem.

Para a extração alcalina, a biomassa seca dos cadinhos foi removida, pesada em balança analítica Kern 510, colocada em gobelé com NaOH 0,1M, na proporção de 150mL para 1g de biomassa seca e em seguida, em banho-maria a 90°C, durante 3 horas (Figura 6.a). Após o processo, efetuou-se uma primeira filtração grosseira com bomba de vácuo Millipore com funil de porcelana e pano-cru (Figura 6.b), seguida de filtração fina com funil G0 para eliminar os componentes não extratáveis (Figura 6.c). Ao resultado destas filtrações foi adicionado etanol a 100% para precipitação dos polissacarídeos (Figura 6.d), que foram recolhidos através de um funil com crivo de malha de 80mm e colocados a secar na estufa a 60°C.



Figura 6. a) Gobelé com a biomassa seca e NaOH, em banho-maria a 90°C. b) Filtração grosseira usando vácuo e pano-cru. c) Filtração fina usando vácuo com funil de malha G0. d) Precipitação em etanol a 100%.

### 2.2.1. Hidrólise dos polissacarídeos

Após a extração alcalina, os polissacarídeos obtidos foram submetidos a uma hidrólise com 0,5mL de HCl a 34% e 0,5mL de água, em banho-maria, durante 2 horas e 30 minutos, a 100°C (Figura 7.a). O extrato foi depois purificado em coluna de extração em fase sólida Chromabond C18 (Macherey-Nagel). Esta coluna tem uma base de octadecilsílica, um diâmetro de poro de 60Å, uma superfície específica de 500m<sup>2</sup>/g e estabilidade de pH entre 2 e 8, é usada para partículas com tamanho de 45µm e separa substâncias polares de apolares, deixando passar as polares e retendo as apolares (Figura 7.b).



Figura 7. a) Hidrólise ácida, em banho-maria, a 100°C. b) Filtração do hidrolisado em coluna Chromabond C18.

### 2.2.2. Análise dos hidrolisados por cromatografia líquida

A solução das amostras foi previamente neutralizada com NaOH para um pH entre 5-7, para não danificar a coluna de separação, e depois filtrada com filtro Millipore de 45µm de diâmetro.

A análise dos monossacarídeos resultantes da hidrólise foi efetuada em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Figura 8), sistema isocrático com bomba Jasco PU-980, injetor Rheodyme modelo 7125, com “loop” de 20µL, coluna de separação Inertsil NH<sub>2</sub> (250 x 4,7mm) e um detetor de índice de refração Jasco RI-830. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrilo/água (80:20) com um caudal de 1mL/min.



Figura 8. Aparelho de HPLC (cromatografia líquida de alta pressão).

A identificação dos monossacarídeos foi feita com base em padrões autênticos (ver Anexo II), para se poderem comparar os tempos de retenção destes e das bandas das amostras. Os padrões usados foram as pentoses arabinose, xilose, ramnose e ribose,

as hexoses glicose, manose, galactose, frutose e fucose e o dissacarídeo maltose. Para cada padrão foi feita uma solução de 20mg/mL com água destilada e posterior injeção em HPLC para determinação do tempo de retenção de cada açúcar (Tabela 5).

Tabela 5. Tempos de retenção obtidos para os vários padrões de açúcares utilizados. RT – Tempo de retenção; RRT-Tempos de retenção relativos a arabinose.

Açúcar	RT 1ª injeção	RRT (Arabinose)	RT 2ª injeção	RRT (Arabinose)
Xilose	9,50	0,86	9,45	0,86
Fucose	10,69	0,97	10,36	0,94
Ramnose	8,04	0,73	8,08	0,74
Arabinose	11,06	1,00	10,98	1,00
Frutose	12,32	1,11	12,31	1,12
Glicose	14,28	1,29	14,18	1,29
Galactose	15,73	1,42	15,72	1,43
Manose	13,37	1,21	13,37	1,22
Maltose	27,09	2,45	26,91	2,45
Ribose	8,39	0,76	8,34	0,76

### 2.3. Atividade antioxidante

Para testar o potencial antioxidante, prepararam-se extratos etanólicos da microalga *Pectodictyon cubicum* seguindo o método de Guedes *et al.* (2013a). Também se prepararam extratos etanólicos de alguns alimentos com atividade antioxidante conhecida (cenoura, mirtilo, framboesa, tomate, amora, morango e uva, adquiridos em supermercado), e que foram considerados como termo de comparação de resultados. Num tubo Falcon previamente pesado, foram colocados 10mL de cultura, centrifugados a 4500rpm, durante cerca de 15 minutos, descartando-se o sobrenadante e voltando-se a pesar o tubo Falcon com a biomassa (não seca). Posteriormente, consoante o peso da biomassa (não seca), foi adicionada ao “pellet” uma determinada quantidade (em mililitros) de etanol absoluto de modo a obter uma concentração de extrato final de 10mg de biomassa (não seca) em 1mL de etanol e levando-se depois ao banho de ultrassons, durante 30 minutos. Para a obtenção dos extratos dos alimentos, os mesmos foram macerados em almofariz, separadamente e colocados em tubo Falcon com a

adição de etanol de modo a obter uma concentração final de cada um dos extratos de 10mg/mL. Todo o procedimento foi realizado no escuro.

O decaimento dos radicais 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>) pode ser seguido por métodos espectrofotométricos, permitindo saber o potencial antioxidante de uma amostra. Estes métodos químicos baseiam-se na descoloração da solução do radical (Brand-Williams *et al.*, 1995; Guedes *et al.*, 2013a).

Antes da realização de cada método antioxidante leram-se as absorvâncias de todos os extratos preparados, entre 400-700nm, usando um espectrofotómetro (Hitachi U-200), (ver Anexo III), de modo a conhecer os comprimentos de onda nos quais as amostras absorviam, compreendendo assim quais os compostos que poderiam ter sido extraídos.

ABTS<sup>•+</sup> foi preparado a partir de duas soluções dissolvidas em água destilada, ABTS (Sigma) 7mol/m<sup>3</sup> e K<sub>2</sub>S<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (Merck) 2,45mol/m<sup>3</sup> (Guedes *et al.*, 2013a). A solução ficou em repouso, à temperatura ambiente e protegida da luz, durante 16 horas, para que a reação de formação do radical se completasse. De modo a que para esta solução se obtivesse uma leitura de absorvância a 734nm foi feita a sua diluição. Como padrão utilizou-se ácido ascórbico (Sigma). Dado que não se conhecia o valor antioxidante que se iria obter nas amostras, foram efetuadas retas de calibração para diferentes volumes de amostra (10, 50, 100, 200, 300 e 350µL).

Quanto ao ensaio analítico, 350µL de extrato foram adicionados a 1mL da solução de ABTS<sup>•+</sup> diluída. Este procedimento foi realizado em quadruplicado para o mesmo extrato. Após 6 minutos de reação leram-se as absorvâncias a 734nm e a média das absorvâncias foi calculada. Nos alimentos usados como referência, foram adicionados 50µL de extrato de mirtilo, amora, uva e morango, 100µL de extrato de cenoura e framboesa e 350µL de extrato de tomate a 1mL de ABTS<sup>•+</sup>, realizando-se também em quadruplicado para cada extrato. A capacidade antioxidante total foi expressa em mg/L equivalente a ácido ascórbico.

DPPH<sup>•</sup> foi preparado seguindo o protocolo descrito por Brand-Williams e seus colaboradores (1995), com algumas modificações. Primeiro foi preparada uma solução de DPPH<sup>•</sup> (Sigma) 0,06mM dissolvendo 4,8mg de DPPH<sup>•</sup> num balão volumétrico de 200mL e ajustando o volume com metanol. Depois de homogeneizada, transferiu-se a solução para um frasco coberto com papel alumínio de forma a evitar a exposição à luz. Recorrendo a espectrofotometria, realizou-se o controlo (1,8mL de DPPH<sup>•</sup> com 0,2mL de

etanol) e de seguida, para verificar a estabilização do DPPH<sup>•</sup>, a partir da solução inicial de DPPH<sup>•</sup> 0,06mM prepararam-se 6 soluções com concentrações diferentes para se efetuar a reta-padrão de calibração do DPPH<sup>•</sup> (Figura 9).

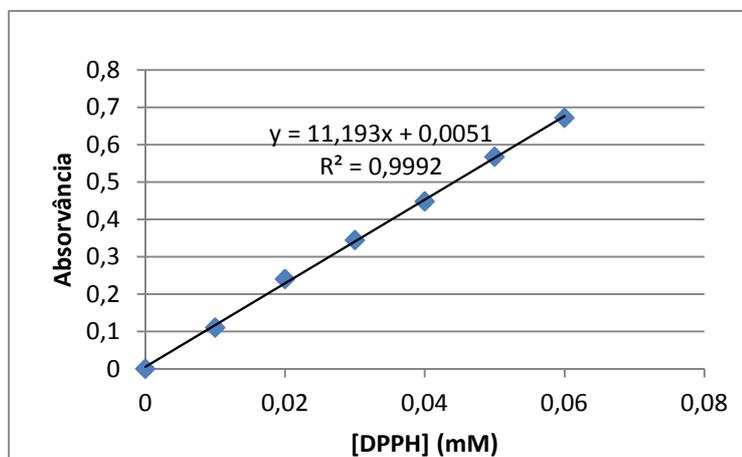


Figura 9. Reta-padrão de calibração do DPPH, com os valores de absorvância medidos no comprimento de onda de 515nm.

A leitura das absorvâncias foi feita a 515nm. Os extratos das microalgas e dos alimentos usados como referência foram diluídos para obtenção de quatro concentrações diferentes, 10, 7, 5 e 3mg/mL de solvente. De seguida, adicionaram-se 0,2mL de extrato a 1,8mL de DPPH<sup>•</sup>, homogeneizou-se e após 15 minutos efetuaram-se as leituras a 515nm. A capacidade antioxidante total foi expressa em percentagem de inibição (PI), ou seja, a capacidade que o composto tem em inibir a presença do radical DPPH<sup>•</sup>, de acordo com a equação  $PI = [(abs\ DPPH^{\bullet} - abs\ amostra) / abs\ DPPH^{\bullet}] \times 100$ . Sempre que possível foi calculado o EC<sub>50</sub>, que expressa a quantidade de extrato necessário para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH<sup>•</sup>, expresso em mg de biomassa/mL de solvente (ver Anexo IV).



### **3.Resultados**



### 3.1.Crescimento de *Pectodictyon cubicum*

O crescimento da cultura foi avaliado ao longo de 31 dias calculando o peso seco após filtração e lavagem da biomassa e sem filtração nem lavagem da biomassa. No primeiro caso (Figura 10) há uma fase inicial de crescimento lento até ao 6º dia, seguida de uma fase exponencial acentuada até ao 10º, depois uma fase de decréscimo até ao 14º e uma fase estacionária até ao 20º, de novo uma fase exponencial até ao 26º e finalmente o decréscimo até ao 31º. O peso seco inicial foi de 0,10g/L e o final de 1,47g/L.

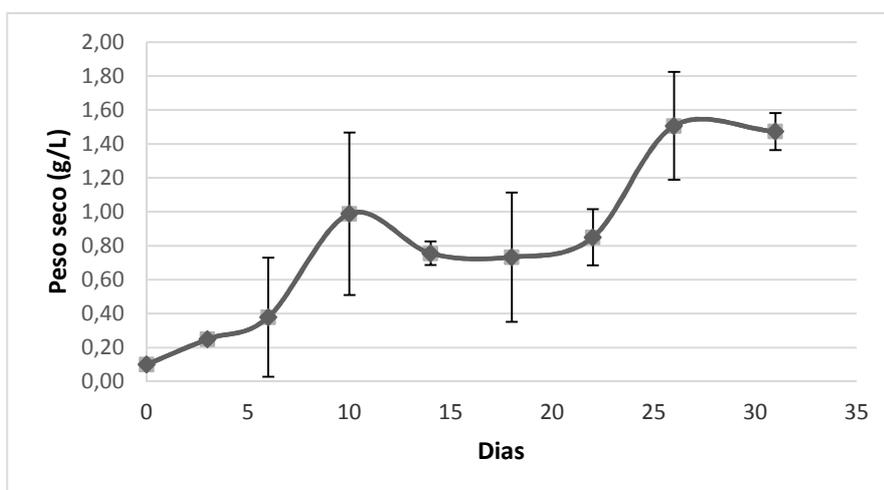


Figura 10. Crescimento de *Pectodictyon cubicum* durante 31 dias, sob intensidade luminosa de  $21,62\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e borbulhamento de ar, estimado em peso seco (g/L), após filtração e lavagem da biomassa, com os respetivos desvios-padrão.

A curva de crescimento baseada no peso seco da biomassa, sem filtração nem lavagem prévias (Figura 11) e iniciada com 0,38g/L, mostra um lento crescimento entre o 1º e o 6º dia, seguindo-se uma fase exponencial e atingindo-se um crescimento máximo ao 26º dia, depois a fase estacionária até ao 31º dia, com um peso seco final de 3,20g/L.

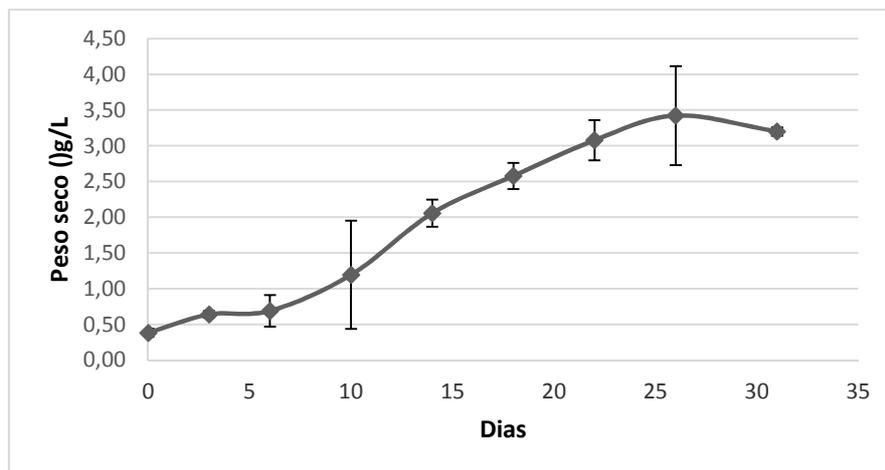


Figura 11. Crescimento de *Pectodictyon cubicum* durante 31 dias, sob intensidade luminosa de  $21,62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e borbulhamento de ar, estimado em peso seco (g/L) após secagem em caixas de Petri na estufa a  $60^\circ\text{C}$ , sem prévia filtração nem lavagem da biomassa, com os respectivos desvios-padrão.

### 3.2.Extração de polissacarídeos e a sua composição em monossacarídeos

Com o processo de extração alcalina obtiveram-se 39,71% e 44,55% de polissacarídeos por mg de biomassa seca, após 15 dias e 1 mês de crescimento de *Pectodictyon cubicum* (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de biomassa total de *Pectodictyon cubicum* obtidos após 15 dias e um mês de crescimento e respetivo conteúdo em polissacarídeos.

Tempo de cultura (dias)	Biomassa total (g)	Polissacarídeos secos (g)	Percentagem de polissacarídeos por mg de biomassa seca (%)
15	0,49	0,19	39,71
30	0,76	0,34	44,55

Como descrito nos métodos, para a análise dos monossacarídeos, foram injetadas as amostras em HPLC e foram obtidos os respetivos cromatogramas para as culturas com 15 e 1 mês de crescimento (Figuras 12 e 13).

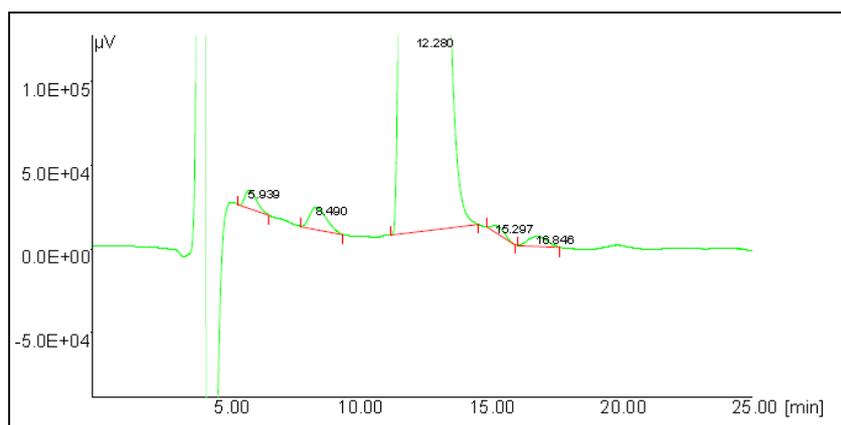


Figura 12. Exemplos dos cromatogramas em HPLC da composição em monossacarídeos de uma cultura de *Pectodictyon cubicum* com 15 dias, apresentando como monossacarídeos principais arabinose, ramnose e galactose.

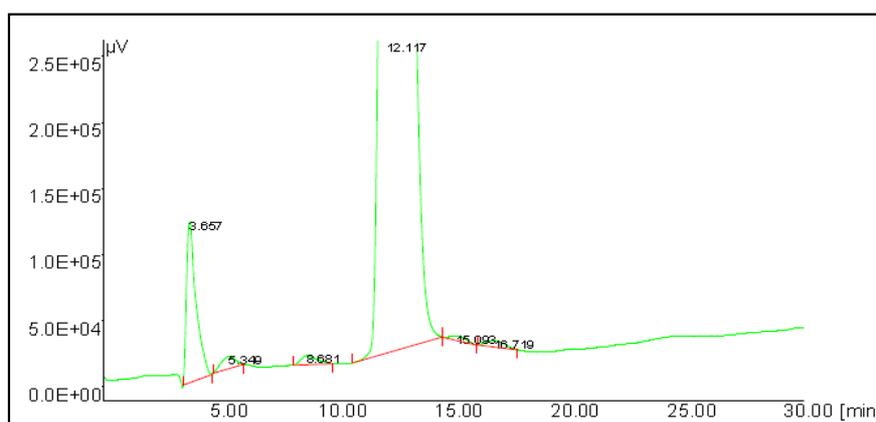


Figura 13. Exemplos dos cromatogramas em HPLC da composição em monossacarídeos de uma cultura de *Pectodictyon cubicum* com 1 mês, apresentando como monossacarídeos principais arabinose, ramnose e galactose.

Após a obtenção dos cromatogramas, a análise dos tempos de retenção de cada monossacarídeo que compõe a amostra e sua comparação com o tempo de retenção dos padrões usados, permitiu identificar os monossacarídeos ramnose, glucose ou manose, galactose e arabinose. Em seguida calcularam-se as percentagens relativas de cada monossacarídeo, sendo arabinose o que aparece em maior percentagem em ambas as amostras (Tabela 7). Os monossacarídeos identificados parecem estar em maior quantidade na amostra da cultura com 15 dias de crescimento, exceto a ramnose. Outros monossacarídeos não foram identificados pois não foram utilizados todos os padrões de açúcares que possam estar presentes nas microalgas.

Tabela 7. Conteúdo em monossacarídeos de *Pectodictyon cubicum* e a sua percentagem relativa em culturas com 15 e 1 mês de crescimento.

Monossacarídeos	% Relativa	
	Cultura com 15 dias de crescimento	Cultura com 1 mês de crescimento
Ramnose	0,61	0,67
Arabinose	94,80	91,00
Glucose/Manose	0,25	0,11
Galactose	0,43	0,28
Outros não identificados	3,91	7,94
Total	100	100

### 3.3. Atividade antioxidante

A análise do potencial antioxidante de *Pectodictyon cubicum* foi determinada para a cultura de 15 dias e para a de 1 mês de crescimento, aplicando os métodos de ABTS e DPPH. Pelo método de ABTS o extrato da cultura de *Pectodictyon cubicum* com 15 dias apresentou uma atividade antioxidante de 7,85mg/L equivalente a ácido ascórbico, enquanto o extrato da cultura com 1 mês de crescimento apresentou 4,85mg/L equivalente a ácido ascórbico (Tabela 8). No que diz respeito aos valores para os alimentos usados como referência, os valores mais altos foram os dos extratos de amora e morango com 60,02 e 55,12mg/L equivalente a ácido ascórbico, respetivamente, e os de menor valor foram os extratos de tomate e cenoura com valores respetivamente de 0,44 e 5,98mg/L equivalente a ácido ascórbico.

Tabela 8. Atividade antioxidante de extratos etanólicos de *Pectodictyon cubicum* com 15 dias e 1 mês de crescimento e de extratos de alimentos utilizados como referência, obtida pelo método de ABTS.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (mg/L equivalente a ácido ascórbico)</b>
Extrato etanólico de <i>Pectodictyon cubicum</i> com 15 dias	7,85
Extrato etanólico de <i>Pectodictyon cubicum</i> com 1 mês	4,85
Amora	60,02
Morango	55,12
Uva	34,11
Mirtilo	26,90
Framboesa	16,03
Cenoura	5,98
Tomate	0,44

Pelo método de DPPH observou-se que os extratos com concentrações mais elevadas apresentaram percentagens de inibição do DPPH<sup>•</sup> maiores, sendo o extrato etanólico de *Pectodictyon cubicum* com 15 dias de crescimento o que apresentou maiores taxas de inibição (Tabela 9).

Tabela 9. Percentagens de inibição do radical de DPPH<sup>•</sup> para diferentes concentrações de extratos etanólicos de *Pectodictyon cubicum* obtidos após 15 e 1 mês de crescimento.

<b>Extrato</b>	<b>Concentração de extrato na solução final (mg de extrato/mL de solvente)</b>	<b>% Inibição do DPPH<sup>•</sup></b>
Extrato etanólico de <i>Pectodictyon cubicum</i> com 15 dias	10	13,90
	7	13,20
	5	12,64
	3	12,22
Extrato etanólico de <i>Pectodictyon cubicum</i> com 1 mês	10	11,01
	7	10,42
	5	-
	3	9,37

A partir dos dados obtidos para a atividade antioxidante pelo método de DPPH foi possível calcular o EC<sub>50</sub>, sendo este de 195,00mg/mL para o extrato de *Pectodictyon cubicum* com 15 dias de crescimento e de 186,40mg/mL para o extrato da cultura com 1 mês de crescimento (Tabela 10). Comparando estes valores com os dos alimentos usados como referência, dentro dos quais a amora tem o valor de EC<sub>50</sub> de 0,71mg/mL e

o tomate o valor de 83,50mg/mL, os valores de EC<sub>50</sub> das amostras não se aproximam de nenhum dos valores de EC<sub>50</sub> dos alimentos de referência.

Tabela 10. Valores de EC<sub>50</sub> para cada amostra e para os alimentos usados como referência.

<b>Amostra</b>	<b>EC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>
Extrato etanólico de <i>Pectodictyon cubicum</i> com 15 dias	195,00
Extrato etanólico de <i>Pectodictyon cubicum</i> com 1 mês	186,40
Amora	0,71
Cenoura	40,46
Framboesa	29,55
Mirtilo	23,86
Morango	9,52
Tomate	83,50
Uva	25,60

Quando se fez a análise dos espectros de absorção, obtidos por espectrofotometria, o espectro do extrato da cultura com 15 dias de crescimento revelou três bandas, a primeira com uma absorvância máxima entre 410-420nm, a segunda com absorvância máxima entre 430-440nm e a terceira com uma absorvância máxima entre 460-480nm (Figura 14.a). O espectro de absorção do extrato da cultura com 1 mês de crescimento mostrou bandas sensivelmente iguais ao espectro da cultura com 15 dias, mas com valores de absorvância máxima mais altos (Figura 14.b). Observando os dois espectros verifica-se que não houve interferência com a absorvância máxima do radical DPPH<sup>•</sup>, a 515nm.

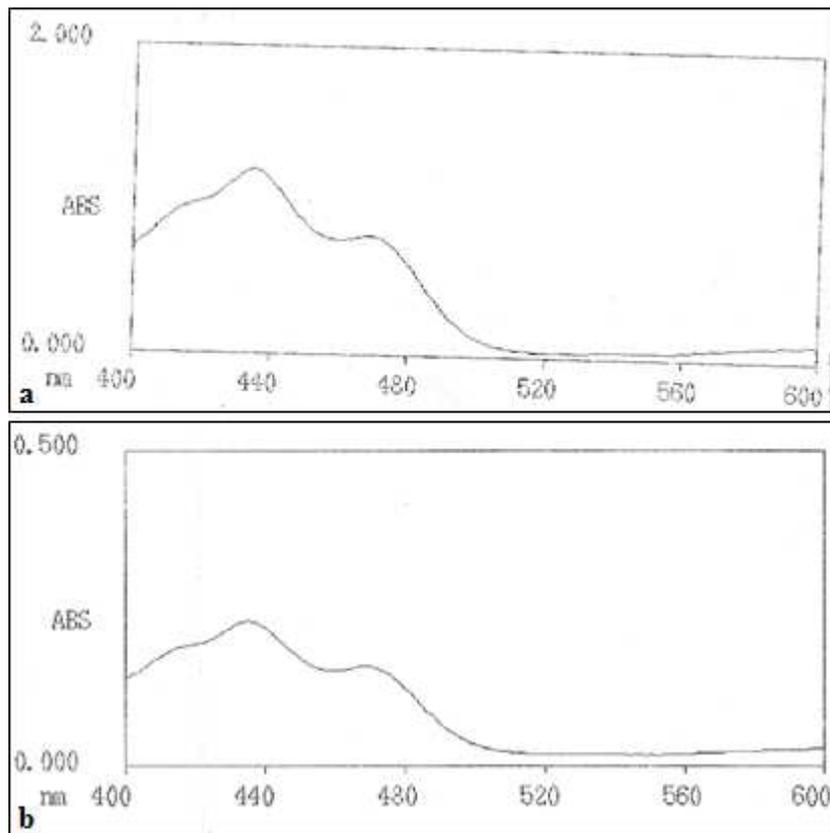


Figura 14. Espectro de absorção para o extrato da cultura de *Pectodictyon cubicum* com 15 dias a) e 1 mês de crescimento b).



## **4.Discussão**



#### **4.1.Crescimento de *Pectodictyon cubicum***

Comparando as duas curvas de crescimento, conclui-se existirem diferenças entre os dois métodos usados para avaliar o crescimento. Pelo método de filtração seguida de lavagem com água destilada, verifica-se que a cultura não apresenta uma curva de crescimento sigmóide típica de cultivo tipo “batch” que se caracteriza por ter diferentes fases identificáveis, uma fase inicial de latência, seguida de fase exponencial, estacionária e por fim de declínio, de acordo com Andersen (2005). Observa-se primeiro uma fase de latência, ou seja, uma fase inicial de crescimento lento, de adaptação às condições de cultivo (Barsanti & Gualtieri, 2006). De seguida ocorre uma fase de crescimento acelerado (fase exponencial) até ao dia 10, em que se nota o aumento da densidade celular, após o que se observa uma ligeira diminuição e aparente estabilização do crescimento até por volta do dia 22 (fase estacionária). Posteriormente há um novo aumento até ao dia 26, podendo não indicar um crescimento a nível celular, mas sim um aumento na produção de mucilagem, que fica retida nos filtros, influenciando assim o peso após secagem (Arad *et al.*, 1988). A partir de dia 26 o crescimento parece voltar a estabilizar.

Com o método de avaliação do crescimento da cultura baseado em peso seco sem filtração nem lavagem, ou seja, apenas biomassa pesada em caixa de Petri na estufa, também não se observa uma curva típica de cultivo em “batch”. Contudo, comparando os resultados entre os dois métodos de avaliação do peso seco, esta segunda curva de crescimento assemelha-se mais a uma curva de crescimento sigmóide típica. Primeiro, observa-se uma fase de latência entre os dias 0 e 6, tal como no método de filtração, de seguida começa a fase de crescimento exponencial ou logarítmica, menos acentuada e mais prolongada em comparação com a mesma fase na curva de crescimento do método de filtração. Uma possível justificação poderá ser a crescente produção de mucilagem, que neste método, baseado em peso seco em caixa de Petri, foi sempre pesada juntamente com as células. Por volta do dia 25 começa um decréscimo no crescimento até ao dia 31. As grandes diferenças que se verificam entre os valores das pesagens em cada dia podem dever-se a erros de pesagens, bem como erros da metodologia aplicada. O método por filtração a vácuo é mais rápido, por ser realizado sob pressão, e preciso, uma vez que as células são separadas do meio de cultura, ficando retidas sob o filtro (Mustafa *et al.*, 2011). Outro passo existente neste método que poderá ter influenciado é a posterior lavagem das células com água destilada, em que o

objetivo é remover impurezas indesejáveis, incluindo nutrientes do meio, que possam influenciar o peso seco final.

## **4.2. Produção, extração de polissacarídeos e a sua composição em monossacarídeos**

Várias são as metodologias usadas para a extração de polissacarídeos e obtenção de monossacarídeos, como foi referido anteriormente. Existe uma grande diversidade de processos químicos e físicos, mas a sua escolha pode ser feita tendo em conta as características dos polissacarídeos, que se encontram dissolvidos no meio ou aderidos às células (Okajima-Kaneko *et al.*, 2007). A metodologia de extração e obtenção de monossacarídeos utilizada neste trabalho foi adaptada dos trabalhos de Pereira e seus colaboradores (2003) e de Okajima-Kaneko e seus colaboradores (2007) com algumas modificações para otimizar o processo. Para a remoção de pigmentos organossolúveis, os autores referidos fizeram a extração com solventes durante vários dias até ocorrer a descoloração. No entanto, neste trabalho, a evaporação mostrou-se demasiado demorada. O uso de ultrassons que, segundo Harun e seus co-autores (2010) tem várias vantagens, tais como reduzir o tempo de extração e a quantidade de solventes utilizados, existindo uma melhor penetração dos solventes nas células e libertação do conteúdo celular, permitiu encurtar o método de extração em vários dias.

Existem diversos fatores que podem influenciar a produção de polissacarídeos e a sua viabilidade para aplicações biotecnológicas, nomeadamente a luminosidade (Liqin & Changhai, 2008; Hongmei *et al.*, 2014). Uma luminosidade elevada pode maximizar a síntese de polissacarídeos e influenciar a composição em monossacarídeos. Neste estudo, para o cultivo de *Pectodictyon cubicum* foi utilizada uma intensidade luminosa média de  $21,62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e um fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro. Em estudos posteriores também seria interessante confirmar se a alteração deste fator pode ou não afetar a quantidade e tipo de polissacarídeo produzido por esta estirpe. Outro dos fatores que pode influenciar a produção de polissacarídeos é o pH do meio. Uma vez que a estirpe estudada por Lang e seus colaboradores (1987) demonstrou um bom desenvolvimento com um pH do meio de cultura de 8, também se usou o mesmo valor neste estudo, observando-se uma boa adaptação e um rápido crescimento desta estirpe.

Neste estudo também se analisaram as diferenças na quantidade de polissacarídeo produzido por *Pectodictyon cubicum* após 15 dias e 1 mês de cultivo.

Alguns autores descreveram a libertação de polissacarídeos na fase estacionária e verificaram diferenças na composição de monossacarídeos entre a fase exponencial e estacionária (Chu *et al.*, 1982; Whyte, 1987; Brown *et al.*, 1993; Giroldo & Vieira, 2002). No tempo de cultivo de 15 dias de *Pectodictyon cubicum*, em que a cultura se encontra no início da fase estacionária, a percentagem de polissacarídeo por mg de biomassa foi de 39,71% e para 1 mês de cultivo foi de 44,55% e talvez a produção de polissacarídeo continuasse a aumentar até a fase de declínio. Como este estudo é o primeiro sobre quantificação de polissacarídeo total em *Pectodictyon cubicum* não são possíveis comparações com outros. Assim sendo, estes valores em percentagem de polissacarídeo são apenas comparáveis aos obtidos noutras espécies de clorófitas, nomeadamente *Monoraphidium braunii* com cerca de 47% de polissacarídeos em biomassa seca, *Ankistrodesmus densus*, com 32% e *Scenedesmus obliquus* com 39% (Blumreisinger *et al.*, 1983).

Em relação à composição em monossacarídeos, após a análise em HPLC, os resultados indicam que arabinose existe em maior quantidade e que também estão presentes, em menores quantidades, ramnose, glucose ou manose e galactose. Há que referir que a avaliação foi feita só por comparação dos tempos de referência, pois não houve a possibilidade de utilização de padrão interno. Comparando os dois tempos de crescimento, podemos dizer que apesar de os valores serem semelhantes, existem maiores percentagens relativas de cada monossacarídeo na cultura com tempo de crescimento de 1 mês, variando apenas no monossacarídeo ramnose, o que vai de acordo com os estudos que descrevem diferenças na composição e quantidade de polissacarídeos dependendo da fase de crescimento da cultura (Brown *et al.*, 1993).

Noutros estudos da composição em monossacarídeos de clorófitas, foram encontrados galactose, glucose, manose, xilose, arabinose e ramnose em várias espécies de *Chlorella* (Sui *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013); nos polissacarídeos de *Scenedesmus acuminatus* foi detetada a presença de grandes quantidades de manose e menores quantidades de arabinose, fucose, galactose, ramnose e xilose (Lombardi *et al.*, 2005); em *Monoraphidium braunii* e *Ankistrodesmus densus* foram identificados ramnose, xilose, manose e glicose e, na última espécie, também fucose (Blumreisinger *et al.*, 1983). Os monossacarídeos mais comuns encontrados em várias clorófitas parecem ser glucose, manose, galactose e ramnose (Blumreisinger *et al.*, 1983; Park *et al.*, 2011; Bayona & Garcés, 2013), o que é consistente com o tipo de monossacarídeos encontrados em *Pectodictyon cubicum*, variando as quantidades relativas.

Parâmetros como variações na composição do meio de cultura, nas condições ambientais, a própria genética da estirpe estudada, bem como a fase de crescimento da cultura em que são extraídos e analisados os polissacarídeos, podem condicionar a sua natureza química (Otero & Vincenzini, 2003). E as características de cada polissacarídeo podem determinar a sua aplicação em biotecnologia. Por exemplo, a presença de grandes quantidades de arabinose bem como de ramnose e galactose e de ser visível a viscosidade da cultura, pode significar alguma semelhança com a goma-arábica. Esta é uma resina natural composta por polissacarídeos e outras moléculas, utilizada nas indústrias de colas, tintas e alimentares, como espessante e estabilizante de emulsões em vários produtos (Islam *et al.*, 1997).

### **4.3. Atividade antioxidante**

A avaliação da atividade antioxidante depende de vários fatores, como por exemplo das condições em que são realizados os métodos, sendo os resultados da atividade antioxidante diferentes consoante o método antioxidante aplicado (Moure *et al.*, 2001).

A escolha do método de ABTS para determinar a atividade antioxidante de *Pectodictyon cubicum* deveu-se ao facto de ser um dos métodos mais utilizados e dos mais recomendados para extratos de plantas (Re *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2007). Este método mede a atividade antioxidante, determinando o aniquilamento que corresponde a uma descoloração do radical ABTS<sup>•+</sup> através da redução do catião radical (Re *et al.*, 1999). Por este método obtivemos uma atividade antioxidante de 7,85mg/L equivalente a ácido ascórbico para o extrato de *Pectodictyon cubicum* com 15 dias de crescimento, sendo um valor superior ao de extrato da cultura com 1 mês, igual a 4,85mg/L equivalente a ácido ascórbico, o que pode indicar que entre os 15 dias e um mês a presença de compostos com atividade antioxidante diminuiu. Observando os espectros de absorção para os dois extratos e como já foi referido anteriormente, há uma maior absorvância entre os 400 e os 480nm no espectro de extrato com 15 dias quando comparado com o extrato da cultura de 1 mês, o que sugere maior concentração das substâncias extraídas.

Os resultados não são comparáveis com outros estudos uma vez que são expressos em unidades diferentes. Goiris e seus colaboradores (2012) apresentaram os resultados do método de ABTS em  $\mu\text{mol}$  equivalente a Trolox/g de biomassa seca

enquanto Guedes e seus colaboradores (2013a) em mg/L equivalente a ácido ascórbico/ $\mu$ g clorofila a. O padrão recomendado pelo método de ABTS original é o Trolox, contudo foi utilizado o ácido ascórbico uma vez que é o mais usado na indústria alimentar, os resultados são reprodutíveis, a preparação da solução é fácil e a solução final exibe uma elevada estabilidade (Guedes *et al.*, 2013a). Sendo difícil a comparação com outros estudos, optou-se pela comparação dos valores obtidos com os de alguns alimentos conhecidos pelo seu elevado teor antioxidante, tendo-se concluído que os dois extratos etanólicos de *Pectodictyon cubicum* possuem uma atividade antioxidante mais próxima à da cenoura, cujo valor é de 5,98mg/L equivalente a ácido ascórbico.

Sabe-se que existem compostos nas microalgas, como os carotenóides, que são responsáveis pela atividade antioxidante (Goiris *et al.*, 2012), porém, como neste estudo não se fez a análise dos compostos presentes em *Pectodictyon cubicum*, não se sabe que compostos é que poderão estar a dar atividade antioxidante, sendo esta uma possível análise a desenvolver futuramente.

O método de DPPH é rápido, simples, preciso e económico para medir a atividade antioxidante de alimentos (Prakash *et al.*, 2001), características que tornam o método interessante para testar as microalgas como fontes naturais de eliminação de radicais e encontrar espécies promissoras para uso comercial (Marxen *et al.*, 2007).

Os resultados deste método foram os esperados, pois à medida que a concentração dos extratos diminuía, também diminuía a percentagem de inibição do DPPH. Comparando os valores de inibição do DPPH obtidos para ambos os tempos de crescimento da cultura, observou-se que com o tempo de crescimento de 15 dias o extrato apresentava percentagens de inibição do DPPH sensivelmente maiores do que o extrato da cultura com 1 mês, talvez por estar numa fase de maior produção de pigmento e/ou das substâncias responsáveis pela atividade. Contudo, o extrato da cultura com 1 mês apresentou um valor de EC<sub>50</sub> mais baixo (186,40mg/mL) que o valor de EC<sub>50</sub> do extrato da cultura de 15 dias (195,00mg/mL), o que indica que a quantidade de extrato necessária para reduzir o DPPH em 50% é menor, ou seja, demonstra uma capacidade antioxidante maior.

Na observação dos espectros verifica-se que não houve interferência da absorvância máxima dos extratos com a absorvância máxima do DPPH, a 515nm, o que foi referido para algumas microalgas, como por exemplo num estudo de Jaime e seus colaboradores (2010) em que ocorreu interferência entre absorvância máxima do extrato

de quistos de *Haematococcus pluvialis* e a absorvância máxima do DPPH, não apresentando resultados viáveis de atividade antioxidante.

Não existem outros estudos sobre atividade antioxidante em *Pectodictyon cubicum*, sendo também difícil fazer comparações com espécies do mesmo grupo, pois os resultados de percentagem de inibição do DPPH são expressos em unidades diferentes das utilizadas neste trabalho. Os estudos existentes em clorófitas mostram que várias espécies exibem atividade antioxidante, como por exemplo *Chlorella* e *Chlamydomonas nivalis* (Li *et al.*, 2007). Do mesmo modo que para o método do ABTS, optou-se por fazer uma comparação dos valores com os obtidos para extratos de alimentos utilizados como referência, sendo que os valores de EC<sub>50</sub> dos dois extratos de *Pectodictyon cubicum* se encontram muito acima do valor do extrato de tomate, com 83,50mg/mL.

## **5. Conclusões**



Este estudo incidiu sobre a microalga *Pectodictyon cubicum* Taft, estirpe ACOI 1651, com o objetivo de avaliar o seu crescimento, conhecer o conteúdo em monossacarídeos dos seus polissacarídeos e determinar a sua atividade antioxidante. A estirpe demonstrou ter um crescimento celular lento, nas condições de cultivo definidas, tendo sido registado um aumento de biomassa de 3,20g/L ao fim de 31 dias. Nestas condições de cultivo produz bastante polissacarídeo que representa cerca de 39 a 44% por mg de biomassa seca, sendo obtida maior quantidade numa cultura com 1 mês ou mais, comparativamente a culturas com 15 dias de crescimento. As análises realizadas sobre a composição em monossacarídeos dos polissacarídeos extraídos evidenciaram uma composição em arabinose, presente em grande quantidade nas culturas mais velhas e, em menores quantidades, ramnose, galactose e glicose ou manose. Ramnose aparece em maior quantidade na cultura mais jovem, embora seja necessário confirmar estes resultados em trabalhos futuros. Esta composição em monossacarídeos é semelhante à da goma-arábica, pelo que *Pectodictyon cubicum* ACOI 1651 poderá ter potencial biotecnológico, especialmente na indústria alimentar, para finalidades espessantes, gelificantes e emulsionantes.

Quanto à sua atividade antioxidante, o extrato que apresentou melhores resultados, pelos métodos de ABTS e DPPH, foi o da cultura com 15 dias, com um valor muito próximo ao do extrato da cenoura pelo método de ABTS. Pelo método de DPPH, observou-se que o extrato da cultura com 15 dias apresentava um valor de EC<sub>50</sub> mais alto, 195,00mg/mL, em comparação com 184,60mg/mL, apresentado pelo extrato com 1 mês. O valor de referência mais próximo foi o do extrato do tomate com 83,50mg/mL.



## **6.Bibliografia**



Algaebase (1996). [www.algaebase.org/](http://www.algaebase.org/)

Aluwihare, L.I. & Repeta, D.J. (1999). A comparison of the chemical characteristics of oceanic DOM and extracellular DOM produce by marine algae. *Marine Ecology*, 186: 105-107.

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

Ascencio, F., Gama, N.L., De Philippis, R. & Ho, B. (2004). Effectiveness of *Cyanothece* spp. and *Cyanospira capsulata* exocellular polysaccharides as antiadhesive agents for blocking attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *Folia Microbiologica*, 49: 64-70.

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

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

Bafana, A. (2013). Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydrate Polymers*, 95: 746-752.

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

Bayona, K.C.D. & Garcés, L.A. (2013). Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*, 26: 2087-2095.

Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25: 207-210.

- Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). Food Chemistry. 4ª edição. Springer.
- Blumreisinger, M., Meindl, D. & Loos, E. (1983). Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry*, 22: 1603-1604.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28: 25-30.
- Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D. & Leroi, J.M. (1993). The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone TISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 285-296.
- Borowitzka, M.A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7: 3-15.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25: 294-306.
- Chu, F.E., Dupuy, J.L. & Webb, K.L. (1982). Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 29: 241-252.
- Cuellar-Bermudez, S.P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D.L. & Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M.A. & Parra-Saldivar, R. (2014). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8: 190-209.
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodriguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J. & Guerrero, M.G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, 76: 51-59.
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodriguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J. & Guerrero, M.G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 848-854.

De Philipps, R., Ena, A., Paperi, R., Sili, C. & Vincenzi, M., (2000). Assessment of the potencial of *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *Journal of Applied Phycology*, 12: 401-407.

De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R. & Vincenzini M. (2001). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review. *Journal of Applied Phycology*, 13: 293-9

Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., Slegers, P.E., Brentner, L.B., Roy, A. & Barbosa, M.J. (2013). Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 169-177.

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

Giroldo, D. & Vieira, A.A.H. (2002). An extracellular sulfated fucose-rich polysaccharide produced by a tropical strain of *Cryptomonas obovata* (Cryptophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 14: 185-191.

Giroldo, D., Vieira, A.A.H., & Paulsen, B.S., (2005). Extracellular polysaccharides produced by a tropical cryptophyte as a carbon source for natural bacterial populations. *European Journal of Phycology*, 40: 241-249.

Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J. & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content, *Journal of Applied Phycology*, 24: 1477-1486.

Goo, B.G., Baek, G., Choi, J.D., Park, Y.I., Synytsya, A., Bleha, R., Seong, D.H., Lee, C. & Park, J.K. (2013). Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 129: 343-350.

Guedes, A.C., Amaro, H.M., Gião, M.S. & Malcata, F.X. (2013a). Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry*, 138: 638-643.

Guedes, A.C., Gião, M.S., Seabra, R., Ferreira, A.C.S., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P. & Malcata, F.X. (2013b). Evaluation of antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Marine Drugs*, 11: 1256-1270.

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M. & Danquah, M.K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 1037-1047.

Helm, R.F., Huang, Z., Edwards, D., Leeson, H., Peery, W. & Potts, M. (2000). Structural Characterization of the Released Polysaccharide of Desiccation-Tolerant *Nostoc commune* DRH-1. *Journal of bacteriology*, 182(4): 974-982.

Herrero, M., Cifuentes, A. & Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review, 98: 136-148.

Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R. & Roemer, S.C. (1993). Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. *Journal of Phycology*, 29: 537-566.

Hongmei, G., Xia, L., Zhou, X., Zhang, D. & Hu, C. (2014). Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polysaccharides from the Cyanobacteria *Nostoc* sp. *Journal of Microbiology*, 52: 179-183.

Huang, Z., Liu, Y., Paulsen, B.S. & Klaveness, D. (1998). Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *Journal of Phycology*, 34: 962-8.

Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J. & Arad, S., M. (2001). Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and Varicella zoster viruses. *Journal of Applied Phycology*, 13: 127-134.

Islam, A.M., Phillips, G.O., Sljivo, Snowden, M.J. & Williams, P.A. (1997). A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. *Food hydrocolloids*, 11: 493-505.

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

Jensen, G.S., Ginsberg, D.I. & Drapeau, M.S. (2001). Blue-green algae as an immune-enhancer and biomodulator. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 3: 24-30.

Lang, N.J., Krupp, J.M. & Koller, A.L. (1987). Culturing, ultrastructure and colony formation in *Pectodictyon cubicum* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Journal of Phycology*, 23: 457-464.

León, R., Martí, M., Vigarà, J., Vilchez, C. & Marí, J. (2003). Microalgae mediated photoproduction of  $\beta$ -carotene in aqueous-organic two phase systems. *Biomolecular Engineering*, 20: 177-182.

Li, Hua-Bin., Cheng, Ka-Wing., Wong, Chin-Chun., Fan, King-Wai., Chen, F. & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771-776.

Liqin, S., Changhai, W. & Lei, S. (2008). Effects of light regime on extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum* cultured in flat plate photobioreactors. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 1488-1491.

Lombardi, A., Hidalgo, T. & Vieira, A. (2005). Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*, 60: 453-459.

Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A. & Hansen, U.-P. (2007). Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, (7): 2080-2095.

Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E. & Señoráns, F.J. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 102: 1357-1367.

Metaxatos, A., Panagiotopoulos, C. & Ignatiades, L. (2003). Monosaccharide and aminoacid composition of mucilage material produced from a mixture of four phytoplanktonic taxa. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 294: 203-217.

Morais, G.M., Vaz, B.S., Morais, E.G. & Costa, J.A.V. (2015). Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International*. Article ID 835761.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M.J. & Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.

Mustafa, N.R., Winter, W., Iren, F. & Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6: 715-742.

Myklestad, S.M. (1995). Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *The Science of the Total Environment*, 165: 155-164.

O'Colla, P.S. (1962). Mucilages. In R. A. Lewin (ed.), *Physiology and biochemistry of algae*. New York: Academic Press, 337-356.

Okajima-Kaneko, M., Ono, M., Kabata, K. & Kaneko, T. (2007). Extraction of novel sulfated polysaccharides from *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada, and its spectroscopic characterization. *Pure and Applied Chemistry*, 79(11): 2039–2046.

Otero, A. & Vincenzini, M. (2003). Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by source and light intensity. *Journal of Biotechnology*, 102:143-152.

Park, J.K., Kim, Z., Lee, C.G., Synytsya, A., Jo, H.S., Kim, S.O., Park, J.W., & Park, Y.I. (2011). Characterization and Immunostimulating Activity of a Water-soluble Polysaccharides Isolated from *Haematococcus lacustris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16: 1090-1098.

Pereira, L., Sousa, A., Coelho, H., Amado, A.M. & Ribeiro-Claro, P.J.A. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, 20: 223-228.

Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C. & Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40: 781-796.

Prakash, A., Rigelhof, F. & Eugene Miller, E. (2001). Antioxidant activity. *Medallion Laboratories, Analytical Progress*.

Prajapati, V.D, Jani, G.K. Moradiya, N.G. & Randeria, N.P. (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 92: 1685–1699.

Priyadarshani, I. & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications in microalgae. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3: 89-100.

Pulz, O. & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and biotechnology*, 65: 635-648.

Raposo, M.F.J., Morais, R.M.S.C. & Morais, A.M.M.B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs*, 11: 233-252.

Richert, L., Golubic, S. Guédès, R.L., Ratiskol, J., Payri, C. & Guezenec, J. (2005). Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian Microbial Mats. *Current Microbiology*, 51: 379-384.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10): 1231–1237.

Schlösser, U.G. (1994). SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen – Catalogue of Strains. *Botanica Acta*, 107, 111-186.

Scragg, A.H., Morrison, J. & Shales, S.W. (2003). The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 884-889.

Silipo, A., Molinaro, A., Molteni, M., Rossetti, C., Parrilli, M., & Lanzetta, R. (2010). Full Structural Characterization of an Extracellular Polysaccharide Produced by the Freshwater Cyanobacterium *Oscillatoria planktothrix* FP1. *European Journal Organic Chemistry*, 5594-5600.

Singh, S. Arad, S. & Richmond, A. (2000). Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat plate glass reactors. *Journal Applied Phycology*, 1: 1-7.

Smith, D.J. & Underwood, G.J.C. (2000). The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology*, 36(2): 321-333.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae, *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87–96.

Sui, Z., Gizaw, Y. & BeMiller, J.N. (2012). Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella*. *Carbohydrates Polymers*, 90: 1-7.

Taft, C.E. (1945). *Pectodictyon*, a new genus in the family Scenedesmaceae. *Transactions of the American Microscopical Society*, 64: 25-28.

Templeton, D.W., Quinn, M., Van Wychen, S., Hyman, D. & Laurens, L.M.L. (2012). Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *Journal of Chromatography*, 1270: 225-234.

Tsekos, J. (1999). The sites of cellulose synthesis in algae: diversity and evolution of cellulose-synthesizing enzyme complexes. *Journal of Phycology*, 35: 635-355.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. & Oomah, B.D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 46: 4113-4117.

Whyte, J.N.C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231-241.

Yim, J., Kim, S., Ahn, S., Lee, C., Rhie, K. & Lee, H. (2004). Antiviral effects of sulphated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Marine Biotechnology*, 6: 17-25.

Zhao, G., Chen, X., Wang, L., Zhou, S., Feng, H., Chen, W.N. & Lau, R. (2013). Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 128: 337-344.

Zheng, Y., Pan, Z. & Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural & Biological Engineering*, 2: 51-68.



## **7.Anexos**



## Anexo I – Composição dos extratos de solo e de *Sphagnum* utilizados no meio M7

### Extrato de solo

200 g de terra virgem : 1 L de água destilada

1. Colocar 1,600 Kg de terra numa panela e juntar lentamente 8 litros água destilada. Mexer.
2. Deixar ferver durante 1 hora, desligar e deixar arrefecer.
3. Filtrar o sobrenadante usando um balão de 3 L, funil de vidro, algodão e filtro de papel.  
Descartar a lama.
4. Distribuir o filtrado por balões até 200 ml cada.
5. Centrifugar o filtrado, a 4 000 rpm, durante 15 minutos. Colocar o sobrenadante em balões de 200 ml esterilizados (encher só 150 ml).
6. Autoclavar durante 1 hora, em 3 dias seguidos.
7. Conservar no frigorífico.

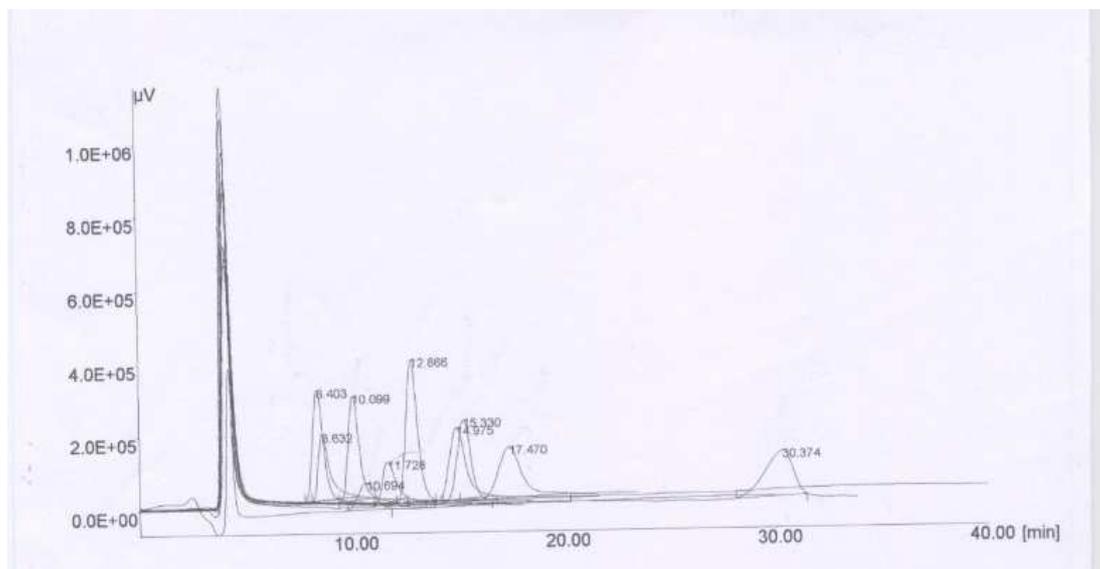
### Extrato de *Sphagnum*

500g de *Sphagnum* : 15L de água destilada

1. Colocar 250g de *Sphagnum* numa panela e juntar lentamente 7,5L de água destilada. Deixar durante a noite.
2. Colocar a ferver durante 1 hora, desligar e deixar arrefecer.
3. Filtrar o sobrenadante usando um balão de 3L, funil de vidro, algodão e filtro de papel.  
Descartar os restos sólidos.
4. Distribuir o filtrado por balões de 200ml esterilizados (encher só 150ml).
5. Autoclavar durante 1 hora, 3 dias seguidos.
6. Colocar no frigorífico.

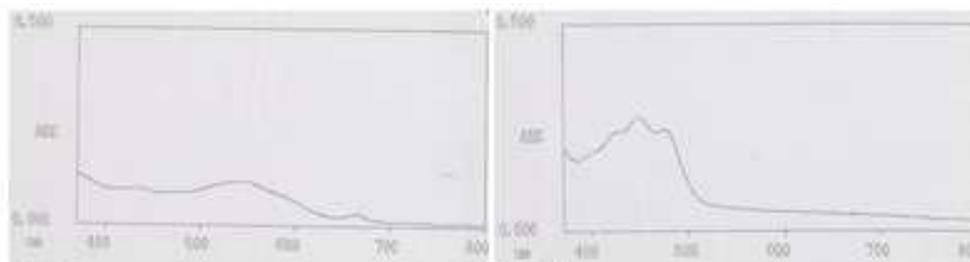


## Anexo II - Cromatograma de 10 padrões autênticos e os seus tempos de retenção



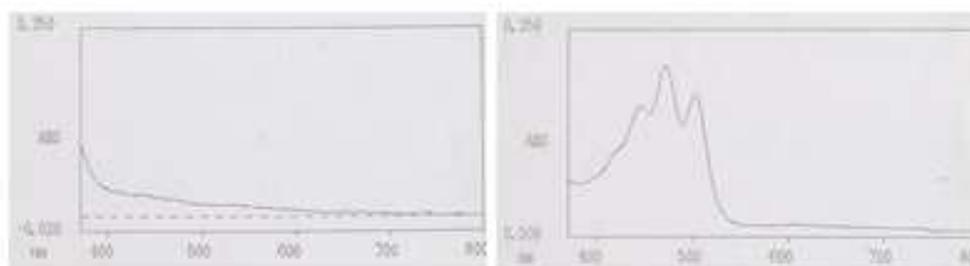


**Anexo III - Espectros de absorção do visível para os diferentes extratos etanólicos.**  
**A- Amora, B-Cenoura, C-Morango, D-Tomate, E- Framboesa, F-Mirtilo, G-Uva.**



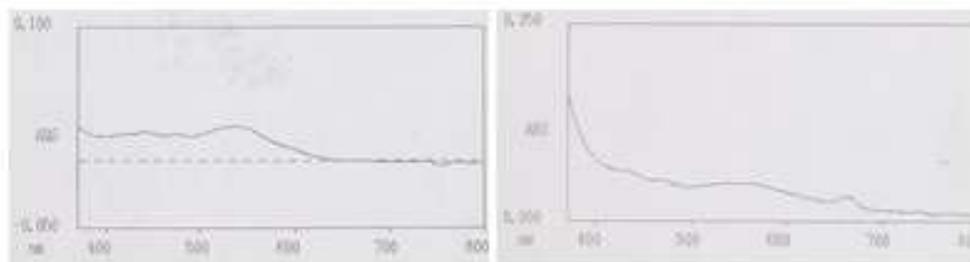
**A - Amora**

**B - Cenoura**



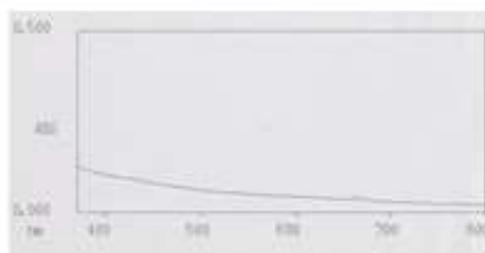
**C - Morango**

**D - Tomate**



**E - Framboesa**

**F - Mirtilo**



**G - Uva**



**Anexo IV - Cálculo do EC<sub>50</sub> para o método de DPPH para o extrato de *Pectodictyon cubicum***

Absorvância inicial DPPH (515nm) = 0,672

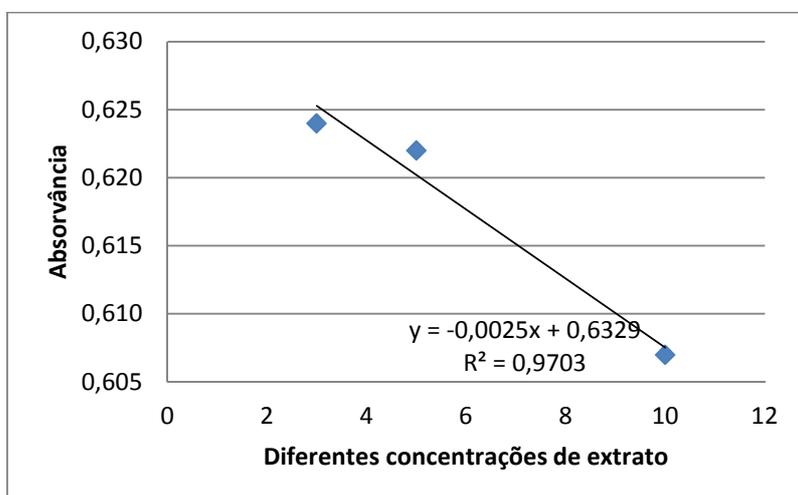


Figura I – Gráfico com os valores da leitura de absorvância das várias diluições do extrato e respetiva equação da reta

Tabela I – Leitura das absorvâncias das diferentes diluições do extrato etanólico de *Pectodictyon cubicum*.

Concentração do extrato (mg/mL)	Absorvância a 515nm
10	0,607
7	0,622
3	0,624

**Cálculo do EC<sub>50</sub>:**

Equação da reta de absorvância do extrato etanólico:

$$y = -ax + b$$

Controlo (1,8 DPPH + 0,2mL extrato etanólico) = 0,603

$$y = 0,603/2$$

$$x = (0,301 - 0,6329) / -0,0025$$

$$x = 132,56 \text{ mg/mL}$$