



2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Codium tomentosum:

Avaliação do seu potencial de cultivo num sistema
IMTA e do seu potencial biotecnológico



Joana Raquel da Costa Pereira

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Codium tomentosum:

Avaliação do seu potencial de cultivo num sistema
IMTA e do seu potencial biotecnológico

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Leonel Pereira (Universidade de Coimbra)

Joana Raquel da Costa Pereira

2014

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende”

Guimarães Rosa

Agradecimentos

Tenho de agradecer a todas as pessoas que fizeram parte deste meu percurso de muita alegria, trabalho, esforço, desafios e, acima de tudo, aprendizagem.

Ao Professor Doutor Leonel Pereira por me ter aceitado como sua mestranda, acreditando e guiando-me neste trabalho. Agradeço a sua disponibilidade sempre que precisei, pelos ensinamentos, conselhos e sobretudo pelas oportunidades que me disponibilizou.

Agradeço também à Doutora Susana Cardoso e à Professora Doutora Teresa Batista pela disponibilidade, atenção e apoio prestado, que foi fundamental para a execução deste trabalho.

Um agradecimento muito especial à Doutora Helena Abreu pela oportunidade de elaboração do estágio curricular na sua empresa (ALGApplus), pelo apoio, carinho, atenção prestada. Igualmente um obrigado a todas as pessoas que partilharam comigo essa etapa da minha vida.

Ao Sr. José Brasão pela paciência e pelo auxílio laboratorial prestado, que foi imensamente importante para este trabalho. Um muito obrigado também pelo carinho e amizade demonstrado.

Em geral, a todos os meus amigos que me acompanharam nesta etapa de estudante e que me ajudaram a vivê-lo na totalidade, e em particular à Raquel Silva pelo companheirismo, paciência para viver comigo e “aturar” as minhas manias.

Sem esquecer, um muito obrigado à minha família, principalmente aos meus pais, por se esforçarem para me proporcionarem o melhor para mim, a entrada no mundo académico, a ida para Ílhavo, sem nunca me faltar nada. MUITO OBRIGADO.

Como não poderia deixar de ser, queria agradecer ao meu namorado David Gomes pelo auxílio prestado sempre que necessitei, que foi mais do que importante para a concretização deste trabalho. Agradeço pelo amor, amizade, carinho, apoio, por tudo. Agradeço pela pessoa que é!

Índice

| | |
|---|-----------|
| Lista de Abreviaturas..... | xi |
| Resumo..... | xiii |
| Abstract..... | xv |
| 1 – INTRODUÇÃO | 3 |
| 1.1 – Algas..... | 5 |
| 1.2 – <i>Codium tomentosum</i> | 10 |
| 1.2.1 – Propriedades Antioxidantes..... | 18 |
| 1.2.2 – Propriedades Anti-inflamatórias..... | 21 |
| 1.2.3 – Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)..... | 24 |
| 1.3 – Contextualização do trabalho e objetivos..... | 28 |
| 2- MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 2.1 – Amostragem..... | 31 |
| 2.1.1 – Local de Amostragem..... | 31 |
| 2.1.2 – Tratamento e Transporte da Amostra..... | 31 |
| 2.2 – Aquacultura de <i>Codium tomentosum</i> | 33 |
| 2.2.1 – Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)..... | 33 |
| 2.2.2 – Aquacultura de Laboratório..... | 34 |
| 2.3 – Obtenção dos extratos algais..... | 37 |
| 2.3.1 – Extração em hexano..... | 39 |
| 2.3.2 – Extração em metanol..... | 39 |
| 2.3.3 – Extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos..... | 41 |
| 2.4 – Ensaio Antioxidantes..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.1 – Quantidade Total de Compostos Fenólicos – Teste <i>Folin</i> | 43 |
| 2.4.2 – Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH..... | 44 |
| 2.4.3 – Avaliação da capacidade de redução do radical NO (“NO Scavenging”)..... | 45 |
| 2.5 – Ensaio Anti-inflamatório..... | 46 |
| 2.5.1 – Cultura de células RAW 264.7 na presença dos extratos e do LPS..... | 47 |
| 2.5.2 – Determinação da produção de nitritos..... | 49 |
| 2.5.3 – Determinação da viabilidade celular..... | 49 |
| 2.6 – Análise Estatística..... | 50 |
| 3 – RESULTADOS..... | 53 |
| 3.1 – Aquacultura de <i>Codium tomentosum</i> | 53 |
| 3.1.1 – Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)..... | 53 |
| 3.1.2 – Aquacultura de laboratório..... | 58 |
| 3.2 – Extratos algais obtidos e usados..... | 62 |
| 3.3 – Ensaio Antioxidante..... | 63 |
| 3.3.1 – Quantidade Total de Compostos Fenólicos – Teste <i>Folin</i> | 63 |
| 3.3.2 – Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH..... | 65 |
| 3.3.3 – Avaliação da capacidade de redução do radical NO (“NO Scavenging”)..... | 66 |
| 3.4 – Ensaio Anti-inflamatório..... | 67 |
| 3.4.1 – Determinação da produção de nitritos..... | 67 |
| 3.4.2 – Determinação da viabilidade celular..... | 70 |
| 4 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS..... | 75 |
| 4.1 – Amostragem..... | 75 |

| | |
|--|------------|
| 4.2 – Aquacultura de <i>Codium tomentosum</i> | 75 |
| 4.3 – Obtenção dos extratos algais..... | 77 |
| 4.4 – Ensaio Antioxidantes..... | 78 |
| 4.4.1 – Quantidade Total de Compostos Fenólicos – Teste <i>Folin</i> | 78 |
| 4.4.2 – Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH..... | 78 |
| 4.4.3 – Avaliação da capacidade de redução do radical NO (“NO Scavenging”)..... | 80 |
| 4.5 – Ensaio Anti-inflamatórios..... | 81 |
| 4.5.1 – Determinação da produção de nitritos..... | 81 |
| 4.5.2 – Determinação da viabilidade celular..... | 82 |
| 5 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS..... | 87 |
| 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 91 |
| 7 – ANEXOS..... | 103 |
| Anexo I – Cortes Histológicos de <i>Codium tomentosum</i> | 103 |
| Anexo II – Meio de Cultura f/2..... | 106 |
| Anexo III – Meio de Cultura VSE..... | 109 |
| Anexo IV – Curva padrão de calibração do ácido gálico..... | 110 |
| Anexo V – Curva padrão de calibração do nitrito de sódio (NaNO ₂)..... | 112 |
| Anexo VI – Gráficos da Experiências A e B..... | 113 |
| Anexo VII – Cálculo da percentagem de inibição do radical DPPH..... | 131 |
| Anexo VIII – Retas de percentagem de inibição do radical NO e cálculos do IC ₅₀ | 135 |
| Anexo IX – Cálculo da percentagem de inibição da produção de nitritos..... | 147 |
| Anexo X – Cálculo do IC ₅₀ para o padrão Ácido Ascórbico – DPPH..... | 150 |
| Anexo XI – Cálculo do IC ₅₀ para o padrão Ácido Ascórbico – NO..... | 151 |

Lista de abreviaturas

AINES – Anti-inflamatórios não esteroides

ARA – Ácido araquidónico

BHA – Butil hidroxianisol

BHT – Butil hidroxitolueno

BSE – Encefalopatia espongiforme bovina

DC – Densidade de cultivo

DHA – Ácido docosahexaenóico

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMSO – Sulfóxido de dimetilo

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EPA – Ácido eicosapentaenóico

FIM – Fundação para a Inovação em Medicina

GSH-Px – Glutathiona peroxidase

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

IMTA – Aquacultura Multitrófica Integrada

LPS – Lipopolissacarídeo da membrana externa das bactérias gram-negativas

MTT – Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NO – Óxido nítrico

ORAC – Capacidade de absorção de radicais oxigénio

PBS – Tampão Salino-Fosfato

PUFA – Ácido gordo polinsaturado

RGR – Taxa de crescimento

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SBF – Soro bovino fetal

SD – Desvio padrão

SE – Erro padrão

SNP – Nitroprussiato de Sódio

SOD – Superóxido dismutase

TBHQ – *tert*-butil hidroquinona

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VSE – *Von Stosch's Enrichment*

WHO – Organização Mundial da Saúde

Resumo

Em todo o mundo tem havido muito interesse no desenvolvimento e comercialização de produtos funcionais a partir de algas, sendo estas usadas para diversos fins: diretamente na alimentação, extração de ficocolóides, extração de compostos com atividade antiviral, antibacteriana ou antitumoral, como fertilizantes, em cosmética e também são usadas na purificação de águas residuais.

Mais recentemente, com a descoberta dos alimentos funcionais e dos nutracêuticos, as algas começaram a captar a atenção como novas fontes de ingredientes funcionais, tendo sido alvo de vários estudos de investigação, como é o caso do *Codium tomentosum* (Chlorophyta).

O *C. tomentosum* mostrou ter uma elevada atividade anticoagulante para o seu extrato aquoso frio. Também o seu extrato aquoso mostrou atividade antibacteriana moderada. Relativamente à cosmética, esta alga é o principal constituinte de vários produtos, como por exemplo, hidratantes de reparação e restauração, cremes de corpo e pernas, cremes de banho e duche, cremes de dia, cremes de noite, cremes de olhos, cremes anti-envelhecimento, máscaras, esfoliantes, hidratantes labiais e loções. Uma das razões pela qual esta alga é usada nos referidos produtos prende-se com o fato de esta possuir uma importante quantidade de ácido glucurónico, o qual regula a distribuição da água na pele, protegendo-a dos efeitos adversos de um ambiente excessivamente seco.

Contudo, para levar a cabo todos os estudos realizados até agora, bem como aqueles que ainda serão realizados, além da biomassa recolhida para todos os outros fins a que se destina o *C. tomentosum*, é necessário proceder com a recolha de elevadas quantidades da alga. Além disso, é sabido que cerca de 4 milhões de toneladas de algas marinhas são colhidas anualmente, a nível mundial. Porém, se colhermos algas mais do que o limite sustentável, provavelmente não seremos capazes de obtê-las em quantidades satisfatórias no futuro, pelo que é necessário apostar em sistemas de cultivo de algas. Entre os sistemas de cultivo de algas encontra-se o sistema de Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA).

O objetivo deste trabalho é avaliar o comportamento do *C. tomentosum* num sistema IMTA, e posteriormente avaliar a capacidade antioxidante e anti-inflamatória dos extratos brutos de uma amostra selvagem e de uma amostra proveniente de IMTA de *C. tomentosum*, e aferir acerca das diferenças nos resultados consoante a amostra testada.

Para isso, após o cultivo em IMTA de *C. tomentosum*, obtiveram-se extratos de ambas as amostras, por recurso a solventes orgânicos e extração aquosa, e foram testados quanto à sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória.

Conclui-se que este trabalho revela que o *C. tomentosum* é uma alga com bom potencial para crescer em IMTA, com fraca capacidade antioxidante para o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), mas com forte capacidade antioxidante para o radical óxido nítrico (NO) para o extrato aquoso da amostra proveniente de IMTA, e com capacidade anti-inflamatória muito fraca para ambas as amostras.

Palavras-chave: ingredientes funcionais, *Codium tomentosum*, IMTA, antioxidante, anti-inflamatórios.

Abstract

All over the world there has been much interest in the development and commerce of functional algae-based products, which can have many uses in: food, extraction of phycocolloids, compounds with antiviral, antibacterial or anti-tumor activity such as fertilizers, cosmetics and also in waste water purification.

Recently with the discovery of functional foods and nutraceuticals, algae started to gather attention as a new source of functional ingredients, leading to various investigation studies, such is the case of *Codium tomentosum* (Chlorophyta).

C. tomentosum demonstrated having a high anticoagulant activity for its cold aqueous extract. Its aqueous extract also showed a moderate antibacterial activity. In the cosmetic industry, this algae is the main ingredient in various products, such as repairing and restoring moisturizers, body lotions, shower gels, day creams, eye creams, anti-age creams, face masks, exfoliates, lip balms and lotions. One of the reasons for which this algae is used in these products mentioned above is linked with the fact that it possesses an important quantity of glucuronic acid, which regulates the distribution of water in the skin, protecting it from the harmful effects of an excessively dry environment.

However, in order to do all of the studies made, and even those that are still to be done, in addition to the gathering of biomass of *C. tomentosum* for all other means, it's necessary to proceed with the gathering of huge quantities of the algae. Furthermore, it's a known fact that almost 4 million tons of marine algae are collected annually in the whole world. However, if we collect over the sustainable limit, it will probably be hard to obtain satisfactory quantities in the future and therefore it's necessary to invest in algae cultivation. Among all the algae cultivation systems, there is the Integrated Multitrophic Aquaculture system (IMTA).

The objective of this study is to evaluate the behavior of *C. tomentosum* in an IMTA system and subsequently evaluate the antioxidant and anti-inflammatory properties of the brute extracts of a wild specimen and a specimen originated from the IMTA of *C. tomentosum*, and assess the differences in the results depending on the tested specimen.

For that matter, after the IMTA cultivation of *C. tomentosum*, extracts of both specimens were obtained, by means of organic solvents and aqueous extraction and they were tested for their antioxidant and anti-inflammatory properties.

Thus, one may conclude that this study demonstrates that *C. tomentosum* is an algae with a good potential to thrive in IMTA, with a low antioxidant capacity for the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, but with a strong antioxidant capacity for the nitric oxide (NO) radical for the aqueous extract of the specimen originated from IMTA and with a very low anti-inflammatory capacity for both of these specimens.

Keywords: functional ingredients, *Codium tomentosum*, IMTA, antioxidant, anti-inflammatory.

Capítulo 1 – Introdução

1 – INTRODUÇÃO

Nos países desenvolvidos, dietas altamente calóricas e desequilibradas substituíram as dietas mais tradicionais, tais como a bem conhecida dieta Mediterrânica, considerada património cultural pela UNESCO em 2012 (Ibañez & Cifuentes, 2012). Mudanças no estilo de vida humana e o fato da nossa sociedade viver uma enganadora abundância alimentar (Fernández Súa, 2003; Pereira, 2011), em que nos rodeia um acesso fácil e barato da comida rápida, rica em calorias e gorduras insaturadas e pobres em nutrientes essenciais (Fernández Súa, 2003; Pereira, 2008), representam grandes motivos de preocupação para os máximos responsáveis da saúde (Fernández Súa, 2003). Este estilo de vida resulta num aumento de casos de obesidade e doenças relacionadas com a ingestão excessiva de açúcares (diabetes), e de gordura (arteriosclerose) (Pereira, 2011), doenças cardiovasculares, hipertensão, hiperlipidemia, cancro (Mohamed et al., 2012), entre outras.

Perante tais fatos, as soluções a serem exploradas devem incidir na melhoria da saúde da população por meio de aconselhamento dietético ou através da projeção de alimentos específicos, capazes de promover a saúde, isto é, os chamados alimentos funcionais ou nutracêuticos (Ibañez & Cifuentes, 2012).

O conceito de alimento funcional, como um método para proteger ou melhorar a saúde dos consumidores, foi introduzido no Japão no início da década de 1980, com base em vários estudos científicos demonstrando a correlação entre a dieta e uma menor incidência de doenças crónicas (Ibañez & Cifuentes, 2012), pois para além da sua função primordial de nutrir, têm também características específicas que contribuem para a redução do risco de doença (Cozzolino, 2012), sendo definidos como:

“O alimento que para além dos seus efeitos nutritivos tem um demonstrado efeito benéfico numa ou mais funções do organismo humano, melhorando o estado de saúde ou o bem-estar, reduzindo o risco de doença.” (Ibañez & Cifuentes, 2012)

As funcionalidades destes alimentos são mais preventivas do que curativas (Pereira, 2011). De modo que, quando um alimento funcional auxilia na prevenção e/ou tratamento de doença (s) e/ou distúrbio (s) (com exceção da anemia) é chamado de Nutracêutico (Kalra, 2003).

Capítulo 1 - Introdução

O termo “nutracêutico” foi criado a partir dos termos “Nutrição” e “Farmacêutico” em 1989 por Stephen DeFelice, fundador e presidente da Fundação para a Inovação em Medicina (FIM). Segundo DeFelice, um nutracêutico pode ser definido como “um alimento (ou parte de um alimento) que proporciona benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças” (Kalra, 2003). Estes produtos são geralmente utilizados como suplementos alimentares, em vez de alimentos integrais, e são comercializados na forma de comprimidos ou pílulas e podem fornecer benefícios de saúde significativos (Pereira, 2011).

A preferência para a descoberta e produção de nutracêuticos sobre produtos farmacêuticos é bem vista em empresas farmacêuticas, tais como a Johnson & Johnson (New Brunswick, NJ) (Kalra, 2003).

Como os consumidores se estão a tornar conscientes da relação entre a saúde e dieta, a exigência de alimentos funcionais/nutracêuticos está a aumentar (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). E, aumentando o mercado de alimentos funcionais/nutracêuticos a nível mundial (com China, Japão, Europa e EUA como maiores mercados), existe um aumento paralelo no interesse em descobrir novos ingredientes alimentares funcionais de diferentes fontes naturais (Ibañez & Cifuentes, 2012). Tal interesse tem recaído sobre os produtos naturais obtidos a partir de organismos marinhos, sendo estes uma potencial fonte de agentes farmacêuticos (Valentão et al., 2010) e de compostos bioativos estruturalmente diversos, providos de várias atividades biológicas (Wijesekara et al., 2011), podendo promover o estado de saúde e bem-estar dos seres humanos e de outros animais (Samarakoon & Jeon, 2012). As algas parecem ser capazes de desempenhar um papel importante nesta área, uma vez que podem proporcionar benefícios fisiológicos (Ibañez & Cifuentes, 2012).

Em todo o mundo tem havido muito interesse no desenvolvimento e comercialização de produtos funcionais a partir de algas (Hafting et al., 2012). As algas marinhas (um recurso natural renovável) são usadas para diversos fins: diretamente na alimentação, extração de ficocolóides, extração de compostos com atividade antiviral, antibacteriana ou antitumoral, como fertilizantes (Pereira, 2012), em cosmética (Pereira, 2008) e também são usadas na purificação/remediação de águas residuais

(Ibañez & Cifuentes, 2012). Pelo que, nos últimos anos, a sua importância económica e nutricional aumentou significativamente (Ortiz et al., 2009).

Mais do que a sua natureza vegetal, as algas são, devido à multitude de cores e formas, o seu grande argumento de venda, tanto para a alimentação como para cosméticos, especialmente depois de certas substâncias de origem animal se tornarem suspeitas de transmitirem a encefalopatia espongiforme bovina (BSE), vulgarmente conhecida como doença das vacas loucas (Pereira, 2012).

As algas marinhas são uma fonte rica de saúde e também oferecem uma variedade estonteante de sabores, fragâncias e texturas. Na verdade, as algas, além de serem um tesouro de vitaminas e minerais, são baixas em gorduras (Pereira, 2012), característica essencial nas dietas de perda de peso e saúde cardiovascular (Andrade et al., 2013). Mais, as algas são ricas em fibras dietéticas, que podem facilitar o trânsito intestinal, reduzir a taxa de colesterol no sangue e o aparecimento de certas doenças, tal como o cancro do cólon (Pereira, 2012). São, portanto, a melhor maneira de resolver as deficiências nutricionais dos alimentos atuais, devido à sua ampla gama de componentes: sais minerais (ferro e cálcio), proteínas (com todos os aminoácidos essenciais) (Pereira, 2011), vitaminas, tais como a A, B1, B2, B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico) (Gupta & Abu-Ghannam, 2011), B12 (ausente nos vegetais terrestres) (Fernández Saa, 2003), D, E e dois terços dos requisitos da vitamina C (Ortiz et al., 2009), e fibras dietéticas solúveis (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). A sua versatilidade como alimento permite o seu consumo em formas frescas, secas, em conserva, cozidas ou como um componente numa grande variedade de outros produtos (Pereira, 2011).

1.1 – Algas

Entre as fontes marinhas, as algas têm despertado um enorme interesse. São organismos fotossintéticos e podem existir em diferentes formas, desde organismos unicelulares microscópicos (microalgas) a organismos multicelulares de grande tamanho (macroalgas) (Ibañez & Cifuentes, 2012).

Capítulo 1 - Introdução

As algas são identificadas e agrupadas em três categorias, incluindo as algas castanhas (Phaeophyceae), as algas vermelhas (Rhodophyta) e as algas verdes (Chlorophyta) (Samarakoon & Jeon, 2012; Tabarsa et al., 2012). A flora algal de Portugal, segundo Ardré (1970; 1971), é caracterizada por possuir cerca de 250 espécies Rhodophyta, 100 Phaeophyceae e 60 Chlorophyta (Andrade et al., 2013; Pereira, 2008). Contudo, Araújo et al., 2009 estudou a flora algal da costa norte de Portugal (aproximadamente 250 Km, de Insua da Caminha ao Cabo Mondego) e identificou 200 espécies Rhodophyta (vs. 115 espécies identificadas por Ardré), 70 Phaeophyceae (vs. 41 espécies identificadas por Ardré) e 50 Chlorophyta (vs. 22 espécies identificadas por Ardré), pelo que os valores obtidos por Ardré (1970; 1971) já sofreram algumas alterações.

Tal como acontece com outros organismos marinhos, as algas conseguem sobreviver em ambientes altamente complexos e competitivos, com níveis de salinidade extremos, variações elevadas de temperatura, baixas intensidades de luz e habitats deficientes em nutrientes (Samarakoon & Jeon, 2012), através da produção de uma grande variedade de metabolitos secundários (biologicamente ativos, que não podem ser encontrados noutros organismos (Ibañez & Cifuentes, 2012).

A importância das algas marinhas como fonte de novas substâncias bioativas tem sido demonstrada recentemente, e muitos estudos têm identificado e isolado compostos biologicamente ativos a partir das algas. A investigação sobre produtos químicos naturais e defesas químicas de algas durante os últimos 40 anos resultou no isolamento de mais de 15.000 novos compostos, muitos dos quais têm demonstrado ter propriedades bioativas (Kelman et al., 2012). Os metabolitos encontrados nas macroalgas são descritos como tendo propriedades antimutagénica, antitumoral, antidiabética e anti-hipertensiva (Andrade et al., 2013).

No entanto, como na maioria da flora, os seus teores de nutrientes ou a composição nutricional das algas variam com a espécie, localização geográfica, estação do ano/sazonalidade, temperatura da água, salinidade, intensidade da luz, condições de amostragem, ou a combinação destes fatores (Mohamed et al., 2012; Stirk et al., 2007).

Assim, o valor nutricional de uma espécie de alga é dependente de diversas características, incluindo a sua forma, tamanho, digestibilidade e toxicidade (Cardozo et al., 2007). Pesquisas recentes revelaram o seu potencial uso medicinal contra o cancro, alergias, diabetes, stresse oxidativo, inflamação, trombose, hipertensão, obesidade e outras doenças degenerativas (Mohamed et al., 2012).

De um modo geral, as macroalgas têm o mesmo tipo de compostos, a prolina, o manitol, o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0). A contribuição da prolina para as três categorias de algas alcança os 54%, sendo que o manitol representa 9% dos compostos em Chlorophyta, 47% em Rhodophyta e 59% em Phaeophyceae (Andrade et al., 2013).

As algas são consideradas fontes naturais de vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, tais como tiamina e riboflavina, β -caroteno e tocoferóis, bem como ácidos gordos polinsaturados essenciais (PUFA) (Ortiz et al., 2009), que não são sintetizados pelos mamíferos, tendo que ser assimilados via ingestão de alimentos adequados (Pereira et al., 2012). Entre os PUFA's, o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5, ω -3), o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:5, ω -3) e o ácido araquidónico (também chamado ácido eicosatetraenóico, ARA, C20:4, ω -6) são muito importantes, pois podem ser úteis no tratamento do cancro da mama, cólon e da próstata (ω -3) (Ibañez & Cifuentes, 2012), doenças do coração, como antibacterianos, anti-inflamatórios e antioxidantes (Pereira et al., 2012). Também podem ajudar na redução da lipoproteína de baixa densidade do colesterol (LDL) e dos triglicéridos (Mohamed et al., 2012).

Em geral, as algas têm baixa razão ω -6: ω -3, tal como recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO) (Ibañez & Cifuentes, 2012) (este rácio não deve ser superior a 10 na dieta). Assim, o consumo de algas pode contribuir exclusivamente para a melhoria no fornecimento de ácidos gordos ω -3 na dieta (Tabarsa et al., 2012).

Os polissacarídeos das macroalgas marinhas (fucoidanas (algas castanhas), xilanas (certas algas vermelhas e verdes), ulvanas (algas verdes) e celulose (todos os géneros)) (Ibañez & Cifuentes, 2012), têm sido referidos por possuírem atividades biológicas de potencial valor medicinal, em adição ao seu estatuto como uma fonte de fibras dietéticas (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). A concentração total destes nas algas

Capítulo 1 - Introdução

variam na gama de 4% a 76% de peso seco (Holdt & Kraan, 2011). Estes polissacarídeos prometem ser boas ferramentas terapêuticas, especialmente porque eles derivam de fontes não-animais, reduzindo os riscos da propagação da doença conhecida como encefalite espongiforme bovina, associada aos medicamentos de origem animal (Ciancia et al., 2007), e têm importantes propriedades funcionais (anticoagulante, antitrombótica, antiviral, antitumoral, imunomoduladora, anti-inflamatória, redução de lípidos no sangue, antioxidante, etc.) (Ibañez & Cifuentes, 2012). No que se refere à atividade antiviral, é de referir que o *Codium fragile* (Chlorophyta) exibe atividade contra a estirpe HSV-2, do vírus *herpes simplex*, com um IC₅₀ de 4.7 µg /mL (Wijesekara et al., 2011). Além disso, o *Codium fragile* é uma das poucas algas que possui atividade significativa contra três tipos de vírus (*herpes simplex*, um vírus DNA com uma membrana; Sindbis, um vírus RNA com uma membrana; e poliovírus, um vírus RNA sem uma membrana) (Hudson et al., 1999).

Em termos de fibra total, as algas comestíveis têm 33-50%, um nível que é mais elevado do que o encontrado nas plantas superiores (Ibañez & Cifuentes, 2012).

Todas as algas contêm elevada quantidade de macrominerais (Ca, Mg, Na, P e K) e elementos vestigiais (Zn, I e Mn) (Mohamed et al., 2012). As algas marinhas contêm geralmente Na, K, Ca, Mg e Fe em grandes quantidades, até 15-25% do seu peso seco (Rizvi & Shameel, 2005), sendo por isso uma das mais importantes fontes de cálcio e fósforo. Além disso, têm baixa razão Na/K, e a sua ingestão ajuda a reduzir a hipertensão (Mohamed et al., 2012).

Os carotenoides, que são pigmentos isoprenóides (Valentão et al., 2010), acessórios para captação da luz, têm muito potencial como corantes de alimentos, suplementos alimentares, nutracêuticos, para fins de cosmética e farmacêuticos (Ibañez & Cifuentes, 2012). A presença de carotenoides nas algas pode dar origem a compostos voláteis, os norisoprenóides, que resultam da clivagem oxidativa dos carotenoides e são sinais no desenvolvimento das algas, servindo como agentes antifúngicos (Valentão et al., 2010).

Os animais não têm a capacidade de sintetizar carotenoides endógenos e assim obtêm-nos através das suas dietas. Para fins nutricionais humanos, alguns carotenoides

oferecem atividade de provitamina A. Deficiência de vitamina A é um problema que tem prevalecido nos países em desenvolvimento nas últimas décadas (Cardozo et al., 2007).

Muitos estudos têm relacionado o alto consumo de carotenoides com a diminuição do risco de certas patologias. A astaxantina ceta-carotenoide acredita-se desempenhar um papel fundamental na melhoria/prevenção de vários processos patológicos humanos, tais como, foto oxidação da pele mediada por UV, inflamação, carcinogênese mamária e da próstata, úlceras devido à infecção por *Helicobacter pylori* e doenças relacionadas com o envelhecimento (Cardozo et al., 2007).

Os principais carotenoides que ocorrem nas algas incluem β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina nas algas verdes (Chlorophyta); α e β -caroteno, luteína e zeaxantina nas algas vermelhas (Rhodophyta) e β -caroteno, violaxantina e fucoxantina nas algas castanhas (Phaeophyceae) (Ibañez & Cifuentes, 2012).

A deficiência em iodo no corpo humano é um resultado dos baixos níveis de iodo na terra, plantas e animais que servem como fontes alimentares comuns. As algas são a melhor fonte natural de iodo e o seu consumo tem sido aconselhado, de modo a ajudar no cumprimento das necessidades diárias de iodo na dieta. As algas comestíveis contêm níveis de iodo entre 4 300 e 2 600 000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. O consumo regular de uma dieta rica em algas tem sido relacionada com baixíssimas incidências de cancro da mama, devido à alta disponibilidade de iodo na dieta (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). Por exemplo, a alga verde comestível, *Codium intricatum*, contém uma quantidade considerável de iodo (0.13-0.16% do peso seco) (Rizvi & Shameel, 2005).

Devido ao referido anteriormente, o valor das macroalgas marinhas como um ingrediente funcional e saudável está a ganhar popularidade (Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

É de salientar ainda que, algumas algas são usadas diretamente na alimentação em diferentes países, e constituem uma fonte de nutrientes benéfica (Andrade et al., 2013), pois não são venenosas, têm geralmente tecidos suaves e, como tal, tem muitos efeitos medicinais indiretos (Rizvi & Shameel, 2005).

É verdade que as algas começaram a captar a atenção como novas fontes de ingredientes funcionais, mas elas ainda são uma grande parte dos recursos inexplorados

quando comparadas com outras matérias-primas (Hafting et al., 2012), pelo que o seu estudo está a ganhar muito interesse. Entre as algas com grande importância encontra-se o *Codium tomentosum*.

1.2 – *Codium tomentosum*

As algas verdes são as mais diversificadas, apresentando clorofila a e b (na mesma proporção, daí a coloração verde) e carotenoides. A sua substância de reserva é sempre o amido, pelo que são consideradas as ancestrais das plantas terrestres. As suas formas de maiores dimensões são marinhas, como o género *Codium*, que pode atingir 25-30 cm de comprimento (Simbiotica, 2013).

O *Codium Stackhouse* (Chlorophyta, Bryopsidales, Codiaceae) é um dos géneros mais comuns e de ampla distribuição entre as algas marinhas no mundo (González & Santelices, 2004), compreendendo aproximadamente 150 espécies (Choi et al., 2013), que crescem em habitats rochosos em águas tropicais ou temperadas (González & Santelices, 2004).

A espécie-tipo (holótipo) deste género é o *Codium tomentosum* (Guiry & Guiry, 2013).

O *Codium tomentosum* é uma pequena macroalga marinha verde, que por isso se enquadra no filo Chlorophyta e na família Codiaceae, e que pode crescer até 30 cm de comprimento. É uma alga verde escura, cujo talo ou fronde (parte ereta de uma macroalga) possui uma estrutura dicotómica, muito ramificada, cujas ramificações são finas e cilíndricas, medindo 8 a 10 milímetros de diâmetro, sendo por isso conhecida como “dedos de morto” (SIA, 2013). Em Portugal é também conhecida comumente por Chorão, Chorão do mar e Pingarelhos (Guiry & Guiry, 2013).

As frondes são sólidas e esponjosas com um toque aveludado, são cobertas por pelos incolores visíveis apenas quando a alga está submersa e encontram-se fixadas ao substrato por um apoio em forma de disco ou em forma de pires, acompanhado por filamentos, dando-lhe uma aparência uniforme (SIA, 2013).

O talo do *C. tomentosum* é composto por células cenocíticas multinucleadas grandes, onde as paredes transversais raramente são formadas, daí se dizer que o talo é sifonado. Os sifões (filamento desprovido de septos transversais) altamente entrelaçados são expandidos para a superfície para formar utrículos (Graham & Wilcox, 2000). Os utrículos, que são tumefações corticais nas pontas dos filamentos, normalmente são projeções da parede celular ou espessamentos celulares incolores arredondados (González & Santelices, 2004) (Figura 1).

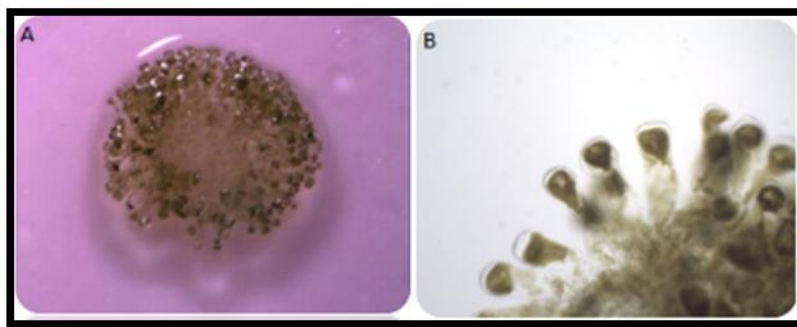


Figura 1 – Cortes histológicos de um talo de *C. tomentosum*. A: Corte geral, observado á lupa, ampliado 3x; B: Corte pormenorizado dos utrículos, observado ao microscópico ótico, ampliado 10x (Anexo I)

É nos utrículos que estão presentes numerosos cloroplastos discoides carentes de pirenoides. As paredes celulares desta espécie não contêm celulose, mas sim monossacarídeos (β -1,4 D- manose) ou polissacarídeos (arabinogalactanas sulfatadas) (Graham & Wilcox, 2000).

O *Codium tomentosum* pode ser confundido com o *Codium fragile*, uma espécie invasora. No entanto, o *Codium tomentosum* tende a ter uma fronde mais fina com pontas arredondadas (SIA, 2013). Também podem ser distinguidos com base nos seus utrículos, já que os utrículos do *C. fragile* são mucronados, enquanto os do *C. tomentosum* não.

O *C. tomentosum*, pertencendo ao género *Codium*, é uma alga perene, sendo o pico da reprodução e o pico do crescimento coincidentes, ocorrendo estes durante os

finais do Verão e inícios do Outono, quando as temperaturas quentes favorecem o rápido crescimento (Kang et al., 2008).

De acordo com Arasaki et al. (1956) e Borden & Stein (1969), o ciclo de vida das algas do género *Codium* é diplonte com meiose gamética (Miravalles et al., 2012), pelo que o ciclo do *Codium tomentosum* será igualmente diplonte com meiose gamética. A reprodução sexuada é realizada através de zigotos que resultam da fusão de gâmetas haploides (Lobban & Harrison, 1997; Nanba et al., 2005). Este zigoto germina num filamento sifonado diploide (Lobban & Harrison, 1997). As populações de *Codium* são, geralmente, dioicas (Miravalles et al., 2012).

Os gametângios desenvolvem-se como “ramos” dos utrículos, que podem ter coloração escura ou clara, pois eles contêm dois tipos diferentes de anisogâmetas biflagelados (Graham & Wilcox, 2000). Os gâmetas masculinos são pequenos e contêm um ou dois cloroplastos, enquanto os gâmetas femininos são grandes e têm muitos cloroplastos (Encyclopædia Britannica, 2013). Os gâmetas surgem por meiose, a partir de protoplastos periféricos (Miravalles et al., 2012).

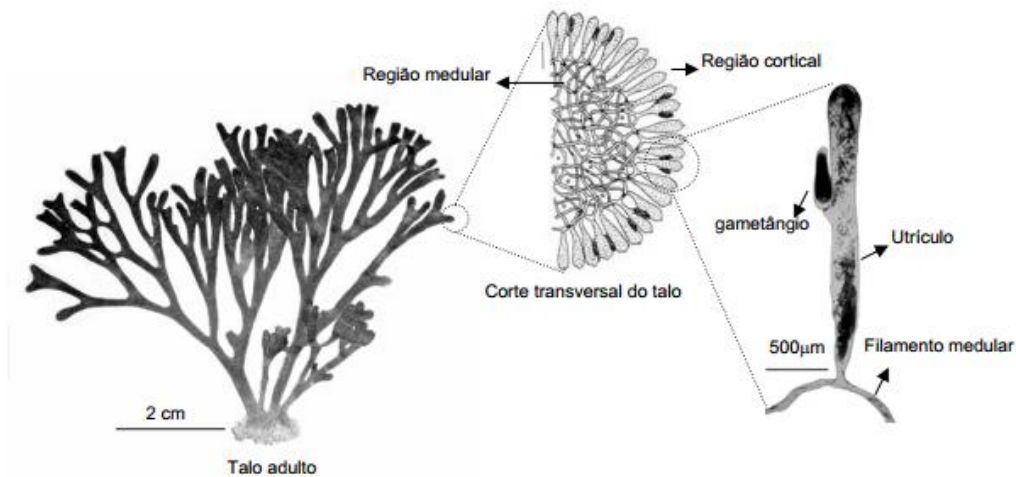


Figura 2 – Desenho esquemático de um espécime do género *Codium* Stackhouse (corte transversal do talo), adaptado de Lee, 1989

Os gametângios são separados do resto do talo por paredes transversais (septos), pois assim o talo pode persistir depois da libertação dos gâmetas. No entanto,

os gâmetas não fecundados do tipo maior, mais escuros, podem germinar em talos vegetativos, o que pode ser visto como uma forma de reprodução assexuada (Graham & Wilcox, 2000).

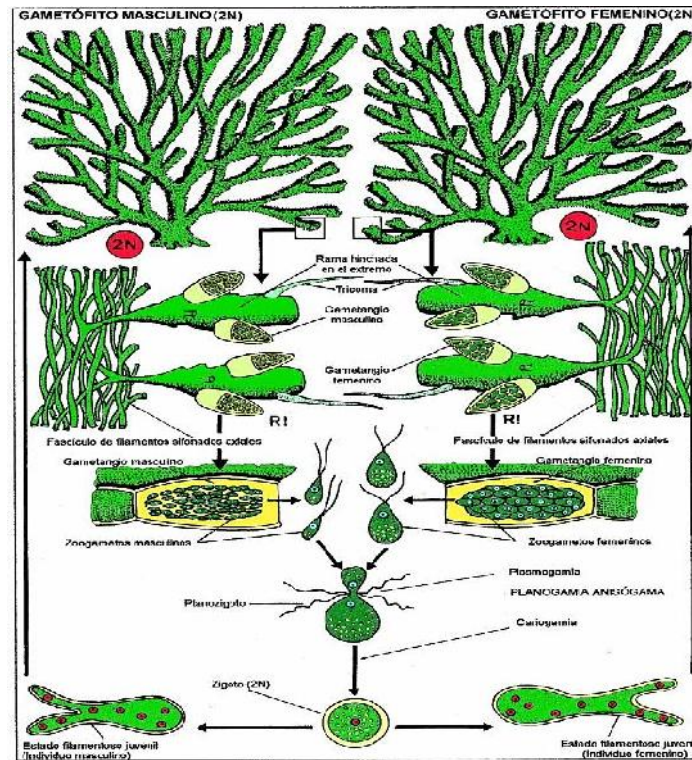


Figura 3 – Ilustração do Ciclo de Vida do *Codium tomentosum*, adaptado de <http://www.unioviado.es/bos/Asignaturas/Botanica/9.htm>

A partenogênese tem sido citada em pelo menos três espécies, entre elas o *Codium tomentosum*. A partenogênese de ambos os gâmetas masculino e feminino é um mecanismo de reprodução assexuada, pela qual talos adultos reprodutores se desenvolvem (Miravalles et al., 2012).

Quanto à germinação intragametangial, foi citada anteriormente em apenas uma única ocasião, em *C. tomentosum* por Dangeard & Parriaud (1956) (Miravalles et al., 2012).

Também a chamada “Fragmentação de Inverno” é um processo que tem sido considerado por ser a possível causa da propagação vegetativa (Hanisak, 1979), pois a

Capítulo 1 - Introdução

fragmentação do talo tem sido considerada um importante meio de propagação vegetativa e dispersão em *Codium*. No entanto, a fragmentação também pode conferir uma vantagem adaptativa pela redução do risco de deslocamento pela ação das ondas (D'Amours & Scheibling, 2007).

Todo este processo do ciclo de vida é controlado e dependente de fatores externos. Para a sua sobrevivência e crescimento os níveis de salinidade, temperatura, luz e azoto disponíveis têm de ser ideais. Assim, para o *C. tomentosum*, baseando-se no relatado para o *C. fragile* ssp. *tomentosoides*, atingir o seu auge de crescimento/reprodução, a temperatura tem que se situar entre os 18 e 24°C, a salinidade entre valores de 24-30‰ e o fotoperíodo de 16H:8H (luz: escuro) (Hanisak, 1979). Estudos mostraram que o crescimento ótimo para o *C. tomentosum* ocorreu a 20°C, com uma taxa de crescimento de 0.22-0.40 g após 15 dias e a uma salinidade de 30.6‰ (Yang et al., 1997). Porém, existem valores de salinidade e temperatura que são limitantes ou mesmos inibitórios do crescimento/reprodução desta espécie. Baseando-se, mais uma vez na espécie *C. fragile* ssp. *tomentosoides*, o talo não sobrevive a temperaturas acima dos 33°C e não se deteta crescimento do mesmo a temperaturas abaixo de 6°C (Hanisak, 1979).

Assim, podemos afirmar que a chave do crescimento vegetativo para a reprodução (que na maioria das algas envolve muito pouco crescimento), muitas vezes depende de fatores ambientais como a temperatura, a salinidade e a intensidade luminosa (Lobban & Harrison, 1997).

No que ao habitat diz respeito, o *Codium tomentosum* está presente tanto em locais abrigados como em locais expostos, no horizonte superior do patamar infralitoral e horizonte inferior do patamar médiolitoral e, também, em poças de marés (Pereira, 2009).

Quanto à distribuição geográfica da espécie em estudo, ela é nativa do nordeste do Oceano Atlântico, desde as ilhas britânicas até ao sul dos Açores e Cabo Verde. Também se encontra ao longo das costas de África, entre outros lugares (SIA, 2013). Em Portugal é comum ao longo de todo o litoral português (Pereira, 2009).

O *C. tomentosum*, ao contrário de muitos *kelps* e fucoides, não possui estruturas especiais cheias de gás, os pneumatocistos (ou aerocistos), mas aprisiona o gás entre os seus filamentos, alcançando o mesmo efeito (Lobban & Harrison, 1997).

É de salientar ainda que esta macroalga em estudo pode apresentar-se recoberta por epífitas (Pereira, 2009), pelo que o seu corpo esponjoso pode servir de hospedeiro a espécies epífitas como *Ectocarpus* (Phaeophyceae), *Ceramium*, *Ulva* e *Chaetomorpha* (Chlorophyta) (González & Santelices, 2004).

O epifitismo é um comum modo de vida, embora poucas algas sejam epífitas obrigatórias. No entanto, mesmo que este modo de vida resolva o problema de espaço para a epífita, ela cria problemas para a espécie âncora. Os efeitos das epífitas são, geralmente, sombra para as espécies âncoras, impedem as suas trocas gasosas e captação de nutrientes, e assim diminuem as taxas de crescimento e aumentam as forças de arrasto, que tendem a arrancar as algas âncora das rochas (Graham & Wilcox, 2000; Lobban & Harrison, 1997). Consequentemente, algumas algas possuem métodos eficazes para se livrarem de tais concorrentes (Graham & Wilcox, 2000).

O *Codium tomentosum* é uma alga com elevada importância económica devido aos seus diversificados fins, nomeadamente na indústria cosmética, embora o seu potencial ainda não esteja muito estudado. Contudo, alguns dos seus compostos, bem como algumas respetivas atividades biológicas, já foram documentados.

Deste modo, já é sabido que as algas marinhas verdes do género *Codium* são uma importante fonte de clerosterol (He et al., 2010), cuja molécula é um derivado do colesterol e é citotóxica para as células de melanoma humano (A2058), tendo inibido significativamente o crescimento celular, de uma forma dependente da concentração. A concentração de clerosterol requerida para a inibição de 50% nas células A2058 (IC₅₀) foi de 150 µM. Além disto, o clerosterol é mais sensível em células cancerígenas do que em células normais. Além disto, as células tratadas com clerosterol demonstraram fragmentação celular, condensação da cromatina e fragmentação do ADN, que são alterações morfológicas típicas associadas com a apoptose. Em conclusão, o clerosterol isolado a partir da alga marinha *Codium fragile* induziu a apoptose mediada pela mitocôndria nas referidas células do melanoma humano (Kim et al., 2013).

Capítulo 1 - Introdução

O ácido araquídico (= ácido eicosanóico) está presente apenas em *C. tomentosum* e *C. adhaerens*. Por sua vez, o ácido palmítico é o que está presente em maior quantidade na espécie em estudo (Andrade et al., 2013).

Se prestarmos atenção a um extrato aquoso liofilizado de *C. tomentosum*, podemos verificar qual a sua composição de ácidos orgânicos, em que o ácido oxálico foi o composto principal, representando cerca de 60.9% do total de ácidos orgânicos identificados, seguido pelo ácido málico (ca. de 31.3% do total de ácidos). Os ácidos aconítico, malónico e fumárico foram os compostos menos presentes (Valentão et al., 2010) (Tabela I).

Tabela I – Representação da composição de ácidos orgânicos presentes no extrato aquoso liofilizado de *C. tomentosum*, adaptado de Valentão et al., 2010

| Ácido orgânico (mg/Kg de extrato liofilizado) | Média (N = 3) | Desvio Padrão |
|--|----------------------|----------------------|
| Oxálico | 6 505.8 | 796.0 |
| Aconítico | Não quantificado | Não quantificado |
| Cetoglutárico | 248.2 | 20.0 |
| Pirúvico | 549.2 | 10.4 |
| Málico | 3 341.4 | 914.1 |
| Malónico | Não quantificado | Não quantificado |
| Fumárico | Não quantificado | Não quantificado |
| Σ | 10680.6 | |

Os extratos aquosos de *Codium tomentosum* também mostraram atividade antibacteriana moderada, em que estes produziram diâmetros máximos da zona de inibição de 10, 11 e 12 mm para concentrações de 0.1 e 1% contra *M. luteus*, *E. coli* e *V. fischeri*. O *C. tomentosum* mostrou melhor atividade para bactérias Gram-negativas do que para Gram-positivas (Christobel et al., 2011).

O *C. tomentosum* também mostrou ter uma elevada atividade anticoagulante para o seu extrato aquoso frio, que parece estar relacionado com o seu elevado conteúdo em sulfato (Shanmugam et al., 2002).

É de salientar que, de fato, o *C. tomentosum* pode ser um tesouro ainda por descobrir, já que muitos estudos ainda têm que ser realizados para explorar todas as potencialidades desta macroalga. Perante isto, nos últimos tempos, vários estudos têm sido efetuados com o objetivo de estudar a sua capacidade antioxidante (Andrade et al., 2013).

Esta espécie, apesar de ainda não ser totalmente explorada e compreendida, é usada diretamente na alimentação humana, em medicina (Kang et al., 2008), em cosmética e em farmacologia (Guiry & Guiry, 2013). Relativamente à cosmética, esta alga é o principal constituinte de vários produtos, como por exemplo, hidratantes de reparação e restauração, soros de hidratação, cremes de corpo e pernas, manteigas e lamas, cremes de banho e duche, cremes de dia, cremes de noite, cremes de olhos, cremes anti-envelhecimento, máscaras, esfoliantes, hidratantes labiais e loções (SIA, 2013). Uma das razões pela qual esta alga é usada nos referidos produtos prende-se com o fato de esta possuir uma importante quantidade de ácido glucurónico, o qual regula a distribuição da água na pele, protegendo-a dos efeitos adversos de um ambiente excessivamente seco (Vázquez Pérez, 2011).

O *C. tomentosum* possui um alto conteúdo das proteínas lectinas, o que lhe confere alguns benefícios, nomeadamente, capacidade anti-inflamatória, intervenção nas comunicações célula-célula e nas interações hospedeiro-patógeno (Holdt & Kraan, 2011).

Para levar a cabo todos os estudos realizados até agora, bem como aqueles que ainda serão realizados, além da biomassa recolhida para todos os outros fins a que se destina o *C. tomentosum*, é necessário proceder com a recolha de elevadas quantidades da alga. Além disso, é sabido que cerca de 4 milhões de toneladas de algas marinhas são colhidas anualmente, a nível mundial (Pereira, 2012).

Perante estes valores elevados de algas colhidas é de referir que as algas são renováveis, mas finitas, pelo que o cultivo destas ou uma exploração ordenada é de

fundamental importância para as comunidades costeiras. Porém, se colhermos algas mais do que o limite sustentável, provavelmente não seremos capazes de obtê-las em quantidades satisfatórias no futuro. Portanto, devemos encontrar soluções de como preservar estes recursos de importância econômica, sendo uma das prioridades fundamentais o cultivo onde as algas poderão se desenvolver e reproduzir em quantidade (Anjos dos Santos et al., 2010).

No passado, a procura do mercado por produtos de algas resultou no desenvolvimento da tecnologia de cultivo, de tal modo que mais de 93.8% das algas produzidas globalmente em 2008 foram de fontes cultivadas (FAO 2010) (Hafting et al., 2012). Entre os sistemas de cultivo de algas encontra-se o sistema de Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA).

1.2.1 – Propriedades Antioxidantes

As algas marinhas da zona intertidal vivem em ambientes severos onde são submetidas a repetidas imersões e emersões devido a flutuações da maré. Como resultado, elas são periodicamente expostas ao ar, experimentando uma variedade de condições ambientais potencialmente stressantes, incluindo a limitação de nutrientes, luz intensa, flutuações rápidas da temperatura, stress osmótico e dessecação, o que leva à formação de radicais livres e outros agentes oxidantes, tais como as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Kelman et al., 2012; Valentão et al., 2010). No entanto, a ausência de danos oxidativos nos componentes estruturais das macroalgas (ou seja, PUFA's) e a sua estabilidade à oxidação durante o armazenamento sugerem que as suas células têm sistemas de defesa de proteção antioxidante (Kelman et al., 2012; Valentão et al., 2010).

A produção de compostos antioxidantes é influenciada por vários fatores, tanto extrínsecos (pressão de herbivoria, irradiação, profundidade, salinidade, nutrientes, etc.) como intrínsecos (tipo, idade e estágio reprodutivo) (Valentão et al., 2010).

Os antioxidantes são metabolitos secundários que impedem a oxidação pela transformação de radicais livres ou radicais peróxido em não-radicaís, por doação de elétrons de hidrogênio, quelantes de metais de transição e dissolução de compostos

gerados por peroxidação (Gupta & Abu-Ghannam, 2011), que de outra forma oxidariam as biomoléculas conduzindo à morte celular e danos nos tecidos (Kelman et al., 2012). Assim, os antioxidantes podem proteger o corpo humano contra prejuízos causados por ROS, que atacam macromoléculas, tais como a membrana lipídica, proteínas e ADN, levam a muitos problemas de saúde, tais como, cancro, *diabetes mellitus*, doenças degenerativas e inflamatórias com lesões graves dos tecidos (Wijesekara et al., 2011).

As ROS (tais como O^{2-} , OH^- e H_2O) são altamente mutagénicos e danificam as macromoléculas celulares, tais como o ADN, proteínas e lípidos. As ROS também resultam na oxidação lipídica, que é a principal razão para a deterioração da qualidade dos alimentos contendo lípidos durante o armazenamento. (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). A oxidação lipídica aumenta com a doença e a idade, e muitas algas marinhas podem reduzir a oxidação lipídica *in vivo*. O consumo de algas em geral aumenta a quantidade de enzimas antioxidantes (Mohamed et al., 2012).

As enzimas endógenas, tais como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e os antioxidantes não-enzimáticos, como a vitamina C, α -tocoferol e selénio, protegem os órgãos internos e tecidos de danos oxidativos por várias espécies reativas de oxigénio e nitrogénio tóxicas (Samarakoon & Jeon, 2012).

O desequilíbrio entre os antioxidantes endógenos e as ROS causa sérios problemas de saúde e doenças, como cancro, doenças cardiovasculares, hipertensão, *diabetes mellitus*, doenças inflamatórias, doenças neuro-degenerativas e envelhecimento (Samarakoon & Jeon, 2012).

Os antioxidantes sintéticos (BHA - butil hidroxianisol, BHT - butil hidroxitolueno, e TBHQ - *terc*-butil hidroquinona) são largamente usados na indústria alimentar para preservar a segurança e qualidade dos alimentos. No entanto, estes antioxidantes sintéticos têm sido reportados por serem tóxicos e exercerem efeitos carcinogénicos (Celikler et al., 2009; Gupta & Abu-Ghannam, 2011). Além disso, devido à procura dos consumidores por alimentos minimamente processados que contenham conservantes naturais, a identificação e posterior extração de compostos antioxidantes alternativos e naturais está a ganhar força (Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

Outro composto importante é o óxido nítrico (NO). Ele está envolvido em vários processos fisiológicos, como o controlo de pressão arterial, transdução do sinal neural, função plaquetária e defesa antimicrobiana. Apesar dos efeitos benéficos, uma superprodução destas espécies reativas está associada com vários tipos de danos biológicos. Além disso, ele reage rapidamente com o radical superóxido para formar peroxinítrito, um importante oxidante prejudicial produzido *in vivo* (Valentão et al., 2010).

Vários estudos estão disponíveis nos quais os efeitos antioxidantes dos extratos brutos das algas têm sido relatados usando simples e rápidos ensaios *in vitro*, tais como 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e capacidade de absorção de radicais oxigénio (ORAC). As macroalgas marinhas representam, então, uma das mais ricas fontes de antioxidantes naturais (Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

Compostos fenólicos, tais como flavonoides e cumarinas, tocoferóis, compostos contendo azoto incluindo os alcaloides, derivados de clorofila, aminoácidos e aminas, assim como outros compostos como carotenoides, ácido ascórbico, glutatona e ácido úrico, são moléculas antioxidantes poderosas encontradas nas macroalgas (Valentão et al., 2010).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários que têm diversas atividades biológicas. As algas intertidais quando descobertas durante a baixa-mar são vulneráveis para sofrer foto-inibição ou danos por radiação fotossinteticamente ativa ou radiação UV. Para evitar foto-danos / foto-envelhecimento, estes organismos marinhos podem alterar o seu metabolismo e produzir um grande número de compostos ativos capazes de absorver a radiação UV, incluindo os polifenóis (Valentão et al., 2010).

Os compostos antioxidantes detetados nas algas têm também um potencial anti-envelhecimento, dietético, anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico, citotóxico, antimalárico, antiproliferativo e propriedades antitumorais (Kelman et al., 2012).

Geralmente as algas marinhas verdes têm maiores propriedades de eliminação de radicais livres, seguidas pelas algas marinhas castanhas e, em seguida pelas vermelhas (Mohamed et al., 2012).

1.2.2 – Propriedades Anti-inflamatórias

A inflamação é uma resposta vital provocada por patógenos, danos físicos, injúrias tóxicas ou autoimunes com o objetivo de proteger o organismo. Os mecanismos de inflamação envolvem cascatas complexas de eventos cujas respostas são iniciadas e reguladas por uma variedade de diferentes mediadores libertados por diversos tipos de células, aos quais estão atribuídas determinadas respostas inflamatórias (Rang et al., 2007).

O processo inflamatório é controlado por um grupo de substâncias chamadas mediadores químicos, que podem ser de origem tecidual, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxido, NO e neuropeptídeos, ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, do complemento e das cininas (Coura, 2011).

A inflamação pode ser classificada, dependendo da dinâmica da sua resposta como aguda ou crônica. Cada fase tem um perfil celular característico: neutrófilos, células dendríticas e macrófagos na fase aguda, e na fase crônica, mononucleares tais como macrófagos, linfócitos e mastócitos são predominante (Guerra, 2011).

A inflamação aguda é a reação imediata do organismo perante um estímulo físico, químico ou biológico, onde os mediadores de defesa são sintetizados e direcionados para o local da lesão. Por outro lado, algumas doenças crônicas podem originar-se a partir das inflamações agudas, que evoluem nos seus sintomas, como por exemplo, infecções por microrganismos, de modo que, uma infecção é denominada crônica quando ocorre a persistência do estímulo agressor, ocasionando uma destruição contínua dos tecidos (Guerra, 2011).

O sistema imune é responsável pelos processos de reparação tecidual como também pela defesa do organismo. Os leucócitos (glóbulos brancos) atuam em momentos distintos da resposta imune. Esta resposta pode ser classificada em imunidade não-específica (inata) e em imunidade específica (adquirida). Na imunidade inata as células que atuam são principalmente células fagocitárias mononucleares (macrófagos/monócitos) e os granulócitos (i.e. neutrófilos). No caso da imunidade

adquirida, além das células efectoras, há a atuação dos linfócitos (linfócitos T e linfócitos B) (Guerra, 2011).

Na imunidade inata, os macrófagos entram em ação secretando diversos mediadores, tais como NO, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), quimiocinas (IL-8), entre outros. A indução para a ativação dos macrófagos pode dever-se tanto ao estímulo lesivo, a um agente infetante ou pela ação de outras citocinas, principalmente pelo interferon gama (IFN- γ), que é libertado pelos linfócitos (Guerra, 2011).

Assim, os macrófagos são células multifuncionais, que orquestram uma infinidade de ações anti-herpéticas durante a primeira hora do ataque. Primeiro, a libertação de citocinas pró-inflamatórias é essencial para a sobrevivência do hospedeiro e também é necessária para a reparação do tecido lesado. A IL-6 e o TNF- α ativam as células vizinhas para produzir quimiocinas ou moléculas de adesão, recrutando assim várias células inflamatórias nos locais de infecção. A IL-1 β é um mediador para gerar as proteínas de fase aguda importantes na resposta do hospedeiro a infecções. Além disso, a IL-12 é uma molécula importante para iniciar uma adequada resposta das células-T (Coura, 2011; Lee et al., 2010).

Por outro lado, tem sido sugerido que a IL-10 pode atuar num mecanismo de *feedback* negativo para evitar potenciais efeitos negativos/prejudiciais da ativação excessiva de macrófagos durante a inflamação (Lee et al., 2010).

O óxido nítrico é uma molécula gasosa inorgânica, incolor, multifuncional e é um radical livre altamente reativo (Coura, 2011). Ele é sintetizado bioquimicamente a partir da L-arginina por enzimas NO sintetase (NOS endotelial, NOS neuronal e NOS induzível) constituindo um mediador inflamatório, pelo que a sua inibição tem sido cada vez mais estudada (Kim et al., 2004; Yoon & Baek, 2005).

O NO tem propriedades pró-inflamatórias, age como vasodilatador, além de aumentar a permeabilidade vascular e estimular a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Quando ocorre a produção de NO em excesso, causa lesão tecidual por peroxidação lipídica (Guzik & Adamek-Guzik, 2003). Além disto, estudos mostram um importante papel do NO como agente anti-inflamatório (Marques, 2007).

Apesar da eficácia dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), fármacos mais utilizados no tratamento da inflamação aguda, os seus efeitos colaterais como a intolerância gástrica, toxicidade renal e aumento da incidência de doenças cardiovasculares representam um grande obstáculo na sua utilização. Perante isto, encontrar substâncias eficazes e com baixa toxicidade levam os investigadores à procura incansável por novos fármacos (Guerra, 2011).

Devido aos efeitos negativos dos AINES, como referido acima, a perceção do consumidor está a crescer no sentido de que o uso de produtos naturais bioativos, próximo do seu estado natural, pode originar menos efeitos adversos e ser semelhante ou ainda mais efetivo que os compostos sintetizados quimicamente (Gosslau, et al., 2011). Além disso, estudos epidemiológicos indicam que as populações que consomem alimentos ricos em polifenóis têm uma menor incidência de desordens inflamatórias crónicas (Werz, 2007).

Vários estudos também sugerem que a ingestão de ácidos gordos ómega-3, principalmente EPA e DHA, podem ter um potencial significativo no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias. No processo de inflamação, os eicosanóides derivados de PUFA's ómega-6 são geralmente considerados pró-inflamatórios ou promotores de outros efeitos nocivos celulares, ao passo que os derivados de PUFA's ómega-3 são considerados menos inflamatórios ou ainda anti-inflamatórios (Pereira et al., 2012).

Como já referido, as algas são uma fonte rica de EPA e DHA, o que nos leva a acreditar que terão um potencial elevado como anti-inflamatórios. Além disso, as galactanas sulfatadas podem aumentar a produção tanto de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α), como de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), e também poderão ser um polissacarídeo imunoestimulador que poderá ativar os macrófagos. (Lee et al., 2010).

Estudos mostram que as galactanas sulfatadas estimulam a produção de uma molécula efetora, tal como o NO, nos macrófagos. Verificou-se que o NO pode inibir uma fase precoce da replicação viral, e assim evitar a propagação viral, promovendo a eliminação viral e a recuperação do hospedeiro (Lee et al., 2010).

1.2.3 – Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)

O rápido desenvolvimento da aquacultura intensiva de alimentados (peixes e mariscos) face ao crescimento da população humana em todo o mundo (Abreu et al., 2011), está associado com preocupações sobre os impactos no meio ambiente. Um dos principais problemas ambientais é a descarga direta de cargas de nutrientes em águas costeiras de sistemas de água aberta (Chopin et al., 2001).

Estas questões têm levado a uma perceção negativa da aquacultura por parte da população em geral. Assim, para o setor da aquacultura continuar a crescer é necessário desenvolver tecnologias e práticas inovadoras e responsáveis. Aquacultura sustentável deve ser ecologicamente eficiente, ambientalmente benigna, produto diversificado, rentável e socialmente benéfica (Abreu et al., 2011).

A aquacultura de organismos de níveis tróficos superiores (por exemplo, peixe, camarão), que são normalmente alimentados de forma artificial, precisa de ser integrada com a aquacultura extrativa orgânica e inorgânica (por exemplo, moluscos e algas). Deste modo, a aquacultura integrada fornece a capacidade de biorremediação de nutrientes, a diversificação económica através da produção de outras culturas marinhas de valor acrescentado, e o aumento da rentabilidade por unidade de cultivo para a indústria de aquacultura (Chopin et al., 2001). Perante isto, a aquacultura integrada tem sido proposta como um meio para o desenvolvimento de práticas de aquacultura ambientalmente sustentáveis e gestão de recursos através de uma abordagem equilibrada do ecossistema costeiro (Kang et al., 2008).

Muitas destas algas de interesse com potencial como produtos funcionais humanos são diminutas em tamanho, escassas em densidade e a sua ocorrência e eficácia bioativa são sazonais, tornando a comercialização pela gestão de recursos e colheita economicamente desafiadora e a aplicação da tradicional produção baseada em métodos do oceano arriscada (Hafting et al., 2012), o que nos leva à produção de “sistemas de cultivo baseados em terra”.

O cultivo em terra pode tomar uma variedade de formas, mas todas são baseadas na retenção de água, que é agitada para manter as algas em suspensão e expostas à luz e dissolver os nutrientes na água. Os nutrientes podem ser adicionados

de forma eficiente. O fluxo de entrada de água salgada também pode ser a partir de uma fonte secundária, tal como a partir da aquacultura de espécies de peixes alimentados, integrando a produção com organismos alimentados e extrativos (Hafting et al., 2012).

Resumindo, a aquacultura multitrófica integrada tem sido proposta como um conceito que combina a aquacultura de espécies alimentadas com a aquacultura de espécies extrativas (Kang et al., 2013), e pode ser definida como:

“O cultivo de espécies de aquacultura de diferentes níveis tróficos de modo que os excessos de resíduos de uma espécie são recapturados por outras espécies, imitando assim o que acontece no ecossistema natural, ocorrendo, deste modo, interações sinérgicas entre as espécies.”

Os objetivos principais desta prática são os da sustentabilidade da aquacultura, promovendo a sustentabilidade ambiental através da bio-mitigação, a sustentabilidade económica através da diversificação de produtos e redução de riscos, e a aceitabilidade social através de melhores práticas de gestão e menor impacto ambiental (Abreu et al., 2009; Abreu et al., 2011).

Para além dos benefícios comerciais que se podem obter a partir da produção de macroalgas, existe também a redução de CO₂ com a produção de O₂ nas águas da aquacultura. O reaproveitamento de efluentes tratados pelas algas ricos em O₂, entre outros elementos, para reintrodução dos mesmos nos tanques dos peixes, resulta num ambiente mais saudável ao crescimento destes últimos.

No entanto, há que ter em conta que a aquacultura integrada é um sistema dinâmico, que sofre alterações de acordo com variáveis como a localização, época, espécies e meio ambiente. É necessário conhecer os mecanismos inerentes a este sistema e adaptá-los consoante cada situação.

Estudos realizados em culturas confirmaram que os nutrientes excretados pelos peixes, camarão e bivalves encontram-se disponíveis para o crescimento das algas (Troell et al., 2003). Deste modo ocorre a libertação de azoto na forma de NH₃ (fonte preferencial para as algas) e aumento de fosfatos na água, aumentando assim a sua produção em termos de biomassa.

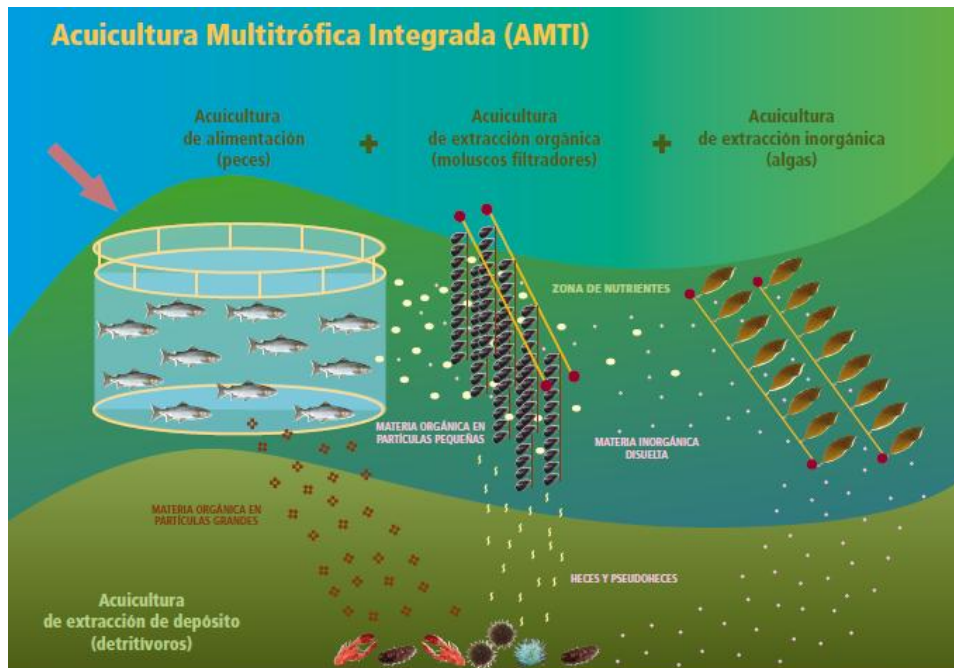


Figura 4 – Esquema do funcionamento de um sistema IMTA, adaptado de Garcia, 2012

Modo de funcionamento: Espécies alimentadas com ração, como peixes e camarão, produzem matéria orgânica particulada (restos de comida, fezes) e excretam amônia e dióxido de carbono. Estes subprodutos são aproveitados por algas (com o contributo da energia), que absorvem e incorporam azoto, fósforo e dióxido de carbono dissolvidos, e por animais filtradores ou detritívoros que utilizam a matéria orgânica particulada como alimento. Além disso, as algas produzem oxigénio que é utilizado pelos animais. Assim cultivando estes elementos combinados de forma apropriada teremos um sistema em que adicionamos ração para uma espécie (ou nível trófico) e todo o produto é utilizado, restando apenas água limpa e biomassa das várias espécies que são os vários produtos da aquacultura (Abreu et al., 2011).

Num sistema IMTA a escolha das espécies de algas ótimas a utilizar depende de alguns critérios (Anjos dos Santos et al., 2010; Garcia, 2012; Lopes da Silva, 2009; Kang et al., 2008; Kang et al., 2013):

- a) Valor comercial/económico;

- b) Eficiência na remoção de nutrientes e capacidade de resistir à exposição prolongada a concentrações elevadas desses compostos;
- c) Elevada taxa de crescimento (devendo ser saudáveis e resistentes) e concentração de azoto nos tecidos;
- d) Facilidade de cultivo;
- e) Controlo do ciclo de vida, preferencialmente com capacidade de propagação vegetativa;
- f) Fornecimento, durante o armazenamento, de grande quantidade de material seco de boa qualidade;
- g) Correspondência entre as características fisiológicas e o ambiente onde serão cultivadas;
- h) Resistência a epífitas e a organismos causadores de doenças.

As taxas de absorção de nutrientes varia consideravelmente com vários fatores físicos, químicos e biológicos. Em particular, a luz, a temperatura e a concentração de nutrientes influenciam as taxas de absorção de nutrientes (Kang et al., 2008). A amónia (NH_4^+), que faz parte do efluente da aquacultura intensiva de peixes, afeta a atividade metabólica dos mesmos e é uma fonte de nutrientes importante para o crescimento das macroalgas. E o excesso de exposição à luz elevada pode levar a danos fisiológicos, apesar dessa luz ter um efeito positivo sobre o crescimento das macroalgas (Kang et al., 2008).

Por fim, juntando a aquacultura em sistemas de IMTA com o potencial do *Codium tomentosum*, grandes benefícios se esperam tirar.

1.3 – Contextualização do trabalho e objetivos

Perante tais fatos aqui referidos, podemos atestar que é preciso compreender melhor a importância do mundo marinho, principalmente das macroalgas, pois o futuro das indústrias farmacêuticas, cosméticas, alimentares, agrícolas, ou até mesmo a medicina, poderá estar dependente destas fontes imensamente ricas com um potencial enorme, que são as macroalgas.

Assim, é importante o contínuo estudo na área das macroalgas com o intuito de descobrir novas aplicações para as mesmas. Como existe uma enorme quantidade e variabilidade de espécies de algas, esta é uma área que necessita ser mesmo explorada e bem compreendida, a fim de descobrirmos algo que nos ajude a proporcionar um futuro melhor.

Este trabalho foi elaborado nesse sentido, onde procuro compreender e dar a compreender a área das macroalgas, mais especificamente do *Codium tomentosum*.

O objetivo deste trabalho foi, numa primeira fase, avaliar o potencial de cultivo do *Codium tomentosum* num sistema IMTA. E, numa segunda fase, avaliar a capacidade antioxidante e anti-inflamatória da mesma espécie, procurando saber se o fato da biomassa do *C. tomentosum* ser selvagem ou proveniente do sistema IMTA tem alguma influência nas referidas capacidades.

Para tal, procedeu-se com a recolha, no campo, da biomassa do *C. tomentosum*, que foi devidamente acondicionada e posteriormente separada, uma parte para congelar, de modo a manter as qualidades do campo, e a outra parte colocada num sistema de cultivo.

A partir da biomassa adquirida pelos processos anteriores (selvagem vs. IMTA) foram obtidos os extratos brutos, os quais foram testados quanto às suas capacidades biológicas já aqui referidas.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Amostragem

2.1.1 – Local de Amostragem

O local de amostragem escolhido para se proceder à recolha da macroalga em estudo foi a praia da Aguda (Figura 5).

A praia da Aguda é conhecida pela sua pesca artesanal, baseada em métodos transmitidos de gerações em gerações. A grande extensão desta praia faz fronteira com uma linda paisagem natural de dunas e vegetação (Pereira,2008: MACOI). Nesta praia, na Freguesia de Arcozelo, a Câmara Municipal de Vila Nova de Gaia realizou um projeto para o Norte do país, a Estação Litoral da Aguda, “ELA” (Pereira, 2004).

O local de colheita possui um substrato rochoso, de inclinação pouco acentuada e muito exposto à ondulação (Pereira, 2004).

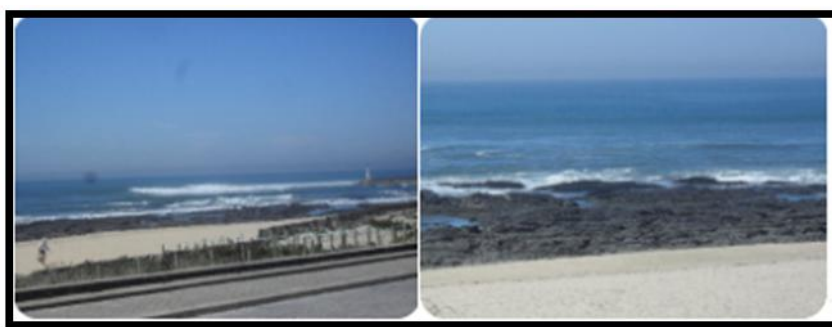


Figura 5 – Fotografias do local de amostragem, a praia da Aguda

2.1.2 – Tratamento e Transporte da Amostra

Os exemplares, pertencentes à espécie *Codium tomentosum*, foram cuidadosamente colhidos com o auxílio de uma faca, de modo a removê-los inteiros do substrato onde estão fixos. Deve-se dar uma primeira limpeza da alga, se possível ainda no próprio local de colheita, de forma a libertar toda a fauna, flora/epífitas de maiores dimensões e algum substrato que possam ter ficado aderidas à alga.

A biomassa recolhida foi armazenada e transportada húmida, dentro de sacos, devidamente identificados com o nome da alga e colocados no interior de uma arca isotérmica, para manter as condições em que a alga foi recolhida.

Ao chegar ao laboratório, os exemplares foram bem identificados e lavados com água do mar, trazida do local de colheita.

Império: Eukaryota

Reino: Plantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Bryopsidales

Família: Codiaceae

Género: *Codium* Stackhouse

Espécie: *Codium tomentosum* Stackhouse



Figura 6 – Fotografia de um exemplar de *Codium tomentosum* Stackhouse e sua classificação taxonómica (Guiry & Guiry, 2013)

Posteriormente, o total de biomassa recolhida foi dividido em duas porções. Uma das porções foi congelada, funcionando como “amostra selvagem”, pois mantém as condições de campo. A outra porção vai funcionar como “biomassa”, a partir da qual se iniciou o cultivo em sistema IMTA e em laboratório.

2.2 – Aquacultura de *Codium tomentosum*

2.2.1 – Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)

A aquacultura do *C. tomentosum* foi em “Batch culture”, isto é, um sistema de cultura fechado, em que o volume de água é fixo, bem como os nutrientes. Assim, antes de colocar a biomassa a cultivar foi preciso efetuar a montagem do sistema, ou seja, montagem dos recipientes, do arejamento (Figura 7A), e a colocação do volume de água fixo, procedente da aquacultura de peixes, ou seja, água da Ria, previamente filtrada. Para evitar o consumo dos nutrientes disponíveis para o crescimento da alga, efetuou-se mudanças de água proveniente da Ria de 2 em 2 dias.

Com o sistema já montado, selecionou-se a biomassa com maior potencial de reprodução vegetativa (Figura 7B) e colocou-se nos devidos recipientes (4/3 réplicas), em cultivo (Figura 7C). Foram testadas duas densidades de cultivo diferentes ($7 \text{ Kg/m}^2 = 41.13 \text{ g/L}$ e $1.7 \text{ Kg/m}^2 = 10 \text{ g/L}$). Sendo que, a concentração que apresentar maior taxa de crescimento e de produtividade, foi depois testada em duas alturas diferentes do ano (Outono e Primavera).



Figura 7 – Etapas do cultivo de *C. tomentosum*. A: Montagem do sistema de cultivo. B: Seleção da biomassa com maior potencial reprodutivo; C: Cultivo da biomassa

A taxa de crescimento (RGR) foi obtida através da seguinte fórmula:

$$(\text{LN (peso final)} - \text{LN (peso inicial)}) / \text{dias} * 100$$

A Produtividade, por sua vez, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$(\text{peso final} - \text{peso inicial}) * \% \text{ peso seco} / \text{área de cultivo} / \text{dias}$$

Para determinar se houve alguma alteração da água provinda da Ria ao longo do período de cultivo da macroalga, procedeu-se a uma monitorização (três vezes por dia) da temperatura (°C), do pH e da salinidade (‰), utilizando um medidor multiparamétrico digital duplo canal HQ 40D (uma sonda para o pH e outra para a condutividade) (Figura 8), e da intensidade luminosa (μE) imediatamente abaixo da coluna da água (intensidade luminosa que atinge a coluna da água, ou seja, a luz que está disponível para ser utilizada pelas algas), utilizando um sensor MQ-200 *Quantum Separate Sensor with Handheld Meter*. O crescimento da biomassa foi controlado uma vez por semana, e caso houvesse aumento de peso, procedia-se à remoção de biomassa até repor o seu peso inicial. A biomassa excedente foi congelada para posterior análise.



Figura 8 – Monitorização da temperatura (°C), do pH e da salinidade (‰)

2.2.2 – Aquacultura de Laboratório

Realizaram-se duas experiências de laboratório, a fim de se verificar quais as melhores condições para o cultivo do *C. tomentosum*. Em ambas as experiências a densidade de cultivo foi igual (4 g/L), bem como o fotoperíodo (16:8), a temperatura da câmara (15 °C), a salinidade (36-37‰) e a intensidade luminosa (μE). Apenas o pH não foi controlado, tendo sido monitorizado aquando da mudança do meio de cultura (a cada 3 dias). O pH foi medido imediatamente após a introdução das algas no meio novo (t0) e antes da remoção das algas para mudança do meio (t3).

A diferença nas experiências residiu no meio de cultura utilizado: na primeira experiência utilizou-se meio f/2, adicionado depois à água da Ria autoclavada; na segunda experiência recorreu-se ao meio VSE, que foi depois adicionado à água do mar autoclavada. Em ambas monitorizou-se o pH (Figura 9), e procedeu-se à medição semanal da taxa de crescimento, da produtividade, assim como à mudança do meio a cada 3 dias, nas 3/4 réplicas testadas. Para a avaliação da taxa de crescimento (RGR) aplicou-se a fórmula descrita acima e para o cálculo da Produtividade semanal aplicou-se a fórmula seguinte:

$$(\text{peso final} - \text{peso inicial}) * \% \text{ peso seco} / \text{volume} / \text{dias}$$

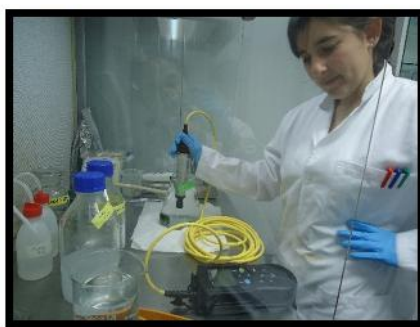


Figura 9 – Monitorização do pH

Antes de iniciar o cultivo propriamente dito, procedeu-se à montagem de todo o sistema, isto é, à desinfecção da estante que serviu de apoio aos matrizes de cultivo, preparação do sistema de arejamento (Figura 10A) e definição do local onde se situariam os matrizes, de modo a garantir que todos ficavam sujeitos à mesma intensidade luminosa.

O passo que se seguiu foi o da filtragem da água salgada (tanto a proveniente da Ria, como a do mar), com o auxílio de uma bomba de vácuo (Figura 10B). A água filtrada foi depois autoclavada.



Figura 10 – Início da aquicultura de laboratório. A: Montagem do sistema de arejamento; B: Filtração, sob vácuo, da água da Ria/ do mar

Foram também preparados previamente os meios de cultivo a usar na experiência. Na primeira experiência, o meio f/2 (Anexo II) e na segunda o meio VSE (Anexo III), ambos preparados a partir das respectivas soluções *stock*.

Com todos os procedimentos preliminares já prontos, deu-se início ao cultivo da macroalga em estudo. Para isso, lavou-se bem a biomassa, em água salgada autoclavada, à qual se seguiu a imersão numa solução a 10% de Betadine ou em água doce durante 20 segundos (Figura 11A), voltou-se a passar de novo a biomassa pela água salgada autoclavada limpa (2 ou 3 vezes) (Figura 11B), removendo-se o excesso de água com papel, pesando-se a biomassa correspondente ao início da experiência (Figura 11C) e, por último, colocando-se a alga nos matrizes já com o meio de cultivo e água salgada (Figura 11D). Todas estas foram executadas em câmara de fluxo laminar, de modo a evitar contaminações.

Os matrizes foram então colocados no interior da câmara de cultura, e a ligação com o sistema de arejamento foi conseguida. A partir desse momento, o *C. tomentosum* ficou em cultivo (Figura12).

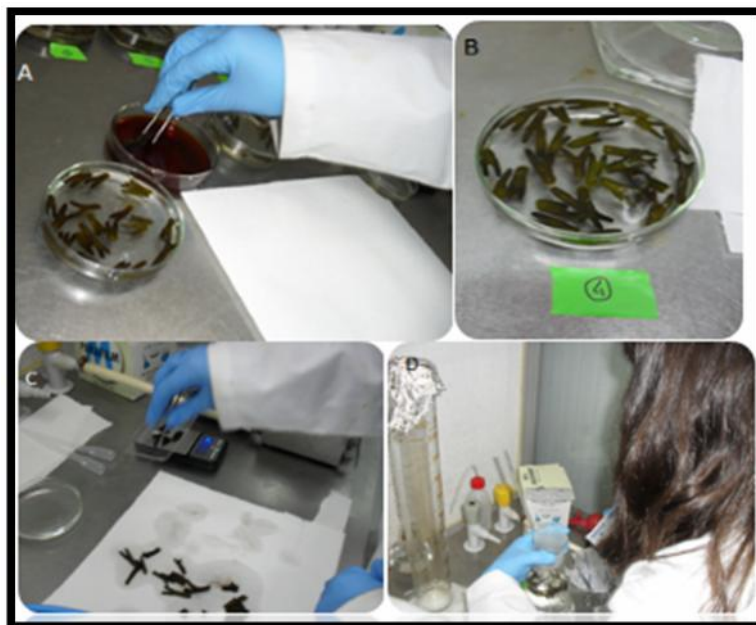


Figura 11 – Tratamento da biomassa. A: imersão na solução a 10% de Betadine; B: imersão em água salgada autoclavada; C: Remoção do excesso de água e pesagem; D: Colocação da biomassa no matraz de cultivo

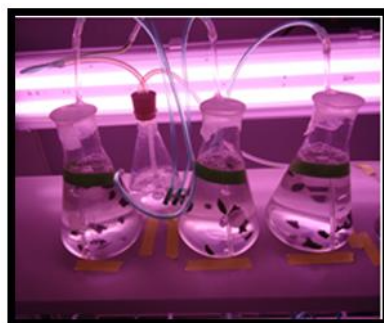


Figura 12 – Fotografia do cultivo de *C. tomentosum* em laboratório

2.3 – Obtenção dos extratos algais

As amostras de *Codium tomentosum* que se usaram na elaboração dos extratos foram a “amostra selvagem” e a “amostra proveniente da aquacultura multitrófica integrada” (experiência com $1.7 \text{ Kg/m}^2 = 10 \text{ g/L}$, elaborada no Outono).

O procedimento adotado para esta etapa do trabalho foi desenvolvido numa tentativa de rentabilizar ao máximo o conteúdo das algas para a posterior avaliação do seu potencial bioativo. Além disso, foi adotado por permitir a recuperação dos solventes utilizados, o que em termos industriais é um aspeto de grande relevância.

Numa primeira fase, as amostras foram liofilizadas e posteriormente moídas com o auxílio de um moinho (Figura 13A). Após isto, as amostras foram armazenadas até à sua utilização, num frasco com tampa, selado com *parafilme*, e posteriormente coberto com papel de alumínio, de modo a proteger da luz (Figura 13B).



Figura 13 – Moagem e armazenamento das amostras liofilizadas. A: Moagem; B: Armazenamento

Depois foram pesadas 8 g de cada amostra utilizadas depois nos processos da extração.

De um modo geral, foram feitas 4 extrações diferentes que, por sua vez, originaram 4 extratos diferentes. Assim, numa primeira etapa foi feita uma extração em hexano, seguida de uma em metanol, uma aquosa a elevadas temperaturas e, por fim, uma precipitação com etanol. É de referir que as extrações não foram isoladas, pois não foram preparadas amostras diferentes para cada uma das extrações. Foi sim um procedimento de extração sequencial, em que as amostras utilizadas foram sempre as mesmas, desde o início ao fim do processo.

2.3.1 – Extração em hexano

Dando início ao processo, foram adicionados 160 mL de hexano a cada 8 g de amostra (proporção de 1:20) num gobelé, o qual se manteve em agitação à temperatura ambiente durante 20 minutos (Figura 14A). Findo esse tempo, deixou-se repousar um pouco antes de se iniciar a sua filtração. Foi usada uma filtração a vácuo, recorrendo ao auxílio de filtros de sílica em funil com porosidade G3 acoplados em *quitasatos* (Figura 14B). De um modo resumido, sob vácuo, o preparado do gobelé foi vertido para o filtro, o solvente foi recuperado no *quitasato*, ficando a amostra seca retida no filtro de sílica, podendo ser usada para as etapas seguintes da extração. O solvente recuperado no *quitasato* foi transferido para um balão *Erlenmeyer*, devidamente identificado e tapado com uma rolha e papel de alumínio, para garantir que não haveria perda de material (Figura 14C), sendo de seguida armazenado num frigorífico. A amostra seca retida no filtro foi de seguida recuperada de novo para o gobelé, ao qual se adicionaram mais 160 mL de hexano, sendo submetido a agitação durante 20 minutos à qual se seguiu nova etapa de extração.

Este processo foi repetido até a solução de hexano ficar translúcida. No início da extração a solução apresentava uma forte coloração amarela e, após sucessivas extrações com o mesmo solvente, a solução foi ficando mais translúcida.

Finalmente, o total da solução de hexano que foi reservado ao longo do procedimento foi concentrado para volumes muito mais baixos (cerca de 12 mL), com o auxílio do evaporador rotativo (vácuo por tromba de água e banho a 37-40°C) (Figura 14D). O pequeno volume da solução obtida no final deste processo passou a ser o nosso extrato de hexano, que se encontra suspenso em hexano e foi conservado no frigorífico.

2.3.2 – Extração em metanol

Seguidamente executou-se o mesmo método usado para o hexano. Adicionaram-se 160 mL de metanol à amostra seca proveniente da extração anterior (proporção de 1:20) num gobelé, o qual se manteve em agitação durante 20 minutos. Seguiu-se uma filtração sob vácuo, com o auxílio de filtros de sílica em funil com porosidade G3 acoplados em *quitasatos*. O solvente recuperado no *quitasato* foi para

outro balão *Erlenmeyer* devidamente identificado. Repetiu-se o processo até à obtenção de uma solução translúcida.

A amostra seguiu para a próxima etapa da extração e a solução de metanol obtida foi, igualmente, concentrada no evaporador rotativo, como no procedimento anterior, onde se atingiu um volume de 25 mL. Esta solução muito mais concentrada passou a ser o extrato metanólico, suspenso em metanol. O extrato metanólico foi depois passado para água destilada recorrendo, novamente, ao evaporador rotativo. Esta técnica consistiu na adição da água destilada na proporção de 1:1. Como o metanol é mais volátil (evapora mais rapidamente que a água), vai sendo substituído pela água até que deixa de estar presente na solução. O extrato metanólico ficou suspenso em água destilada, tendo sido depois armazenado num frigorífico.



Figura 14 – Etapas do método de extração. A: extração em solvente orgânico; B: filtração a vácuo (filtro de sílica em funil de porosidade G3 acoplados a *quitasato*); C: armazenamento do extrato num balão *Erlenmeyer*; D: evaporador rotativo (concentração de soluções ou separação de solventes por evaporação); E: extração aquosa (100°C, 2h); F: filtração a vácuo (funil de louça/cerâmica, coberto com um pano, acoplado a um *quitasato*); G: Secagem dos polissacarídeos à temperatura ambiente

2.3.3 – Extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos

A etapa que se seguiu foi a aquosa. Nesta etapa foram medidos 800 mL de água destilada (proporção de 1:100) para um balão de 2 L. O balão foi colocado numa placa de aquecimento, até que a água destilada atingisse a temperatura de 100°C. Após se atingir essa temperatura foi adicionada a amostra, ocorrendo a extração aquosa a 100°C durante 2 horas (Figura 14E).

Findo esse tempo, deixou-se arrefecer a solução, ficando esta num frigorífico “*overnight*”, para que ocorresse sedimentação da amostra/partículas. No dia seguinte procedeu-se com uma filtração. A filtração a vácuo foi conseguida com o auxílio de um funil de louça/cerâmica, coberto com um pano (funcionou como um filtro), acoplado a um *quitasato*. O pano foi substituído ao longo da filtragem evitando a sua saturação (Figura 14F). O resíduo que ficou retido no pano foi descartado, uma vez que esta etapa foi a última do processo da extração. Passou-se, assim, a trabalhar apenas com a solução aquosa que foi recuperada no *quitasato*. Como a solução aquosa é rica em polissacarídeos, estes têm que ser extraídos por precipitação alcoólica com recurso a etanol. Porém, antes dessa precipitação, foi necessário concentrar a solução aquosa no evaporador rotativo (vácuo por tromba de água e banho a 50°C) até atingir cerca de 1/10 do volume inicial, de forma a diminuir a quantidade de etanol (96-100%) a usar. Depois da sua concentração, o volume da solução aquosa foi medido para se saber qual a quantidade exata de etanol a adicionar (proporção de 1:1).

O etanol foi adicionado à solução aquosa num gobelé, verificando-se logo a precipitação dos polissacarídeos (resíduos esbranquiçados). Passou-se a ter duas fases, uma fase líquida (solução aquosa + etanol) e uma fase sólida em suspensão (polissacarídeos). Com o auxílio de uma espátula ou de uma vareta de vidro tentou-se aglomerar e retirar a máxima quantidade de polissacarídeos para um novo gobelé. O restante conteúdo da solução foi filtrado a vácuo com o auxílio de um funil de louça/cerâmica, coberto com um pano, acoplado a um *quitasato*, recuperando alguns polissacarídeos que ainda se encontravam na solução aquosa. Aos polissacarídeos recuperados no gobelé adicionou-se etanol até que todos ficaram submersos, colocando-se depois num frigorífico, onde ficaram por 24 horas. Posteriormente, descartou-se o etanol e os polissacarídeos ficaram a secar à temperatura ambiente, para

pesagem (Figura 14G). Os polissacarídeos passaram a ser o extrato obtido pela precipitação alcoólica.

A solução líquida que se encontrava no gobelé, uma mistura da solução aquosa recuperada no *quitasato* com etanol, foi concentrada no evaporador rotativo (vácuo por tromba de água e banho a 37-40°C), de modo a recuperar o etanol, separando-o na sua totalidade da solução aquosa. Após a evaporação total do etanol, prosseguiu-se com a concentração da solução aquosa até atingir 1/3 do seu volume inicial. Este concentrado passou a ser o extrato aquoso e foi armazenado num frigorífico.

Os extratos que se encontravam suspensos em água (extratos metanólicos e aquosos) foram depois liofilizados. Todos os extratos, exceto os de hexano, foram conservados em frascos devidamente identificados e selados, evitando a reidratação dos mesmos, e posteriormente armazenados dentro de um exsiccador, com sílica gel (Figura 15A). Os extratos em hexano foram novamente concentrados, mas com ajuda de azoto líquido (Figura 15B), posteriormente secos numa estufa sob vácuo (30°C e pressão a 200 mb = 0,197 atm) e armazenados num congelador.



Figura 15 – Etapas de conservação dos extratos. A: extratos liofilizados são armazenados num exsiccador, no interior de frascos devidamente identificados e selados; B: extratos de hexano foram concentrados com o auxílio de azoto líquido

2.4 – Ensaio Antioxidantes

A capacidade antioxidante foi determinada através da Quantificação Total de Compostos Fenólicos e através da avaliação da capacidade de redução do radical DPPH) e do radical NO.

Os extratos utilizados para os ensaios antioxidantes foram os extratos metanólicos e aquosos das duas amostras em estudo, a amostra selvagem e a amostra proveniente de IMTA. Em todos os ensaios antioxidantes as concentrações dos extratos foram uma constante. As concentrações desses extratos, tendo por base outros estudos já realizados neste sentido, foram 20 mg/mL e 25 mg/mL para os extratos metanólicos e aquosos, respetivamente.

2.4.1 – Quantidade Total de Compostos Fenólicos – Teste *Folin*

A quantidade Total de Compostos Fenólicos foi avaliada utilizando o reagente *Folin*. Este método envolveu a redução do reagente (coloração amarela) pelos compostos fenólicos dos extratos, com formação de um complexo azul.

Num tubo de ensaio adicionaram-se 1 580 µL de água destilada, 20 µL de extrato (os extratos metanólicos foram dissolvidos em metanol e os extratos aquosos em água destilada) e 100 µL do reagente *Folin*. Após 2 minutos adicionaram-se 300 µL de carbonato de sódio, Na₂CO₃. Um teste em branco foi conduzido nas mesmas condições, de modo que foram usados 2 000 µL de água destilada em substituição do extrato. As amostras, protegidas com papel de alumínio, foram colocadas num banho a 40°C por 30 minutos (Figura 16A). Findo esse tempo, procedeu-se com a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 765 nm, num espectrofotómetro UV-VIS (Figura 16B).

O ácido gálico foi usado como padrão para a curva de calibração. Foram precisas duas curvas de calibração diferentes, consoante se tratava dos extratos metanólicos ou aquosos (Anexo IV). A Quantidade Total de Compostos Fenólicos foi expressa em microgramas de equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato (µg EAG/mg extrato). Todos os extratos, de ambas as amostras, foram analisados em duplicado, em três ensaios independentes.

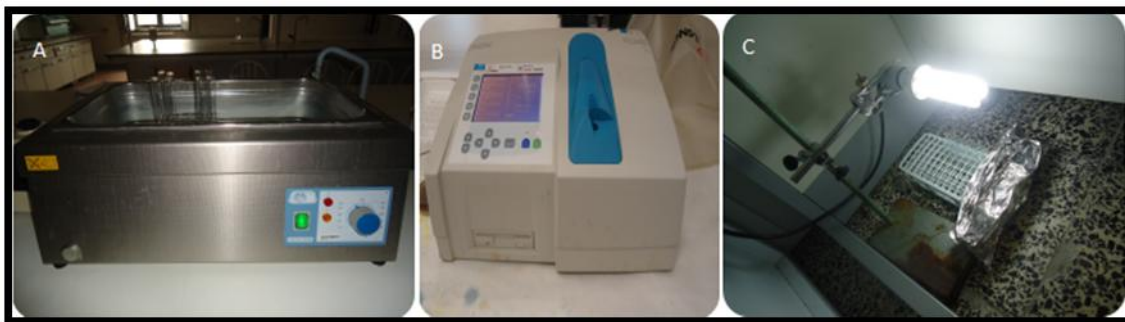


Figura 16 – Etapas dos ensaios antioxidante. A: banho a 40°C por 30 minutos; B: espectrofotômetro UV-VIS; C: tubos de ensaio incubados sob uma lâmpada fluorescente (ensaio “NO Scavenging”)

2.4.2 – Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

O radical DPPH é um radical estável e é usado enquanto método químico e rápido para determinar o potencial de neutralização de radicais livres através de ensaios laboratoriais. O método baseia-se na redução do radical DPPH (roxo) na sua hidrazina correspondente (amarela), através da sua reação com doadores de hidrogénio (RH) ou outros radicais (A*) (Brand-Williams et al., 1995). A redução do radical para a sua hidrazina é caracterizada pela mudança de cor da solução de roxo para amarelo.

Previamente preparou-se a solução de DPPH com metanol (concentração de 30 µg/mL). Depois, num tubo de ensaio adicionaram-se 100 µL de extrato e 1.9 mL de DPPH, indo ao vórtex para homogeneizar. Um teste em branco foi conduzido nas mesmas condições, de modo que foram usados 100 µL de água destilada em substituição do extrato. Incubaram-se os tubos de ensaio durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente, e após isso leu-se a absorvância a um comprimento de onda de 517 nm, num espectrofotômetro UV-VIS, usando metanol para a calibração do mesmo. Todas as amostras foram analisadas em duplicado, em três ensaios independentes.

A capacidade de redução do radical DPPH foi calculada pela seguinte equação, baseada na equação de Yen & Duh, 1994:

$$\% \text{ Redução} = [(Abs \text{ extrato} - Abs \text{ branco}) / Abs \text{ branco}] * 100$$

2.4.3 – Avaliação da capacidade de redução do radical NO (“NO Scavenging”)

O óxido nítrico é gerado a partir do Nitroprussiato de Sódio (*Sodium Nitroprusside*) e é detetado pela reação de *Griess*. O Nitroprussiato de Sódio em solução aquosa, a pH fisiológico, gera espontaneamente NO, que interage com o oxigénio para produzir iões nitrito que podem ser estimados pela utilização do reagente de *Griess*. Eliminadores do NO competem com o oxigénio conduzindo a uma redução da produção do NO (Jagetia et al., 2004).

A primeira etapa deste processo foi a preparação dos reagentes a utilizar ao longo do ensaio. O Tampão Fosfato de Potássio (100 mM) preparou-se solubilizando 13.61 g de fosfato de potássio em 800 mL de água destilada, ajustando depois o pH para 7.4 e, por fim, transferiu-se a solução para um frasco volumétrico e fez-se o volume até 1L. A preparação do Nitroprussiato de Sódio, SNP, (20 mM) ocorreu solubilizando 0.010 g de SNP em 10 mL de Tampão Fosfato de Potássio. Por sua vez, o Reagente de *Griess* foi preparado solubilizando 0.1 g de Sulfanilamida e 0.01 g de Dicloridrato N- (1-naftil) etilenodiamina em 10 mL de ácido fosfórico a 2%, sendo depois agitado vigorosamente e protegido da luz. Também os extratos a testar tiveram que ser preparados. Para isso, solubilizou-se 20 e 25 mg de extrato metanólico e aquoso, respetivamente, em 1 mL de Tampão Fosfato de Potássio.

O ensaio foi realizado para 6 diluições diferentes, sendo estas feitas diretamente na solução final do ensaio. Para isso, foram pipetados 10, 25, 50, 100, 150, e 200 μ L de extrato a testar para tubos de ensaio, para um volume total de 600 μ L cada. Foi com base nestas diferentes diluições que se determinou o IC_{50} , ou seja, os valores de concentração de inibição de 50% da atividade. Também foram pipetados os mesmos volumes de extrato para outros tubos de ensaio, funcionando como o controlo da cor das respetivas diluições dos extratos. Preparou-se igualmente um branco, para calibrar o espectrofotómetro, e um controlo (Tabela II).

Tabela II – Representação do volume (μL) de cada reagente a ser adicionado aos tubos de ensaio. B: branco; C: controle; 1, 2, 3, 4, 5, e 6: tubos de ensaio onde se procedeu ao ensaio com as diferentes diluições dos extratos; 1', 2', 3', 4', 5' e 6': tubos de ensaio onde se procedeu com o controle da cor das respectivas diluições dos extratos

| | B | C | 1 | 1' | 2 | 2' | 3 | 3' | 4 | 4' | 5 | 5' | 6 | 6' |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tampão | 200 | 200 | 190 | 190 | 175 | 175 | 150 | 150 | 100 | 100 | 50 | 50 | 0 | 0 |
| Extrato | 0 | 0 | 10 | 10 | 25 | 25 | 50 | 50 | 100 | 100 | 150 | 150 | 200 | 200 |
| SNP | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |

Estando todas as soluções preparadas, nos respectivos tubos de ensaio, foram incubadas sob uma lâmpada fluorescente durante 30 minutos (Figura 16C).

Findo esse tempo, adicionaram-se 200 μL do Reagente de *Griess* aos tubos de ensaio que continham os extratos (ou seja, 1, 2, 3, 4, 5, e 6) e ao controle. Aos restantes tubos de ensaio (ou seja, 1', 2', 3', 4', 5' e 6') e ao branco adicionaram-se 200 μL de ácido fosfórico a 2%. Seguiu-se a incubação no escuro durante 10 minutos, antes de se recorrer ao espectrofotômetro para a leitura da absorvância a 562 nm. Todos os extratos, de ambas as amostras, foram analisados em duplicado, em três ensaios independentes.

A capacidade de redução do radical NO foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução} = [(Abs \text{ controle} - (Abs \text{ extrato} - Abs \text{ controle da cor})) / Abs \text{ controle}]$$

* 100

2.5 – Ensaio Anti-inflamatórios

A capacidade anti-inflamatória foi determinada *in vitro*, utilizando-se células de ratinho denominadas RAW 264.7 (macrófagos). Estas células foram mantidas em cultura, usando o meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado

com 10 % de Soro Bovino Fetal (SBF) não inativado. Neste ensaio, além da determinação dos nitritos produzidos no meio de cultura das células RAW 264.7, também se determinou a sua viabilidade celular.

Todo o ensaio foi elaborado na sala de cultura celular, numa câmara de fluxo laminar, num ambiente altamente estéril, de modo a evitar contaminações.

As concentrações a testar, tratando-se dum ensaio envolvendo células, foram diferentes das usadas para os ensaios antioxidantes. Ambos os extratos foram testados para quatro concentrações diferentes, obtidas por diluições sucessivas, partindo da concentração inicial. No que diz respeito aos extratos metanólicos, as concentrações testadas foram 5, 2.5, 1.25 e 0.625 mg/mL, correspondendo às concentrações em cada poço de 250, 125, 62.5 e 31.25 µg/mL, respetivamente. A concentração inicial (5 mg/mL) foi preparada solubilizando 5 mg de extrato metanólico em 2% de DMSO (Sulfóxido de Dimetilo) e adicionando PBS (Tampão Salino-Fosfato) até perfazer 1 mL. Relativamente aos extratos aquosos, as respetivas concentrações foram 10, 5, 2.5 e 1.25 mg/mL, correspondendo às concentrações em cada poço de 500, 250, 125 e 62.5 µg/mL, respetivamente. A concentração inicial foi preparada solubilizando 10 mg de extrato aquoso em 1 mL de PBS.

2.5.1 – Cultura de células RAW 264.7 na presença dos extratos e do LPS

Este ensaio iniciou-se com a observação das células RAW 264.7, nas placas de cultura, ao microscópico ótico, a fim de se verificar o estado das mesmas (existência de contaminações ou grande número de células mortas). De seguida, retirou-se o meio DMEM no qual as células se encontravam em cultura, com o auxílio de uma pipeta volumétrica estéril, e descartou-se. Adicionaram-se cerca de 10 mL de meio DMEM novo (à temperatura de 37°C) e, com a ajuda de um raspador, raspou-se cuidadosamente a superfície da placa de cultura, de modo a desagregar e soltar as células aderidas à placa.

Seguidamente, as células RAW 264.7 foram semeadas numa placa estéril de 48 poços durante cerca de 18 horas, ficando a incubar a 37°C. Foram necessários 46 poços, em que 36 deles foram preenchidos com células em cultura (Figura 17). Para isso, e como cada poço tinha que ter $0.3 \cdot 10^6$ células (valor padrão), foi necessário determinar

qual o volume de meio com células a adicionar a cada poço, de modo a que cada um tivesse um volume final de 600 μ L.

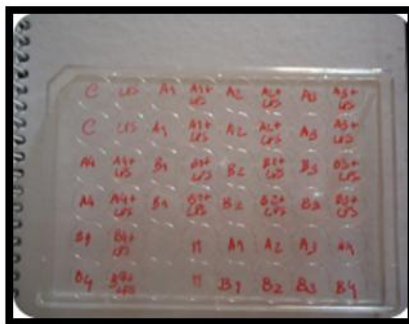


Figura 17 – Exemplo de uma tampa da placa de cultura com os poços devidamente marcados

Findo o tempo de incubação das células na nova placa estéril, voltou-se a observar as células ao microscópio ótico, com o intuito de detetar alguma contaminação. Seguiu-se a aspiração do “meio velho”, aspirando-se apenas o líquido, sem tocar no fundo da placa, não danificando as células, e a adição de novo meio DMEM, num volume de 600 μ L nos poços referentes ao Controlo, ao LPS (estimulador da produção de NO). Os poços restantes foram preenchidos com 570 μ L de meio novo DMEM. Esta fase de adição do meio tem que ser relativamente rápida, para que as células estejam o mínimo tempo possível sem líquido.

Adicionaram-se 30 μ L de extrato (cada concentração em duplicado) aos poços que apenas tinham 570 μ L de meio DMEM, tanto aos poços que tinham células como aos poços do controlo dos extratos (poços sem células). As células foram a pré-incubar a 37°C durante 1 hora. Por fim, as células foram novamente a incubar, durante 24 horas, com 2 μ L de LPS (300 μ g/mL).

Este tempo de incubação das células na presença dos extratos metanólicos e aquosos, bem como do LPS, permitiu determinar a produção dos nitritos no meio de cultura, auxiliando na perceção do modo como os extratos influenciam a produção de

nitritos pelas células RAW 264.7. A viabilidade celular foi outro parâmetro determinado neste ensaio, detetando se os extratos a testar são tóxicos para as células.

2.5.2 – Determinação da produção de nitritos

Os nitritos acumulados no meio de cultura foram medidos com base no Reagente de *Griess* (composição já referida anteriormente nos ensaios antioxidantes), que é considerado um indicativo da produção do NO (Kim, Yang et al., 2013).

Para uma placa não estéril e com tampa, pipetaram-se 170 µL do Reagente de *Griess*, previamente preparado, para 46 poços. Após se retirar a placa com as células em cultura da incubadora, adicionaram-se 170 µL do sobrenadante de cada poço, sem tocar no fundo para não danificar as células, ao Reagente de *Griess* na nova placa. Aguardaram-se 30 minutos, sempre com a placa ao abrigo da luz, evitando que esta interferisse na reação. Findo esse tempo, leu-se a absorvância a 550 nm num leitor de microplacas. A concentração de nitritos foi determinada com base na curva padrão de calibração do nitrito de sódio (NaNO₂) (Anexo V).

2.5.3 – Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada com base no método de Mosmann (1983), utilizando MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este método implica a conversão do MTT, um pigmento amarelo e hidrossolúvel, em formazano que é insolúvel e de cor roxa. Para esta conversão ocorrer é necessária a redução do MTT que ocorre na presença do H⁺, proveniente do NADH das células vivas.

Numa primeira etapa, foram adicionados 30 µL de MTT apenas aos poços da placa estéril que continham células RAW 264.7 e colocou-se a placa na incubadora a 37°C durante 15 minutos.

A fase do processo que se seguiu foi toda elaborada no interior de um recipiente com gelo. Findo o tempo referido, retirou-se a placa da incubadora e, colocando a ponta da pipeta junto à parede do poço para não aspirar as células, aspirou-se todo o conteúdo

líquido dos poços. Seguidamente adicionaram-se 300 µL de Isopropanol Ácido, promovendo a dissolução dos cristais de formazano, permitindo que todo conteúdo dos poços seja transferido para uma placa não estéril com tampa, prosseguindo-se com a leitura da absorvância a 570 nm, com um comprimento de onda de referência de 620 nm.

A viabilidade celular foi, assim, avaliada por comparação da absorvância das células Controlo.

2.6 – Análise Estatística

Alguns dados obtidos, considerados relevantes, foram avaliados através da análise de variância com 1 fator (ANOVA de 1 via), seguido do teste de Tukey sempre que necessário. Assim, foram efetuados testes estatísticos para a aquacultura multitrófica integrada e para o ensaio do “NO Scavenging”, como objetivo de averiguar se as possíveis diferenças encontradas nos diferentes extratos das diferentes amostras em estudo serão significativas. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p < 0.05$).

Todas as análises foram realizadas no Statistica 7.

Capítulo 3 – Resultados

3 - RESULTADOS

3.1 – Aquacultura de *Codium tomentosum*

3.1.1 – Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)

Como descrito no capítulo anterior, foram realizadas três experiências de cultivo de *Codium tomentosum* no sistema de tanques da ALGAplus Lda., a partir daqui denominadas como preliminar (DC de 41.13 g/L), A (DC de 10 g/L, no Outono) e B (DC de 10 g/L, na Primavera).

Relativamente à monitorização dos fatores ambientais, como se pode ver pela análise das tabelas III e IV, os fatores com maior variação entre as experiências A e B foram a temperatura (valores entre 4.8°C e 13.8°C em A; valores entre 14.2°C e 23.0°C em B) e a intensidade de luz disponível para as algas (valores entre 2 µE e 131 µE em A; valores entre 32 µE e 831 µE em B). Em anexo são incluídos os valores detalhados para cada parâmetro (Anexo VI).

Como se pode ver pela Figura 18, a variação diária da luz, como o esperado, foi também diferente ao longo das semanas de cultivo e consoante a experiência, observando-se, para a experiência A um padrão geral de diminuição da intensidade luminosa ao longo do dia (Figura 18A), e para a experiência B um padrão geral de aumento da intensidade luminosa até às 14h (Figura 18B).



Figura 18 – Variação diária da intensidade luminosa. A: Padrão geral para a experiência A; B: Padrão geral para a experiência B

Capítulo 3 – Resultados

Tabela III – Condições de cultivo da experiência A (DC de 1.7 Kg/m² = 10 g/L) realizada no Outono: Temperatura (média ± SE), Salinidade (média ± SE), pH (média ± SE) e intensidade luminosa abaixo da coluna da água (média ± SE)

| Exp. A | | Semana 1 | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | Semana 5 |
|-----------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| T (°C) | Média | 11.4 ±0.27 | 9.8±0.20 | 9.27±0.34 | 11.1±0.34 | 11.7±0.21 |
| | Min-Max | 7.0-13.8 | 6.9-12.1 | 5.5-11.9 | 4.8-11.1 | 8.5-11.7 |
| Sal. (‰) | Média | 35.6±0.068 | 35.6±0.089 | 36.6±0.10 | 38.1±0.07 | 37.3±0.10 |
| | Min-Max | 34.6-36.5 | 34.6-36.9 | 35.4-37.9 | 36.8-39.4 | 35.1-37.9 |
| pH | Média | 8.27±0.009 | 8.29±0.007 | 8.11±0.15 | 8.28±0.00 | 8.33±0.03 |
| | Min-Max | 8.06-8.42 | 8.22-8.43 | 8.16-8.35 | 8.15-8.28 | 8.21-8.82 |
| Luz (μE) | Média | 51±5.60 | 44.6±3.94 | 38.8±3.76 | 32.5±3.48 | 35.9±4.19 |
| | Min-Max | 2-131 | 2-81 | 2-78 | 2-81 | 2-85 |

Tabela IV – Condições de cultivo da experiência B (DC inicial de 1.49 Kg/m² = 8.73 g/L) realizada na Primavera: Temperatura (média ± SE), Salinidade (média ± SE), pH (média ± SE) e intensidade luminosa abaixo da coluna da água (média ± SE)

| Exp. B | | Semana 1 | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 |
|-----------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| T (°C) | Média | 20.18±0.57 | 16.77±0.36 | 18.88±0.50 | 18.18±0.26 |
| | Min-Max | 17.7-23.0 | 14.2-18.4 | 15.3-21.2 | 16.9-19.4 |
| Sal. (‰) | Média | 37.24±0.55 | 38.50±0.50 | 36.49±0.63 | 38.41±0.66 |
| | Min-Max | 34.7-40.6 | 36.0-42.0 | 34.1-42 | 36.2-41.6 |
| pH | Média | 8.48±0.037 | 8.22±0.013 | 8.30±0.017 | 8.26±0.010 |
| | Min-Max | 8.29-8.70 | 8.13-8.32 | 8.19-8.42 | 8.20-8.32 |
| Luz (μE) | Média | 373±39.61 | 352.72±59.24 | 424.67±52.53 | 259.67±52.68 |
| | Min-Max | 191-635 | 32-831 | 153-852 | 50-603 |

No decorrer da experiência preliminar foram ocorrendo perdas de peso da biomassa, juntamente com o crescimento de muitas epífitas, bem como o aparecimento de pequenos filamentos (semelhantes a pelos, pelos esses que no campo não eram visíveis) nos talos dos exemplares do *Codium tomentosum*. Foi notória a circulação pouco eficaz da biomassa sob estas condições experimentais. Estes aspetos foram confirmados aquando do cálculo das taxas de crescimento semanal e da produtividade semanal (Figura 19).

Após verificar que a densidade de cultivo escolhida para a experiência preliminar não foi a melhor escolha, avancei com a experiência A, em que a densidade de cultivo foi de 1.7 Kg/m² (= 10 g/L). E deveria ter sido também com esta densidade de cultivo que realizaria o cultivo do *C. tomentosum* na Primavera. Contudo, por falta de biomassa disponível, a experiência B foi iniciada com uma densidade de cultivo de 1.49 Kg/m² (= 8.73 g/L) e ao longo das semanas não ocorreu remoção da biomassa para repor o peso inicial, pelo que deu para estudar o comportamento da alga nas diferentes densidades de cultivo.

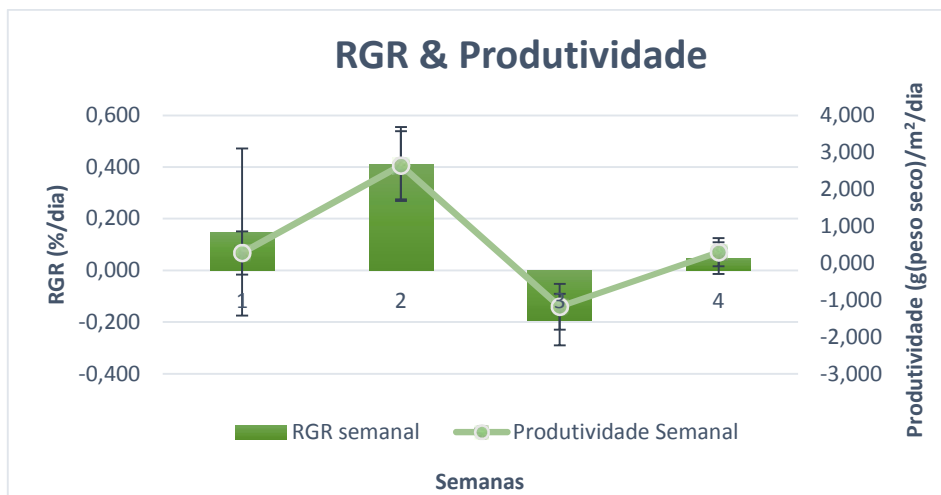


Figura 19 – Representação da variação a cada semana do RGR e da Produtividade (média ± SE) para a experiência preliminar

Além da monitorização das condições de cultivo, a monitorização do peso/crescimento da biomassa foi outra etapa importante, dado que permitiu determinar as novas taxas de crescimento semanal e a produtividade semanal para as duas experiências.

Na experiência A, com base nos resultados do RGR e da Produtividade (Figura 20), a escolha da densidade de cultivo foi mais aceitável que a escolhida na experiência preliminar de cultivo de *Codium tomentosum*, pois verificou-se que ao longo das semanas a biomassa não sofreu perda de peso nos tanques de cultivo, ocorrendo sempre crescimento da mesma, embora se tenha registado uma diminuição do RGR na semana 2, tendo recuperado nas semanas seguintes. Tanto para o RGR como para a Produtividade ao longo das semanas, as réplicas em estudo não revelaram diferenças significativas (Teste estatístico, Anova de 1 via, com valor de $p = 0.38114$ para o RGR e $p = 0.381288$ para a Produtividade), pelo que, a apresentação dos resultados finais em função das médias das 4 réplicas é aceitável. Na Figura 20 podemos constatar que a Produtividade e o RGR foram diretamente proporcionais.

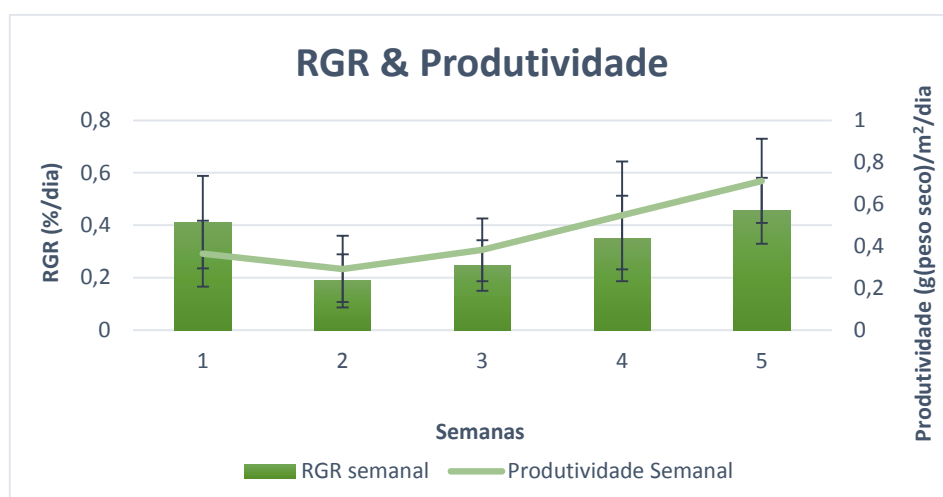


Figura 20 – Representação da variação em cada semana do RGR e da Produtividade (média \pm SE) para a experiência A

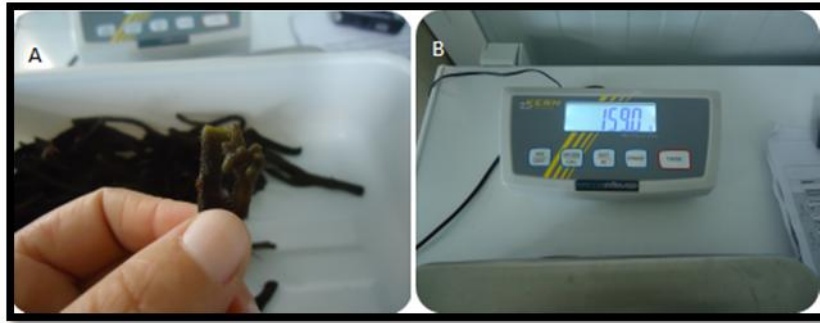


Figura 21 – Fotografias dos resultados obtidos na experiência A. A: Exemplar de *Codium tomentosum* onde se evidencia o crescimento deste; B: Peso obtido após uma semana de cultivo, partindo do peso inicial igual a 150 g

Na experiência B, apesar de serem testadas diferentes densidades de cultivo, por observação gráfica (Figura 22) não parece haver realmente uma diferença aparente entre as densidades de cultivo. Este fato foi confirmado por análise estatística (Teste estatístico, Anova de 1 via, com valor de $p = 0.083814$ para o RGR e $p = 0.048716$ para a Produtividade. Foi necessário realizar um teste de *Tukey*, afim de averiguar qual a réplica responsável pelas diferenças obtidas. Contudo, este teste revelou que não há diferenças! (Figura 23)).

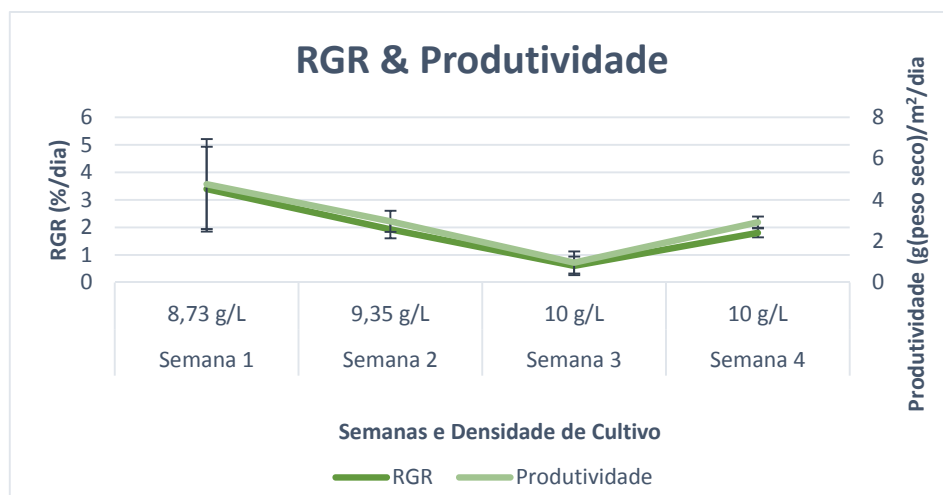


Figura 22 – Representação da variação a cada semana do RGR e da Produtividade (média \pm SE) para a experiência B

| Tukey HSD test; variable Prod (anova) | | | | |
|--|----|----------|----------|----------|
| Approximate Probabilities for Post Hoc Tests | | | | |
| Error: Between MS = 4,1941, df = 9,0000 | | | | |
| Cell No. | DC | {1} | {2} | {3} |
| 1 | A | 4,7673 | 2,9673 | 1,9477 |
| 2 | B | 0,551124 | 0,551124 | 0,181391 |
| 3 | C | 0,181391 | 0,767263 | 0,767263 |

Figura 23 – Print screen retirado do programa Statistica 7, onde mostra o resultado do teste de Tukey para a Produtividade

Assim, analisando o comportamento geral do *Codium tomentosum* na experiência B (Figura 20), podemos verificar que, apesar de não se ter verificado perda de biomassa em nenhuma semana de cultivo, nas primeiras semanas o RGR e a Produtividade foram diminuindo, conseguindo recuperar a partir da semana 3.

Analisando as Figuras 20 e 22, afim de saber qual das experiências A ou B demonstrou resultados de RGR e Produtividade mais promissores, para a mesma densidade de cultivo (10 g/L), verificou-se que a experiência B apresentando valores de RGR e de Produtividade superiores (Experiência B: RGR máximo = $1.804 \pm 0.16\%$ /dia e Produtividade máxima = 2.923 ± 0.271 g (peso seco) /m²/dia; Experiência A: RGR máximo = $0.455 \pm 0.13\%$ /dia e Produtividade máxima = 0.711 ± 0.201 g (peso seco) /m²/dia).

Em termos de médias, a experiência A registou valores de RGR de 0.31 ± 0.06 %/dia (excluindo a primeira semana, pois é a semana de aclimação) e de Produtividade de 0.48 ± 0.09 g (peso seco) /m²/dia. Por sua vez, a experiência B registou valores médios de RGR de 1.45 ± 0.42 %/dia (excluindo igualmente a primeira semana, pois é a semana de aclimação) e de Produtividade de 2.29 ± 0.66 g (peso seco) /m²/dia. Logo, a experiência B foi superior em 21% para o RGR e 21% para a Produtividade.

3.1.2 – Aquacultura de laboratório

Numa primeira experiência para o cultivo de *Codium tomentosum* realizada em laboratório, foi utilizado o meio de cultura f/2 juntamente com água da Ria autoclavada.

Esta experiência teve a duração de apenas 2 semanas, pois detetou-se que a biomassa estava a perder semanalmente peso, estava a ficar coberta por epífitas e o seu aspeto não era saudável (Figura 24). Assim, decidiu-se iniciar uma nova experiência utilizando igualmente o meio f/2, tendo este sido preparado de novo, e nova biomassa, que se encontrava num tanque de cultivo no exterior. As condições de cultivo foram iguais às registadas para a experiência anterior, e o pH igualmente monitorizado.

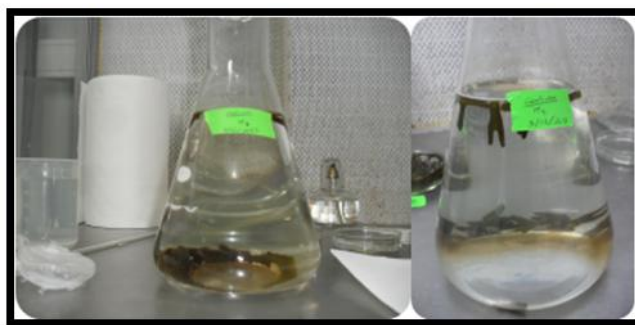


Figura 24 – Fotografias onde se evidencia o aspeto de *C. tomentosum* nos matrazes de cultivo

O pH apresentou valores sempre entre 7.6 e 8.6, nunca ultrapassando o valor de 9.

Tal como referido no capítulo anterior, foram determinadas as taxas de crescimento semanal (RGR) e de produtividade semanal para esta nova experiência utilizando o meio f/2 (Figura 25).

A outra experiência elaborada no laboratório diferiu da anterior apenas no referente ao meio de cultura utilizado. Nesta utilizou-se o meio VSE juntamente com água salgada autoclavada (em substituição da água da Ria autoclavada). A duração do cultivo foi de 4 semanas.

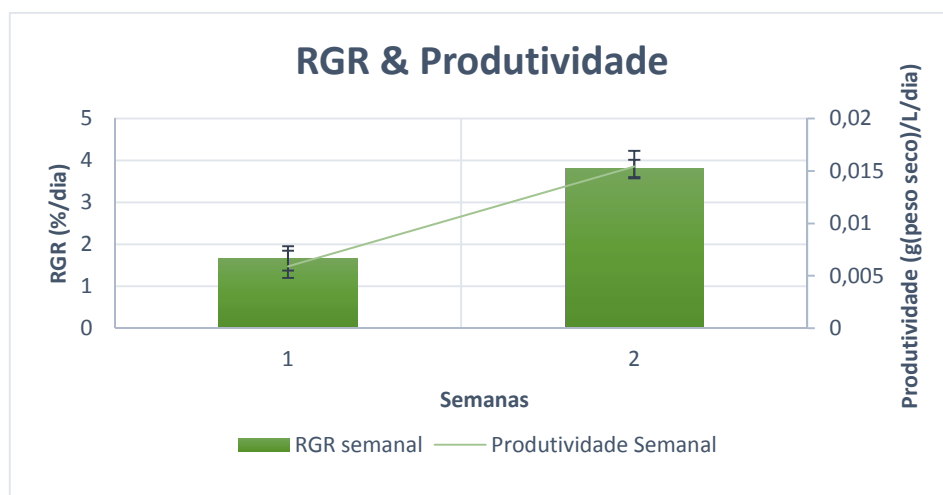


Figura 25 – Representação da variação em cada semana do RGR e da Produtividade (média \pm SE) para a experiência laboratorial (4 g/L)

Nesta experiência, utilizando o VSE, foram testadas várias densidades de cultivo (o peso inicial colocado em cada matraz foi de 4 g, e ao longo das várias semanas de cultivo nunca se removeu a biomassa de crescimento. Todas as semanas a densidade de cultivo nos matrizes foi diferente), pelo que foi possível a análise de qual a melhor para o cultivo do *Codium tomentosum*.

Também nesta experiência se verificou que o valor do pH nunca apresentou um valor superior a 9, variando entre 7.2 e 8.8.

Ao longo das semanas de cultivo observou-se crescimento da biomassa para todas as densidades de cultivo testadas.



Figura 26 – Fotografias de exemplares de *Codium tomentosum* após cultura em laboratório, onde se evidenciam estruturas de crescimento

A etapa que se seguiu foi o cálculo dos RGR e das Produtividades para as diferentes densidades de cultivo, a fim de averiguar qual a densidade de cultivo que melhor se adequa ao cultivo do *Codium tomentosum*.

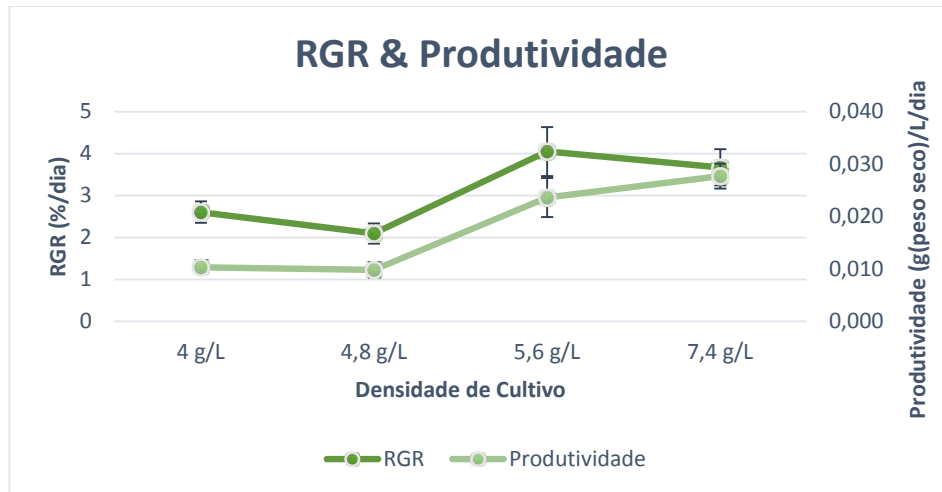


Figura 27 – Representação da variação do RGR e da Produtividade (média \pm SE) ao longo da experiência laboratorial, para as diferentes densidades de cultivo

Pela análise da figura acima podemos constatar que o *Codium tomentosum* teve a melhor performance de crescimento global (melhor relação entre RGR e Produtividade) quando cultivado a uma densidade de, aproximadamente, 7 g/L. O RGR estava perto de 3.8 %/dia, traduzido numa produção de biomassa perto de 0.028 g (peso seco) /L/dia. Contudo, tanto para o RGR como para a Produtividade ao longo das semanas, as várias densidades de cultivo testadas não revelaram diferenças significativas, apresentando ambas um valor de p superior a 0.05 (Teste estatístico, Anova de 1 via, com valor de p = 0.608428 para o RGR e p = 0.837071 para a Produtividade).

3.2 – Extratos algais obtidos e usados

Os extratos da amostra selvagem e da amostra proveniente de IMTA obtidos no final do procedimento de extração foram um extrato de hexano sólido, um extrato metanólico sólido liofilizado, um extrato aquoso sólido também liofilizado, e um extrato obtido pela precipitação alcoólica (polissacarídeos), para cada uma das amostras.

O fato dos referidos extratos terem sido liofilizados ou secos, como no caso dos extratos de hexano e dos polissacarídeos, permitiu o cálculo do rendimento de cada extração (Tabela V).

Tabela V – Determinação do Rendimento de cada extração realizada, para ambas as amostras de *Codium tomentosum* em estudo

| Rendimento das diferentes extrações, das duas amostras | <i>Codium tomentosum</i> | <i>Codium tomentosum</i> |
|--|--------------------------|--------------------------|
| | Selvagem | IMTA |
| Extração em Hexano | 1.47% | 1.14% |
| Extração em Metanol | 52.70% | 37.72% |
| Extração Aquosa | 2.41% | 5.13% |
| Precipitação dos Polissacarídeos | 3.63% | 3.25% |
| Σ total | 60.21% | 47.24% |

Verificou-se que apenas as extrações em metanol/metanólica e aquosa foram as que diferiram no seu rendimento consoante as amostras, sendo o rendimento da extração em metanol da amostra selvagem superior ao rendimento da mesma extração, mas da amostra de IMTA. O contrário ocorreu para extração aquosa.

Se analisarmos o somatório de todo o processo de extração, podemos verificar que a amostra selvagem apresentou um rendimento total superior (60.21%) ao da amostra de IMTA (47.24%).

Como já referido, apenas os extratos metanólicos e aquosos é que foram testados.

3.3 – Ensaio Antioxidantes

3.3.1 – Quantidade Total de Compostos Fenólicos – Teste *Folin*

A Quantificação Total de Compostos Fenólicos dos extratos metanólicos e aquosos das duas amostras de *C. tomentosum* foi realizada através do Teste *Folin*. Foram feitos três ensaios independentes, calculando-se as médias e os desvios padrão que nos permitiram obter os resultados finais, bem como uma noção da percentagem de erro associado (Tabela VI).

Através das médias calculadas em cima, foi possível determinar a quantidade total de compostos fenólicos para cada um dos extratos testados. Os resultados foram expressos em microgramas de equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato (μg EAG/mg extrato) (Figura 28).

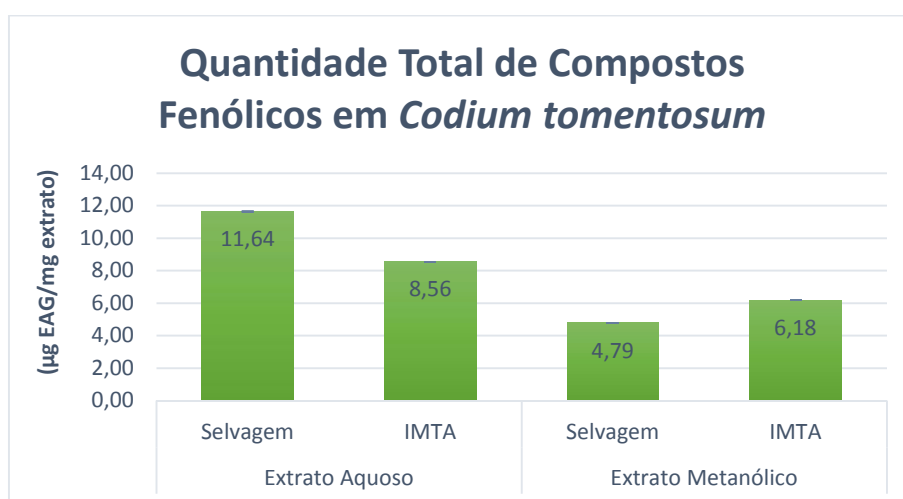


Figura 28 – Representação da Quantidade Total de Compostos Fenólicos (média \pm SE) nos diferentes extratos de *Codium tomentosum*

Tabela VI – Resultados da absorvância a 765 nm, em duplicado, para os três ensaios independentes, bem como as respetivas Médias, SD, Ideia da percentagem de erro e SE

| | N=1 | N=2 | N=3 | MÉDIA | SD | Ideia da % de erro | SE |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|--------|
| Extrato Aquoso Selvagem | 0.186 | 0.181 | 0.186 | 0.193 | 0.017 | 8.85 | 0.007 |
| | 0.191 | 0.228 | 0.191 | | | | |
| Extrato Aquoso IMTA | 0.125 | 0.127 | 0.126 | 0.126 | 0.003 | 2.63 | 0.0014 |
| | 0.131 | 0.128 | 0.121 | | | | |
| Extrato Metanólico Selvagem | 0.021 | 0.021 | 0.022 | 0.023 | 0.002 | 8.87 | 0.0008 |
| | 0.021 | 0.025 | 0.025 | | | | |
| Extrato Metanólico IMTA | 0.056 | 0.056 | 0.053 | 0.050 | 0.005 | 10.71 | 0.002 |
| | 0.042 | 0.045 | 0.046 | | | | |

Tal como pode ser observado na Figura 28, o extrato aquoso da amostra selvagem foi o que apresentou um maior conteúdo de compostos fenólicos ($11.64 \pm 0.007 \mu\text{g EAG/mg extrato}$). Por sua vez, relativamente aos extratos aquosos, foi o extrato da amostra de IMTA que conteve maior quantidade de compostos fenólicos ($6.18 \pm 0.002 \mu\text{g EAG/mg extrato}$).

Se avaliarmos o conjunto dos dois extratos de forma a entender o conteúdo total de compostos fenólicos por amostra de *Codium tomentosum*, podemos verificar que a amostra selvagem foi a que exibiu maior teor de compostos fenólicos ($16.43 \mu\text{g EAG/mg extrato}$), face à amostra de IMTA ($14.74 \mu\text{g EAG/mg extrato}$).

3.3.2 – Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

O DPPH é um radical livre relativamente estável, podendo ser reduzido por moléculas antioxidantes. Este ensaio baseou-se na capacidade de moléculas antioxidantes funcionarem como doadores de hidrogénio ou redutores de radicais livres. Foram feitos três ensaios independentes, determinando-se as médias e os desvios padrão que nos permitiram obter os resultados finais, bem como uma noção da percentagem de erro associado (Anexo VII).

Para este ensaio, para todos os extratos, apenas se testou a diluição maior (100 µL de extrato). Assim, a capacidade de redução radical DPPH demonstrada pelos diferentes extratos em estudo encontra-se representada na Figura 29.

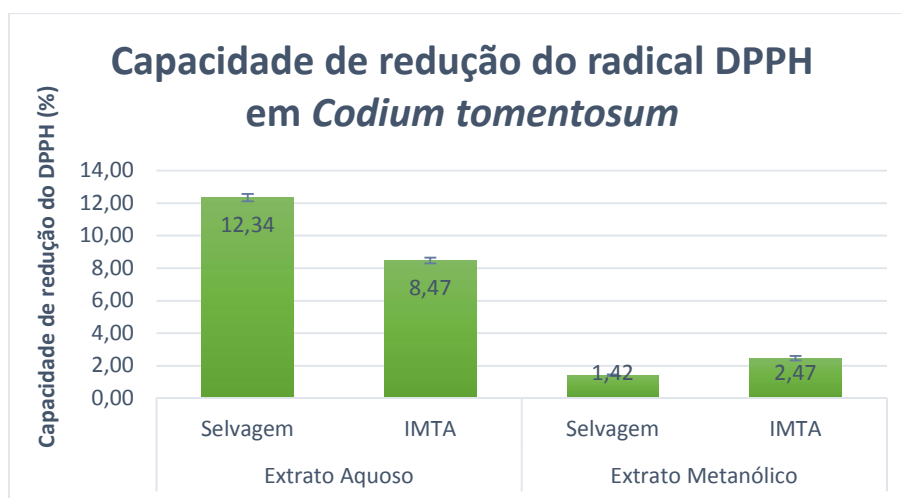


Figura 29 – Capacidade de redução do radical DPPH (média ± SE) de todos os extratos em estudo de *Codium tomentosum*

De todos os extratos testados, verificou-se claramente que os extratos aquosos foram os que possuíam maior capacidade de redução do DPPH, e entre eles, o extrato aquoso da amostra selvagem foi o que apresentou maior percentagem de inibição com $12.34 \pm 0.228\%$. Relativamente aos extratos metanólicos foi o extrato da amostra IMTA que teve maior, embora reduzida, capacidade de redução do DPPH ($2.47 \pm 0.137\%$).

3.3.3 – Avaliação da capacidade de redução do radical NO (“NO Scavenging”)

O óxido nítrico, produzido pelo Nitroprussiato de Sódio, interage com oxigênio para produzir iões nitrito, que são estimados pela utilização do reagente de *Griess*. Este ensaio baseou-se na capacidade de moléculas eliminadoras do NO competirem com o oxigênio reduzindo a produção do NO. Foram feitos três ensaios independentes para obter as retas de inibição e a partir dessas retas então calcular o IC₅₀ de cada ensaio (Anexo VIII). A Tabela VII mostra os valores de IC₅₀ obtidos para os três ensaios.

Tabela VII – Resultados dos três ensaios independentes realizados para cada um dos extratos testados, com o cálculo dos respectivos IC₅₀ (concentração de cada extrato que inibe 50% da atividade do radical NO), bem como da média, do SD, da ideia da percentagem de erro e do SE

| IC ₅₀ (mg/mL) | N=1 | N=2 | N=3 | MÉDIA | SD | Ideia da % de erro | SE |
|--|-------|-------|-------|--------------|-------|--------------------------|-------|
| Extrato Aquoso Selvagem | 1.75 | 1.85 | 1.72 | 1.79 | 0.092 | 5.15 | 0.053 |
| Extrato Aquoso IMTA | 0.33 | 0.29 | 0.36 | 0.33 | 0.049 | 15.23 | 0.029 |
| Extrato Metanólico Selvagem | 11.07 | 11.02 | 10.95 | 10.99 | 0.049 | 0.45 | 0.029 |
| Extrato Metanólico IMTA | 9.58 | 9.07 | 9.71 | 9.39 | 0.453 | 4.82 | 0.261 |

De todos os extratos testados, foram os extratos metanólicos que apresentaram maior valor de IC₅₀, com o extrato metanólico da amostra selvagem a exibir um valor de IC₅₀ de 10.99 ± 0.029 mg/mL, embora não se tenham observado diferenças significativas entre os extratos metanólicos de ambas as amostras (Teste estatístico, Anova de 1 via, com valor de p = 0.065, superior a 0.05).

No que se refere aos extratos aquosos, estes mostraram valores de IC₅₀ bastante inferiores aos dos extratos metanólicos, pelo que foi o extrato aquoso da amostra de IMTA que apresentou o menor valor de IC₅₀ com 0.33 ± 0.029 mg/mL. Também neste caso, embora tenha sido a amostra de IMTA que revelou menor valor de IC₅₀, a diferença entre os extratos aquosos das duas amostras não foi significativa (Teste estatístico, Anova de 1 via, com valor de p = 0.418, superior a 0.05).

Analisando o conjunto dos dois extratos, a fim de averiguarmos qual das amostras possuiu maior atividade de redução do radical NO, podemos constatar que a amostra de IMTA apresentou menores valores de IC₅₀ para ambos os extratos testados, o que implica uma maior atividade de redução do radical NO, comparativamente à atividade mostrada pelos extratos da amostra selvagem.

3.4 – Ensaio Anti-inflamatórios

3.4.1 – Determinação da produção de nitritos

Os níveis de nitrito presentes nos sobrenadantes das culturas das células RAW 264.7 foram mensurados após 24 horas de incubação com os diferentes extratos nas concentrações testadas já referidas. Além desta análise, também se procedeu com o cálculo da percentagem de inibição da produção de nitritos em relação ao tratamento com LPS (Anexo IX), permitindo aferir sobre a atividade anti-inflamatória, caso exista, dos extratos em estudo. Foram feitos dois ensaios independentes para os extratos metanólicos e apenas um ensaio para os extratos aquosos.

Os resultados mostrados nas Figuras 30 e 31 apresentam a concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas na presença dos extratos e do LPS, em relação à concentração dos mesmos nos sobrenadantes das culturas controlo (sem extratos).

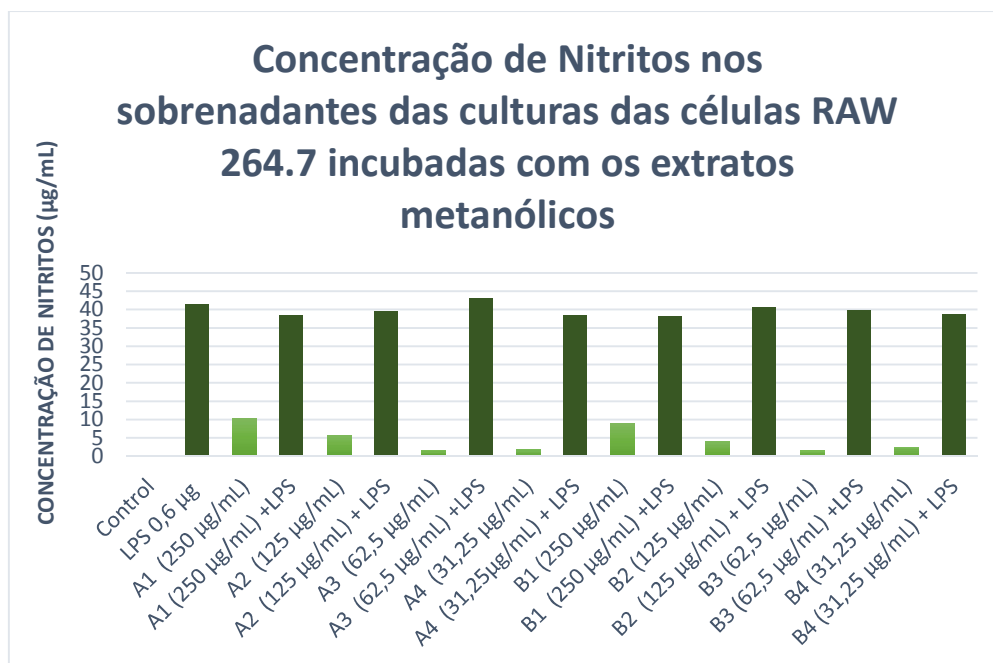


Figura 30 – Determinação da concentração de nitritos, ou seja, da produção de NO na presença das diferentes concentrações dos extratos metanólicos (B - amostra selvagem; A - amostra de IMTA)

Relativamente aos extratos metanólicos, verificou-se uma nítida produção de nitritos dependente da concentração de extratos testados, pois à medida que a concentração do extrato diminuiu igualmente diminuiu a produção de nitritos, embora essa produção tenha sido sempre superior à do controlo. Quando as células RAW 264.7 foram incubadas com o extrato metanólico e com o LPS verificou-se uma atividade mínima ou nula na produção dos nitritos, em comparação com as células incubadas apenas com o LPS. Pelo que, os extratos metanólicos de ambas as amostras em estudo, não tiveram atividade significativa sob a produção de nitritos quando esta foi estimulada pela presença do LPS, sendo a inibição máxima da produção de nitritos registada para a concentração de 250 µg/mL do extrato metanólico da amostra selvagem, com um valor de $8.07 \pm 0.680\%$.

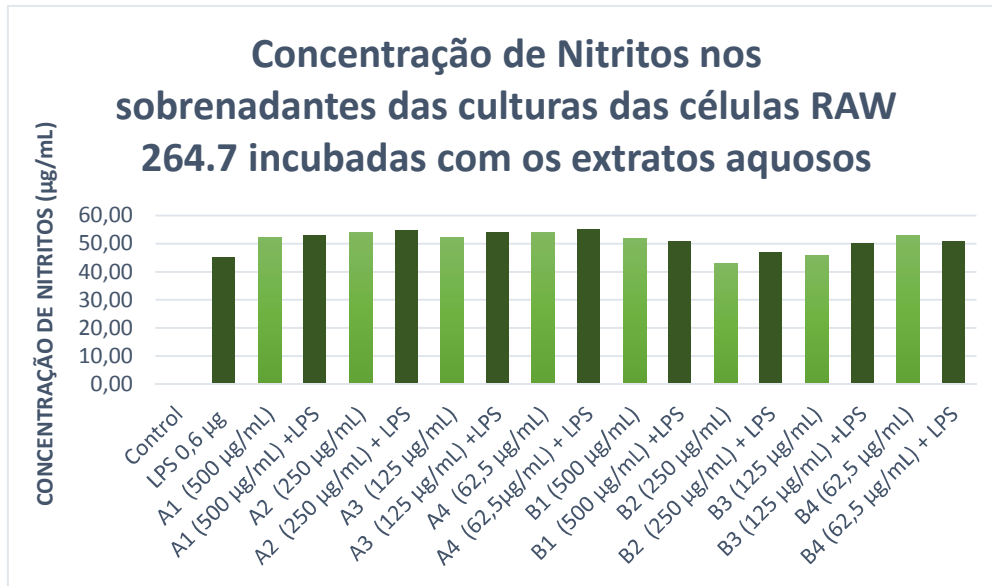


Figura 31 – Determinação da concentração de nitritos, ou seja, da produção de NO na presença das diferentes concentrações dos extratos aquosos (B - amostra selvagem; A - amostra de IMTA)

No que aos extratos aquosos diz respeito, podemos constatar que as células incubadas com os extratos tiveram um efeito semelhante às do tratamento com LPS, ou seja, os extratos aquosos estimularam igualmente a produção de nitritos. Nestes extratos não se verificou a dependência da produção de nitritos pela concentração de extrato testada. Quando as células RAW 264.7 foram incubadas com os extratos e com o LPS, não se verificou diminuição na produção de nitritos, ou seja, nenhum extrato aquoso teve atividade de inibição da produção de nitritos, face ao tratamento com LPS.



Figura 32 – Fotografia dos resultados obtidos para a produção de nitritos na presença dos extratos aquosos. Cor amarela - controlos. Cor rosa - LPS e diferentes concentrações de extrato testadas

Ao analisarmos ambas as figuras podemos observar um aumento, em relação ao controlo, na produção de nitritos após 24 horas de incubação com os diferentes extratos testados.

3.4.2 – Determinação da viabilidade celular

Para determinar a viabilidade celular, isto é, o efeito citotóxico dos diferentes extratos sobre as células RAW 264.7, foi realizada a incubação destas por 24 horas com as diferentes concentrações dos extratos.

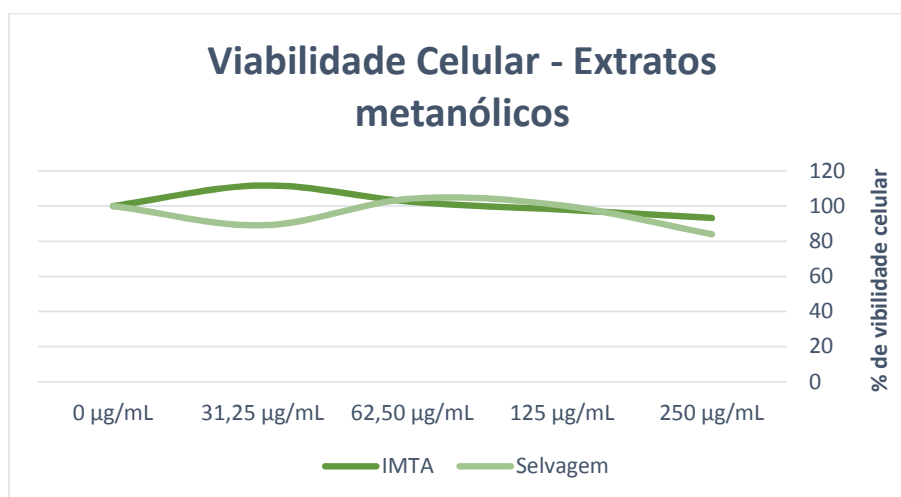


Figura 33 – Determinação da viabilidade celular registada para as diferentes concentrações dos extratos metanólicos de ambas as amostras de *Codium tomentosum* em estudo

Ao analisarmos a figura em cima podemos verificar que a incubação por 24 horas das células RAW 264.7 com o extrato metanólico da amostra de IMTA não alterou a sua viabilidade celular, em comparação com o controlo (0 µg/mL, 100%), exceto no caso do extrato com a concentração maior (93.13 ± 12.96%). Também podemos constatar que a viabilidade celular foi inversamente proporcional da concentração do extrato, pois quanto maior a concentração, menor a viabilidade celular. Por outro lado, quanto ao extrato metanólico da amostra selvagem, não se detetou nenhuma relação de

proporcionalidade entre a viabilidade celular e a concentração, registando um valor mínimo de viabilidade celular de $83.92 \pm 15.04\%$.

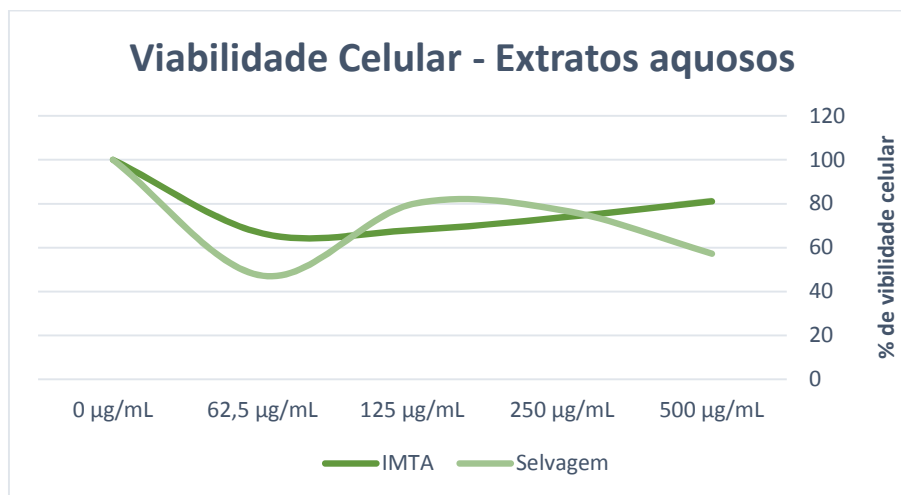


Figura 34 – Determinação da viabilidade celular registada para as diferentes concentrações dos extratos aquosos de ambas as amostras de *Codium tomentosum* em estudo

Ao contrário do que acontece com os extratos metanólicos, para as células RAW 264.7 incubadas por 24 horas com o extrato aquoso, verificou-se uma queda na viabilidade celular face ao controlo (0 µg/mL, 100%), que no caso do extrato da amostra de IMTA, foi diretamente proporcional à concentração do extrato, pois para concentrações maiores, maior é a viabilidade celular (concentrações menores do extrato aquoso foram mais tóxicas), tendo a viabilidade celular sido menor para a concentração de 62.5 µg/mL e foi de 66.43%.

Por outro lado, quanto ao extrato aquoso da amostra selvagem não se detetou nenhuma relação de proporcionalidade entre a viabilidade celular e a concentração. Contudo, neste caso também se registou um valor mínimo de viabilidade celular para a concentração de 62.5 µg/mL, sendo ela de 47.13%.

Ambos os extratos aquosos representaram o valor mínimo de viabilidade celular para a concentração menor testada.

Capítulo 4 – Discussão dos Resultados

4 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 – Amostragem

De um modo geral, as macroalgas, em Portugal, apresentam uma maior produção de biomassa nos meses de Junho-Julho e de Setembro. Concretamente, o *Codium tomentosum* exibe o seu pico da reprodução e de crescimento durante os finais do Verão e inícios do Outono, quando as temperaturas quentes favorecem o seu rápido crescimento (Kang et al.,2008). Contudo, este fato não é sempre linear, pois depende das condições atmosféricas, bem como das condições costeiras associadas ao local de colheita. Devido a isso, neste trabalho, as amostragens foram feitas em Setembro-Outubro, baseadas na disponibilidade local da biomassa.

4.2 – Aquacultura de *Codium tomentosum*

Na primeira experiência exterior realizada (7 kg/m² (41.13 g/L), verificou-se perdas de biomassa, aparecimento de epífitas e pelos/cabelos nos talos dos exemplares de *Codium tomentosum*, pelo que, a densidade de cultivo selecionada não foi a melhor para a cultura desta macroalga (movimento da água não era suficiente para fazer circular toda a biomassa do tanque). O movimento da água proporciona a mistura de nutrientes na água e reduz a densidade da camada adjacente à superfície da água, melhorando assim o rácio de difusão e absorção de nutrientes, e previne a supersaturação pelo oxigénio produzido fotossinteticamente (Craigie & Shacklock,1995).

A produção de pelos/cabelos observada poderá ser uma resposta à falta de nutrientes. Os pelos são um meio de aumentar a área de superfície de absorção do talo (Lobban & Harrison, 1997).

Como os principais fatores ambientais que afetam as algas são a intensidade luminosa (μE), a temperatura ($^{\circ}C$), a salinidade (‰), o movimento da água e a disponibilidade de nutrientes (Lobban & Harrison, 1997), não é de estranhar que a densidade de cultivo testada não tenha produzido resultados muito positivos, uma vez

que densidades de cultivo mais elevadas geram competição pelos fatores abióticos disponíveis.

Assim, para a experiência exterior A, realizada no Outono, a densidade de cultivo testada sofreu uma redução ($1.7 \text{ Kg/m}^2 = 10 \text{ g/L}$), observando-se crescimento da biomassa ao longo das semanas de cultivo. O aspeto da biomassa também foi significativamente diferente, pois os talos de *C. tomentosum* não se apresentavam cobertos por epífitas e estavam ausentes de pelos/cabelos. Nesta experiência, apesar da água nos tanques atingir temperaturas bastante inferiores às registadas no campo (4.8°C), a biomassa conseguiu sobreviver e crescer, sendo esta que foi utilizada nos ensaios biotecnológicos realizados neste trabalho.

Na experiência B, realizada na Primavera, onde se testaram várias densidades de cultivo, e o objetivo foi a comparação com a experiência anterior, podemos constatar que a biomassa apresentou taxas de crescimento superiores. Esta discrepância no crescimento deve-se às diferenças registadas para a temperatura, para a salinidade e para a intensidade luminosa, que foram todas superiores para esta experiência B.

Esta experiência B revelou reunir melhores condições ao crescimento do *Codium tomentosum* que a experiência A para a DC de 10 g/L . Comparando com a densidade testada na experiência preliminar, em qualquer experiência (A ou B), o cultivo de *C. tomentosum* teve maior sucesso para a densidade de 10 g/L .

Relativamente às experiências de laboratório, a experiência onde se utilizou o meio VSE foi a que melhores resultados obteve. Isto pode dever-se ao fato do meio f/2 ser específico para microalgas e os talos de *C. tomentosum*, ao não serem previamente bem limpos, podem apresentar na sua superfície algumas microalgas, conseguindo estas promover o seu crescimento neste meio, prejudicando, assim, o crescimento e sobrevivência da macroalga. Como o meio VSE é mais específico para macroalgas, estas conseguiram crescer melhor e mais rápido. Também nesta experiência foram testadas várias densidades de cultivo, permitindo detetar qual a densidade de cultivo ótima para o *Codium tomentosum*.

No que diz respeito ao pH mensurado, em todas as experiências de laboratório, este nunca foi superior ao valor 9, o que indica que as densidades de cultivo testadas

foram aceitáveis, pois, segundo a literatura (Abreu, Pereira, Yarish, Buschmann & Sousa-Pinto, 2011), apenas quando o pH é superior a 9 é considerado limitante, uma vez que, as algas podem reduzir a sua capacidade fotossintética e então reduzirem as suas taxas de crescimento.

Assim, quando se trata de aquacultura exterior, em que a biomassa está sujeita às condições ambientais naturais e está em “*Batch culture*”, a densidade de cultivo que melhores resultados obteve situa-se aproximadamente nos 10 g/L, em que a macroalga em estudo cresceu 1.45 ± 0.42 %/dia com uma produção de 2.29 ± 0.66 g (peso seco) /m²/dia. Quando se trata de uma experiência de cultura em laboratório, sob condições controladas de temperatura e salinidade, a densidade de cultivo situa-se, aproximadamente, nos 7 g/L.

4.3 – Obtenção dos extratos algais

Os extratos de ambas as amostras, a amostra selvagem e a amostra proveniente de IMTA (amostra proveniente da experiência A), por motivos técnicos, selecionados para os ensaios testados foram os metanólicos e aquosos. Todos os extratos testados foram liofilizados, evitando, assim, possíveis variações que possam ter ocorrido durante o processo extrativo. Além disso, o uso de extratos liofilizados permite uma melhor preservação do extrato durante o armazenamento, reduzindo a possibilidade da sua alteração por, por exemplo, hidrólise ou mesmo a evaporação do solvente (Valentão et al., 2010).

Quanto ao rendimento do processo de extração, a amostra selvagem apresentou um rendimento total superior (60.21%), devido essencialmente ao rendimento da extração em metanol (52.70%), face à amostra de IMTA (Σ = 47.24%; extração em metanol = 37.72%). Este fato demonstra que a amostra selvagem possui maior quantidade de compostos polares do que a amostra de IMTA, uma vez que o metanol é um solvente polar.

4.4 – Ensaio Antioxidantes

4.4.1 – Quantidade Total de Compostos Fenólicos – Teste *Folin*

O *Codium tomentosum*, independentemente do extrato testado, bem como da amostra, revelou uma fraca quantidade total de compostos fenólicos, sendo o extrato metanólico da amostra selvagem que revelou uma maior quantidade ($11.64 \pm 0.007 \mu\text{g EAG/mg extrato}$). Relativamente aos extratos aquosos, foi o da amostra de IMTA que exibiu uma maior quantidade de compostos fenólicos ($6.18 \pm 0.002 \mu\text{g EAG/mg extrato}$), indo de encontro aos resultados obtidos para o rendimento de cada extração, dado que, a extração que apresentou maior rendimento foi a que possuiu maior quantidade de compostos fenólicos e vice-versa.

A amostra que exibiu maior teor de compostos fenólicos foi a selvagem, com um total de $16.43 \mu\text{g EAG/mg extrato}$, que comparativamente aos resultados obtidos por Celikler et al., 2009, para o extrato etanólico ($0.30 \pm 0.05 \text{ mg EAG/g alga seca}$), foi bastante reduzido, indicando que as amostras testadas neste trabalho não possuem grande teor de compostos fenólicos.

Outro estudo de Valentão et al., 2010, em que foram testados extratos aquosos de *Codium tomentosum*, revelou a ausência de compostos fenólicos, pelo que o fato de ambas as amostras testadas demonstrarem possuir compostos fenólicos, mesmo que em baixas quantidades, foi já um resultado positivo.

Esta discrepância nos resultados obtidos nos diversos trabalhos, pode dever-se aos vários fatores referidos anteriormente, local de amostragem/localização geográfica, sazonalidade, temperatura da água, salinidade, intensidade da luz, condições de amostragem (Mohamed et al., 2012), bem como à idade e estágio reprodutor da alga (Valentão et al., 2010), e ao método de extração utilizado.

4.4.2 – Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

Tendo em consideração que apenas foi testada a diluição maior ($100 \mu\text{L}$) de cada extrato, e a concentração de cada um (20 mg/mL para os extratos metanólicos e 25 mg/mL para os extratos aquosos), os resultados obtidos para a avaliação da capacidade

de redução do radical DPPH não foram muito promissores, quando comparados com os do padrão ácido ascórbico (IC₅₀ de 7.61 µg/mL) (Anexo X), sendo o extrato aquoso da amostra selvagem que revelou maior capacidade e esta foi de 12.34 ± 0.228% (corresponde a uma concentração no meio de reação de 1.25 mg/mL). Contudo, os resultados obtidos foram de encontro com a relação bem conhecida de que, geralmente, alto teor de compostos fenólicos resulta numa elevada capacidade antioxidante (Celikler et al., 2009), embora os extratos que revelaram maior teor de compostos fenólicos não tenham sido os que maior atividade antioxidante revelaram. Contudo, como os extratos testados revelaram baixos conteúdos totais em compostos fenólicos, também a sua capacidade antioxidante teria que ser reduzida.

Ao comparar este resultado com o obtido no estudo de Andrade et al., 2013, em que o extrato etanólico de *Codium tomentosum* não exibiu capacidade de redução do radical DPPH, mas o extrato etanólico de *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss exibiu um IC₅₀ de 0.58 mg alga seca/mL, podemos verificar que os extratos de *Codium tomentosum*, independentemente da amostra, revelaram capacidade antioxidante reduzida.

Além disso, o estudo de Valentão et al., 2010, revelou que os extratos aquosos liofilizados de *Codium tomentosum* possuem uma fraca capacidade antioxidante dependente da concentração (IC₁₀ de 794 µg/mL), pelo que vem apoiar os resultados obtidos neste trabalho.

Perante tais fatos, estes resultados são bastantes surpreendentes porque esta espécie vive em áreas litorais superiores altamente dinâmicas, caracterizadas por inúmeros fatores de stresse (ou seja, limitação de nutrientes, luz intensa, flutuações rápidas da temperatura, stresse osmótico e dessecação) (Valentão et al., 2010) pelo que seria de esperar que possuíssem elevada capacidade antioxidante. No entanto, não podemos esquecer que apenas se testaram dois extratos das amostras da macroalga, pelo que há a probabilidade de encontrar alguma atividade antioxidante noutros extratos.

4.4.3 – Avaliação da capacidade de redução do radical NO (“NO Scavenging”)

Cada ensaio independente proporcionou a obtenção de dados que permitiram obter uma reta de percentagem de inibição e a respetiva equação da reta ($y=mx+b$). Foi a partir da equação das retas, por simples regra matemática (substituindo o y por 50) que se obteve o IC₅₀ do respetivo ensaio (Anexo VIII). Nas retas de percentagem de inibição verifica-se que o aumento do efeito antioxidante é proporcional ao aumento da concentração do extrato.

De todos os extratos testados, apenas os extratos aquosos revelaram alguma capacidade de redução do radical NO, em que o extrato aquoso de IMTA foi o que revelou maior capacidade, sendo esta de 0.33 ± 0.029 mg/mL. Assim, o extrato aquoso da amostra de IMTA revelou ter uma capacidade antioxidante, para este radical em estudo, significativa quando comparada com o padrão ácido ascórbico (0.31997 mg/mL) (Anexo XI).

Comparando este valor com o obtido no estudo de Valentão et al., 2010, em que os extratos aquosos apresentaram atividade protetora contra o óxido nítrico, com um IC₅₀ de 0.737 mg/mL, e no estudo de Andrade et al., 2013, em que o extrato etanólico apresentou um IC₅₀ de 1.25 mg de alga seca/mL, verificamos que o extrato aquoso da amostra de IMTA possui uma capacidade de redução do radical NO elevada, superior à até agora encontrada.

O fato desta capacidade antioxidante estar associada ao extrato aquoso da amostra de IMTA, sendo esta a que sofreu maiores flutuações de temperatura, de salinidade e de intensidade luminosa, pode ser indicativo de que o *Codium tomentosum*, quando sujeito a maior stresse tem a capacidade de produzir compostos bioativos que lhe conferem atividade antioxidante significativa. Contudo, como não se procedeu à análise qualitativa dos extratos testados, ficamos sem entender se esta capacidade antioxidante superior do extrato aquoso de IMTA se deve apenas a um aumento da produção dos compostos bioativos ou se os compostos bioativos produzidos nesta situação são diferentes dos produzidos pela amostra selvagem.

Além disso, aconteceu o mesmo que para a avaliação da capacidade de redução do radical DPPH, pois não se testaram todos os extratos da macroalga, pelo que

poderiam haver outros extratos que também revelassem atividade antioxidante. Também seria interessante verificar se extratos da amostra de IMTA, mas da experiência elaborada na Primavera, revelariam a mesma resposta para a atividade antioxidante (tal como para todos os ensaios realizados neste trabalho).

4.5 – Ensaios Anti-inflamatórios

4.5.1 – Determinação da produção de nitritos

O NO é um importante mediador do processo inflamatório. Ele é uma molécula que rapidamente é transformada em nitrito e nitrato, e por esse motivo esses parâmetros são frequentemente utilizados para monitorizar a sua produção.

Assim, para a avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos testados de ambas as amostras, monitorizou-se a produção de nitritos *in vitro*. Relativamente aos extratos metanólicos podemos observar que, na ausência de LPS, os nossos extratos induziram a produção de nitritos face ao controlo, sendo que a produção de nitritos diminui com a diminuição da concentração do extrato. Na presença de LPS, verificou-se que os nossos extratos metanólicos, não tiveram atividade significativa sob a produção de nitritos (máxima atividade de $8.07 \pm 0.680\%$ para o extrato metanólico selvagem). Estes resultados foram semelhantes para ambas as amostras, pelo que não se nota grande diferença dependendo da amostra testada. Logo, podemos afirmar que os extratos metanólicos das amostras testadas neste trabalho não possuem atividade anti-inflamatória significativa. Para isso se verificar, no ensaio teríamos que detetar uma diminuição nítida na produção de nitritos, na presença do LPS, induzida pela presença do extrato. Esta atividade anti-inflamatória muito pouco promissora, tendo em consideração o IC_{50} obtido no ensaio “NO scavenging” (10.99 ± 0.029 mg/mL, para o extrato selvagem e 9.39 ± 0.261 mg/mL para o extrato de IMTA), e as concentrações utilizadas, foi algo muito pouco surpreendente.

No que diz respeito aos extratos aquosos, estes extratos tiveram uma atividade na produção de nitritos semelhante à do LPS, ou seja, atividade pro-inflamatória. Estes

resultados foram semelhantes para ambas as amostras em estudo. Contudo, estes resultados não estão de acordo com os resultados obtidos para o IC₅₀ no ensaio “NO scavenging” (1.79 ± 0.053 mg/mL para o extrato selvagem e 0.33 ± 0.029 mg/mL para o extrato de IMTA), uma vez que seria de esperar que os extratos aquosos tivessem alguma capacidade anti-inflamatória, ou seja, conseguissem induzir a diminuição na produção de nitritos. Além disso, como apenas foi realizado um ensaio para os extratos aquosos, por motivos técnicos, não há garantias de que os resultados obtidos estejam corretos, pelo que seria necessário a elaboração de mais ensaios independentes.

É de referir que, também, para os ensaios anti-inflamatórios não se testaram todos os extratos da macroalga, pelo que não é inteiramente correto afirmar que o *Codium tomentosum* não possui atividade anti-inflamatória.

4.5.2 – Determinação da viabilidade celular

Muitos estudos têm sido realizados em relação à citotoxicidade de compostos candidatos a novos fármacos ou a nutracêuticos e, para isso, utiliza-se com frequência a determinação da viabilidade celular como metodologia. Sendo assim, para verificar a presença ou não de efeitos tóxicos dos extratos de *Codium tomentosum* sobre as células, recorreu-se a uma metodologia que mede a viabilidade celular baseada na redução do MTT.

A escolha de macrófagos como o tipo celular a ser utilizado deve-se ao fato de que essas células têm sido amplamente usadas em muitos testes de citotoxicidade por permitirem a monitorização da resposta diretamente na cultura celular e por causa da sua habilidade em manter as suas funções na presença de muitos agentes químicos diferentes (Marques, 2007).

Os resultados obtidos para os extratos metanólicos, de ambas as amostras em estudo, demonstram que estes extratos não têm um efeito tóxico significativo sobre as células em cultura, uma vez que o valor mínimo de viabilidade detetado foi de $83.92 \pm 15.04\%$, para o extrato metanólico selvagem de maior concentração.

Relativamente aos extratos aquosos, sabendo que quando ocorre a produção de NO em excesso, causa lesão tecidual por, por exemplo, peroxidação lipídica (Guzik & Adamek-Guzik, 2003), e que neste trabalho, os extratos aquosos induziram um aumento da produção de nitritos, é de esperar que tenham um efeito tóxico sobre as células em cultura. Foi isto que se verificou, os extratos aquosos demonstraram ser citotóxicos, chegando a exibir valores de viabilidade celular de 47.13%.

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

5 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Com a elaboração deste trabalho foi possível compreender que cada fase do trabalho teve a sua importância e influência nos resultados obtidos, sendo um dos aspetos mais importantes o método utilizado para a obtenção dos extratos. A escolha do protocolo de extração foi selecionado numa tentativa de rentabilizar ao máximo o conteúdo algal para posteriores análises laboratoriais, bem como por permitir a recuperação dos solventes utilizados, minimizando assim os custos de todo o processo de extração.

A aquacultura multitrófica integrada (IMTA) do *Codium tomentosum*, tratando-se da primeira vez que esta macroalga foi cultivada neste tipo de sistema, foi uma etapa um pouco trabalhosa (conjugando o trabalho exterior com o trabalho laboratorial), mas com resultados bastante positivos, pois ao longo das semanas de cultivo foi possível acompanhar o crescimento da biomassa. Além disso, permitiu a determinação da densidade de cultivo que melhor se adequa a esta espécie, em “Batch culture”, e em laboratório, o que para trabalhos futuros de aquacultura é um aspeto muito importante, pois trata-se do primeiro requisito para iniciar a aquacultura de *C. tomentosum*. No futuro, a aquacultura num sistema IMTA em fluxo contínuo para esta macroalga, seria algo bastante importante e relevante. Também novos ensaios de cultivo em laboratório seria algo a executar.

Testar o potencial biotecnológico da macroalga em estudo foi relativamente fácil, embora os resultados obtidos não tenham sido muito promissores. Quanto à atividade antioxidante, podemos concluir que os extratos testados de ambas as amostras em estudo de *C. tomentosum* demonstraram possuir baixa quantidade total de compostos fenólicos, e não possuem significativa capacidade de redução do radical DPPH. Relativamente à capacidade de redução do radical NO, apenas o extrato aquoso da amostra de IMTA demonstrou possuir atividade significativa (embora não significativamente diferentes, $p > 0.05$, da demonstrada pelo extrato aquoso da amostra selvagem), superior à demonstrada em estudos realizados até agora. No que diz respeito à atividade anti-inflamatória, os extratos aquosos de ambas as amostras revelaram atividade pró-inflamatória e reduziram a viabilidade celular. Contudo, estes resultados não nos permitem afirmar fidedignamente que estes extratos possuem atividade pró-

inflamatória, pois apenas foi feito um ensaio. Os extratos metanólicos de ambas as amostras demonstraram ter atividade anti-inflamatória reduzida, muito pouco promissora.

No futuro, seria interessante realizar todos estes ensaios com a amostra de IMTA cultivada na Primavera, a fim de se averiguar se a sazonalidade tem alguma influência nestes ensaios. Também seria importante testar os outros extratos obtidos com o processo de extração para podermos concluir acerca do potencial biotecnológico total da macroalga. Outro aspeto relevante seria a análise de todos os compostos presentes em cada extrato, a fim de averiguar qual a composição da macroalga, e qual o composto ou conjunto de compostos responsáveis pela atividade demonstrada.

6 – Referências Bibliográficas

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, M. H., Varela, D. A., Henríquez, L., Villarroel, A., Yarish, C., Sousa-Pinto, I. & Buschmann, A. H. (2009). Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of *Gracilaria chilensis*. C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. *Aquaculture* 293: 211-220.

Abreu, M. H., Pereira, R., Mata, L., Nobre, A. & Sousa Pinto, I. (2011). IMTA em Portugal. Macroalgas en la Acuicultura Multitrófica Integrada Peninsular: Valorización de su Biomasa. In: Vázquez Ferreiro, U, Filgueira, M. I., Fernández Otero, R. & Maroto Leal, J. (Eds.). Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR; Vigo; Spain; pp. 54-77; ISBN: 978-84-615-4974-0.

Abreu, M. H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A. H. & Sousa-Pinto, I. (2011). IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture* 312: 77-81.

Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing techniques*. Elsevier Academic Press, China. ISBN: 0-12-088426-7.

Andrade, P. B., Barbosa, M., Matos, R. P., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T. & Valentão, P. (2013). Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry* 138: 1819-1828.

Anjos dos Santos, C. H., Lourenço, J. A., Wiegand, M. C., Penafort, J. M. & Igarashi, M. A. (2010). Aspectos do cultivo de algas marinhas com vistas a sustentabilidade da actividade. (Open Access) PDF URL: http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos_teses/2011/biologia/artigos/3cultivo_algasmarinhas.pdf, consultado em 22 de Fevereiro de 2014.

Araújo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Díaz Tapia, P., Pereira, R., Santos, R. & Sousa Pinto, I. (2009). Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina* 52: 24-46.

6 – Referências Bibliográficas

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology* 28(1): 25-30.

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P. & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 60-78.

Celikler, S., Vatan, O., Yildiz, G. & Bilaloglu, R. (2009). Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology* 47: 796-801.

Choi, JH., Sapkota, K., Park, SE., Kim, S. & Kim, SJ. (2013). Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-functional fibrinolytic enzyme from *Codium fragile*. *Biochimie* 95: 1266-1277.

Chopin, T., Buschmann, A. H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G. P., Zertuche-González, J. A., Yarish, C. & Neefus, C. (2001). Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *Journal of Phycology* 37: 975-986.

Christobel, G. J., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S., Sarika, A. R. & Udayakumar, A. (2011). Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. *Seaweed Res. Utiln* 33(1&2): 67-75.

Ciancia, M., Quintana, I., Vizcargüénaga, M. I., Kasulin, L., de Dios, A., Estevez, J. M. & Cerezo, A. S. (2007). Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 641-649.

Cozzolino, S. (2012). Nutracêuticos: o que Significa? ABESO 55. (Open Access) PDF URL: <http://www.abeso.org.br/pdf/revista55/artigo.pdf>, consultado em 12 de Dezembro de 2013.

Coura, Christiane Oliveira. (2011). Atividades antinociceptiva e antiinflamatória dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh. Universidade Federal do Ceará. Dissertação de Mestrado. (Open Access) PDF URL: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/5446/1/2011_dis_cocoura.pdf, consultado em 25 de Março de 2014.

Craigie, J. S. & Shacklock, P. F. (1995). Culture of Irish moss. In: Cold-water Aquaculture in Atlantic Canada (pp. 363-390), A. D. Boghen (ed.). Canadian Institute for Research and Regional Development, Moncton, NB, Canada.

D'Amours, O. & Scheibling, R. E. (2007). Effect of wave exposure on morphology, attachment strength and survival of the invasive green alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 351: 129-142.

Encyclopædia Britannica (2013). <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/124026/Codium>, consultado em 10 de Outubro de 2013

Fernández Súa, C. (2003). Algas do Atlântico, Alimento e Saúde – As verduras do Oceano – Propriedades, Receitas e Descrição. Algamar, Espanha. ISBN: 84-607-7819-3.

Garcia, J. (2012). Una alternativa sostenible para diversificar cultivos y proteger la calidad del medio marino. In: Acuicultura multitrófica integrada. Una alternativa sostenible y de futuro para los cultivos marinos en Galicia. XUNTA DE GALICIA. ISBN: 978-84-695-3260-7.

González, A. & Santelices, B. (2004). A dichotomous species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) is colonizing Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 293-304.

Gossiau, A., Li, S., Ho, C. T., Chen, K. Y. & Rawson, N. E. (2011). The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 55(1): 74-82.

Graham, L. E. & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. Prentice Hall. ISBN: 0-13-660333-5.

6 – Referências Bibliográficas

Guerra, Aline Stamford Henrique da Silva. (2011). Estudo das Atividades Anti-inflamatória e Antinociceptiva dos Derivados Indol-imidazolidínicos 5-(1H-Indol-3-il-metileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-56) e 3-(4-Bromo-benzil)-5-(1H-indol-3-il-metileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-52). Universidade Federal de Pernambuco. Dissertação de mestrado. (Open Access) PDF URL: http://www.bdttd.ufpe.br/bdttd/tedeSimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=3012, consultado em 22 de Março de 2014.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2013). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>, consultado em 12 de Novembro de 2013.

Gupta, S. & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12: 600-609.

Guzik, T. J., Korbut, R. & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology* 54(4): 469-487.

Hafting, J. T., Critchley, A. T., Cornish, M. L., Hubley, S. A. & Archibald, A. F. (2012). On-land cultivation of functional seaweed products for human usage. *Journal of Applied Phycology* 24: 385-392.

Hanisak, M. D. (1979). Growth Patterns of *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* in Response to Temperature, Irradiance, Salinity, and Nitrogen Source. *Marine Biology* 50: 319.-332.

He, Z., Zhang, A., Ding, L., Lei, X., Sun, J. & Zhang, L. (2010). Chemical composition of the green alga *Codium divarticatum* Holmes. *Fitoterapia* 81: 1125-1128.

Holdt, S. L. & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23: 543-597.

Hudson, J. B., Kim, J. H., Lee, M. K., DeWreede, R. E. & Hong, Y. K. (1999). Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. *Journal of Applied Phycology* 10: 427-434.

Ibañez, E. & Cifuentes, A. (2012). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 703-709.

Jagetia, G. C., Rao, S. K., Baliga, M. S. & Babu, K. S. (2004). The Evaluation of Nitric Oxide Scavenging Activity of Certain Herbal Formulations in vitro: A Preliminary Study. *Phytotherapy Research* 18: 561-565.

Kang, Y. H., Shin, J. A., Kim, M. S. & Chung, I. K. (2008). A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) during the summer. *Journal of Applied Phycology* 20:183-190.

Kang, Y. H., Hwang, J. R., Chung, I. K. & Park, S. R. (2013). Development of a Seaweed Species-Selection Index for Successful Culture in a Seaweed-Based Integrated Aquaculture System. *Journal of Ocean University of China* 12(1): 125-133.

Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical – Definition and Introduction. *AAPS - Pharmaceutical Sciences* 5(3):E25.

Kelman, D., Posner, E. K., McDermond, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R. & Wright, A. D. (2012). Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Mar. Drugs* 10: 403-416.

Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W. & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 96(4): 229-245.

Kim, A. D., Lee, Y., Kang, SH., Kim, G. Y., Kim, H. S. & Hyun, J. W. (2013). Cytotoxic Effect of Clerosterol Isolated from *Codium fragile* on A2058 Human Melanoma Cells. *Mar. Drugs* 11: 418-430.

Kim, MJ., Yang, KW., Lee, W. J., Kim, S. S., Lee, N. H. & Hyun, CG. (2013). Inhibitory Effect of *Ulva fasciata* and *Desmarestia viridis* on the Production of Nitric Oxide,

6 – Referências Bibliográficas

- Prostaglandin E₂ and Pro-inflammatory Cytokines in RAW 264.7 Cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3: 001-007.
- Lee, R. E. (1989). *Phycology*, second edition. Cambridge University Press, New York, USA. ISBN: 0-521-36744-1
- Lee, JB., Ohta, Y., Hayashi, K. & Hayashi, T. (2010). Immunostimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile*. *Carbohydrate Research* 345:1452-1454.
- Lobban, C. S. & Harrison, P. J. (1997). *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, New York, USA. ISBN: 0-521-40897-0.
- Lopes da Silva, Bruna. (2009). Estudos do cultivo de algas vermelhas e castanhas em laboratório para aplicação em sistemas de Aquacultura Integrada Multitrófica. Universidade do Porto. Dissertação de mestrado. (Open Access) PDF URL: <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/16147/2/Tese%20Mestrado%20Bruna%20Lopes%20Silva.pdf>, consultado em 9 de Novembro de 2013.
- Marques, Cybelle Teixeira. (2007). Atividade antiinflamatória de uma heterofucana da alga marrom *Padina gymnospora*. Universidade do Rio Grande do Norte. Dissertação de mestrado. (Open Access) PDF URL: http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/1/7707/1/CybelleTM_DISSERT.pdf, consultado em 30 de Março de 2014.
- Miravalles, A. B., Leonardi, P. I. & Cáceres, E. J. (2012). Female gametogenesis and female gamete germination in the anisogamous green alga *Codium fragile* subsp. *Novaezelandiae* (Bryopsidophyceae, Chlorophyta). *Phycological Research* 60: 77-85.
- Mohamed, S., Hashim, S. N. & Rahman, H. A. (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology* 23: 83-96.

Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.

Nanba, N., Kado, R., Ogawa, H., Nakagawa, T. & Sugiura, Y. (2005). Effects of irradiance and water flow on formation and growth of spongy and filamentous thalli of *Codium fragile*. *Aquatic Botany* 81: 315-325.

Ortiz, J., Uquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V. & Llantén, C. (2009). Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111: 320-327.

Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizzeto-Duarte, C., Polo, C., Rešek, E., Engelen, A. & Varela, J. (2012). Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Macroalgae: Potential for Nutritional and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs* 10: 1920-1935.

Pereira, L. (2004). Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa - aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos. Universidade de Coimbra. Dissertação de Doutoramento.

Pereira, L. (2008). As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. Monografias. 913: 1-19 (Open Access) PDF URL: <http://br.monografias.com/trabalhos913/algas-marinhas-utilidades/algas-marinhas-utilidades.pdf>, consultado em 15 de Outubro de 2013.

Pereira, L. (2008). MACOI, Portal das Macroalgas Portuguesas. Publicação eletrónica online, IMAR-CMA, DCV, Universidade de Coimbra. <http://macoi.ci.uc.pt>, consultado em 11 de Janeiro de 2014.

Pereira, L. (2009). Guia ilustrado das macroalgas: conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. ISBN: 9-789892-600024.

Pereira, L. (2011). A Review of the Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds. In *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*, ed. Pomin, V. H., 15-47. ISBN: 978-1-61470-920-6. Nova Iorque: Nova Science Publishers, Inc..

6 – Referências Bibliográficas

Pereira, L. (2012). Analysis of Seaweeds from the Portuguese Flora for Nutraceuticals Survey. Texto de apoio à presente dissertação. (DCV – IMAR). Universidade de Coimbra.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. & Henderson, G. (2007). Pharmacology. 6ª ed. Elsevier. ISBN: 978-0-443-06911-6.

Rizvi, M. A. & Shameel, M. (2005). Pharmaceutical Biology of Seaweeds from the Karachi Coast of Pakistan. *Pharmaceutical Biology* 43(2): 97-107.

Samarakoon, K. & Jeon, YJ. (2012). Bio-functionalities of proteins derived from marine algae – A review. *Food Research International* 48: 948-960.

Shanmugam, M., Mody, K. H., Ramavat, B. K., Murthy, A. S. K. & Siddhanta, A. K. (2002). Screening of Codiacean algae (Chlorophyta) of the Indian coasts for blood anticoagulant activity. *Indian Journal of Marine Sciences* 3(1): 33-38.

SIA - Seaweed Industry Association (2013). Descrição do *Codium tomentosum*. <https://seaweedindustry.com/seaweed/type/codium-tomentosum>, consultado em 15 de Outubro de 2013.

Simbiotica - Rede Simbiótica de Biologia e Conservação da Natureza (2013). <http://simbiotica.org/clorofita.htm>, consultado em 13 de Outubro de 2013.

Stirk, W. A., Reinecke, D. L. & van Staden, J. (2007). Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 19: 271-276.

Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanpour, Z. & Waaland, J. R. (2012). Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2500-2506.

Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, H. A., Kautsky, N. & Yarish, C. (2003). Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture* 226: 69-90.

Valentão, P., Trindade, P., Gomes, D., Guedes de Pinho, P., Mouga, T. & Andrade, P. B. (2010). *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. *Food Chemistry* 119: 1359-1368.

Vázquez Pérez, A. (2011). Extracción de compuestos bioactivos a partir de algas para uso cosmético. Las algas como recurso: Valorización. Aplicaciones industriales y tendencias. In: Filgueira, M. I., Ferreiro, U. V., Leal, J. M., Gesteira, J. L. G., Cañamo, M. L. F. (Eds.). Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR; Vigo; Spain; pp. 95-107; ISBN: 978-84-615-3593-4

Werz, O. (2007). Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Medica* 73(13): 1331-1357.

Wijesekara, I., Pangestuti, R. & Kim, S. K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* 84: 14-21.

Yang, M. H., Blunden, G., Huang, F. L. & Fletcher, R. L. (1997). Growth of a dissociated, filamentous stage of *Codium* species in laboratory culture. *Journal of Applied Phycology* 9: 1-3.

Yen, G. C. & Duh, P. D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 629-632.

Yoon, J. H. & Baek, S. J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Medical Journal* 46(5): 585-596.

7 – ANEXOS

Anexo I – Cortes Histológicos de *Codium tomentosus*

Realização de preparações temporárias, dado que o objetivo foi a observação à lupa e ao microscópio para a obtenção de imagens para complementar este trabalho.

Os cortes histológicos foram feitos manualmente, com o auxílio de um micrómetro de cordiza (corre numa calha) (Figura 35). Este aparelho é o mais indicado para cortes anatómicos, não fazendo cortes por sequência (faz cortes individuais, selecionados pelo utilizador).



Figura 35 – Fotografias de um micrómetro de cordiza

Para a execução dos cortes histológicos é necessário material de suporte para o corte (serve de suporte à base do material para fixar no micrómetro), que pode ser medula de sabugueiro, cortiça, esferovite ou a inclusão em *parafilme*. Para este trabalho foi utilizada a medula de sabugueiro (Figura 36).

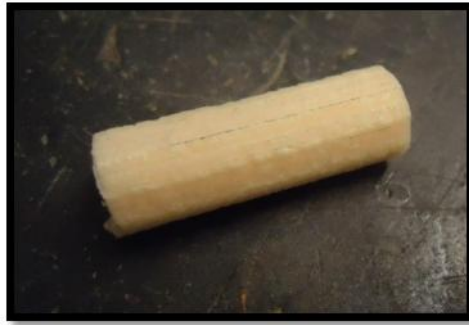


Figura 36 – Fotografia de medula de sabugueiro utilizada para a execução dos cortes histológicos

Outro utensílio necessário foi uma lâmina de barbear, para a realização das calhas na medula de sabugueiro (a medula não foi cortada ao meio, mas sim de modo a obter duas partes desiguais, com uma mais grossa que outra, pois a parte mais grossa serve melhor de suporte). Assim, após se fazer a calha em duas partes da medula de sabugueiro, colocou-se o material de *Codium tomentosum* na calha que fica no meio das duas partes da medula (Figura 37A), e prosseguiu-se com os cortes no micrómetro (Figura 37B).

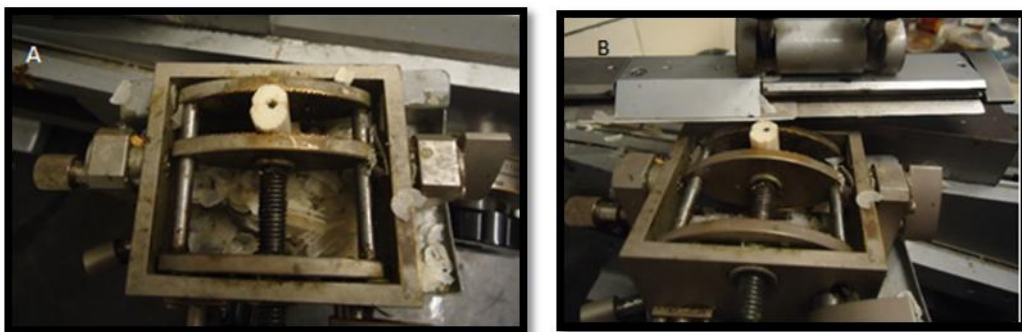


Figura 37 – Fotografias do micrómetro. A: Fotografia onde se observa o material no interior das calhas formadas por duas partes da medula de sabugueiro no micrómetro; B: Fotografia onde se observa a realização dos cortes no micrómetro

Com o auxílio de um pincel retirou-se os cortes do material e colocou-se numa lâmina com uma gota de água do mar (o pincel é o mais indicado porque é suave e não danifica o material) (Figura 38). Por fim, seleccionam-se, com o auxílio de uma lupa, os melhores cortes para observação ao microscópio.

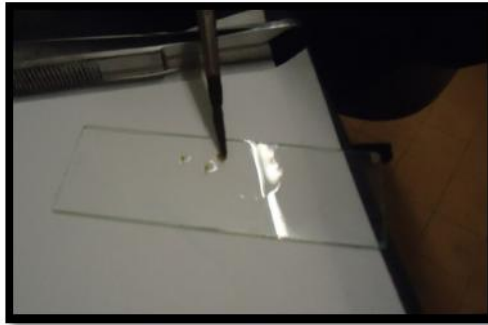


Figura 38 – Fotografia onde se observa a inserção do corte do material, com o auxílio de um pincel, na lâmina

Anexo II – Meio de Cultura f/2 (Andersen, 2005)***f/2 Medium***

(Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975)

This is a common and widely used general enriched seawater medium designed for growing coastal marine algae, especially diatoms. The concentration of the original formulation, termed "f Medium" (Guillard and Ryther 1962), has been reduced by half.

To prepare, begin with 950 mL of filtered natural seawater and add the following components. The trace element and vitamin solutions are provided below. Bring the final volume to 1 liter with filtered natural seawater. If the alga to be grown does not require silica, then it is recommended that the silica be omitted because it enhances precipitation. Autoclave.

| <i>Component</i> | <i>Stock Solution</i> | <i>Quantity</i> | <i>Molar Concentration in Final Medium</i> |
|--|--------------------------|-----------------|--|
| NaNO ₃ | 75 g/L dH ₂ O | 1 mL | 8.82 x 10 ⁻⁴ M |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 5 g/L dH ₂ O | 1 mL | 3.62 x 10 ⁻⁵ M |
| Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O | 30 g/L dH ₂ O | 1 mL | 1.06 x 10 ⁻⁴ M |
| trace metal solution | (see recipe below) | 1 mL | --- |
| vitamin solution | (see recipe below) | 0.5 mL | --- |

f/2 Trace Metal Solution

To prepare, begin with 950 mL of dH₂O, add the components and bring final volume to 1 liter with dH₂O. Autoclave. Note that the original medium (Guillard and Ryther 1962) used ferric sequestrene; we have substituted Na₂EDTA · 2H₂O and FeCl₃ · 6 H₂O.

| <i>Component</i> | <i>Primary Stock Solution</i> | <i>Quantity</i> | <i>Molar Concentration in Final Medium</i> |
|--|-------------------------------|-----------------|--|
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | --- | 3.15 g | 1.17 x 10 ⁻⁵ M |
| Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | --- | 4.36 g | 1.17 x 10 ⁻⁵ M |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 9.8 g/L dH ₂ O | 1 mL | 3.93 x 10 ⁻⁸ M |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 6.3 g/L dH ₂ O | 1 mL | 2.60 x 10 ⁻⁸ M |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 22.0 g/L dH ₂ O | 1 mL | 7.65 x 10 ⁻⁸ M |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 10.0 g/L dH ₂ O | 1 mL | 4.20 x 10 ⁻⁸ M |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 180.0 g/L dH ₂ O | 1 mL | 9.10 x 10 ⁻⁷ M |

f/2 Vitamin Solution

First, prepare primary stock solutions. To prepare final vitamin solution, begin with 950 mL of dH₂O, dissolve the thiamine, add 1 mL of the primary stocks and bring final volume to 1 liter with dH₂O. Filter sterilize. Store in refrigerator or freezer.

| <i>Component</i> | <i>Primary Stock Solution</i> | <i>Quantity</i> | <i>Molar Concentration in Final Medium</i> |
|--|-------------------------------|-----------------|--|
| thiamine HCl (vit. B ₁) | --- | 200 mg | 2.96×10^{-7} M |
| biotin (vit. H) | 1.0 g/L dH ₂ O | 1 mL | 2.05×10^{-9} M |
| cyanocobalamin (vit. B ₁₂) | 1.0 g/L dH ₂ O | 1 mL | 3.69×10^{-10} M |

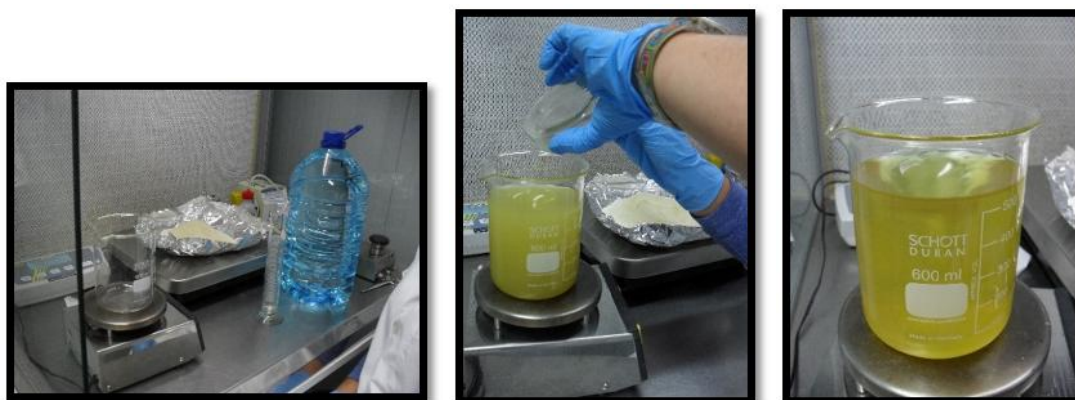


Figura 39 – Fotografias das várias etapas da preparação do meio f/2 a partir da solução *stock*

Anexo III - Meio de Cultura VSE

VON STOSCH'S ENRICHED SEAWATER MEDIUM

von Stosch's Enrichment (as cited by Ott, 1956)

The seawater should be filtered (Whatman's #1) to remove large organic particles and sand. Then sterilize by autoclaving (time: 100 ml requires 10 minutes; 2 liters requires 40 minutes; 3 liters requires 50 minutes; and 5 liters requires 70 minutes). To each liter of seawater, then add the following:

| Salts | 1 liter of seawater |
|---|---------------------|
| x (1) Na NO ₃ | 42.50 mg |
| x (2) Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O | 10.75 mg |
| v (3) FeSO ₄ 7H ₂ O | 278.00 ug |
| v (4) MnCl ₂ 4H ₂ O | 19.80 ug |
| v (5) Na ₂ EDTA 2H ₂ O | 3.72 mg |

| Vitamins | 1 liter of seawater |
|----------------------|---------------------|
| x (6a) Thiamine-HCl | 0.20 mg |
| (6b) Biotin | 1.00 ug |
| (6c) B ₁₂ | 1.00 ug |

It is convenient to prepare a stock solution of each salt in distilled water, of such concentration that 1 ml of the stock solution gives the required concentration of each ingredient. The three vitamins may be incorporated in the same stock solution which should be refrigerated. The salts and vitamins after preparation into stock solutions should be sterile filtered.

- I. To make stock solutions use deionized distilled water and clean volumetric flasks.
- II. Filter each stock solution through separate 0.22 um millipore filters. Each solution will have to be sterilized separately.
- III. Aseptically pour filtered volume of liquid into autoclaved stock bottles.

| 1 liter stock solution | 2 liter stock solution |
|-------------------------|------------------------|
| (1) 42.500 grams 21,250 | 85.000 grams |
| (2) 10.750 " 5,375 | 21.500 " |
| (3) 0.278 " 0,139 | 0.556 " |
| (4) 0.0198 " 0,0099 | 0.039 " |
| (5) 3.720 " 1,860 | 7.440 " |
| (6a) 0.200 " 0,100 | 0.400 " |
| (6b) 0.001 " 0,0005 | 0.002 " |
| (6c) 0.001 " 0,0005 | 0.002 " |

01/18/01 THU 12:10 FAX 203 231 8892
LCONN STAMFORD
2002

Anexo IV – Curva padrão de calibração do ácido gálico

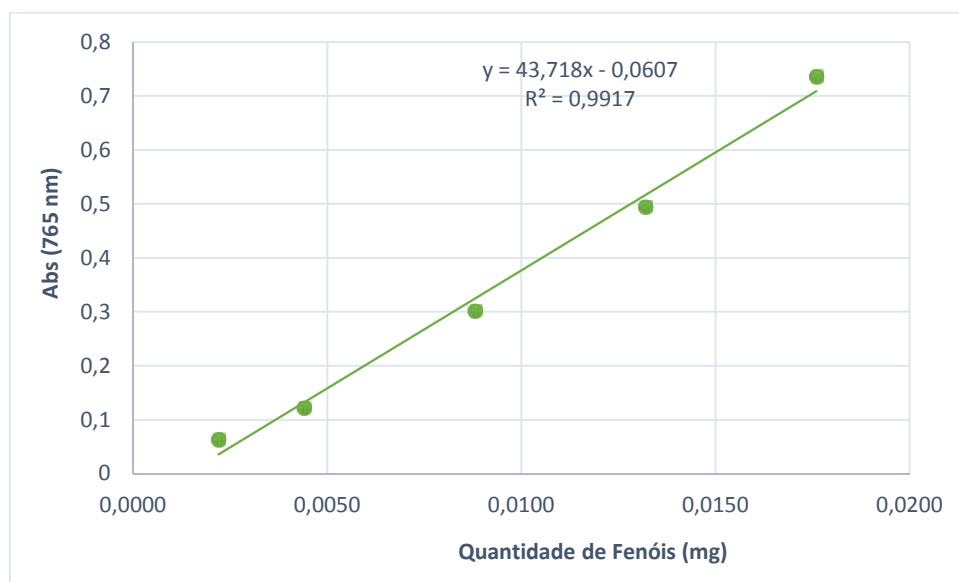
- Curva de Calibração para os Extratos Aquosos

Preparação do ácido gálico em água

| Massa (mg) | Volume (mL) | Concentração (mg/mL) |
|------------|-------------|----------------------|
| 0.22 | 1 | 0.22 |

Reta de Calibração

| V ac. Gálico (mL) | Qtd ac. Gálico (mg) | abs (765 nm) | | Média | Declive da reta |
|-------------------|---------------------|--------------|-------|--------|-----------------------|
| 0 | 0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 43.718 |
| 0.01 | 0.0022 | 0.060 | 0.066 | 0.063 | |
| 0.02 | 0.0044 | 0.125 | 0.119 | 0.122 | Interceção da reta |
| 0.04 | 0.0088 | 0.315 | 0.288 | 0.3015 | |
| 0.06 | 0.0132 | 0.459 | 0.530 | 0.4945 | -0.0607 |
| 0.08 | 0.0176 | 0.706 | 0.765 | 0.7355 | |



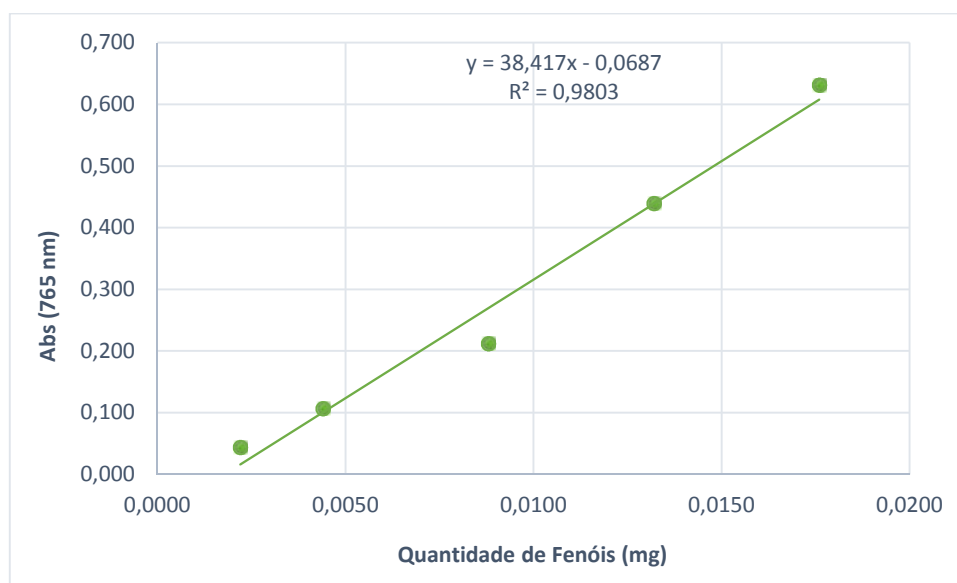
- Curva de Calibração para os Extratos Metanólicos

Preparação do ácido gálico em metanol

| Massa (mg) | Volume (mL) | Concentração (mg/mL) |
|------------|-------------|----------------------|
| 0.22 | 1 | 0.22 |

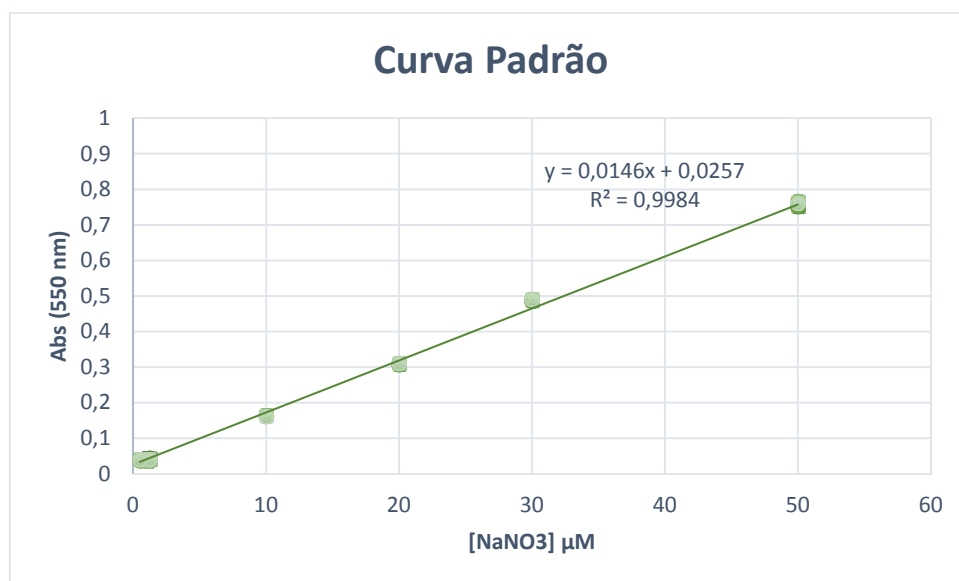
Reta de Calibração

| V ac. Gálico (mL) | Qtd ac. Gálico (mg) | abs (765 nm) | | Média | Declive da reta |
|-------------------|---------------------|--------------|-------|-------|--------------------|
| 0 | 0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 38.417 |
| 0.01 | 0.0022 | 0.044 | 0.043 | 0.044 | |
| 0.02 | 0.0044 | 0.113 | 0.100 | 0.107 | Interceção da reta |
| 0.04 | 0.0088 | 0.233 | 0.190 | 0.212 | |
| 0.06 | 0.0132 | 0.427 | 0.451 | 0.439 | -0.0687 |
| 0.08 | 0.0176 | 0.653 | 0.609 | 0.631 | |



Anexo V – Curva padrão de calibração do nitrito de sódio (NaNO₂)

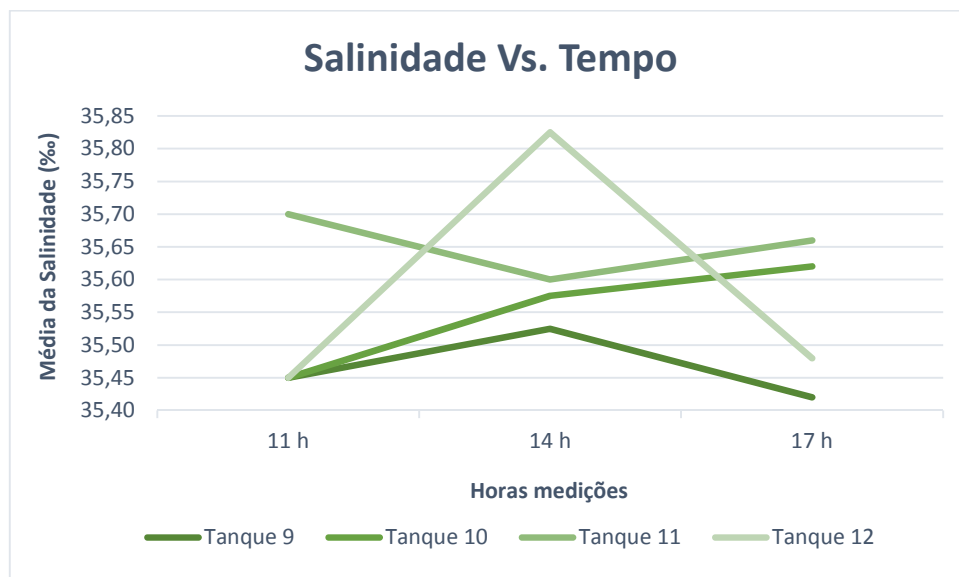
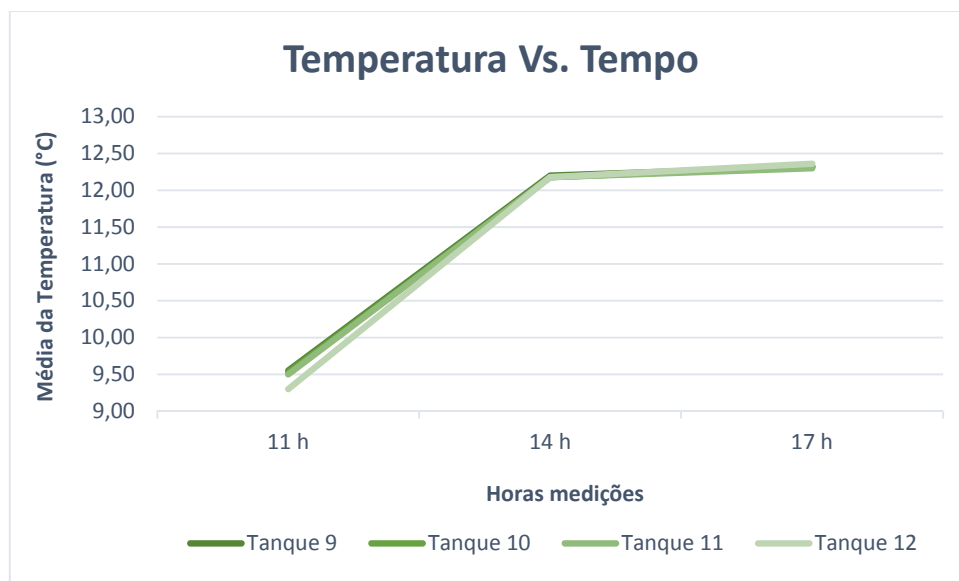
| [NaNO ₃] μM | N = 1 | N = 2 | N = 3 | Média | SD |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------------|--------|
| 50 | 0.751 | 0.753 | 0.766 | 0.76 | 0.0081 |
| 30 | 0.485 | 0.487 | 0.491 | 0.49 | 0.0031 |
| 20 | 0.307 | 0.307 | 0.311 | 0.31 | 0.0023 |
| 10 | 0.162 | 0.163 | 0.163 | 0.16 | 0.0006 |
| 1.0 | 0.041 | 0.039 | 0.035 | 0.04 | 0.0031 |
| 1.25 | 0.044 | 0.038 | 0.041 | 0.04 | 0.0030 |
| 0.5 | 0.039 | 0.04 | 0.036 | 0.04 | 0.0021 |

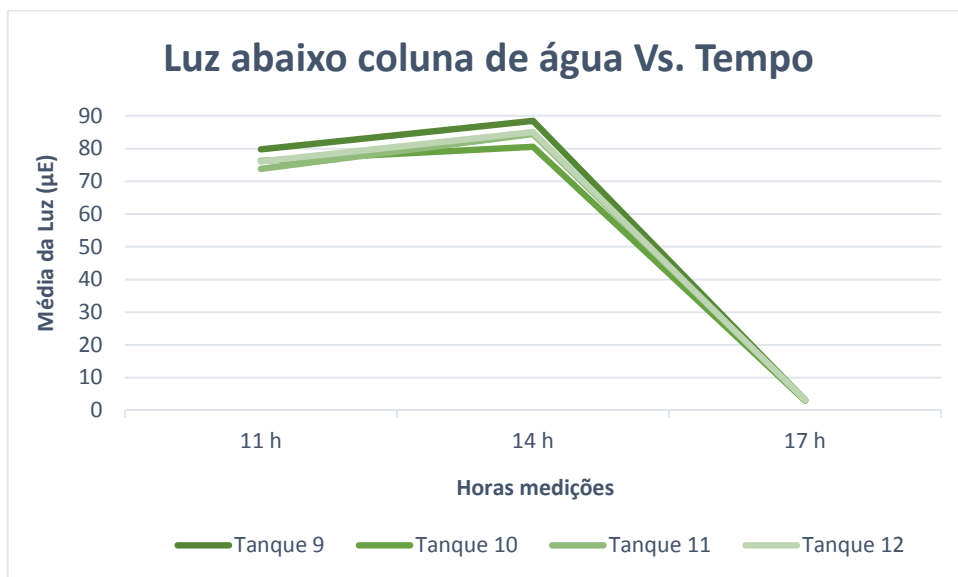
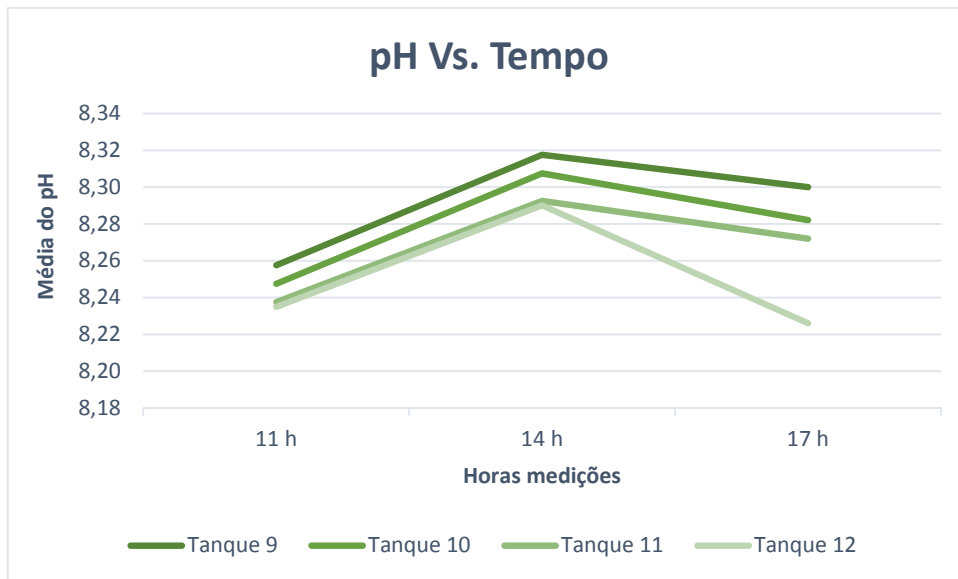


Anexo VI – Gráficos da Experiências A e B

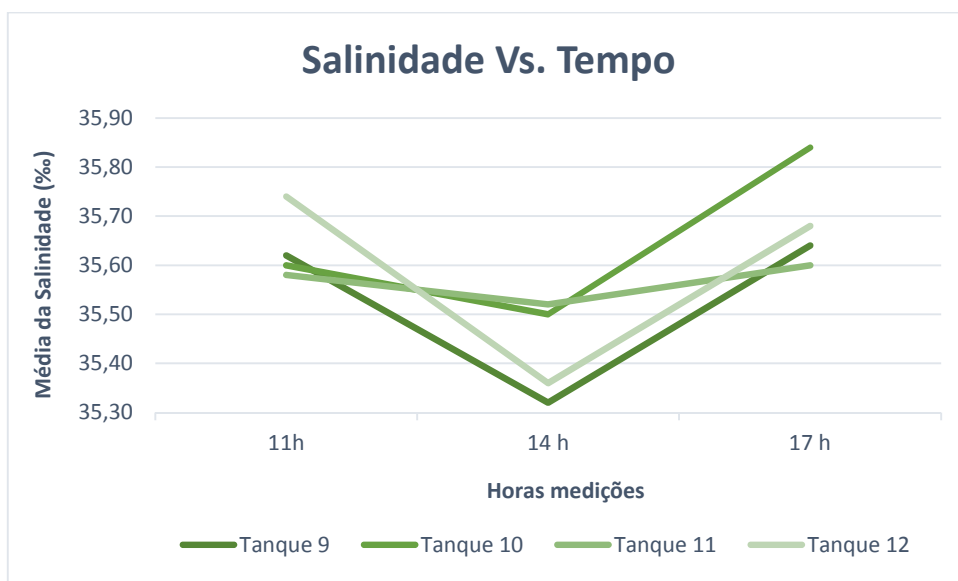
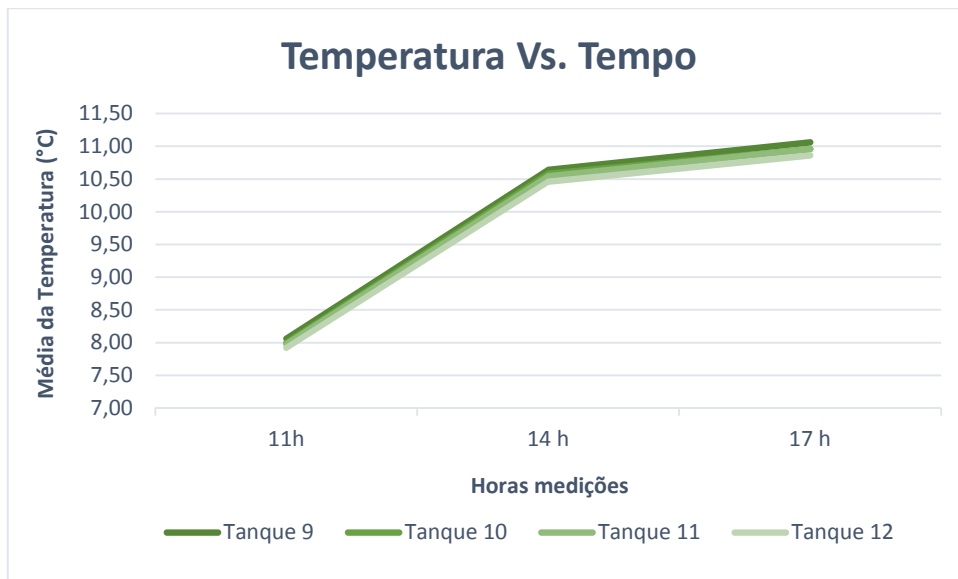
Monitorização da temperatura (°C), do pH, da salinidade (‰), da intensidade luminosa abaixo da coluna de água (μE) e pesagens semanais das experiências A e B

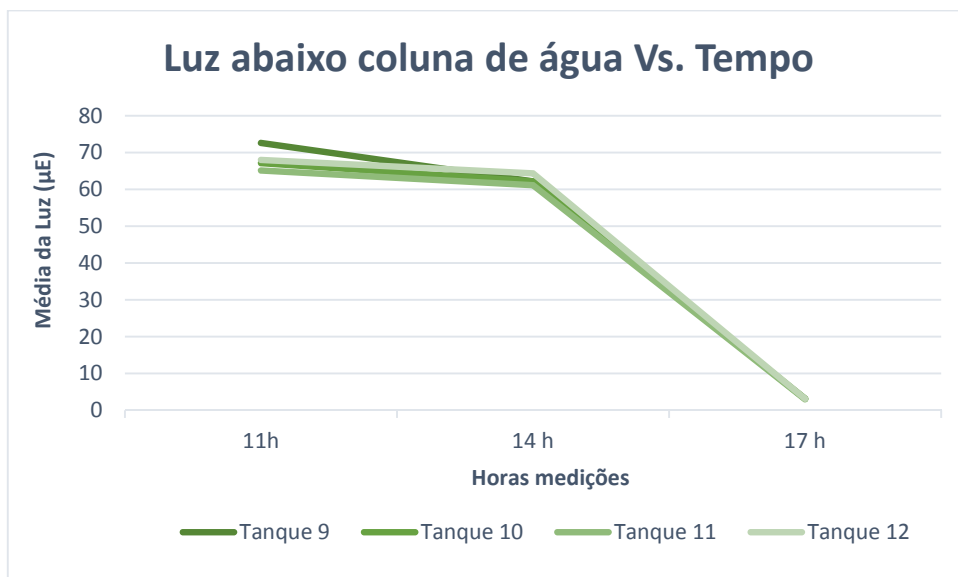
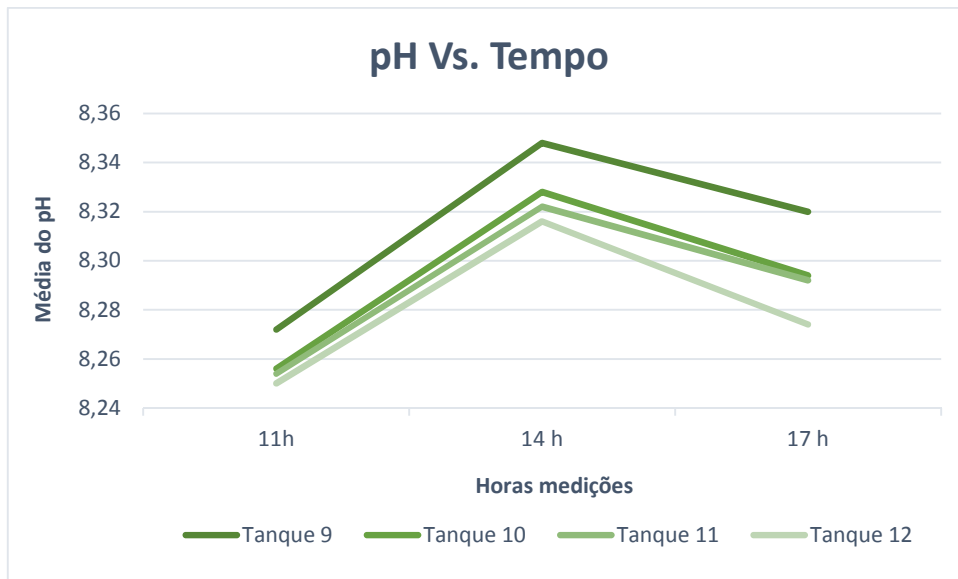
- Experiência A
 - Semana 1



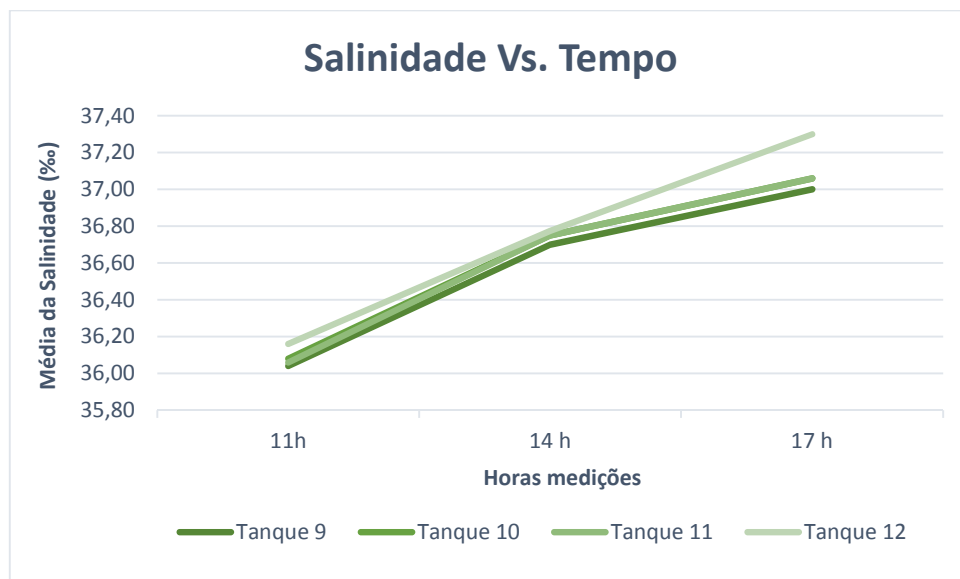
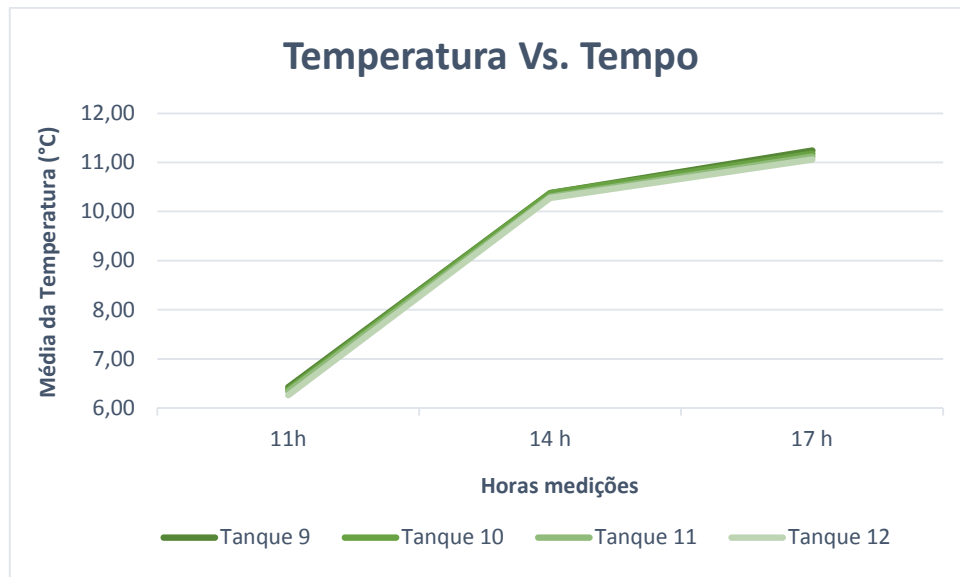


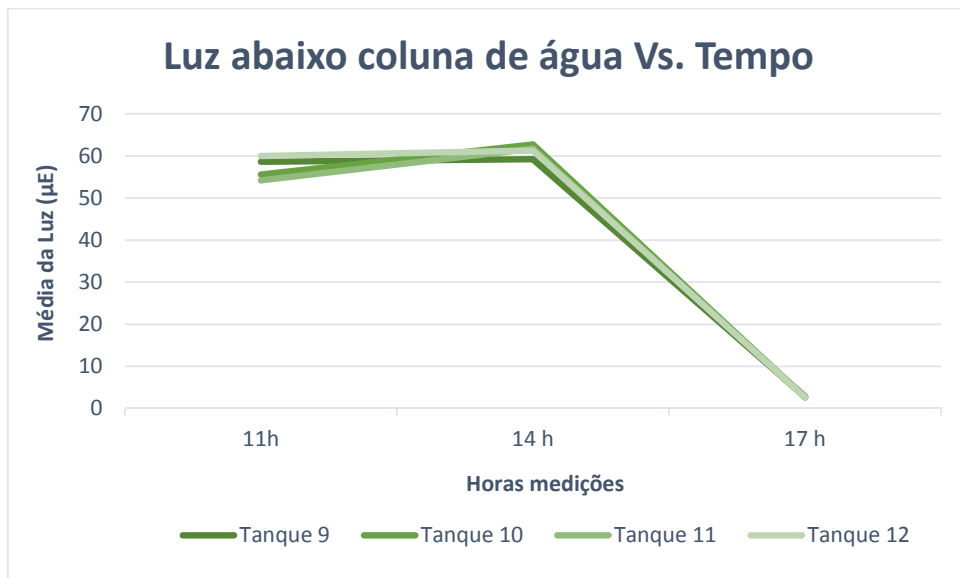
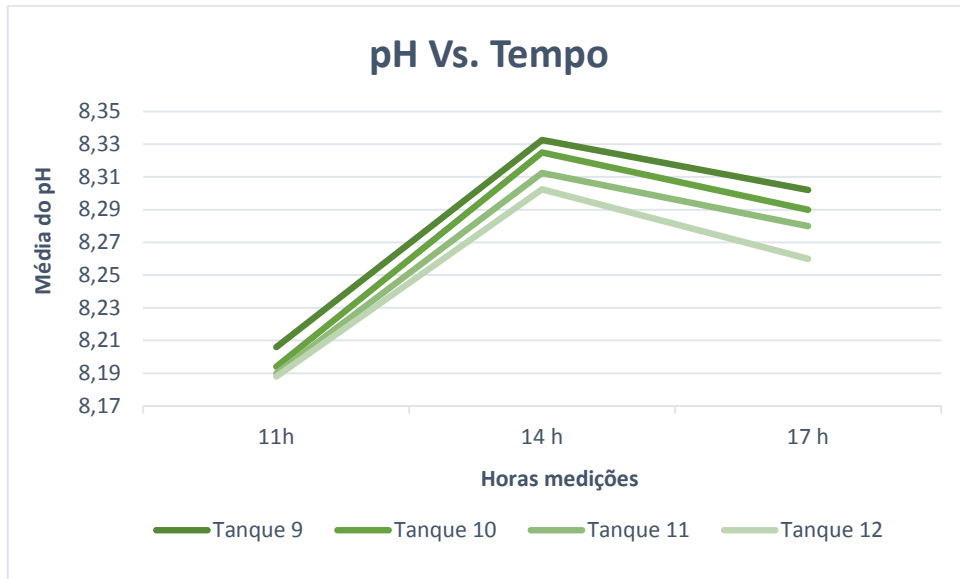
- Experiência A
 - Semana 2



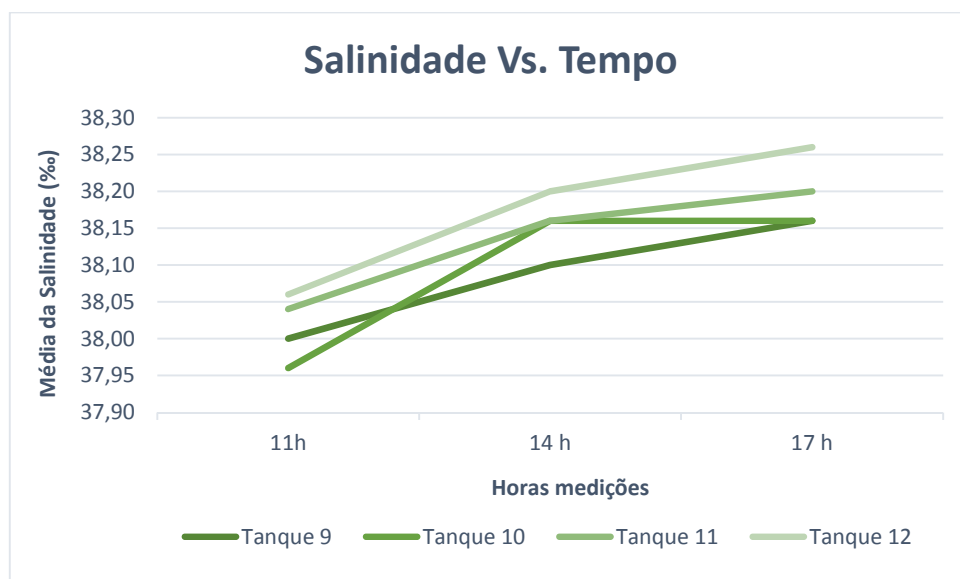
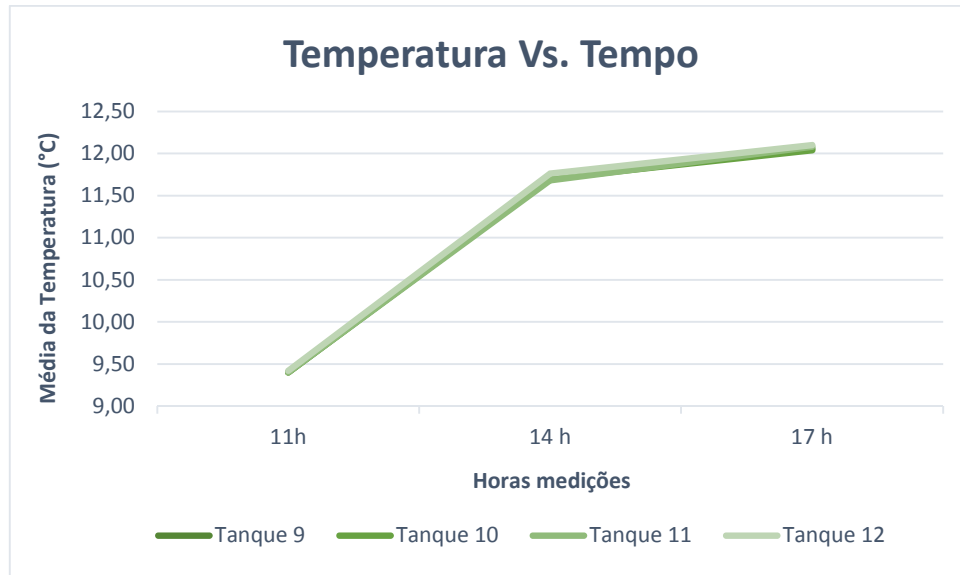


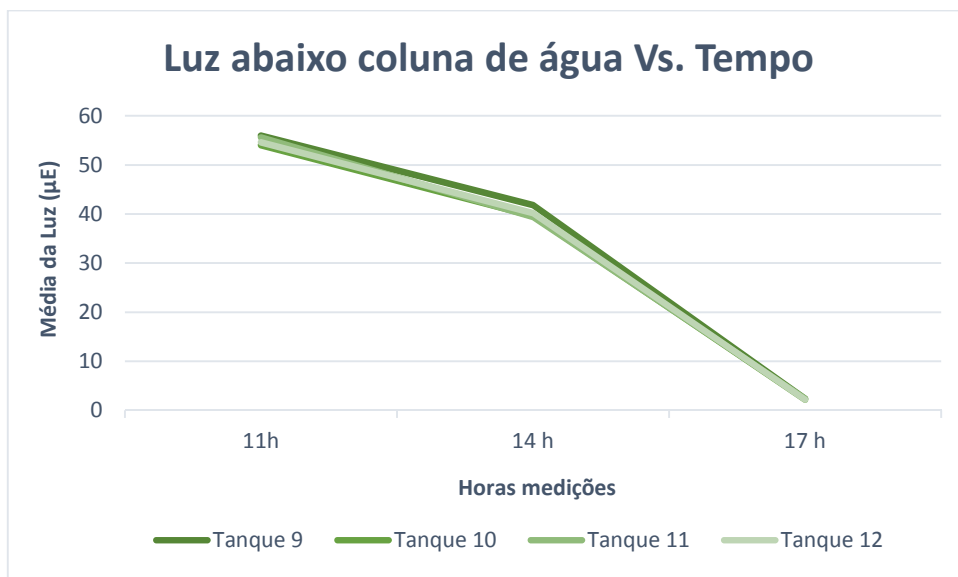
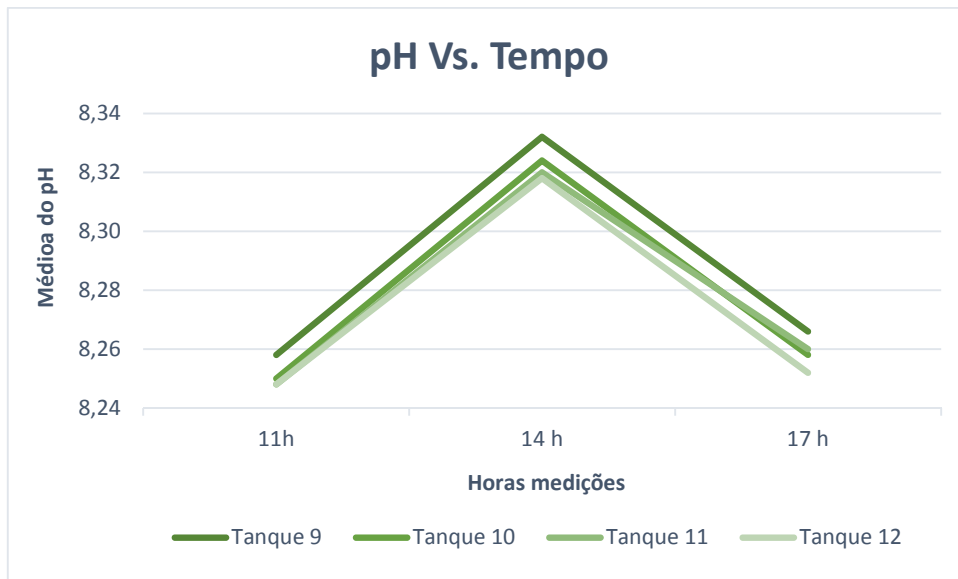
- Experiência A
 - Semana 3



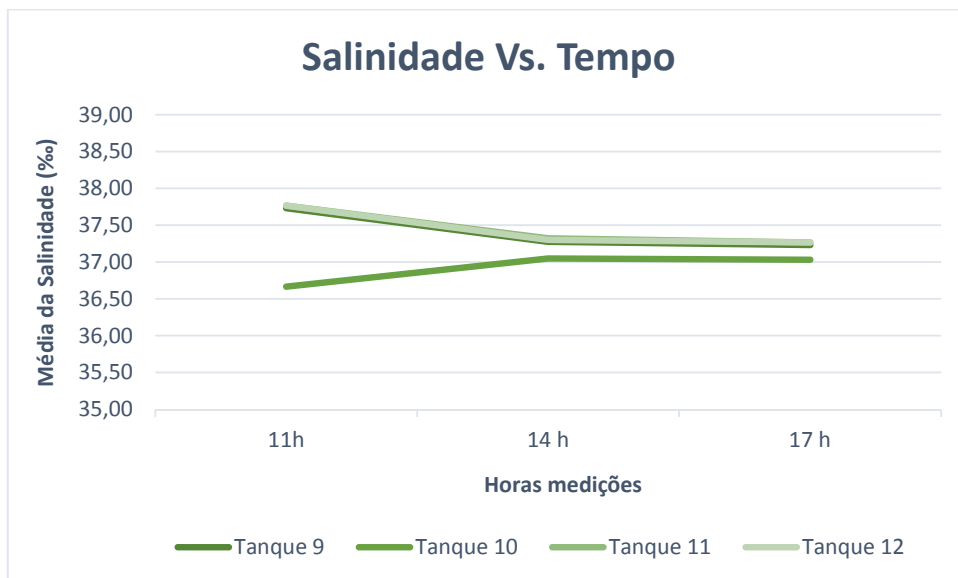
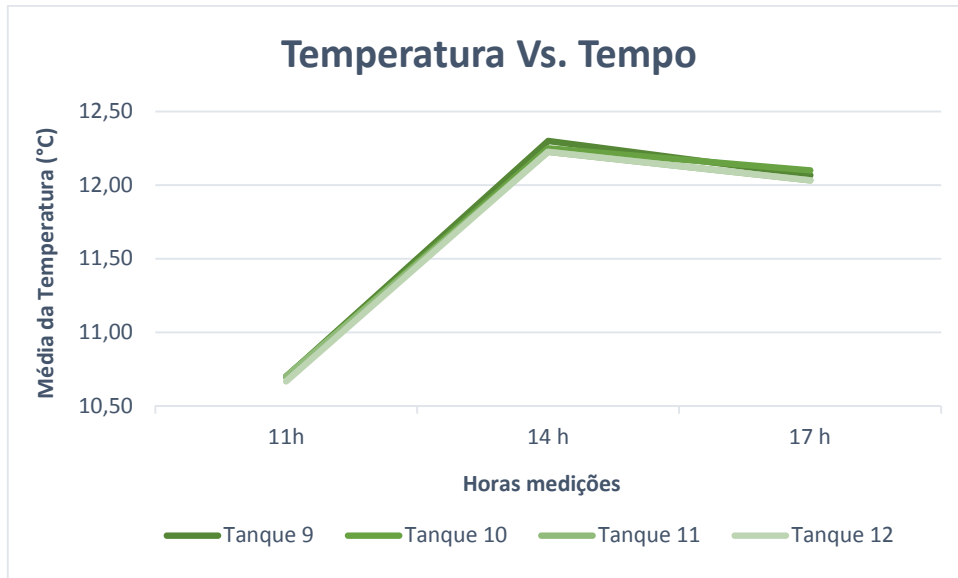


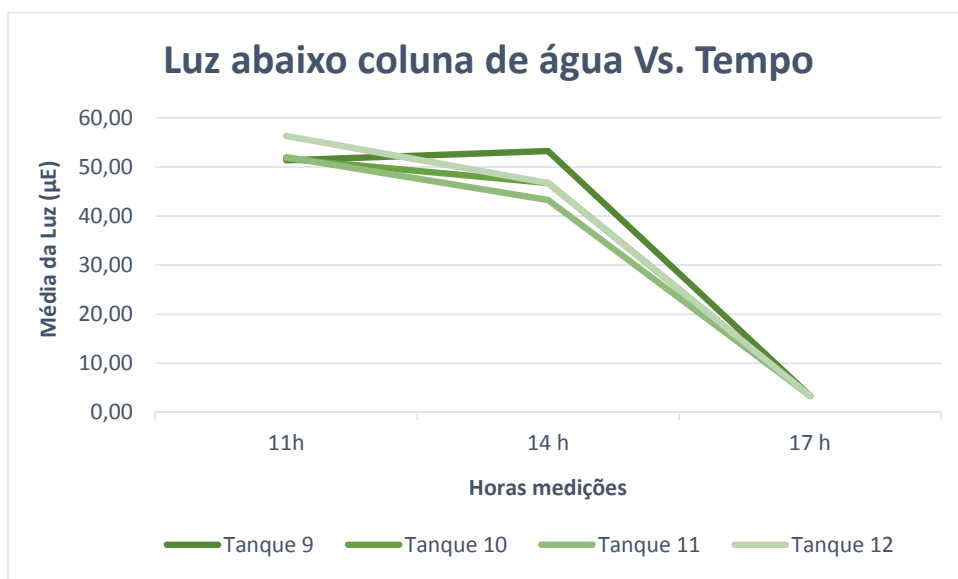
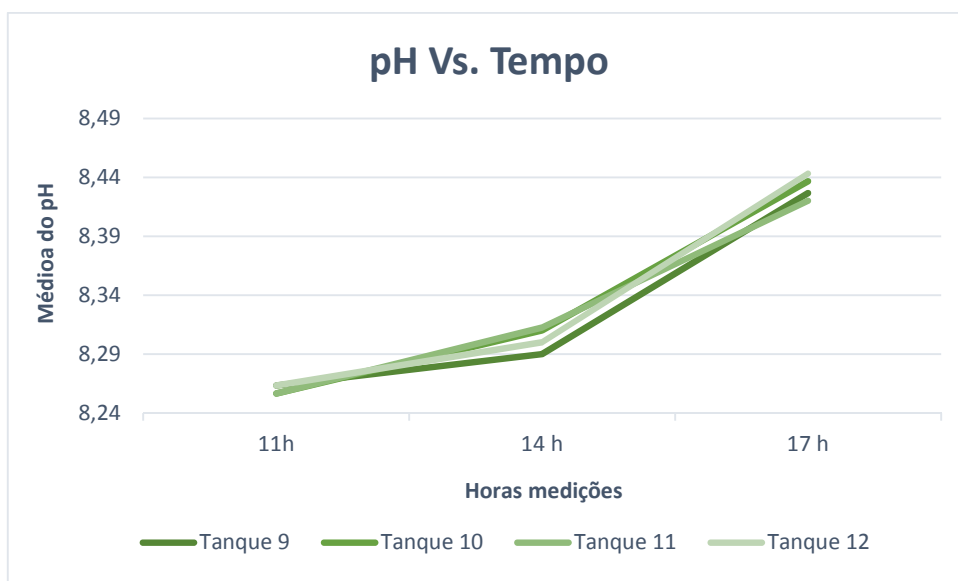
- Experiência A
 - Semana 4





- Experiência A
 - Semana 5

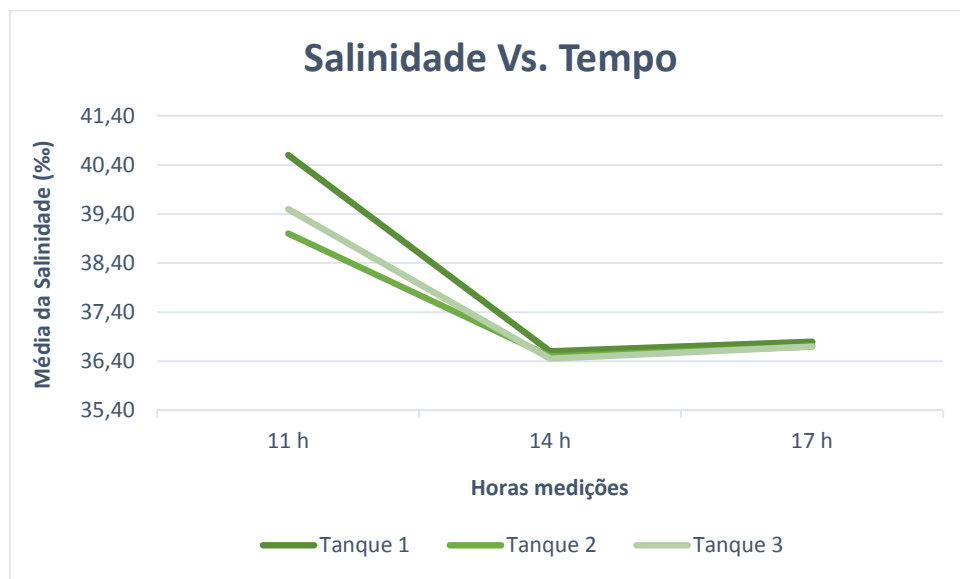
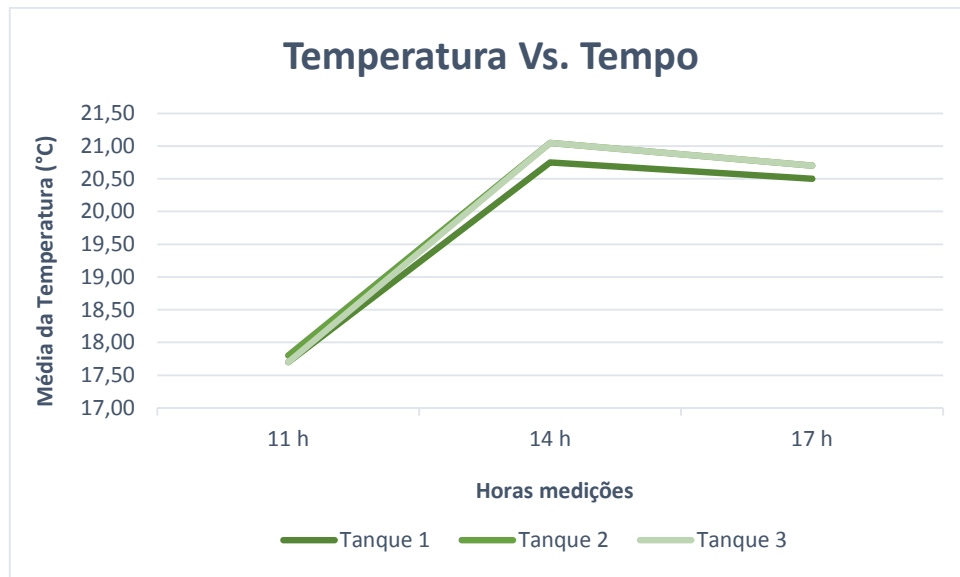


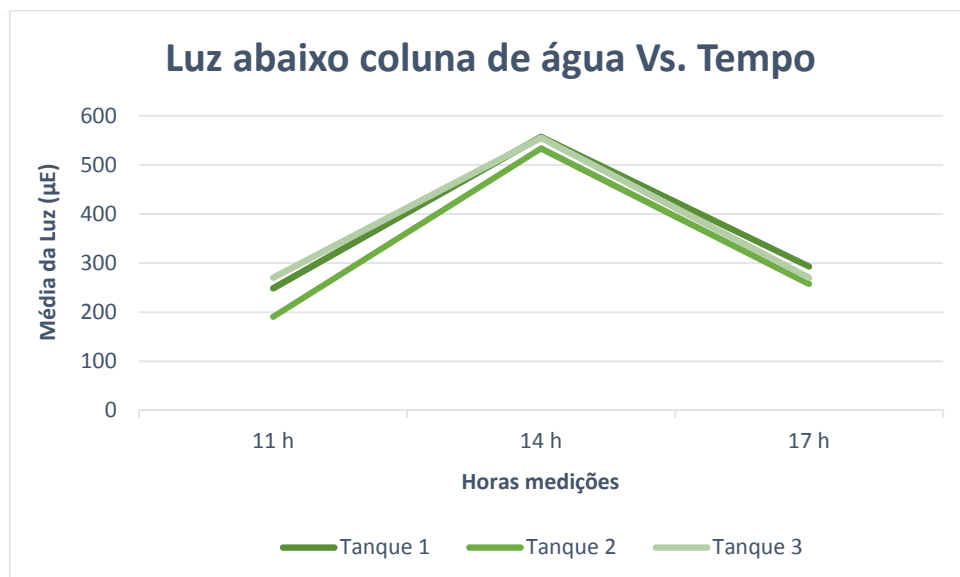
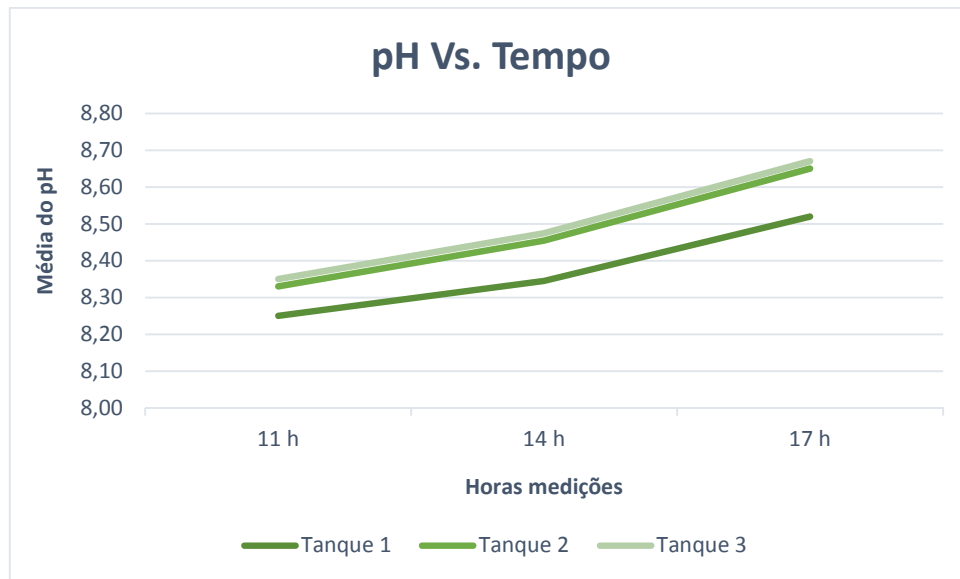


- Experiência A
 - Pesagens por tanque (Pi corresponde ao peso inicial e Pf ao peso final)

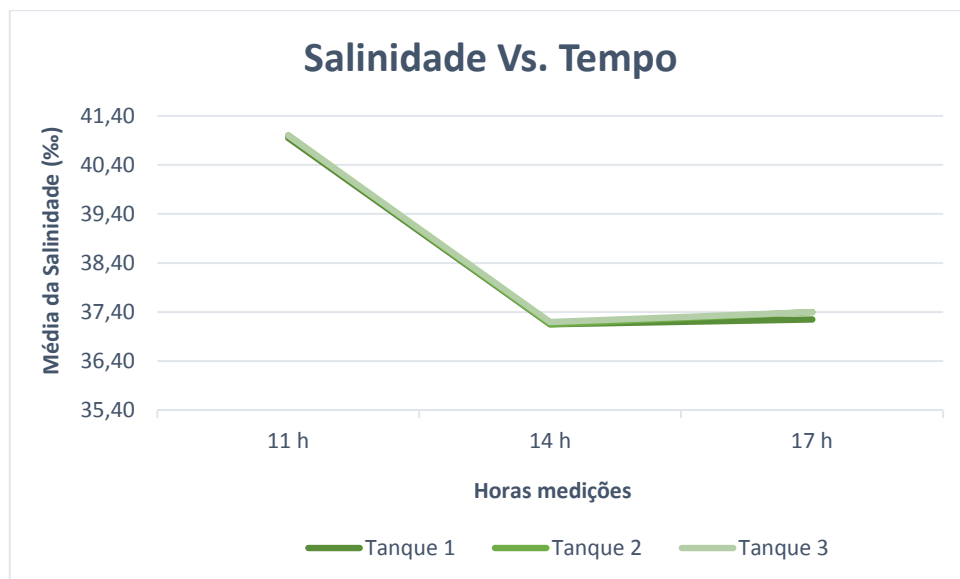
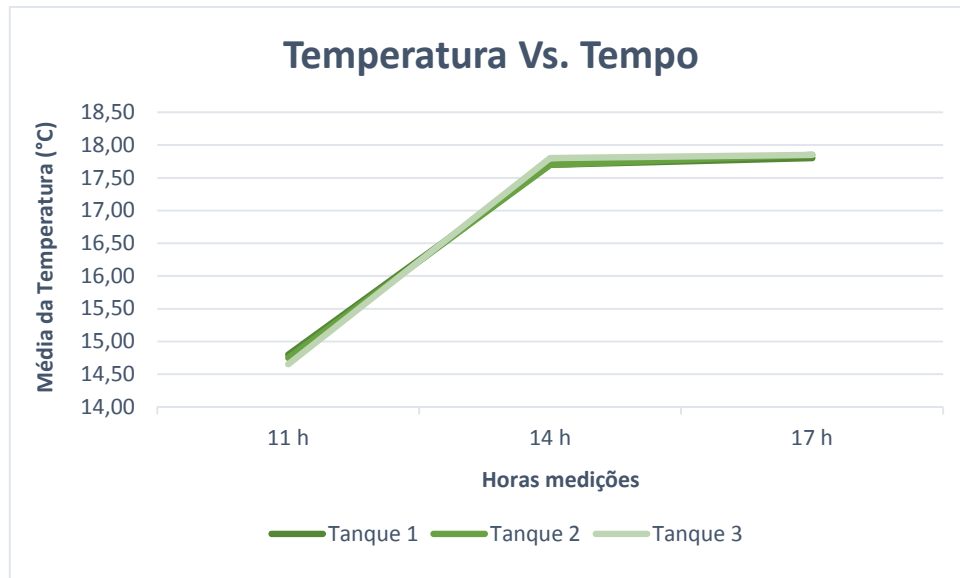
| Tanques | Semana 1 | | Semana 2 | | Semana 3 | | Semana 4 | | Semana 5 | |
|-----------|----------|--------|----------|------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | Pi | Pf | Pi | Pf | Pi | Pf | Pi | Pf | Pi | Pf |
| Tanque 9 | 150g | 155.5g | 150g | 150g | 150g | 155g | 150g | 153g | 150g | 153.5g |
| Tanque 10 | 150g | 152.5g | 150g | 152g | 150g | 153g | 150g | 158.5g | 150g | 159g |
| Tanque 11 | 150g | 151.5g | 150g | 151g | 150g | 152.5g | 150g | 150g | 150g | 153.5g |
| Tanque 12 | 150g | 150.5g | 150g | 155g | 150g | 150g | 150g | 153.5g | 150g | 153.5g |

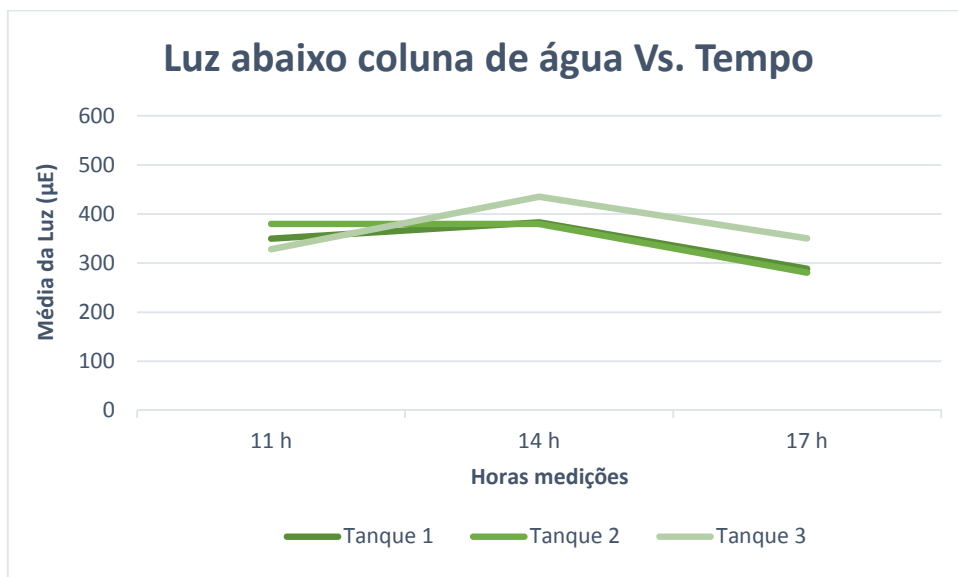
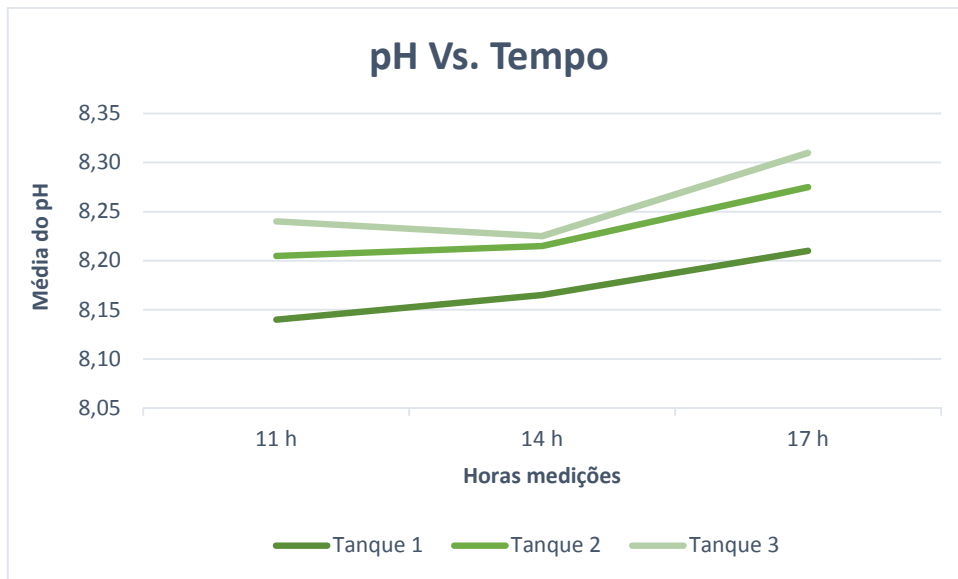
- Experiência B
 - Semana 1



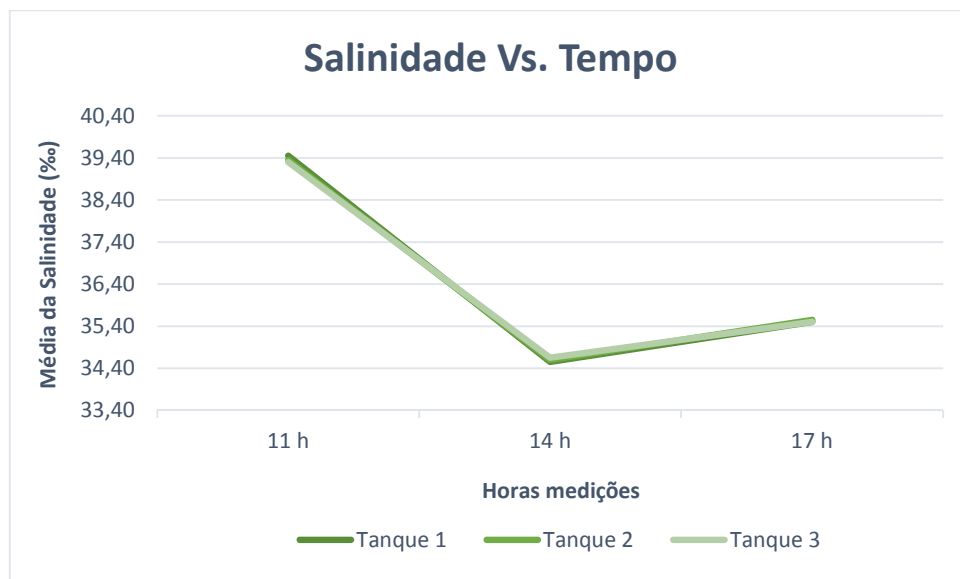
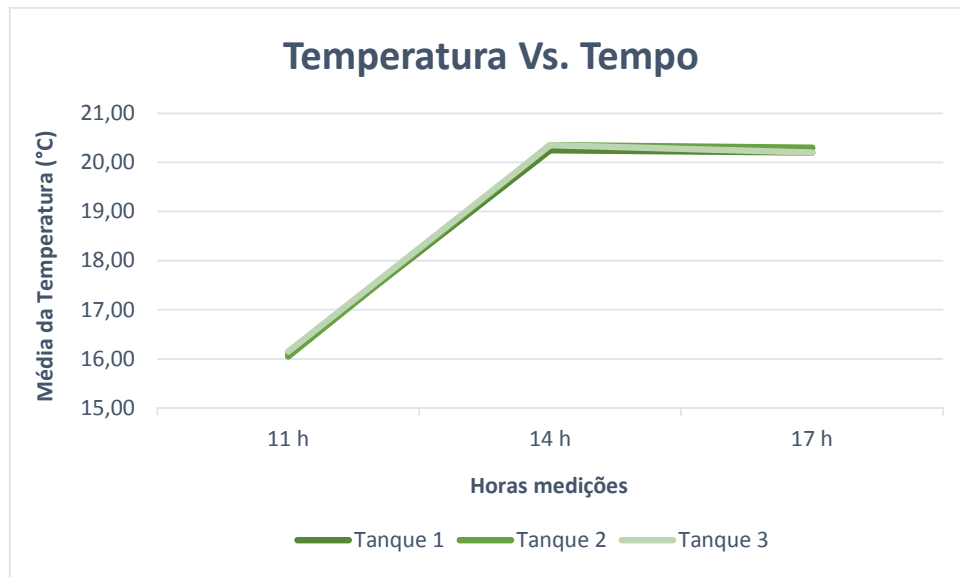


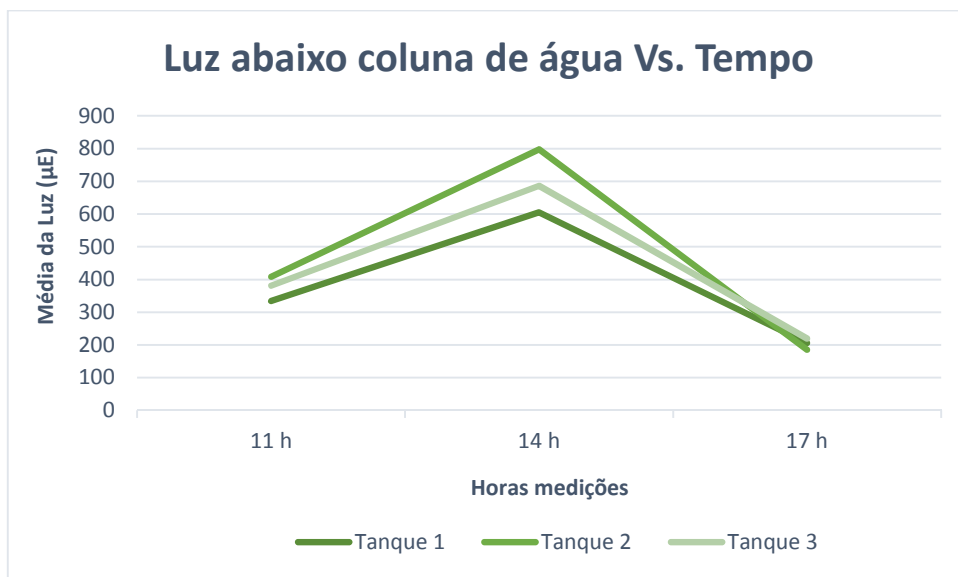
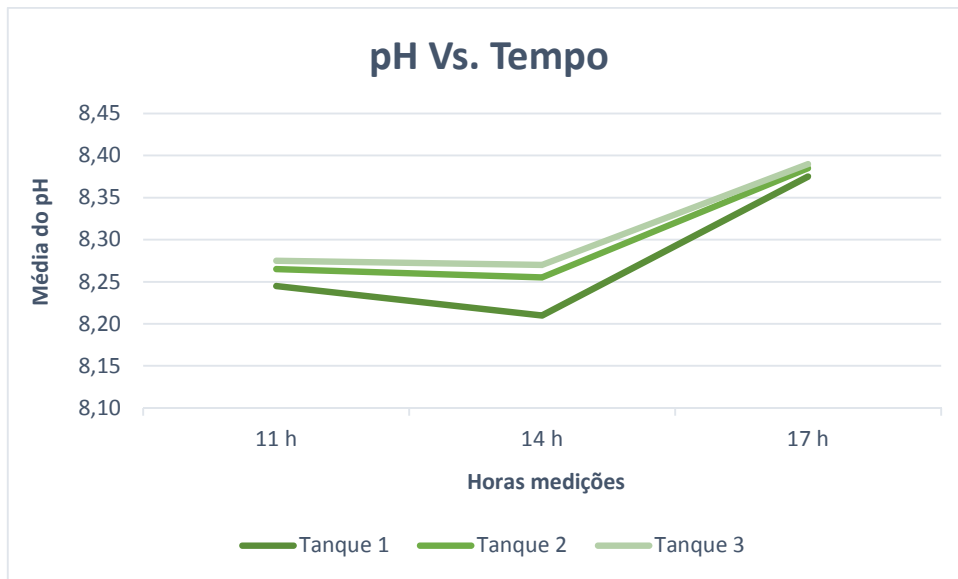
- Experiência B
 - Semana 2



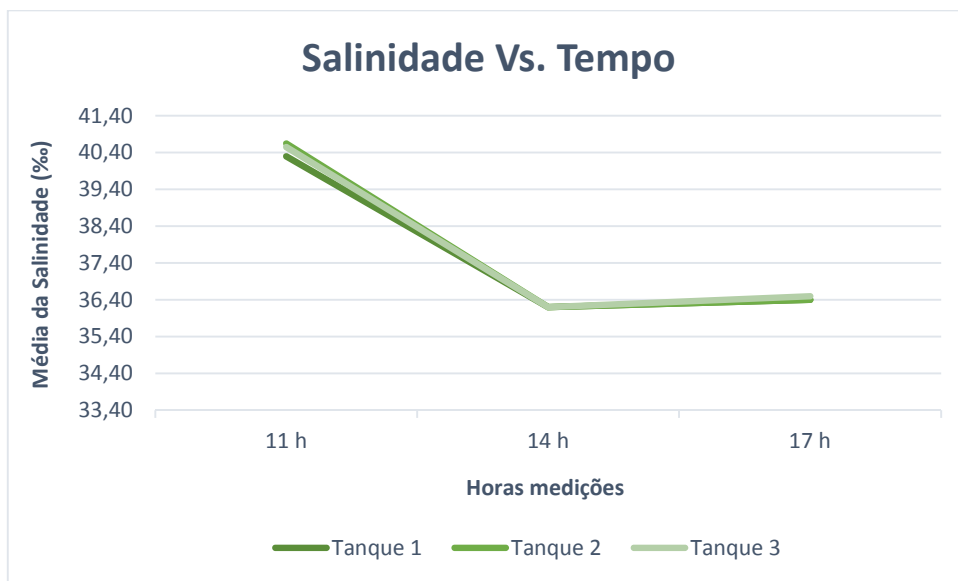
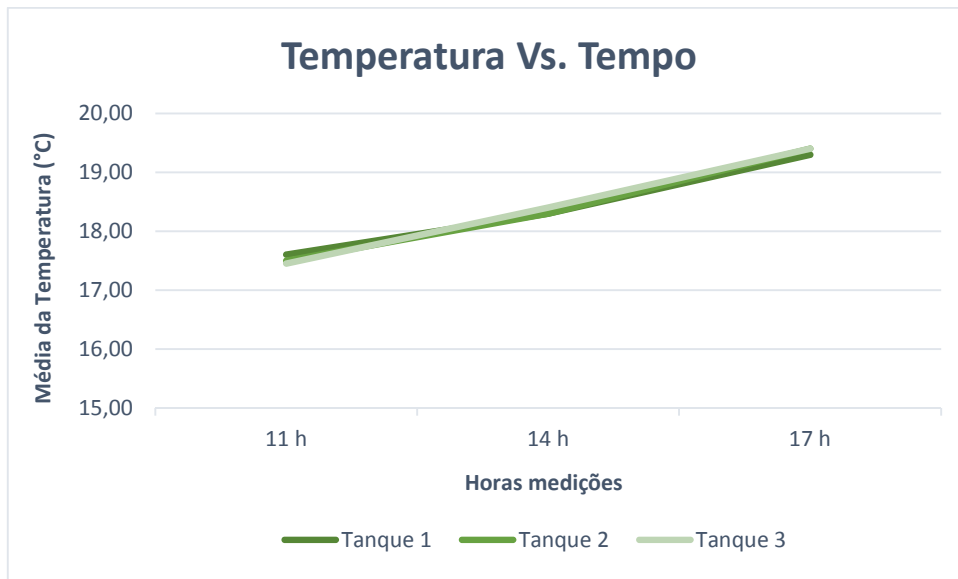


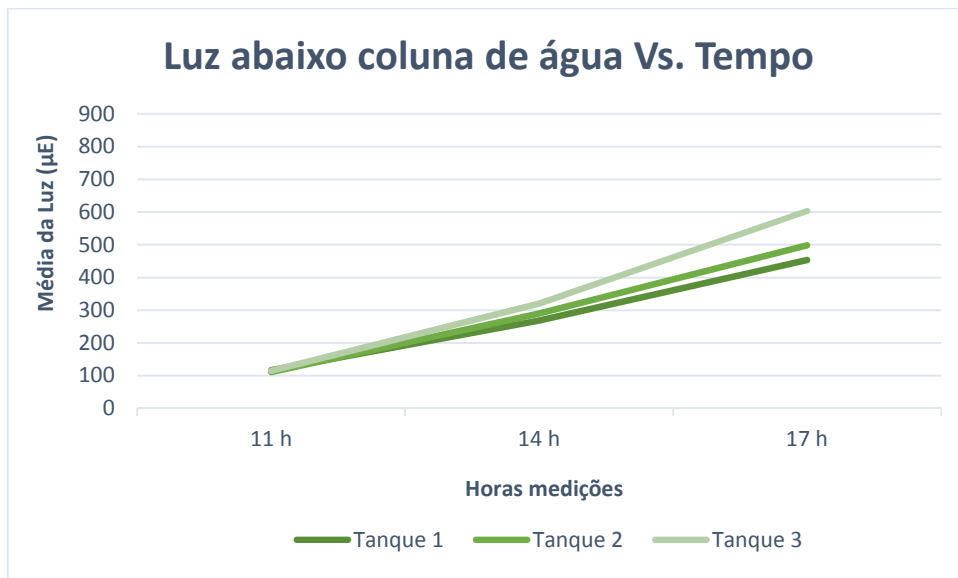
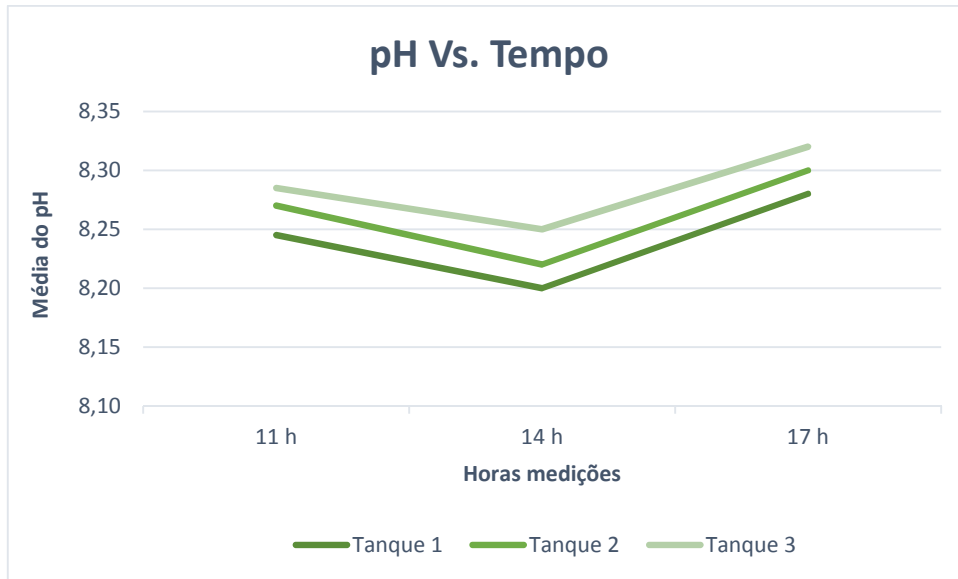
- Experiência B
 - Semana 3





- Experiência B
 - Semana 4





- Experiência B
 - Pesagens por tanque (Pi corresponde ao peso inicial e Pf ao peso final)

| Tanques | Semana 1 | | Semana 2 | | Semana 3 | | Semana 4 | |
|----------|----------|------|----------|------|----------|--------|----------|--------|
| | Pi | Pf | Pi | Pf | Pi | Pf | Pi | Pf |
| Tanque 1 | 131g | 132g | 132g | 153g | 150g | 149.5g | 150g | 170g |
| Tanque 2 | 131g | 146g | 146g | 160g | 150g | 161.5g | 150g | 164.5g |
| Tanque 3 | 131g | 143g | 143g | 169g | 150g | 159g | 150g | 167g |

Anexo VII – Cálculo da percentagem de inibição do radical DPPH

- Extratos Aquosos

| N = 1 | V Extrato Aquoso adicionado meio reação (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 517 nm | Média | % inib |
|-------------------------|--|----------------------------------|----------------|--------|-----------------|
| Extrato Aquoso Selvagem | 0 | 0 | 1.046 | 1.046 | |
| | 0.1 | 1.25 | 0.917 0.919 | 0.918 | 12.23709 |
| Extrato Aquoso IMTA | 0 | 0 | 1.046 | 1.046 | |
| | 0.1 | 1.25 | 0.955 0.96 | 0.9575 | 8.460803 |

| N = 2 | V Extrato Aquoso adicionado meio reação (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 517 nm | Média | % inib |
|-------------------------|--|----------------------------------|----------------|--------|--------------|
| Extrato Aquoso Selvagem | 0 | 0 | 0.6375 | 0.6375 | |
| | 0.1 | 1.25 | 0.577 0.545 | 0.561 | 12.00 |
| Extrato Aquoso IMTA | 0 | 0 | 0.6375 | 0.6375 | |
| | 0.1 | 1.25 | 0.596 0.575 | 0.5855 | 8.16 |

| N = 3 | V Extrato Aquoso adicionado meio reação (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 517 nm | Média | % inib |
|-------------------------|--|----------------------------------|----------------|--------|--------------|
| Extrato Aquoso Selvagem | 0 | 0 | 0.7165 | 0.7165 | |
| | 0.1 | 1.25 | 0.631 0.619 | 0.625 | 12.77 |
| Extrato Aquoso IMTA | 0 | 0 | 0.7165 | 0.7165 | |
| | 0.1 | 1.25 | 0.677 0.63 | 0.6535 | 8.79 |

Ensaio DPPH

| | N = 1 | N = 2 | N = 3 | MÉDIA | SD | Ideia da % de erro | SE |
|-------------------------|--------|--------|--------|---------------|-------|--------------------|-------|
| Extrato Aquoso Selvagem | 12.237 | 12.000 | 12.770 | 12.336 | 0.395 | 3.20 | 0.228 |
| Extrato Aquoso IMTA | 8.461 | 8.157 | 8.793 | 8.470 | 0.318 | 3.75 | 0.184 |

- Extratos Metanólicos

| N = 1 | V Extrato Metanólico adicionado meio reação (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 517 nm | Média | % inib |
|-----------------------------|--|----------------------------------|----------------|--------|-------------|
| Extrato Metanólico Selvagem | 0 | 0 | 1.046 | 1.046 | |
| | 0.1 | 1 | 1.031 1.032 | 1.0315 | 1.39 |
| Extrato Metanólico IMTA | 0 | 0 | 0.76 | 0.76 | |
| | 0.1 | 1 | 0.744 0.741 | 0.7425 | 2.30 |

| N = 2 | V Extrato Metanólico adicionado meio reação (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 517 nm | Média | % inib |
|-----------------------------|--|----------------------------------|----------------|--------|-------------|
| Extrato Metanólico Selvagem | 0 | 0 | 0.6375 | 0.6375 | |
| | 0.1 | 1 | 0.65 0.606 | 0.628 | 1.49 |
| Extrato Metanólico IMTA | 0 | 0 | 0.6375 | 0.6375 | |
| | 0.1 | 1 | 0.621 0.619 | 0.62 | 2.75 |

| N = 3 | V Extrato Metanólico adicionado meio reação (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 517 nm | Média | % inib |
|-----------------------------------|--|--|----------------|--------|-------------|
| Extrato Metanólico Selvagem | 0 | 0 | 0.7165 | 0.7165 | |
| | 0.1 | 1 | 0.714 0.699 | 0.7065 | 1.40 |
| Extrato Metanólico IMTA | 0 | 0 | 0.7165 | 0.7165 | |
| | 0.1 | 1 | 0.698 0.701 | 0.6995 | 2.37 |

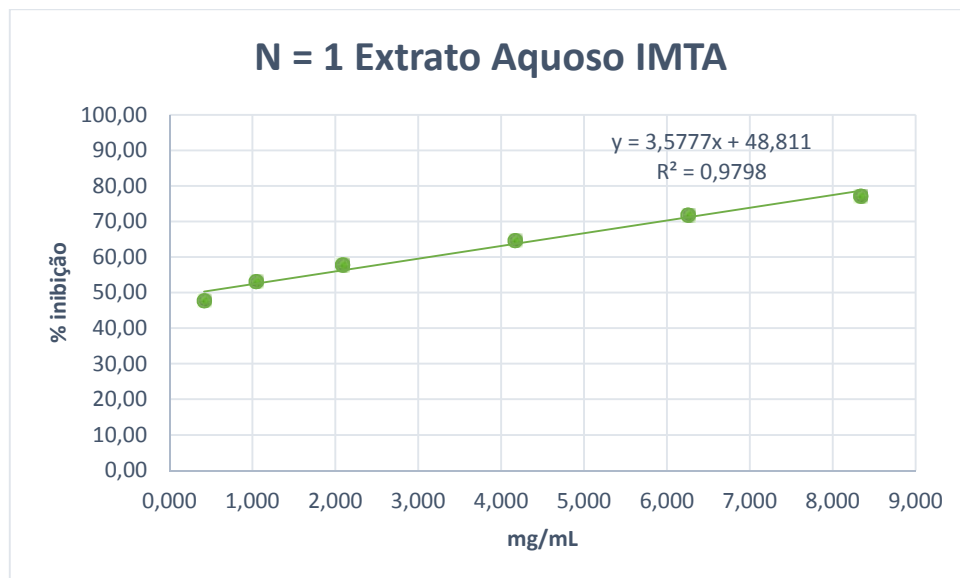
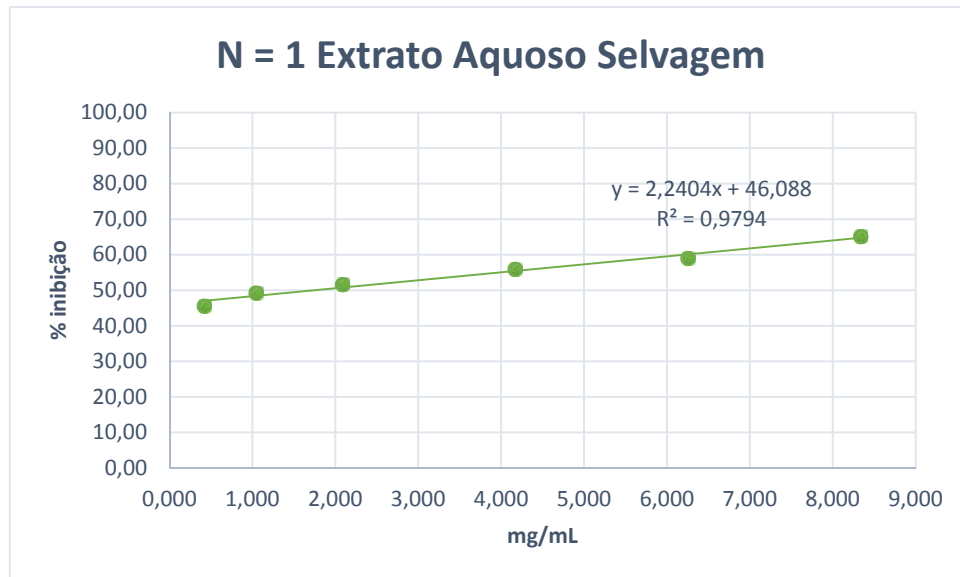
Ensaio DPPH

| | N = 1 | N = 2 | N = 3 | MÉDIA | SD | Ideia da % de erro | SE |
|--------------------------------|-------|-------|-------|--------------|-------|-----------------------------|-------|
| Extrato Metanólico Selvagem | 1.386 | 1.490 | 1.396 | 1.424 | 0.057 | 4.04 | 0.033 |
| Extrato Metanólico IMTA | 2.303 | 2.745 | 2.373 | 2.473 | 0.238 | 9.62 | 0.137 |

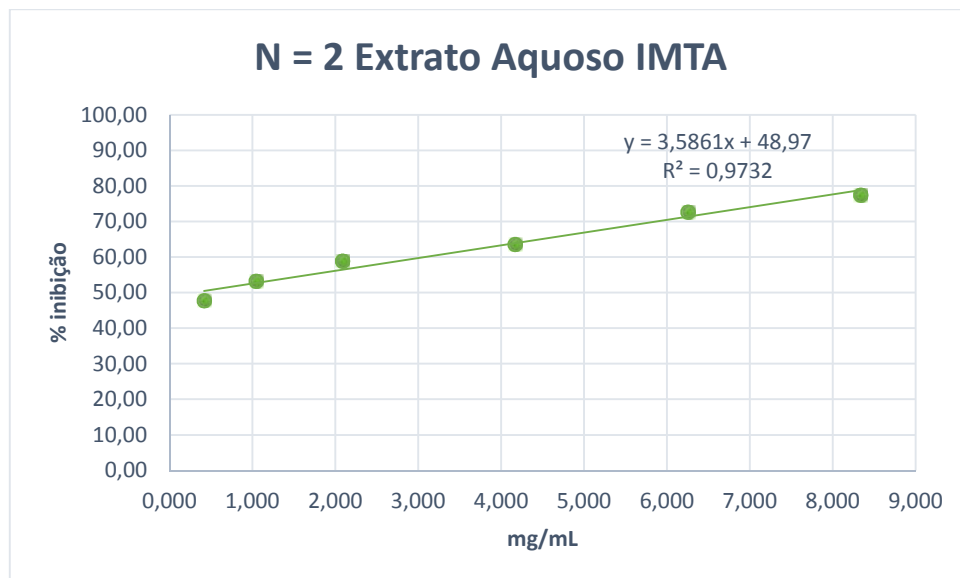
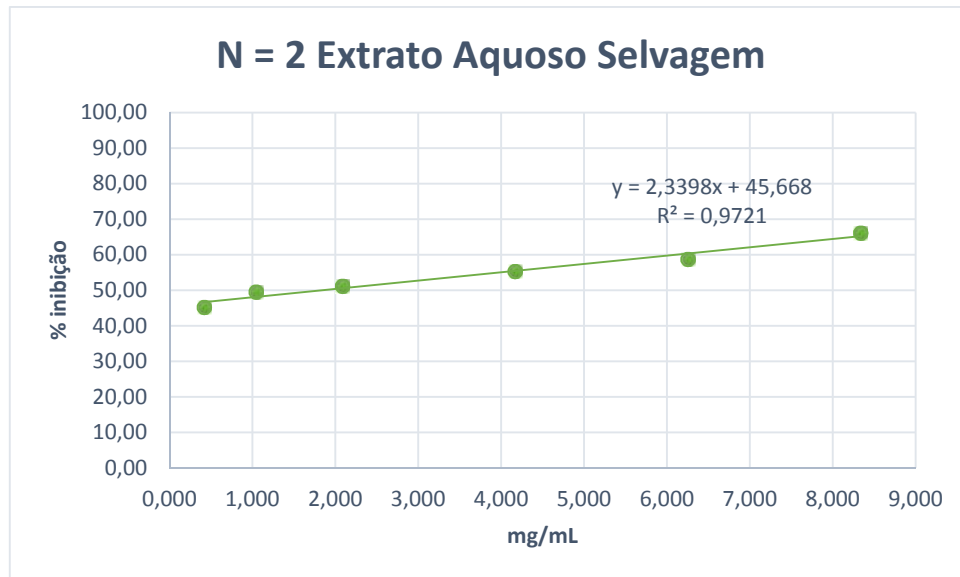
Anexo VIII – Retas de percentagem de inibição do radical NO e cálculos do IC₅₀

- Extratos Aquosos

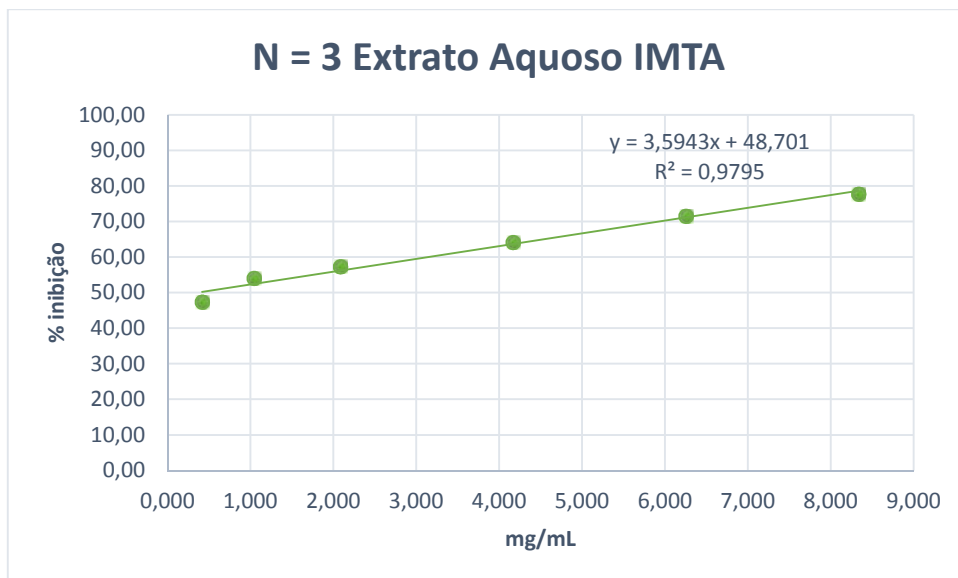
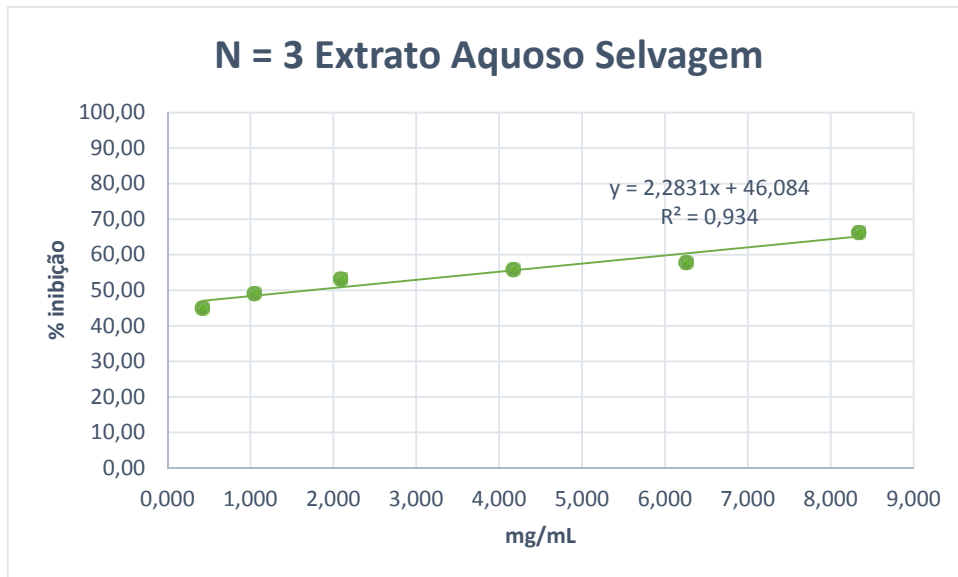
| N = 1 | V extrato aquoso add (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 562 nm | ctrl cor | abs corrigidas | Média | % inib | IC ₅₀ (mg/mL) | |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|----------------------------|----------------|--------|--------|--------------------------|--|
| Extrato Aquoso Selvagem | 0.000 | 0.000 | 2.790 | Média dos controlos | | | | | |
| | | | 2.790 | 2.790 | | | | | |
| | 0.010 | 0.417 | 1.624 | 0.060 | 1.564 | 1.5185 | 45.57 | 1.75 | |
| | | | 1.533 | | 1.473 | | | | |
| | 0.025 | 1.042 | 1.497 | 0.098 | 1.399 | 1.4155 | 49.27 | | |
| | | | 1.530 | | 1.432 | | | | |
| | 0.050 | 2.083 | 1.495 | 0.186 | 1.309 | 1.3495 | 51.63 | | |
| | | | 1.576 | | 1.390 | | | | |
| | 0.100 | 4.167 | 1.481 | 0.212 | 1.269 | 1.2295 | 55.93 | | |
| | | | 1.402 | | 1.190 | | | | |
| | 0.150 | 6.250 | 1.569 | 0.392 | 1.177 | 1.1440 | 59.00 | | |
| | | | 1.503 | | 1.111 | | | | |
| | 0.200 | 8.333 | 1.762 | 0.747 | 1.015 | 0.9745 | 65.07 | | |
| | | | 1.681 | | 0.934 | | | | |
| Extrato Aquoso IMTA | 0.000 | 0.000 | 2.790 | Média dos controlos | | | | | |
| | | | 2.790 | 2.790 | | | | | |
| | 0.010 | 0.417 | 1.548 | 0.114 | 1.434 | 1.4570 | 47.78 | | |
| | | | 1.594 | | 1.480 | | | | |
| | 0.025 | 1.042 | 1.497 | 0.125 | 1.372 | 1.3075 | 53.14 | | |
| | | | 1.368 | | 1.243 | | | | |
| | 0.050 | 2.083 | 1.377 | 0.073 | 1.304 | 1.1765 | 57.83 | | |
| | | | 1.122 | | 1.049 | | | | |
| | 0.100 | 4.167 | 1.411 | 0.32 | 1.091 | 0.9840 | 64.73 | | |
| | | | 1.197 | | 0.877 | | | | |
| | 0.150 | 6.250 | 1.861 | 0.94 | 0.921 | 0.7830 | 71.94 | | |
| | | | 1.585 | | 0.645 | | | | |
| | 0.200 | 8.333 | 1.681 | 1.111 | 0.570 | 0.6360 | 77.20 | | |
| | | | 1.813 | | 0.702 | | | | |



| N = 2 | V extrato aquoso add (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 562 nm | ctrl cor | abs corrigidas | Média | % inib | IC ₅₀ (mg/mL) | |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|----------------------------|----------------|--------|--------|--------------------------|--|
| Extrato Aquoso Selvagem | 0.000 | 0.000 | 1.932 | Média dos controlos | | | | | |
| | | | 2.138 | 2.035 | | | | | |
| | 0.010 | 0.417 | 1.243 | 0.057 | 1.186 | 1.1140 | 45.26 | 1.85 | |
| | | | 1.099 | | 1.042 | | | | |
| | 0.025 | 1.042 | 1.155 | 0.106 | 1.049 | 1.0270 | 49.53 | | |
| | | | 1.111 | | 1.005 | | | | |
| | 0.050 | 2.083 | 1.277 | 0.171 | 1.106 | 0.9930 | 51.20 | | |
| | | | 1.051 | | 0.880 | | | | |
| | 0.100 | 4.167 | 1.319 | 0.212 | 1.107 | 0.9090 | 55.33 | | |
| | | | 0.923 | | 0.711 | | | | |
| | 0.150 | 6.250 | 1.146 | 0.305 | 0.841 | 0.8395 | 58.75 | | |
| | | | 1.143 | | 0.838 | | | | |
| | 0.200 | 8.333 | 1.157 | 0.434 | 0.723 | 0.6900 | 66.09 | | |
| | | | 1.091 | | 0.657 | | | | |
| Extrato Aquoso IMTA | 0.000 | 0.000 | 1.932 | Média dos controlos | | | | | |
| | | | 2.138 | 2.035 | | | | | |
| | 0.010 | 0.417 | 1.155 | 0.121 | 1.034 | 1.0620 | 47.81 | 0.29 | |
| | | | 1.211 | | 1.090 | | | | |
| | 0.025 | 1.042 | 0.993 | 0.221 | 0.772 | 0.9510 | 53.27 | | |
| | | | 1.351 | | 1.130 | | | | |
| | 0.050 | 2.083 | 1.133 | 0.356 | 0.777 | 0.8360 | 58.92 | | |
| | | | 1.251 | | 0.895 | | | | |
| | 0.100 | 4.167 | 1.057 | 0.401 | 0.656 | 0.7410 | 63.59 | | |
| | | | 1.227 | | 0.826 | | | | |
| | 0.150 | 6.250 | 0.993 | 0.534 | 0.459 | 0.5555 | 72.70 | | |
| | | | 1.186 | | 0.652 | | | | |
| | 0.200 | 8.333 | 1.243 | 0.781 | 0.462 | 0.4585 | 77.47 | | |
| | | | 1.236 | | 0.455 | | | | |

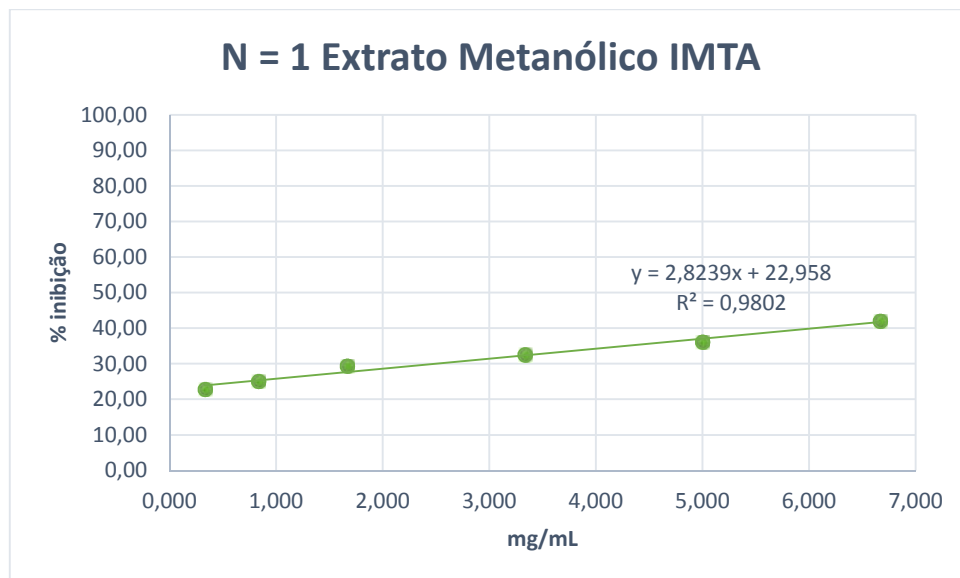
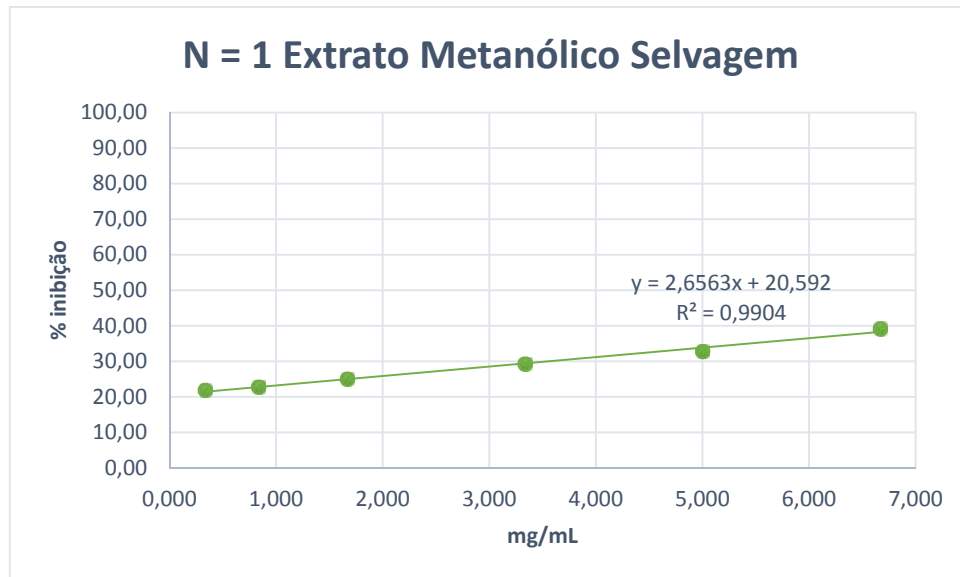


| N = 3 | V extrato aquoso add (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 562 nm | ctrl cor | abs corrigidas | Média | % inib | IC ₅₀ (mg/mL) | | |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|----------------|--------|--------|--------------------------|--|--|
| Extrato Aquoso Selvagem | 0.000 | 0.000 | 2.008 | Média dos controlos | | | | | | |
| | | | 2.043 | 2.026 | | | | | | |
| | 0.010 | 0.417 | 1.153 | 0.059 | 1.094 | 1.1130 | 45.05 | 1.72 | | |
| | | | 1.191 | | 1.132 | | | | | |
| | 0.025 | 1.042 | 1.106 | 0.125 | 0.981 | 1.0305 | 49.12 | | | |
| | | | 1.205 | | 1.080 | | | | | |
| | 0.050 | 2.083 | 1.187 | 0.206 | 0.981 | 0.9465 | 53.27 | | | |
| | | | 1.118 | | 0.912 | | | | | |
| | 0.100 | 4.167 | 1.219 | 0.279 | 0.940 | 0.8950 | 55.81 | | | |
| | | | 1.129 | | 0.850 | | | | | |
| | 0.150 | 6.250 | 1.246 | 0.391 | 0.855 | 0.8535 | 57.86 | | | |
| | | | 1.243 | | 0.852 | | | | | |
| | 0.200 | 8.333 | 1.457 | 0.507 | 0.950 | 0.6830 | 66.28 | | | |
| | | | 0.923 | | 0.416 | | | | | |
| Extrato Aquoso IMTA | 0.000 | 0.000 | 2.008 | Média dos controlos | | | | | | |
| | | | 2.043 | 2.026 | | | | | | |
| | 0.010 | 0.417 | 1.195 | 0.108 | 1.087 | 1.0655 | 47.40 | 0.36 | | |
| | | | 1.152 | | 1.044 | | | | | |
| | 0.025 | 1.042 | 0.913 | 0.132 | 0.781 | 0.9295 | 54.11 | | | |
| | | | 1.210 | | 1.078 | | | | | |
| | 0.050 | 2.083 | 1.111 | 0.269 | 0.842 | 0.8640 | 57.34 | | | |
| | | | 1.155 | | 0.886 | | | | | |
| | 0.100 | 4.167 | 0.999 | 0.362 | 0.637 | 0.7260 | 64.16 | | | |
| | | | 1.177 | | 0.815 | | | | | |
| | 0.150 | 6.250 | 1.178 | 0.552 | 0.626 | 0.576 | 71.56 | | | |
| | | | 1.078 | | 0.526 | | | | | |
| | 0.200 | 8.333 | 1.066 | 0.669 | 0.397 | 0.4505 | 77.76 | | | |
| | | | 1.173 | | 0.504 | | | | | |

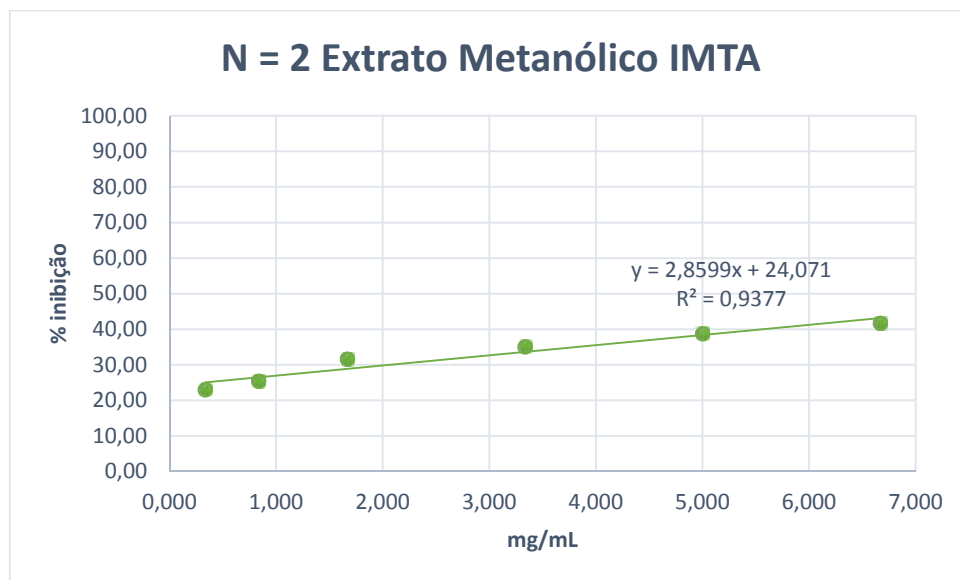
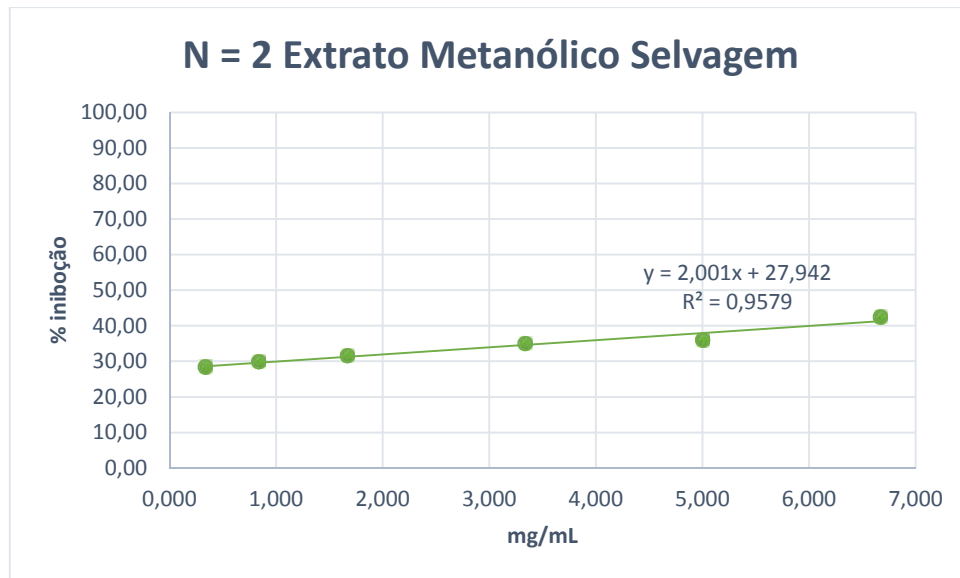


- Extratos Metanólicos

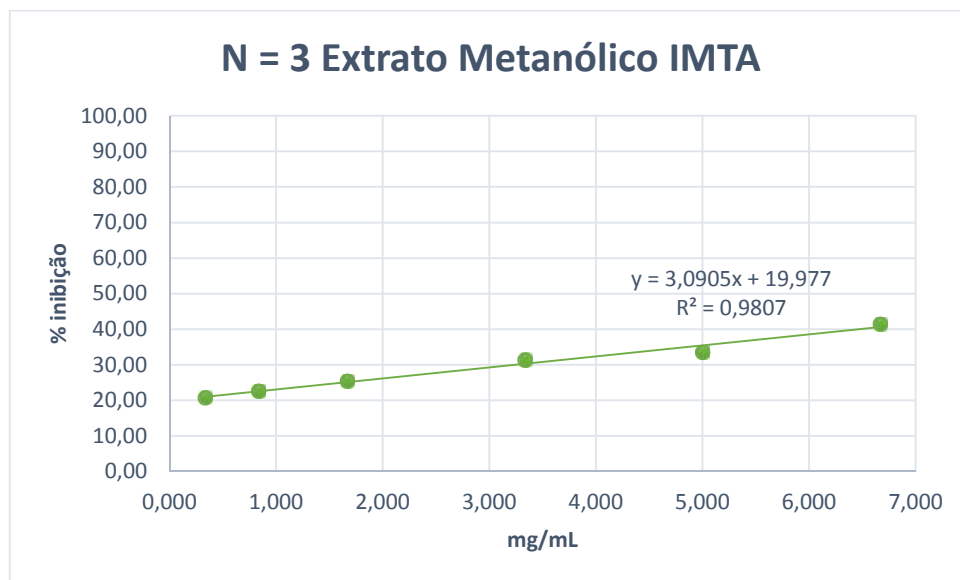
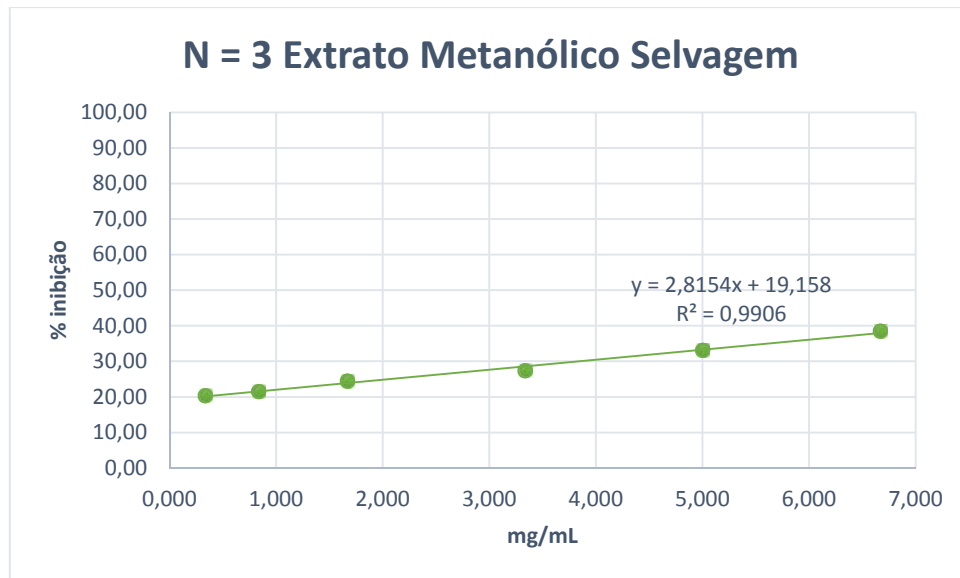
| N = 1 | V extrato metanólico add (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 562 nm | ctrl cor | abs corrigidas | Média | % inib | IC ₅₀ (mg/mL) |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|----------------|--------|--------|--------------------------|
| Extrato Metanólico Selvagem | 0.000 | 0.000 | 2.754 | Média dos controlos | | | | |
| | | | 2.553 | 2.6535 | | | | |
| | 0.010 | 0.333 | 2.010 | 0.033 | 1.977 | 2.0735 | 21.86 | |
| | | | 2.203 | | 2.170 | | | |
| | 0.025 | 0.833 | 2.149 | 0.062 | 2.087 | 2.0495 | 22.76 | |
| | | | 2.074 | | 2.012 | | | |
| | 0.050 | 1.667 | 2.259 | 0.114 | 2.145 | 1.9885 | 25.06 | |
| | | | 1.946 | | 1.832 | | | |
| | 0.100 | 3.333 | 1.965 | 0.15 | 1.815 | 1.8765 | 29.28 | |
| | | | 2.088 | | 1.938 | | | |
| | 0.150 | 5.000 | 2.008 | 0.205 | 1.803 | 1.7835 | 32.79 | |
| | | | 1.969 | | 1.764 | | | |
| | 0.200 | 6.667 | 1.900 | 0.31 | 1.590 | 1.6140 | 39.17 | |
| | | | 1.948 | | 1.638 | | | |
| Extrato Metanólico IMTA | 0.000 | 0.000 | 2.754 | Média dos controlos | | | | |
| | | | 2.553 | 2.6535 | | | | |
| | 0.010 | 0.333 | 2.231 | 0.048 | 2.183 | 2.0470 | 22.86 | |
| | | | 1.959 | | 1.911 | | | |
| | 0.025 | 0.833 | 2.085 | 0.089 | 1.996 | 1.9875 | 25.10 | |
| | | | 2.068 | | 1.979 | | | |
| | 0.050 | 1.667 | 1.876 | 0.150 | 1.726 | 1.8735 | 29.40 | |
| | | | 2.171 | | 2.021 | | | |
| | 0.100 | 3.333 | 2.139 | 0.312 | 1.827 | 1.7890 | 32.58 | |
| | | | 2.063 | | 1.751 | | | |
| | 0.150 | 5.000 | 2.204 | 0.510 | 1.694 | 1.6935 | 36.18 | |
| | | | 2.203 | | 1.693 | | | |
| | 0.200 | 6.667 | 2.236 | 0.625 | 1.611 | 1.5390 | 42.00 | |
| | | | 2.092 | | 1.467 | | | |



| N = 2 | V extrato metanólico add (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 562 nm | ctrl cor | abs corrigidas | Média | % inib | IC ₅₀ (mg/mL) | |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------|----------------------------|----------------|--------|--------|--------------------------|--|
| Extrato Metanólico Selvagem | 0.000 | 0.000 | 2.753 | Média dos controlos | | | | | |
| | | | 2.580 | 2.6665 | | | | | |
| | 0.010 | 0.333 | 1.924 | 0.02 | 1.904 | 1.9080 | 28.45 | 11.02 | |
| | | | 1.932 | | 1.912 | | | | |
| | 0.025 | 0.833 | 1.960 | 0.025 | 1.935 | 1.8700 | 29.87 | | |
| | | | 1.830 | | 1.805 | | | | |
| | 0.050 | 1.667 | 1.788 | 0.033 | 1.755 | 1.8245 | 31.58 | | |
| | | | 1.927 | | 1.894 | | | | |
| | 0.100 | 3.333 | 1.829 | 0.098 | 1.731 | 1.7335 | 34.99 | | |
| | | | 1.834 | | 1.736 | | | | |
| | 0.150 | 5.000 | 1.818 | 0.146 | 1.672 | 1.7065 | 36.00 | | |
| | | | 1.887 | | 1.741 | | | | |
| | 0.200 | 6.667 | 1.580 | 0.199 | 1.381 | 1.5345 | 42.45 | | |
| | | | 1.887 | | 1.688 | | | | |
| Extrato Metanólico IMTA | 0.000 | 0.000 | 2.753 | Média dos controlos | | | | | |
| | | | 2.580 | 2.6665 | | | | | |
| | 0.010 | 0.333 | 2.096 | 0.041 | 2.055 | 2.0540 | 22.97 | 9.07 | |
| | | | 2.094 | | 2.053 | | | | |
| | 0.025 | 0.833 | 2.176 | 0.165 | 2.011 | 1.9885 | 25.43 | | |
| | | | 2.131 | | 1.966 | | | | |
| | 0.050 | 1.667 | 2.091 | 0.183 | 1.908 | 1.8240 | 31.60 | | |
| | | | 1.923 | | 1.740 | | | | |
| | 0.100 | 3.333 | 2.017 | 0.264 | 1.753 | 1.7335 | 34.99 | | |
| | | | 1.978 | | 1.714 | | | | |
| | 0.150 | 5.000 | 1.999 | 0.380 | 1.619 | 1.6340 | 38.72 | | |
| | | | 2.029 | | 1.649 | | | | |
| | 0.200 | 6.667 | 2.119 | 0.564 | 1.555 | 1.5540 | 41.72 | | |
| | | | 2.117 | | 1.553 | | | | |



| N = 3 | V extrato metanólico add (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs 562 nm | ctrl cor | abs corrigidas | Média | % inib | IC ₅₀ (mg/mL) | |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------|----------------------------|----------------|--------|--------|--------------------------|--|
| Extrato Metanólico Selvagem | 0.000 | 0.000 | 2.753 | Média dos controlos | | | | | |
| | | | 2.450 | 2.6015 | | | | | |
| | 0.010 | 0.333 | 2.212 | 0.028 | 2.184 | 2.0725 | 20.33 | 10.95 | |
| | | | 1.989 | | 1.961 | | | | |
| | 0.025 | 0.833 | 2.210 | 0.062 | 2.148 | 2.0435 | 21.45 | | |
| | | | 2.001 | | 1.939 | | | | |
| | 0.050 | 1.667 | 2.125 | 0.097 | 2.028 | 1.9645 | 24.49 | | |
| | | | 1.998 | | 1.901 | | | | |
| | 0.100 | 3.333 | 2.104 | 0.150 | 1.954 | 1.8910 | 27.31 | | |
| | | | 1.978 | | 1.828 | | | | |
| | 0.150 | 5.000 | 1.997 | 0.205 | 1.792 | 1.7410 | 33.08 | | |
| | | | 1.895 | | 1.690 | | | | |
| | 0.200 | 6.667 | 1.844 | 0.278 | 1.566 | 1.6000 | 38.50 | | |
| | | | 1.912 | | 1.634 | | | | |
| Extrato Metanólico IMTA | 0.000 | 0.000 | 2.753 | Média dos controlos | | | | | |
| | | | 2.450 | 2.6015 | | | | | |
| | 0.010 | 0.333 | 2.097 | 0.044 | 2.053 | 2.0620 | 20.74 | 9.71 | |
| | | | 2.115 | | 2.071 | | | | |
| | 0.025 | 0.833 | 2.094 | 0.061 | 2.033 | 2.0140 | 22.58 | | |
| | | | 2.056 | | 1.995 | | | | |
| | 0.050 | 1.667 | 1.994 | 0.109 | 1.885 | 1.9415 | 25.37 | | |
| | | | 2.107 | | 1.998 | | | | |
| | 0.100 | 3.333 | 1.903 | 0.321 | 1.582 | 1.7860 | 31.35 | | |
| | | | 2.311 | | 1.990 | | | | |
| | 0.150 | 5.000 | 2.384 | 0.652 | 1.732 | 1.7305 | 33.48 | | |
| | | | 2.381 | | 1.729 | | | | |
| | 0.200 | 6.667 | 2.201 | 0.722 | 1.479 | 1.5230 | 41.46 | | |
| | | | 2.289 | | 1.567 | | | | |



Anexo IX – Cálculo da percentagem de inibição da produção de nitritos

- Extratos Metanólicos

| N = 1 | | Média | | [Nitritos] | [Nitritos] - Meio | % De LPS | % De inibição | |
|---------------------------|---------------------------|-------|--------|------------|----------------------|----------|------------------|----------------|
| Com células | Controlo | 0.072 | 0.065 | 0.0685 | 2.930 | 0.140 | 0.320 | 99.68% |
| | LPS 0.6 µg | 0.728 | 0.673 | 0.7005 | 46.22 | 43.42 | 100.0 | 0.00% |
| | A1 (250 µg/mL) | 0.32 | 0.320 | 0.3200 | 20.16 | 17.36 | 39.98 | 60.02% |
| | A1 (250 µg/mL) +LPS | 0.651 | 0.660 | 0.6555 | 43.14 | 40.34 | 92.90 | 7.10% |
| | A2 (125 µg/mL) | 0.217 | - | 0.2170 | 13.10 | 10.31 | 23.74 | 76.26% |
| | A2 (125 µg/mL) + LPS | 0.600 | 0.732 | 0.6660 | 43.86 | 41.06 | 94.56 | 5.44% |
| | A3 (62.5 µg/mL) | 0.125 | 0.097 | 0.1110 | 5.840 | 3.050 | 7.020 | 92.98% |
| | A3 (62.5 µg/mL) +LPS | 0.766 | 0.741 | 0.7535 | 49.85 | 47.05 | 108.36 | -8.36% |
| | A4 (31.25 µg/mL) | 0.110 | 0.127 | 0.1185 | 6.360 | 3.560 | 8.200 | 91.80% |
| | A4 (31.25 µg/mL) + LPS | 0.677 | 0.637 | 0.6570 | 43.24 | 40.45 | 93.14 | 6.86% |
| | B1 (250 µg/mL) | 0.333 | 0.302 | 0.3175 | 19.99 | 17.19 | 39.590 | 60.41% |
| | B1 (250 µg/mL) +LPS | - | 0.645 | 0.6450 | 42.42 | 39.62 | 91.250 | 8.75% |
| | B2 (125 µg/mL) | 0.152 | 0.203 | 0.1775 | 10.40 | 7.600 | 17.510 | 82.49% |
| | B2 (125 µg/mL) + LPS | 0.695 | 0.718 | 0.7065 | 46.63 | 43.84 | 100.95 | -0.95% |
| | B3 (62.5 µg/mL) | 0.118 | 0.103 | 0.1105 | 5.810 | 3.010 | 6.9400 | 93.06% |
| | B3 (62.5 µg/mL) +LPS | 0.693 | 0.660 | 0.6765 | 44.58 | 41.78 | 96.210 | 3.79% |
| B4 (31.25 µg/mL) | 0.112 | 0.155 | 0.1335 | 7.380 | 4.590 | 10.570 | 89.43% | |
| B4 (31.25 µg/mL) + LPS | 0.691 | 0.585 | 0.638 | 41.94 | 39.14 | 90.140 | 9.86% | |
| Sem células | Meio | 0.066 | 0.067 | 0.0665 | 2.79 | 0.00 | 0.00 | 100.00% |
| | A1 (250 µg/mL) | 0.069 | - | 0.069 | 2.97 | 0.17 | 0.39 | 99.61% |
| | A2 (125 µg/mL) | 0.066 | - | 0.066 | 2.76 | -0.03 | -0.08 | 100.08% |
| | A3 (62.5 µg/mL) | 0.067 | - | 0.067 | 2.83 | 0.03 | 0.08 | 99.92% |
| | A4 (31.25 µg/mL) | 0.067 | - | 0.067 | 2.83 | 0.03 | 0.08 | 99.92% |
| | B1 (250 µg/mL) | 0.065 | - | 0.065 | 2.69 | -0.10 | -0.24 | 100.24% |
| | B2 (125 µg/mL) | 0.068 | - | 0.068 | 2.90 | 0.10 | 0.24 | 99.76% |
| | B3 (62.5 µg/mL) | 0.068 | - | 0.068 | 2.90 | 0.10 | 0.24 | 99.76% |
| B4 (31.25 µg/mL) | 0.073 | - | 0.073 | 3.24 | 0.45 | 1.03 | 98.97% | |

| | N = 2 | | Média | [Nitritos] | [Nitritos] - Meio | % De LPS | % De inibição | |
|---------------------------|---------------------------|-------|--------|------------|----------------------|----------|------------------|----------------|
| Com células | Controlo | 0.070 | 0.063 | 0.0665 | 2.790 | 0.070 | 0.170 | 99.83% |
| | LPS 0.6 µg | 0.638 | 0.643 | 0.6405 | 42.11 | 39.38 | 100.0 | 0.00% |
| | A1 (250 µg/mL) | 0.120 | 0.107 | 0.1135 | 6.010 | 3.290 | 8.350 | 91.65% |
| | A1 (250 µg/mL) +LPS | 0.602 | 0.594 | 0.5980 | 39.20 | 36.47 | 92.61 | 7.39% |
| | A2 (125 µg/mL) | 0.082 | 0.079 | 0.0805 | 3.750 | 1.030 | 2.610 | 97.39% |
| | A2 (125 µg/mL) + LPS | 0.620 | 0.620 | 0.6200 | 40.71 | 37.98 | 96.43 | 3.57% |
| | A3 (62.5 µg/mL) | 0.068 | 0.066 | 0.0670 | 2.830 | 0.100 | 0.260 | 99.74% |
| | A3 (62.5 µg/mL) +LPS | 0.682 | 0.589 | 0.6355 | 41.77 | 39.04 | 99.13 | 0.87% |
| | A4 (31.25 µg/mL) | 0.067 | 0.065 | 0.0660 | 2.760 | 0.030 | 0.090 | 99.91% |
| | A4 (31.25 µg/mL) + LPS | 0.599 | 0.590 | 0.5945 | 38.96 | 36.23 | 92.00 | 8.00% |
| | B1 (250 µg/mL) | 0.072 | 0.087 | 0.0795 | 3.680 | 0.960 | 2.430 | 97.57% |
| | B1 (250 µg/mL) +LPS | 0.604 | 0.592 | 0.5980 | 39.20 | 36.47 | 92.61 | 7.39% |
| | B2 (125 µg/mL) | 0.067 | 0.068 | 0.0675 | 2.860 | 0.140 | 0.350 | 99.65% |
| | B2 (125 µg/mL) + LPS | 0.609 | 0.611 | 0.6100 | 40.02 | 37.29 | 94.70 | 5.30% |
| | B3 (62.5 µg/mL) | 0.064 | 0.065 | 0.0645 | 2.660 | -0.070 | -0.170 | 100.17% |
| | B3 (62.5 µg/mL) +LPS | 0.628 | 0.606 | 0.6170 | 40.50 | 37.77 | 95.91 | 4.09% |
| B4 (31.25 µg/mL) | 0.064 | 0.071 | 0.0675 | 2.860 | 0.140 | 0.350 | 99.65% | |
| B4 (31.25 µg/mL) + LPS | 0.626 | 0.614 | 0.6200 | 40.71 | 37.98 | 96.43 | 3.57% | |
| Sem células | Meio | 0.065 | 0.066 | 0.0655 | 2.73 | 0.00 | 0.00 | 100.00% |
| | A1 (250 µg/mL) | 0.067 | - | 0.067 | 2.83 | 0.10 | 0.26 | 99.74% |
| | A2 (125 µg/mL) | 0.065 | - | 0.065 | 2.69 | -0.03 | -0.09 | 100.09% |
| | A3 (62.5 µg/mL) | 0.06 | - | 0.06 | 2.35 | -0.38 | -0.96 | 100.96% |
| | A4 (31.25 µg/mL) | 0.062 | - | 0.062 | 2.49 | -0.24 | -0.61 | 100.61% |
| | B1 (250 µg/mL) | 0.067 | - | 0.067 | 2.83 | 0.10 | 0.26 | 99.74% |
| | B2 (125 µg/mL) | 0.066 | - | 0.066 | 2.76 | 0.03 | 0.09 | 99.91% |
| | B3 (62.5 µg/mL) | 0.065 | - | 0.065 | 2.69 | -0.03 | -0.09 | 100.09% |
| | B4 (31.25 µg/mL) | 0.065 | - | 0.065 | 2.69 | -0.03 | -0.09 | 100.09% |

| % De Inibição dos diferentes extratos | N = 1 | N = 2 | Média | SD | SE |
|--|---------|--------|-----------------|-------|-------|
| A1 (250 µg/mL) +LPS | 7.10 % | 7.39 % | 7.245 % | 0.205 | 0.145 |
| A2 (125 µg/mL) + LPS | 5.44 % | 3.57 % | 4.505 % | 1.322 | 0.935 |
| A3 (62.5 µg/mL) +LPS | -8.36 % | 0.87 % | -3.745 % | 6.523 | 4.612 |
| A4 (31.25 µg/mL) + LPS | 6.86 % | 8.00 % | 7.430 % | 0.806 | 0.570 |
| B1 (250 µg/mL) +LPS | 8.75 % | 7.39 % | 8.070 % | 0.962 | 0.680 |
| B2 (125 µg/mL) + LPS | -0.95 % | 5.30 % | 2.175 % | 4.419 | 3.125 |
| B3 (62.5 µg/mL) +LPS | 3.79 % | 4.09 % | 3.940 % | 0.212 | 0.150 |
| B4 (31.25 µg/mL) + LPS | 9.86 % | 3.57 % | 6.715 % | 4.448 | 3.145 |

- Extratos Aquosos

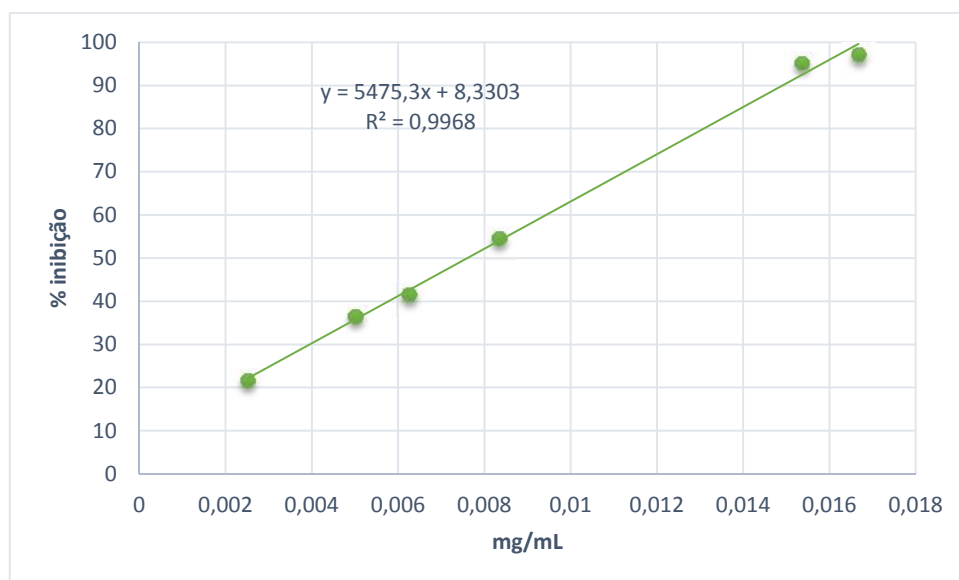
| | N = 1 | | Média | [Nitritos] | [Nitritos] - Meio | % De LPS | % De inibição | |
|---------------------------|---------------------------|-------|--------|------------|----------------------|----------|------------------|----------------|
| Com células | Controlo | 0.067 | 0.065 | 0.0660 | 2.760 | 0.140 | 0.3000 | 99.70% |
| | LPS 0.6 µg | 0.742 | 0.710 | 0.7260 | 47.97 | 45.34 | 100.00 | 0.00% |
| | A1 (250 µg/mL) | 0.89 | 0.765 | 0.8275 | 54.92 | 52.29 | 115.33 | -15.33% |
| | A1 (250 µg/mL) +LPS | 0.855 | 0.823 | 0.8390 | 55.71 | 53.08 | 117.07 | -17.07% |
| | A2 (125 µg/mL) | 0.806 | 0.902 | 0.8540 | 56.73 | 54.11 | 119.34 | -19.34% |
| | A2 (125 µg/mL) + LPS | 0.873 | 0.860 | 0.8665 | 57.59 | 54.97 | 121.22 | -21.22% |
| | A3 (62.5 µg/mL) | 0.787 | 0.868 | 0.8275 | 54.92 | 52.29 | 115.33 | -15.33% |
| | A3 (62.5 µg/mL) +LPS | 0.830 | 0.879 | 0.8545 | 56.77 | 54.14 | 119.41 | -19.41% |
| | A4 (31.25 µg/mL) | 0.838 | 0.868 | 0.8530 | 56.66 | 54.04 | 119.18 | -19.18% |
| | A4 (31.25 µg/mL) + LPS | 0.855 | 0.887 | 0.8710 | 57.90 | 55.27 | 121.90 | -21.90% |
| | B1 (250 µg/mL) | 0.831 | 0.807 | 0.8190 | 54.34 | 51.71 | 114.05 | -14.05% |
| | B1 (250 µg/mL) +LPS | 0.714 | 0.897 | 0.8055 | 53.41 | 50.79 | 112.01 | -12.01% |
| | B2 (125 µg/mL) | 0.658 | 0.727 | 0.6925 | 45.67 | 43.05 | 94.94 | 5.06% |
| | B2 (125 µg/mL) + LPS | 0.765 | 0.741 | 0.7530 | 49.82 | 47.19 | 104.08 | -4.08% |
| | B3 (62.5 µg/mL) | 0.744 | 0.723 | 0.7335 | 48.48 | 45.86 | 101.13 | -1.13% |
| | B3 (62.5 µg/mL) +LPS | 0.834 | 0.757 | 0.7955 | 52.73 | 50.10 | 110.50 | -10.50% |
| B4 (31.25 µg/mL) | 0.827 | 0.849 | 0.8380 | 55.64 | 53.01 | 116.92 | -16.92% | |
| B4 (31.25 µg/mL) + LPS | 0.816 | 0.803 | 0.8095 | 53.68 | 51.06 | 112.61 | -12.61% | |
| Sem células | Meio | 0.063 | 0.065 | 0.064 | 2.62 | 0.00 | 0.000 | 100.00% |
| | A1 (250 µg/mL) | 0.148 | - | 0.148 | 8.38 | 5.75 | 12.69 | 87.31% |
| | A2 (125 µg/mL) | 0.070 | - | 0.07 | 3.03 | 0.41 | 0.910 | 99.09% |
| | A3 (62.5 µg/mL) | 0.064 | - | 0.064 | 2.62 | 0.00 | 0.000 | 100.00% |
| | A4 (31.25 µg/mL) | 0.062 | - | 0.062 | 2.49 | -0.14 | -0.300 | 100.30% |
| | B1 (250 µg/mL) | 0.155 | - | 0.155 | 8.86 | 6.23 | 13.75 | 86.25% |
| | B2 (125 µg/mL) | 0.074 | - | 0.074 | 3.31 | 0.68 | 1.510 | 98.49% |
| | B3 (62.5 µg/mL) | 0.068 | - | 0.068 | 2.90 | 0.27 | 0.600 | 99.40% |
| B4 (31.25 µg/mL) | 0.071 | - | 0.071 | 3.10 | 0.48 | 1.060 | 98.94% | |

Anexo X – Cálculo do IC₅₀ para o padrão Ácido Ascórbico – DPPH**Preparação do ácido ascórbico**

| Massa (mg) | Volume (mL) | Concentração (mg/mL) |
|------------|-------------|----------------------|
| 5 | 10 | 0.50 |

Reta de Calibração

| V Total meio reação (mL) | V ac. Ascórbico adicionado (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs (517 nm) | | Média | % inib | IC ₅₀ (mg/mL) |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|-------|---------------|----------|--------------------------|
| 2.1 | 0 | 0 | 1.081 | 1.084 | 1.0825 | - | 0.00761 |
| | 0.0105 | 0.0025 | 0.761 | 0.937 | 0.849 | 21.57044 | |
| | 0.021 | 0.005 | 0.621 | 0.755 | 0.688 | 36.44342 | |
| | 0.02625 | 0.00625 | 0.402 | 0.864 | 0.633 | 41.52425 | |
| | 0.035 | 0.083 | 0.397 | 0.587 | 0.492 | 54.54965 | |
| | 0.042 | 0.01 | 0.194 | 0.044 | 0.119 | - | |
| | 0.0645 | 0.01536 | 0.038 | 0.068 | 0.053 | 95.10393 | |
| | 0.07 | 0.01667 | 0.042 | 0.032 | 0.032 | 97.04388 | |



Anexo XI – Cálculo do IC₅₀ para o padrão Ácido Ascórbico – NO

Preparação do ácido ascórbico

| Massa (mg) | Volume (mL) | Concentração (mg/mL) |
|------------|-------------|----------------------|
| 4 | 2 | 2 |

Reta de Calibração

| V Total meio reação (mL) | V ac. Ascórbico adicionado (mL) | Concentração meio reação (mg/mL) | abs (562 nm) | | Média | % inib | IC ₅₀ (mg/mL) |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|-------|---------------|--------|--------------------------|
| 0.6 | 0 | 0 | 0.783 | 0.787 | 0.785 | - | 0.31997 |
| | 0.01 | 0.03333 | 0.78 | 0.78 | 0.78 | 0.64 | |
| | 0.025 | 0.08333 | 0.677 | 0.72 | 0.6985 | 11.02 | |
| | 0.05 | 0.16667 | 0.595 | 0.595 | 0.595 | 24.20 | |
| | 0.1 | 0.33333 | 0.377 | 0.376 | 0.3765 | 52.04 | |
| | 0.15 | 0.5 | 0.274 | 0.297 | 0.2855 | - | |
| | 0.2 | 0.66667 | 0.246 | 0.296 | 0.271 | - | |

