

Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra



# Crescimento e capacidade antioxidante de estirpes da classe Eustigmatophyceae

José Fernando Trindade Diniz

Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal

Janeiro de 2020



Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra



# Crescimento e capacidade antioxidante de estirpes da classe Eustigmatophyceae

José Fernando Trindade Diniz

Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada pela Professora Doutora Lília Maria Antunes dos Santos e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra.

Janeiro de 2020



## Agradecimentos

Começo por agradecer a Professora Doutora Lilia Santos pela oportunidade de poder trabalhar na Algoteca de Coimbra, pelo encorajamento e a dedicação na realização desta tese de mestrado e acima de tudo, na partilha de conhecimento sobre microalgas, uma área desconhecida por mim.

Um especial agradecimento à Mariana pela ajuda na parte experimental e na realização da parte escrita.

Agradeço a Clara, Joana e a Maria João e Raquel por serem as melhores colegas de laboratório estando sempre disponíveis a ajudar.

Um enorme agradecimento aos meus pais pela motivação e suporte que me deram, de modo a tornar-me na pessoa que hoje sou.

Agradeço a todos que direta e indiretamente estiveram relacionados com a realização da minha tese.

E por fim agradeço a ti, Adriana.



# Índice

<b>Resumo</b> .....	V
<b>Abstract</b> .....	VI
<b>Introdução</b> .....	1
Classe Eustigmatophyceae .....	1
Biotecnologia das Eustigmatophyceae .....	4
Cultivo de microalgas .....	6
Stress oxidativo e antioxidantes .....	8
<b>Objetivos</b> .....	12
<b>Materiais e métodos</b> .....	13
Estirpes de microalgas .....	13
Condições de cultivo .....	14
Análise do crescimento .....	16
Preparação dos extratos .....	16
Análise do potencial antioxidante .....	17
Método de TEAC .....	17
Método de DPPH .....	18
Método de FRAP .....	18
Conteúdo em fenóis .....	19
Determinação do conteúdo em clorofilas e carotenoides .....	19
Análise estatística .....	19
<b>Resultados</b> .....	21
Curvas de crescimento .....	21
Rendimento de extração .....	25
Potencial antioxidante .....	26
Método de TEAC .....	26
Método de DPPH .....	27
Método de FRAP .....	28
Compostos fenólicos .....	29
Clorofila e carotenoides totais .....	30
Relação da atividade antioxidante com o total de fenóis, clorofila e carotenoides .....	32
<b>Discussão</b> .....	34
Monitorização do crescimento de culturas .....	34
Rendimentos de extração .....	36
Potencial antioxidante .....	37
<b>Conclusões</b> .....	43
Bibliografia .....	44



## Resumo

As microalgas são organismos fotossintéticos com capacidade de crescer rapidamente e de se adaptarem a diversas condições, crescendo nos mais variados ambientes. Durante a sua atividade metabólica, fotossintética e mitocondrial, são produzidos radicais livres em excesso. Contudo, as células não revelam danos uma vez que ocorre estimulação do seu sistema de defesa antioxidante intrínseco que leva à produção de compostos com atividade antioxidante, nomeadamente carotenoides, clorofilas e fenóis, entre outros. A classe Eustigmatophyceae é reconhecida pela sua capacidade de produção e acumulação de carotenoides, em especial violaxantina, astaxantina, luteína e  $\beta$ -caroteno.

Este trabalho teve como principal objetivo a caracterização da capacidade antioxidante e a sua relação com o total de clorofilas, carotenoides e compostos fenólicos de 14 estirpes da classe Eustigmatophyceae, cultivadas em dois meios de cultura diferentes. Para todas as estirpes o crescimento foi monitorizado através da densidade celular, a capacidade antioxidante determinada por três métodos distintos (TEAC, DPPH e FRAP) e o total de clorofilas, carotenoides e compostos fenólicos quantificado.

Nas condições de cultivo estabelecidas, as estirpes cultivadas em meio de cultura M7 demonstraram uma fase exponencial mais longa e conseqüentemente uma maior taxa de multiplicação. Foi também nos cultivos em meio M7 que se obtiveram os melhores valores de capacidade antioxidante. As estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* foram as que demonstraram valores mais elevados de atividade antioxidante, ultrapassando os valores obtidos por *Nannochloropsis* e *Microchloropsis*. Verificou-se que todas as estirpes são boas produtoras de carotenoides e compostos fenólicos, contudo, o conteúdo em carotenoides e em clorofilas contribuiu mais para explicar alguma da atividade antioxidante, tendo os compostos fenólicos uma participação marginal. Este estudo sugere que nestas estirpes existem outros compostos que contribuem para a atividade antioxidante detetada para além dos compostos fenólicos, dos carotenoides e das clorofilas totais. Com este trabalho o potencial da classe Eustigmatophyceae para a produção de compostos com atividade antioxidante foi confirmado. Revelou também que para além dos géneros amplamente estudados *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* outros géneros dentro da classe podem ter um elevado potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Microalgas, Eustigmatophyceae, antioxidantes, carotenóides, fenóis

## Abstract

Microalgae are photosynthetic organisms with the ability of growing quickly and adapting to different conditions, growing in the most varied environments. During their metabolic, photosynthetic and mitochondrial activity, free radicals are produced in excess, however, the cells do not reveal damage since there is stimulation of their intrinsic antioxidant defense system that leads to the production of compounds with antioxidant activity, namely carotenoids, chlorophylls, phenols among others. The Eustigmatophyceae class is recognized for its ability to produce and accumulate carotenoids, especially violaxanthin, astaxanthin, lutein and  $\beta$ -carotene.

This work had as main objective the characterization of the antioxidant capacity and its relation with the total of chlorophylls, carotenoids and phenolic compounds of 14 strains of the class Eustigmatophyceae, cultivated in two different culture media. For all strains, growth was monitored through cell density, the antioxidant capacity determined by three different methods (TEAC, DPPH and FRAP) and the total of chlorophylls, carotenoids and phenolic compounds quantified.

Under the established culture conditions, strains grown in M7 culture medium showed a longer exponential phase and consequently a higher multiplication rate. It was also in the M7 medium that the best values of antioxidant capacity were obtained. Strains of the genus *Monodopsis* showed higher values of antioxidant activity, surpassing the values obtained from *Nannochloropsis* and *Microchloropsis*. It was found that all strains are good producers of carotenoids and phenolic compounds, however, the content of carotenoids and chlorophylls contributed more to explain some of the antioxidant activity, with phenolic compounds having a marginal participation. This study suggests that in these strains there are other compounds that contribute to the antioxidant activity detected in addition to phenolic compounds, carotenoids and total chlorophylls. With this work, the potential of the Eustigmatophyceae class for the production of compounds with antioxidant activity was confirmed. It also revealed that in addition to the genera *Nannochloropsis* and *Microchloropsis*, other genera within the group may have a high biotechnological potential

Key words: Microalgae, Eustigmatophyceae, antioxidant, carotenoid, phenol

# Introdução

## Classe Eustigmatophyceae

As microalgas são organismos procariontes ou eucariontes que têm a capacidade de produzir compostos orgânicos como proteínas, lípidos e hidratos de carbono através da fotossíntese, que é um processo 10 vezes mais eficiente nas microalgas que nas plantas terrestres (Mostafa, 2012). Características como rápido crescimento, capacidade de proliferar nas mais adversas condições e estrutura unicelular ou multicelular simples permitem que as microalgas existam em ecossistemas tanto aquáticos como terrestres. Estima-se que haja mais de 300.000 espécies de microalgas sendo que apenas 30.000 se encontram descritas e estudadas (Mobin e Alam, 2017).

As Eustigmatophyceae são uma classe distinta de microalgas de cor verde-amarelada, com cerca de 30 espécies descritas, contudo estudos recentes demonstram que existe uma diversidade muito maior ainda por identificar. Grande parte das espécies de algas pertencentes a esta classe habita zonas de água doce, mas podem ser também encontradas no solo e um pequeno número de géneros é marinho. A sua coloração verde ou verde-amarelada, quando no estado vegetativo, é semelhante à das algas xantofíceas ou clorofíceas, contudo características citológicas e ultraestruturais únicas demonstraram ser uma linhagem evolutiva que permite organizar uma outra classe (Eliš et al., 2017).

A classe Eustigmatophyceae foi estabelecida em 1970 por Hibberd e Leedale que estudaram as características citológicas e ultraestruturais de 12 estirpes de microalgas que até à data pertenciam à classe Xanthophyceae (Hibberd et al., 1970). Estes autores encontraram características únicas que permitiram a sua distinção das restantes xantofíceas, quer nas células vegetativas (Figura 1) quer nos zoósporos (Figura 2). Ao nível da célula vegetativa, essas características são: i) a presença de um glóbulo vermelho-alaranjado citoplasmático (Figura 1C), constituído por substâncias lipídicas (Eliš et al., 2017), tornando-se bastante visível a sua cor característica e tamanho quanto maior o estado de senescência da célula; ii) a presença de um ou mais cloroplastos parietais (Hibberd, 1990) sem lamela de cintura a rodear o sistema de tilacoides e com ou sem pirenoide associado (Santos, 1996; Andersen et al., 1998) (Figura 1D); e iii) a presença de vesículas lameladas no citoplasma (Figura 1B) (Eliš et al., 2017). Ao nível do zoósporo as principais diferenças são na estrutura do aparelho flagelar, no tipo de estigma e sua localização extracloroplastidial (Hibberd, 1981; Santos, 1996). Muitas espécies apresentam apenas um flagelo longo, anterior, com pêlos (Figura 2A) e uma dilatação também chamada de tumefação

(Figura 2B), sendo que alguns géneros podem ter um segundo flagelo, curto, liso e com orientação perpendicular ao flagelo longo (Figura 2F) (Hibberd et al., 1970). Outras características são a presença de vesículas lameladas (Figura 2E) e o estigma encontrar-se fora do cloroplasto (Figura 2 C) (Lee, 2008).

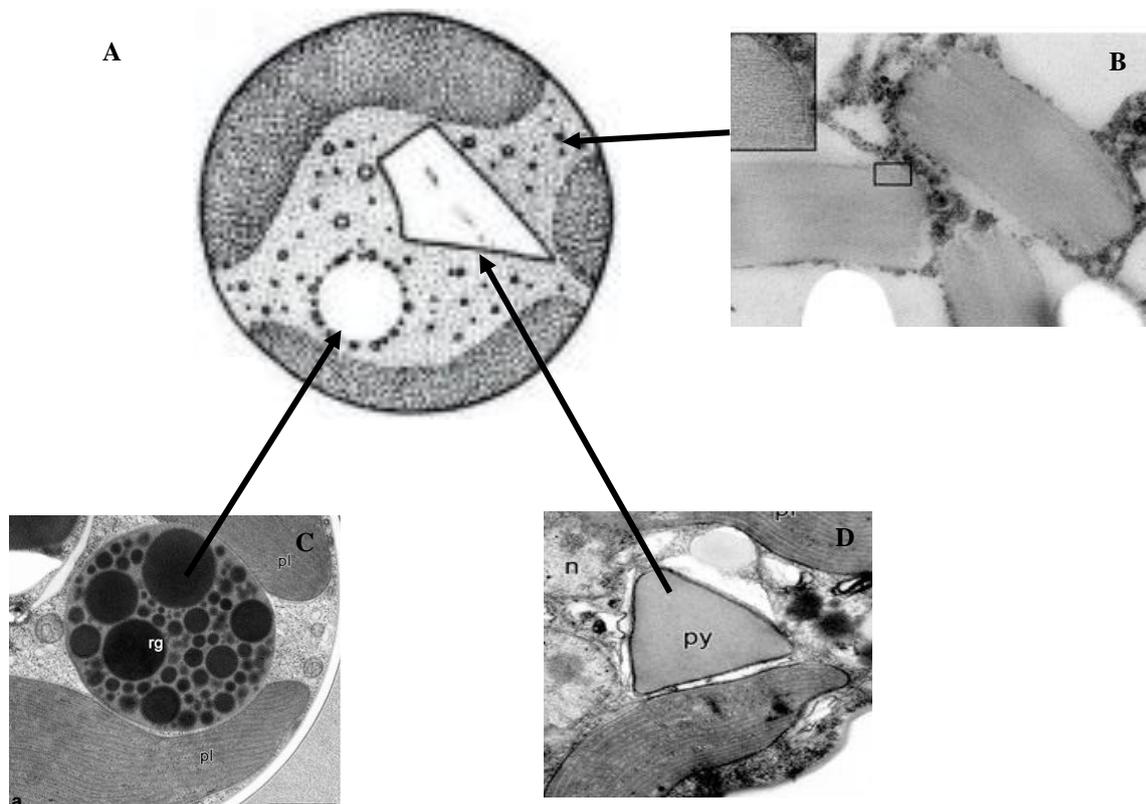


Figura 1 – Estrutura típica de uma célula de Eustigmatophyceae. A) Representação de uma célula vegetativa de *Eustigmatos polyphem* (adaptado de Ott et al., 2015); B) Detalhe ultraestrutural das vesículas lameladas de *Pseudocharaciopsis ovalis* (Eliáš et al., 2017); C) Detalhe ultraestrutural do glóbulo vermelho de *Vischeria helvetica* (Eliáš et al., 2017); D) Detalhe ultraestrutural do pirenoide de *Eustigmatos magna* (Eliáš et al., 2017).

Ao longo dos anos, foram realizados vários estudos demonstrando que os cloroplastos das algas pertencentes à classe Eustigmatophyceae apresentavam uma composição pigmentar com características únicas. As quantidades variam de espécie para espécie, contudo existe um padrão no qual a violaxantina aparece como um dos principais carotenoides (60% do total de carotenoides) e apenas é detetada a presença de clorofila *a* (Owens et al., 1987; Whittle e Casselton, 1975a). Já as algas pertencentes à classe Xanthophyceae possuem clorofilas *a* e *c*, sendo a diadinoxantina a xantofila presente em maior quantidade (Whittle e Casselton, 1975b).

A classificação baseada na composição pigmentar e nas características ultraestruturais e citológicas foram durante muito tempo a principal forma de classificar organismos com potencial de pertencerem à classe Eustigmatophyceae (Santos, 1996). Com o aparecimento das técnicas moleculares a organização taxonómica das Eustigmatophyceae expandiu-se, com descrição de novos géneros como *Pseudellipsoidion* (Neustupa e Nemcová, 2001), *Pseudotetraëdriella* (Hegewald et al., 2007), *Microchloropsis* (Fawey et al., 2015) e *Vacuoliviride* (Nakayama et al., 2015) e com a transferência de alguns géneros das xantofíceas (p.e. *Characiopsis*) (Amaral et al. 2011). Contudo ainda existem muitas estirpes não estudadas e que podem representar novas taxa para a classe Eustigmatophyceae (Eliáš et al., 2017).

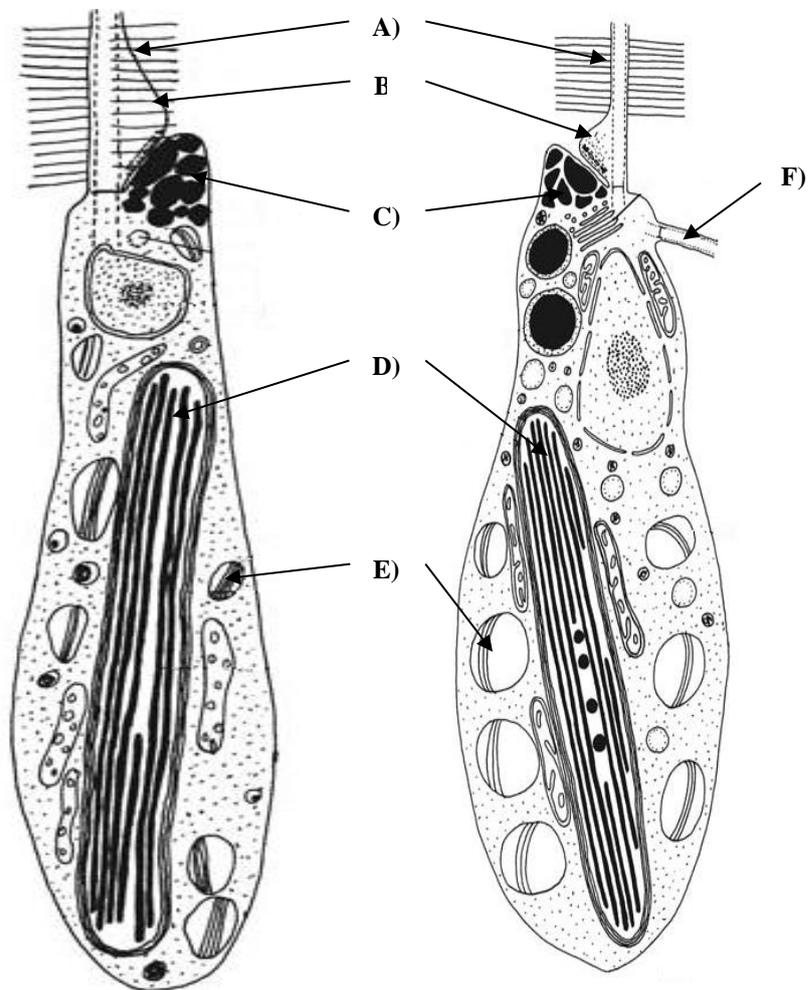


Figura 2 – Estrutura típica dos zoósporos de Eustigmatophyceae. A) Flagelo longo; B) Tumefação; C) Estigma; D) Cloroplasto; E) Vesículas lameladas; F) Flagelo curto (adaptado de Lee, 2008).

## Biocologia das Eustigmatophyceae

As microalgas têm vindo a ganhar atenção em vários sectores da indústria por serem organismos autotróficos com uma boa capacidade de adaptação e rápido crescimento. Têm capacidade para produzir compostos com elevado interesse biotecnológico, nomeadamente para a produção de biocombustível, produtos farmacêuticos e alimentos funcionais (Stoyneva-Gärtner et al., 2019b). As de microalgas mais conhecidas e estudadas ou mesmo exploradas para fins comerciais são membros do filo Cyanobacteria e Chlorophyta (Stoyneva-Gärtner et al., 2019b). Contudo, o interesse na classe Eustigmatophyceae tem vindo a aumentar, devido em especial ao potencial biotecnológico do género *Nannochloropsis*, reconhecido como excelente produtor de ácidos gordos polinsaturados (Boussiba, 1987) e esteróis (Volkman et al., 1992, 1993) e com elevada capacidade de acumulação de pigmentos nomeadamente clorofilas e carotenoides como zeaxantina, luteína, cantaxantina e astaxantina (Antia e Cheng, 1982; Marcilla et al., 2009).

Desta forma, estudos com estirpes de eustigmatófitas têm sido realizados com foco em três principais compostos com interesse biotecnológico, pigmentos lípidos e vitaminas.

No que respeita aos pigmentos, dois principais grupos têm sido abordados, clorofilas e carotenoides. A clorofila *a* é o principal pigmento das eustigmatófitas, havendo estudos que indicam o elevado conteúdo deste pigmento em *Microchloropsis gaditana* (Sin. *Nannochloropsis gaditana*) (Braun et al., 2014) e *Eustigmatos magnus* (Sin. *Pleurochloris magna*) (Whittle and Casselton, 1975a) em comparação com os carotenoides totais. Os principais carotenoides presentes nas estirpes desta classe são a violaxantina, vaucherioxantina, astaxantina, cantaxantina, luteína e  $\beta$ -caroteno (Stoyneva-Gärtner et al., 2019a, Stoyneva-Gärtner et al., 2019b). A violaxantina foi detetada como composto mais de 60% do total de carotenoides em *Microchloropsis salina* (Sin. *Nannochloropsis salina*) e *Nannochloropsis* sp. (Owens et al., 1987). Num estudo elaborado por Lubián et al., em 2000, também se observou que a violaxantina é o carotenóide existente em maior proporção em *Nannochloropsis oculata*, *Microchloropsis salina* (Sin. *Nannochloropsis salina*) e *Microchloropsis gaditana* (Sin. *Nannochloropsis gaditana*). Outros estudos também indicam a presença desta xantofila em estirpes de *Vischeria* e *Eustigmatos*, contudo não é o carotenóide presente em maior quantidade (Li et al., 2012b). Apenas um estudo indica baixas quantidades de violaxantina em *Pseudostaurastrum limneticum* (Schnepf et al., 1996) e outro indica a total ausência desta xantofila em três estirpes do grupo *Vischeria/Eustigmatos* (Stoyneva-Gärtner et al., 2019a). A vaucherioxantina é encontrada nas Eustigmatophyceae principalmente sobre a forma diesterificada aparecendo normalmente em menor quantidade que a violoxantina (Takaichi, 2011). Alguns estudos demonstram a presença de vaucherioxantina em quantidades elevadas em *Chlorobotrys regularis* com 34,8% de carotenoides totais (Whittle, 1976) e em *Eustigmatos polyphem*, *Eustigmatos vischeri* e *Vischeria punctata* com 12,7; 14,1 e 11,8% carotenoides totais, respetivamente (Li et al., 2012a). A astaxantina é outra xantofila também presente nas

eustigmatofíceas. Foi detetada inicialmente em *Nannochloropsis oculata* (Antia e Cheng, 1982) sendo mais tarde também detetada em outras espécies de *Nannochloropsis* (Lubián et al., 2000). O principal produtor desta xantofila é *Haematococcus*, que é uma alga verde, sendo atualmente extraída desta microalga para fins comerciais (Fang et al., 2019). Mais recentemente foi demonstrada por Aburai et al. (2015) a presença de astaxantina em três estirpes de *Vischeria* e posteriormente confirmados estes resultados com outras estirpes de *Vischeria* obtendo-se percentagens de astaxantina de 9 a 13% do total de carotenoides (Stoyneva-Gärtner et al., 2019a). A cantaxantina julgava-se não existir nesta classe, contudo estudos realizados por Antia e Cheng (1982) demonstraram a presença deste pigmento em *Nannochloropsis oculata* contabilizando 5% do total de carotenoides. Mais recentemente Stoyneva-Gärtner et al. (2019a) também verificaram a presença desta xantofila, com valores semelhantes, em estirpes de *Vischeria/Eustigmatos*. Segundo estes autores, a cantaxantina tende a aumentar ao longo do crescimento da microalga mesmo quando vaucherixantina e violaxantina são as xantofilas predominantes, nunca chegando a ter predominância em relação a estas. A luteína e a zeaxantina, são dois compostos isoméricos normalmente associados as plantas superiores e, mais recentemente, associados a algas (Stoyneva-Gärtner et al., 2019a). No caso particular das Eustigmatophyceae a presença de luteína e zeaxantina é referida por Li et al. (2012b) nos géneros *Vischeria* e *Eustigmatos*. Stoyneva-Gärtner et al. (2019a) demonstraram a presença de luteína (13-25% total carotenoides) e zeaxantina (8-11% total de carotenoides) em 5 estirpes do grupo *Vischeria/Eustigmatos*. Estes autores sugerem a necessidade de aumentar os estudos relacionados com estes pigmentos nesta classe uma vez que revelam um potencial de produção interessante. O  $\beta$ -caroteno presente em 6 estirpes do género *Vischeria* apresenta potencial para a produção em fotobioreatores de painel (Li et al., 2012a). Embora com resultados bastante interessantes, no entanto, os seus valores não ultrapassam os detetados em *Dunaliella salina*, pertencente à classe Chlorophyceae, que consegue acumular 10% em peso seco contra os 7% do peso seco obtidos nas estirpes de *Vischeria*. Atualmente *Dunaliella salina* é a única e principal fonte de  $\beta$ -caroteno, contudo alguns autores (Li et al., 2012b; Gao et al., 2016) sugerem a possibilidade de se obter  $\beta$ -caroteno de *Vischeria*, em particular de *Vischeria stellata* uma vez que possui maior capacidade de acumular biomassa do que *Dunaliella salina* se as condições de cultivo forem otimizadas.

Outra aplicação das Eustigmatophyceae é na produção de lípidos, com *Nannochloropsis* uma vez mais a ser o género mais explorado pela sua capacidade de acumulação de lípidos neutros, em particular triacilgliceróis (TAGs) (Stoyneva-Gärtner et al., 2019b). Os TAGs constituem a maior parte do lípido acumulado nas algas como produto de armazenamento e reserva de energia (Klok et al., 2014). Os estudos com *Nannochloropsis* permitiram perceber que as eustigmatofíceas apresentam na sua constituição lipídica ácidos gordos com aplicabilidade em duas áreas da biotecnologia, na área alimentar devido à presença de ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5  $\omega$ -3) e para produção de biocombustíveis devido à presença de ácido oleico (C18:1) (Stoyneva-Gärtner

et al., 2019b). Estudos com *Monodus subterraneus* também revelaram o elevado potencial deste gênero para a produção de lípidos com interesse alimentar, nomeadamente ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), como o EPA (Mercer et al., 1974). Estes ácidos gordos quando consumidos, trazem benefício para a saúde humana reduzindo a incidências de doenças cardiovasculares, diabetes do tipo II, doenças oculares, artrites entre outras (Stoyneve-Gärtner et al., 2019b). Além de *Monodus*, têm-se obtido resultados promissores em gêneros como *Vischeria*, *Ellipsoidion* e *Trachydiscus* (Xuecheng, 2001; Illiev et al., 2010; Gao et al., 2016). Outras espécies de eustigmatófitas também foram identificadas como oleaginosas com potencial para a produção de biocombustíveis devido ao seu elevado conteúdo lipídico, entre as quais, *Vischeria polyphem* com conteúdo lipídico de 60,59% de peso seco e *Vischeria stellata* com 56% de lípidos totais sendo 52% ácidos neutros (Zhang et al., 2013). Para além do potencial lipídico estas duas microalgas demonstraram uma elevada taxa de crescimento em comparação com o gênero *Nannochloropsis*.

Por fim as Eustigmatophyceae também demonstraram ter bastante potencial para a produção de vitamina E principalmente sobre a forma de  $\alpha$ -tocoferol (Stoyneve-Gärtner et al., 2019b), que é uma vitamina com elevado poder antioxidante protegendo a célula de danos causados pelas espécies reativas de oxigénio (ROS) (Hess, 2017). Esta vitamina apenas é produzida por organismos fotossintéticos havendo estudos que demonstram que está presente em quantidades significativas em *Nannochloropsis oculata* chegando a ter uma biodisponibilidade mais alta que o  $\beta$ -caroteno e o licopeno quando comparado com várias espécies do gênero *Chaetoreros* (Goh et al., 2009; Durmaz 2007). Para além de vitamina E os gêneros *Nannochloropsis* e *Monodus* também são ricos em vitaminas B, C, D e K (Stoyneve-Gärtner et al., 2019b).

## Cultivo de microalgas

Os principais nutrientes essenciais para o cultivo das microalgas são azoto, fósforo e carbono, referidos como macronutrientes sendo que algumas espécies de microalgas, nomeadamente as diatomáceas, também têm necessidade de sílica (Khan et al., 2018). O azoto e o fósforo geralmente são adicionados na forma de nitratos e fosfatos e o carbono pode ser glicerol ou acetatos, contudo também se usa CO<sub>2</sub>, que é a forma mais barata e usada principalmente a nível industrial (Bold e Wynne, 1978). Outros elementos que têm um forte impacto no crescimento das microalgas são o ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), níquel (Ni), boro (B), vanádio (V), cobalto (Co), cobre (Cu), molibdénio (Mo) e selénio (Se) (Becker, 1994), geralmente referidos como micronutrientes, porque apenas são necessários em quantidades vestigiais. Estes elementos têm como principal função servir de cofator nas mais variadas atividades metabólicas (Procházková et al., 2014).

É o conjunto de macronutrientes e micronutrientes que formam um meio de cultura que, apesar de ter quantidades recomendadas para o crescimento das microalgas, pode sofrer modificações nessas quantidades tendo em vista um determinado objetivo, por exemplo, a alteração

de macronutrientes para uma maior produção lipídica como demonstrado por Xin e seus colaboradores (Xin et al., 2010). Estes autores verificaram que limitando o azoto (2,5 mg/L), a quantidade de lípidos totais aumentava em cerca de 30% e que limitando o fósforo (0,1 mg/L) os lípidos totais aumentavam em 53%. Outra forma de controlar e manipular o cultivo da biomassa é alterando os vários parâmetros ambientais, como temperatura, pH, salinidade e luz (Paliwal et al., 2017). Estes parâmetros também podem afetar a produção de biomassa ou até mesmo as características da biomassa (Paliwal et al., 2017). As microalgas, como todos os seres fotossintéticos, têm a capacidade de converter energia luminosa em energia química acumulando-a na forma de compostos orgânicos como pigmentos, lípidos, proteínas ou vitaminas, sendo de todos os organismos fotossintéticos os que mais eficazmente fixam dióxido de carbono (Morales et al., 2017). Variações no comprimento de onda da luz podem influenciar a produção de biomassa, de ácidos gordos e de carotenóides nas microalgas como foi demonstrado na microalga *Stichococcus bacillaris* que teve uma maior produção de biomassa quando exposta a luz vermelha e azul sendo que a produção de ácidos gordos foi maior quando exposta apenas a luz vermelha (Mutaf et al., 2019). Já num estudo realizado em *Chlamydomonas nivalis* concluiu-se que luz UV-C e UV-A estimulava a produção de compostos fenólicos com capacidade antioxidante e aumentava a produção de carotenóides, respetivamente (Duval et al., 1999).

A temperatura e a luz são dois fatores ambientais que têm uma dinâmica conjunta isto porque estações do ano têm características de luz diferentes, nomeadamente fotoperíodo e comprimentos de onda com diferentes oscilações de temperatura (Singh e Singh, 2015). Vários estudos feitos com várias microalgas demonstram que no intervalo de 22 a 35°C as microalgas têm um crescimento máximo sendo que a temperaturas baixas com luz favorável a taxa de fotossíntese é diminuída (Singh e Singh, 2015).

Quanto à salinidade, as microalgas reagem de maneira diferente quanto expostas a diferentes salinidades (Ishika et al., 2018), podendo ser divididas em halófitas, em que o sal é necessário para um crescimento normal e halotolerantes, em que o organismo tem um mecanismo de resposta que permite a sobrevivência em meio salino (Richmond, 1986). Em ambos os casos são produzidos compostos que permitem o controlo osmótico interno e externo das microalgas. Exemplo disso é o aumento de carotenóides, em particular da luteína e de hidratos de carbono quando se aumenta a salinidade em *Botryococcus braunii* (Rao et al., 2007) ou na produção de ácidos gordos quando a salinidade é alta no caso *Isochrysis* sp. e *Nannochloropsis oculata* (Renaud e Parry, 1994). Contudo, em ambos os estudos é referido que existe uma diminuição do rendimento da biomassa.

O pH é outro fator ambiental importante para as microalgas, sendo que grande parte das microalgas são sensíveis às variações deste fator, crescendo apenas no intervalo de pH de 6 a 8,76, contudo, existem exceções (Khan et al., 2018). Existem microalgas capazes de crescer em intervalos de pH maiores, como é referido para *Chlorella vulgaris* (Lam e Lee, 2012). Esta

característica confere vantagens a algumas microalgas pois contribui para impedir contaminações por parte de outros organismos mais sensíveis ao pH (Touloupakis et al., 2016).

### **Stress oxidativo e antioxidantes**

Durante a atividade metabólica, nomeadamente na respiração mitocondrial e na fotossíntese de qualquer organismo vivo, são produzidas ROS (Shalaby, 2015; Carochó e Ferreira, 2013). Estas moléculas instáveis e extremamente reativas, quando presentes em quantidades controladas, têm como função no organismo a ativação de mecanismos sinalizadores de alterações dentro e fora das células (Jabs, 1999). Quando produzidas em excesso provocam danos oxidativos nas células, tecidos, ácidos nucleicos (RNA e DNA). Estes danos estão associados a doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, cancro entre outras (Wiernsperger, 2003; Veskoukis et al., 2012; Mahbouli et al. 2018). Para a diminuição e controlo dos níveis de ROS e, com isso, redução dos danos oxidativos, o organismo produz compostos com atividade antioxidante que inibem e reparam os danos oxidativos ou até mesmo inativam os ROS. No caso do organismo humano, este tem a capacidade de produzir alguns antioxidantes, contudo não são suficientes para contrariar os efeitos dos oxidantes, sendo necessário adquirir antioxidantes exogéneos através de suplementos ou pela alimentação (Carochó e Ferreira, 2013). Estudos mostram que a ingestão de alimentos com elevado conteúdo em antioxidantes ajuda a proteger contra os ROS e conseqüentemente aumenta a longevidade (Wilson et al, 2017).

Os antioxidantes podem ser de origem sintética, como por exemplo o BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) ou BHT (2,6-diterc-butil-p-creso) contudo, estudos demonstram que estes podem ter efeitos secundários indesejados, como por exemplo provocando danos no fígado ou mesmo ter atividade cancerígena (Khan e Alam, 2019). Em alternativa aos antioxidantes sintéticos existem os naturais que têm a mesma capacidade antioxidante, contudo, possuem a vantagem de não ter os efeitos secundários indesejados (Caleja et al., 2017). A maioria dos antioxidantes naturais atualmente disponíveis são derivados de plantas terrestres, sendo as microalgas uma alternativa promissora (Goiris et al., 2012). Nas microalgas, as atividades metabólicas e fotossintéticas produzem bastantes ROS, contudo, as células não revelam danos. Isto porque as células apresentam respostas adaptativas ao stress oxidativo pela estimulação do seu sistema de defesa antioxidante intrínseco enzimático e não enzimático (Guedes et al., 2013a; Guedes et al., 2013b), mecanismos de proteção que previnem a acumulação de ROS e com isso contrariam o stress oxidativo (Goiris et al., 2012). Devido à origem natural destes compostos antioxidantes as aplicações podem ir desde a cosmética, como por exemplo produtos de proteção solar, a alimentos funcionais e nutracêuticos, e à aplicação na indústria farmacêutica (Pulz e Gross, 2004).

Existem vários compostos nas microalgas com características antioxidantes, nomeadamente ubiquinonas (Klein et al., 2012), carotenoides, vitaminas C e E, florotatinos, ácidos gordos polinsaturados  $\omega$ 3, polissacarídeos, entre outros (Guedes et al., 2013a). Contudo os de maior

interesse são os carotenoides, em especial a astaxantina, o  $\beta$ -caroteno e a luteína (Guedes et al., 2011). Os carotenoides são o principal grupo de antioxidantes presentes nas microalgas que têm a importante função de “queching” de ROS que são gerados durante a fotossíntese, em particular do oxigénio singlete. Vários estudos comprovam que os carotenoides contribuem significativamente para a atividade antioxidante total das microalgas sendo atualmente os géneros *Haematococcus* (Goiris et al., 2012) e *Dunaliella* (Murthy et al., 2005) os mais explorados a nível comercial para a sua obtenção (astaxantina e  $\beta$ -caroteno, respetivamente). Nas plantas terrestres os compostos fenólicos são apresentados como responsáveis pela capacidade antioxidante das plantas, nomeadamente os flavonoides que têm a capacidade de inibir a oxidação de lípidos (Goiris et al., 2012). Nas microalgas os compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante são ainda um tema que necessita de mais estudos. Existem autores que relacionam a atividade antioxidante das microalgas com o conteúdo em fenóis (Goiris et al., 2012; Monteiro et al., 2019; Safafar et al., 2015) e outros que não encontraram nenhuma relação entre a atividade antioxidante e estes compostos (Maadane et al., 2015). As microalgas na sua constituição possuem vários tipos de compostos fenólicos. Um estudo realizado por Klejdus et al. (2010) demonstrou a presença de vários fenóis como isoflavonas, flavanonas, flavonóis e dihidrochalconas em microalgas e cianobactérias, indicando que apesar das microalgas serem organismos mais primitivos que as plantas terrestres, ou mesmo pertencerem a linhagens evolutivas diferentes conseguem sintetizar polifenóis complexos.

A nível bioquímico os antioxidantes podem reagir com os radicais por dois mecanismos: transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e transferência de eletrões (SET), sendo que podem ocorrer isoladamente ou em paralelo. Os métodos de análise de compostos antioxidantes são específicos para a deteção de antioxidantes que funcionam por cada um dos mecanismos, havendo métodos que detetam antioxidantes que funcionam pelos dois mecanismos. Contudo, mesmo dentro de métodos que detetam antioxidantes com o mesmo mecanismo de ação, pode haver diferenças na eficácia em reduzir diferentes radicais, o que acontece devido às características físico-químicas do antioxidante ou dos compostos usados nos métodos (Prior et al., 2005).

O TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) é um teste que deteta antioxidantes que funcionam pelos dois mecanismos, SET e HAT, e que se baseia na capacidade de reação do antioxidante com o radical ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). É um método espectrofotométrico em que a reação do antioxidante com o radical ABTS é visível através da alteração da cor de azul para transparente (Figura 3), a 734nm. Os resultados do teste TEAC são apresentados em comparação à reação do padrão Trolox (análogo da vitamina E) com o radical ABTS<sup>•+</sup>. Tem como vantagens ser um método simples e ser solúvel em meio aquoso e orgânico, o que permite ser usado para quantificar antioxidantes nestas duas fases. As duas principais desvantagens são o tempo de preparação do radical ABTS<sup>•+</sup>, que demora 16 horas e o facto de este radical ser um radical não fisiológico, uma vez que não é encontrado em mamíferos. Quando usado

para análise, o tempo de atuação de 6 minutos pode deixar de fora outros compostos com reações mais lentas (Prior et al., 2005).



Figura 3 – Esquema representativo da alteração de cor dos diferentes métodos após a adição do antioxidante.

O FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) é também um método espectrofotométrico que se baseia na redução do TPTZ (2,4,6-tripirydyls-triazine) pelo antioxidante observando-se uma alteração de cor amarelo para verde (Figura 3) a 593nm. Desta forma, este teste tem a capacidade de detetar compostos com habilidade de manter o estado de redox, bastante semelhante ao teste ABTS, no entanto não deteta compostos que atuam por HAT. Devido ao teste FRAP ser realizado a pH 3,6 o potencial de ionização que conduz a transferência de electrões é diminuído e aumenta o potencial redox, causando a dominância do mecanismo de transferência de eletrões, sendo desta forma um método que deteta antioxidantes que atuam pelo mecanismo SET (Prior et al., 2005). Tal como no teste TEAC, o teste FRAP é simples, barato e rápido não necessitando de equipamento especializado, mas assenta na premissa de que todas as reações ocorrem em menos de 4 min, podendo deixar de parte alguns compostos antioxidantes (Prior et al., 2005).

O DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) é outro método espectrofotométrico que se baseia na redução do radical DPPH<sup>·</sup> de cor púrpura forte para amarelo (Figura 3) pela atuação do composto antioxidante, a 515nm. Tal como o TEAC este é um método que deteta compostos antioxidantes que atuam por HAT e SET, contudo, possui a desvantagem de haver compostos como os carotenoides que se sobrepõem com o radical nos comprimentos de onda a 515nm e interferem na análise. Outra desvantagem deste método é o facto de alguns compostos antioxidantes, que têm uma rápida reação com outros radicais, terem uma reação mais lenta podendo mesmo ficar inertes quando aplicado o radical DPPH<sup>·</sup>. Como vantagens tem o facto de ser um método simples, fácil e barato (Prior et al., 2005).

O método de Folin-Ciocalteu é também um método espectrofotométrico de quantificação de compostos fenólicos. Este método baseia-se na redução do reagente Folin de cor amarelo para

azul, em condições alcalinas, na presença do antioxidante (Figura 4). De forma a padronizar os resultados é usado o ácido gálico como padrão para a quantificação da capacidade antioxidante. Este método é bastante simples, contudo, tem como desvantagem sofrer inúmeras interferências com alguns compostos, nomeadamente açúcares, ácidos orgânicos, Fe (II) ou compostos não fenólicos que reagem com o reagente Folin (Prior et al., 2005).



Figura 4 - Esquema representativo da alteração de cor do método Folin após a adição do antioxidante.

## Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial antioxidante de estirpes pertencentes à classe Eustigmatophyceae e relacioná-lo com o conteúdo em clorofilas, carotenoides e compostos fenólicos. Foram selecionadas 13 estirpes pertencentes a géneros diferentes da classe Eustigmatophyceae da Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI) e procedeu-se à avaliação do crescimento ao longo de 21 dias em dois meios de cultura diferentes; à extração e quantificação da atividade antioxidante por três métodos de análise diferentes (TEAC, DPPH, FRAP); à quantificação das clorofilas, carotenoides e compostos fenólicos totais e, por fim, à análise da relação do conteúdo em clorofilas, carotenoides e compostos fenólicos totais com a atividade antioxidante determinada.

# Materiais e métodos

## Estirpes de microalgas

Para este trabalho foram usadas 14 estirpes de microalgas da classe da Eustigmatophyceae (Tabela 1), 9 provenientes da Algoteca de Coimbra (ACOI) (<http://acoi.ci.uc.pt>), 4 da Culture Collection of Algae at Göttingen University (SAG) (<http://sagdb.uni-goettingen.de>) e 1 da Culture Collection of Marine Phytoplankton integrada no Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (CCMP-NCMA) (<https://ncma.bigelow.org/cms/index/index/>).

Tabela 1 – Estirpes de microalgas estudadas, local de colheita e meios usados para o seu cultivo

Estirpe	Microalga	Local de colheita	Meio de cultura
ACOI 2424	<i>Characiopsis aquilonaris</i>	Rabaçal, Lagoa de Chança, Portugal	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
ACOI 307	<i>Chlorobotrys regularis</i>	Lagoa de Marinho, Serra do Gerês, Portugal	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
ACOI 2029	<i>Dioxys</i> sp.	Caramulo, Portugal	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
ACOI 4864ni	<i>Eustigmatos</i> sp.	Madeira	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
ACOI 1852	<i>Goniochloris sculpta</i>	Rabaçal, Lagoa de Chanca, Portugal	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
SAG 848-1	<i>Monodopsis subterranea</i>	Connecticut, rio em Marion, EUA	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
SAG 8.83	<i>Monodopsis unipapilla</i>	Alpes de Venoste, Hochwilde, Tyrol, Áustria	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
ACOI 4769ni	<i>Monodopsis</i> (como <i>Monodus</i> na coleção) sp.	Abrantes, Campo Militar de Santa Margarida, Lagoa da Murta, Portugal	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
ACOI 2938	<i>Monodopsis unipapilla</i> (como <i>Monodus</i> na coleção)	Abrantes, Campo Militar de Santa Margarida, Barragem do Carvalhoso, Portugal	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
CCMP 1775	<i>Microchloropsis gaditana</i>	Baía de Cádiz, Cádiz, Espanha	F/2 20ppm, pH 8,4-8,8

SAG 38.85	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Skate Point, Ilha do Cumbrae, Escócia, Reino Unido	F/2 20ppm, pH 8,4-8,8
SAG 40.85	<i>Microchloropsis salina</i>	Skate Point, Ilha do Cumbrae, Escócia, Reino Unido	F/2 35ppm, pH 8,4 – 8,8
ACOI 2419ni	<i>Pseudostaurastrum</i> sp.	Açude da Argolada, Portugal	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5
ACOI 299	<i>Vischeria helvetica</i>	Serra do Gerês, Lagoa do Marinho, Portugal	M7, pH 7,2 – 7,6 F/2 0ppm, pH 8,0-8,5

### Condições de cultivo

O cultivo de cada estirpe foi realizado em condições controladas, com uma intensidade luminosa de  $51 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (lâmpadas OSRAH Cool White L36W/20 Hellweiss), um fotoperíodo de 16:8 h luz/escuro e uma temperatura de 23°C (Figura 5).



Figura 5 – Cultivo das microalgas em estudo em balões Erlenmeyer de 5L em condições controladas.

Foram usados dois meios de cultura, o meio M7 (adaptado de Schlösser, 1994) (Tabelas 2 e 3) e o meio F/2 (adaptado de Guillard e Ryther, 1962) (Tabelas 4 e 5), este último com diferentes salinidades. Para garantir um inóculo inicial controlado, para cada estirpe foi estabelecida uma cultura-mãe em balões de Erlenmeyer de 5L diluindo um litro de cultura densa com a mesma quantidade de meio de cultura fresco (1:1 v/v). A cultura foi mantida a crescer durante 3 dias após

os quais se adicionaram 2L de meio de cultura fresco (1:1 v/v) e deixou-se a crescer durante 20 dias nas condições descritas anteriormente e com borbulhamento de ar (0,5-1 L/min).

Onze das catorze estirpes estudadas foram cultivadas em dois meios de cultura diferentes (Tabela 1).

Tabela 2- Composição química do meio de cultura M7.

Solução	Solução stock (g/100mL)	(mL/L)
KNO <sub>3</sub>	1%	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1%	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2%	5
CaSO <sub>4</sub>	Solução saturada	10
Extrato de solo		20
Extrato de <i>Sphagnum</i>		10
Micronutrientes		5
Vitamina B <sub>12</sub>	5 x 10 <sup>-6</sup> g/L	1
Água destilada		929

Tabela 3 – Composição química da solução de micronutrientes presente no meio M7.

Solução	Solução stock (g/100mL)	(mL/L)
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1	1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1	2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,2	5
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02	5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02	5
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0005	1
EDTA		0,8g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0,7g

O extrato de solo do meio M7 (Tabela 2) foi preparado adicionando 1L de água destilada a 200g de terra composta por baixo teor em húmus, adubos e outros químicos. A mistura anterior foi fervida durante 1 hora, arrefecida e filtrada com recurso a filtro de papel e algodão hidrófilo. Posteriormente foi centrifugada e autoclavada durante 1 hora a 120 °C e 1 bar de pressão ao longo de três dias consecutivos. No caso do extrato de *Sphagnum* (Tabela 2), este foi preparado adicionando 7,5L de água destilada a 250g de *Sphagnum*, deixou-se a mistura em repouso durante uma noite e posteriormente foi fervida durante uma hora. Foi arrefecida, filtrada e autoclavada como anteriormente descrito para o extrato de solo.

Tabela 4 – Composição química do meio de cultura F/2.

Solução	Solução stock (g/L)	(mL/L)
NaNO <sub>3</sub>	75	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5	1
Solução de micronutrientes		1
Solução de vitaminas		0,5
Água destilada ou salina		995,5

Tabela 5 – Composição química da solução de micronutrientes presente no meio F/2.

Solução	Solução stock (g/L)	(mL/L)
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O		3,15 g
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O		4,36 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9,8	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6,3	1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22,0	1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,0	1
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180,0	1

A solução de vitaminas do meio F/2 (Tabela 4) é composta por tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) com uma concentração de  $2,96 \times 10^{-7} \text{M}$  e biotina (vitamina B<sub>7</sub>) com concentração de  $2,05 \times 10^{-9} \text{M}$ .

Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados em autoclave (Uniclave 88) durante 20 minutos a 120 °C de temperatura e 1 bar de pressão.

### Análise do crescimento

Para análise do crescimento, a densidade celular das culturas foi monitorizada ao longo de 20 dias em balões Erlenmeyer de 5L nas condições anteriormente referidas.

Nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17 e 20 foram retiradas amostras de 1mL e realizadas contagens do número de células usando um hemocitómetro e observação ao microscópio (VWR modelo BI500), em triplicado. Os resultados foram apresentados em células/mL de solução.

### Preparação dos extratos

Após o cultivo durante 20 dias, a biomassa foi recolhida centrifugando (Heraeus Megafuge 8) o volume total de cada cultura a 4500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente a biomassa foi congelada e liofilizada (ScanVac Cool Safe) e os extratos preparados segundo o método de Leão et al. (2013) com algumas modificações, em triplicado. Para tal pesaram-se 200 mg de biomassa liofilizada num tubo falcon, no caso das microalgas de salinidade 0 ppm, no caso das algas de salinidade 20ppm e 35ppm foram usadas 600mg e 900mg, respetivamente. A biomassa foi macerada em azoto líquido usando-se um almofariz e respetivo pilão. Posteriormente foi distribuída

por Eppendorfs de 1,5mL, a cada um sendo adicionada uma esfera de inox com 5mm de diâmetro e 1mL de diclorometano: metanol (1:1, v/v); em seguida as amostras foram levadas ao moinho de esferas, durante 10 minutos, com uma frequência de 30 Hz/segundo. Todas as amostras foram posteriormente reunidas num único falcon ao qual se adicionaram 20mL de diclorometano: metanol (1:1, v/v), levou-se ao vórtex durante 2 minutos e centrifugou-se durante 15 minutos a 4500 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi recolhido. Os passos anteriormente descritos foram repetidos até total extração de compostos. Por fim os sobrenadantes foram combinados, evaporados num evaporador rotatório (Buchi Rotavapor R-300), ressuspensos em diclorometano: metanol (1:1, v/v) e centrifugados (Sigma 1-14) durante 15 minutos a 13 000 rpm. Posteriormente os extratos foram transferidos para Eppendorf de 2mL previamente pesados e colocados numa centrífuga speed-vac (Gyrozen MiniVac) para remoção completa do solvente.



Figura 6 – Processo de extração para obtenção de extratos. A) Biomassa liofilizada; B) Maceração da biomassa com almofariz e pilão em azoto líquido; C) Extração em moinho de esferas; D) Extrato final.

### Análise do potencial antioxidante

O potencial antioxidante das estirpes foi determinado por três métodos espectrofotométricos distintos, os métodos de TEAC, DPPH e FRAP. Os extratos a analisar, preparados anteriormente, foram ressuspensos em etanol 95% (v/v) e levados aos ultrassons (Bandelin Sonorex RK100, 35kHz, 240W, 1% detergente) até total dissolução do extrato. Todo o trabalho de análise do potencial antioxidante foi executado em ambiente escuro.

#### Método de TEAC

O método de TEAC foi realizado segundo Guedes et al. (2013a). Inicialmente o radical catiónico ABTS ( $\text{ABTS}^+$ ) concentrado foi preparado a partir de duas soluções dissolvidas em etanol/água (1:1 v/v), uma solução de ABTS (Sigma) a  $7\text{mol/m}^3$  e uma solução de  $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$  (Merck) a  $2,45\text{mol/m}^3$ . Após a preparação das soluções estas foram misturadas num frasco Schoot e a mistura deixada a repousar durante 16h protegida da luz e à temperatura ambiente, para que a reação

de formação do catião se completasse. De seguida foi preparada uma solução diluída do ABTS<sup>++</sup> com etanol: água (1:1 v/v) até se obter uma leitura de absorvância, a 734nm, entre 680-720nm de modo a ajustar com a escala do espectrofotómetro. O Trolox (Sigma-Aldrich) foi usado como padrão e realizadas retas de calibração para três volumes diferentes de amostra (50, 100 e 350µL). Para tal fez-se uma solução-mãe de Trolox em etanol absoluto com concentração de 0,1g/L e a partir desta solução prepararam-se 10 diluições que variaram entre 0,8 e 0,0005 g/L. A análise dos extratos das microalgas foi realizada, em triplicado, adicionando 50, 100 ou 350 µL de extrato a 1mL de solução diluída de ABTS<sup>++</sup>e, após 6 minutos de reação, a leitura foi feita num espectrofotómetro (Jenway 6850) a 734 nm. O controlo foi realizado fazendo leituras de 50, 100, 350 µL de etanol 95% (v/v) com 1mL de solução diluída de ABTS<sup>++</sup>. A percentagem de inibição (PI) foi calculada de acordo com a equação  $PI = ((abs\ ABTS^{++} - abs\ amostra) / abs\ ABTS^{++} \times 100$  (Guedes et al., 2013a), em que abs representa o valor registrado de absorvância. A capacidade antioxidante total foi expressa em µmol equivalente a Trolox por grama de biomassa seca (µmol eq. Trolox/g BS).

### **Método de DPPH**

O método DPPH utilizado foi baseado no método de Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. O radical de DPPH (DPPH<sup>•</sup>) com concentração de 0,06mM foi preparado dissolvendo 2,4mg de DPPH (Sigma-Aldrich) em 100mL de metanol. A análise dos extratos foi realizada em triplicado, adicionando 1,8mL de DPPH<sup>•</sup> a 0,2mL de extrato e após 15 minutos de reação foi feita a leitura no espectrofotómetro a 515nm. O Trolox foi usado como padrão e realizadas retas de calibração. Para tal fez-se uma solução-mãe de Trolox em etanol absoluto com concentração de 0,1g/L e a partir desta solução prepararam-se 6 diluições que variaram entre 0,04 e 0,003 g/L. O controlo foi realizado fazendo leituras de 0,2mL de etanol 95% (v/v) com 1,8mL de solução de DPPH<sup>•</sup>. A percentagem de inibição (PI) foi calculada de acordo com a equação  $PI = ((abs\ DPPH^{\bullet} - abs\ amostra) / abs\ DPPH^{\bullet} \times 100$  (Mishra et al. 2012), em que abs representa o valor registrado de absorvância. A capacidade antioxidante total foi expressa em µmol equivalente a trolox por grama de biomassa seca (µmol eq. Trolox/g BS).

### **Método de FRAP**

O método FRAP foi realizado segundo Goiris et al. (2012). O reagente FRAP foi preparado misturando volumes iguais (1:1 v/v) de TPTZ (2,4,6-tripirydyil-S-triazine) (Sigma-Aldrich) 10mM feito em HCL 40mM com FeCl<sub>3</sub> (Merck) a 20mM. Esta mistura foi posteriormente diluída 5 vezes com tampão de acetato a 0,3M (pH 3.6) seguida de aquecimento em banho maria a 37 °C. Para a análise dos extratos foram adicionados 3mL de reagente FRAP a 100µL de extrato a testar, a mistura foi posteriormente incubada durante 10 minutos a 37°C e a leitura feita em espectrofotómetro a 593nm, em triplicado. O padrão utilizado foi o Trolox, para o qual se

realizaram retas de calibração. Para tal fez-se uma solução-mãe de Trolox em etanol absoluto com concentração de 0,1g/L e a partir desta solução prepararam-se 6 diluições que variaram entre 0,06 e 0,001 g/L. O controlo foi realizado fazendo leituras de 100µL de etanol 95% (v/v) com 3mL de solução de FRAP. A capacidade antioxidante total foi expressa em µmol equivalente a trolox por grama de biomassa seca (µmol eq. Trolox/g BS).

### Conteúdo em fenóis

A análise dos compostos fenólicos totais foi realizada utilizando o método Folin-Ciocalteu (Goiris et al., 2012). Inicialmente foi preparado o reagente Folin-Ciocalteu (Panreac AppliChem), o qual teve de ser previamente diluído 10 vezes em água destilada. Para a análise dos extratos foram adicionados num tubo 1,5mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído a 200 µL de extrato. Após 5 minutos de incubação foram adicionados 1,5mL de solução de bicarbonato de sódio com concentração de 60g/L e a mistura incubada durante 90 minutos. A leitura da reação foi feita a 750nm no espectrofotómetro, em triplicado. O ácido gálico (Sigma-Aldrich) foi usado como padrão. Foram preparadas seis concentrações (150, 125, 100, 50, 25, 5 mg/L) de ácido gálico e feitas retas de calibração. O controlo foi realizado fazendo leituras de 200µL de etanol 95% (v/v) com 1,5mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído e 1,5mL de bicarbonato de sódio (60g/L). Os fenóis totais foram expressos em mg equivalente a Trolox por grama de biomassa seca (mg eq. Trolox/g BS).

### Determinação do conteúdo em clorofilas e carotenoides

As clorofilas e carotenoides totais foram determinados espectrofotometricamente de acordo com o método de Lichtenthaler and Buschmann (2001). Para tal foram feitas leituras de absorvância de alíquotas de extratos a 664,1; 648,6; 470nm. O conteúdo total de clorofilas e carotenoides foi calculado usando as equações de Lichtenthaler:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 13,36 \text{ Abs}_{664,1} - 5,19 \text{ Abs}_{648,6}$$

$$\text{Carotenoides totais (}\mu\text{g/mL)} = (1000 \text{ Abs}_{470} - 2,13 (\text{Clorofila } a)) / 209$$

Para todos os extratos ainda foi feito um varrimento do espectro entre os 400 e 700nm.

### Análise estatística

Resultados são apresentados com média  $\pm$  desvio padrão ( $\bar{x} \pm DP$ ). As análises estatísticas foram realizadas no *software* Statistica Statsoft Statistica v13.3 EN mediante a análise de variâncias, ANOVA de uma via e ANOVA fatorial, com um nível de probabilidade de 5% ( $p < 0,05$ ) selecionado antecipadamente com intuito de demonstrar as diferenças estatisticamente

significativas. De seguida, procedeu-se ao tratamento de dados com o teste de comparações múltiplas, teste de Tukey com nível de significância de  $p < 0,05$  e nível de rejeição de  $p < 0,01$ . Para o modelo de regressão usado na regressão linear múltipla a atividade antioxidante determinada por cada teste foi calculada em função do conteúdo em compostos fenólicos, das clorofilas e carotenoides totais. A regressão linear múltipla permitiu saber a contribuição dos diferentes compostos na atividade antioxidante determinada por cada teste de antioxidante.

# Resultados

## Curvas de crescimento

O crescimento das 14 estirpes utilizadas neste estudo foi monitorizado durante 20 dias através da densidade celular (Figura 7). Em dez das catorze estirpes a monitorização do crescimento foi feita em dois meios de cultura diferentes, M7 e F/2 a 0ppm. Para a estirpe *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni apenas foi monitorizado o crescimento em meio M7, e nas estirpes *Microchloropsis gaditana* CCMP 1775, *M. salina* SAG 40.85 e *Nannochloropsis oculata* SAG 38.85 em meios F/2 a 20ppm e 35ppm respetivamente. Com exceção de *Chlorobotrys regularis* ACOI 307 em meio F/2 0ppm, *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni em meio M7, *Monodopsis unipapilla* ACOI 2938 em meio M7 e *N. oculata* SAG 38.85 em meio F/2 20ppm todas as estirpes apresentam uma fase de latência ( $p < 0,05$ ). De uma forma geral é visível que esta fase tem uma duração inferior nas estirpes cultivadas em M7 quando comparadas com o cultivo em F/2 a 0ppm. Nas estirpes *Characiopsis aquilonaris* ACOI 2424 e *Goniochloris sculpta* ACOI 1852 isto não se verifica tendo ambas a mesma duração de fase de latência (3 e 5 dias respetivamente) em ambos os meios de cultura. E na estirpe *M. subterranea* SAG 848-1 o contrário é observado, possuindo uma duração superior de fase de latência (7 dias) em meio M7 quando comparado com meio F/2 a 0ppm (5 dias). Nas estirpes que apresentam fase de latência, esta tem duração de 3-7 dias, com exceção de *Dioxys* sp. ACOI 2029 e *Microchloropsis gaditana* CCMP 1775 em que esta fase tem uma duração de 10 dias.

Todas as estirpes apresentaram fase exponencial de crescimento ( $p < 0,05$ ) em ambos os meios de cultura. Com exceção de *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni em meio M7 que possui uma duração de fase exponencial de 17 dias, a média da duração desta fase é de 2-12 dias nas restantes estirpes. Observando o cultivo em ambos os meios de cultura, com exceção de *M. subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* SAG 8.83, *C. regularis* ACOI 307 e *C. aquilonaris* ACOI 2424, esta fase tem duração mais curta em meio F/2 0ppm.

As estirpes *C. aquilonaris* ACOI 2424, *C. regularis* ACOI 307, *E. sp* ACOI 4864ni, e *Monodopsis* SAG 8.83 apresentaram uma paragem com estabilização do número de células a meio da fase exponencial quando cultivadas nos dois meios de cultura ( $p < 0,05$ ). Essa estabilização de células também foi verificada nas estirpes *G. sculpta* ACOI 1852 e *Monodopsis* ACOI 4769ni em meio M7 e *Monodopsis* SAG 848-1 em F/2 0ppm. Observa-se também que as estirpes *Dioxys* sp. ACOI 2029 em meio F/2 0ppm, *Vischeria helvetica* ACOI 299 em meio F/2 0ppm e *M. gaditana* CCMP 1775 em meio F/2 20ppm são as que possuem uma fase exponencial mais curta, com duração de 2 dias ( $p < 0,05$ ).

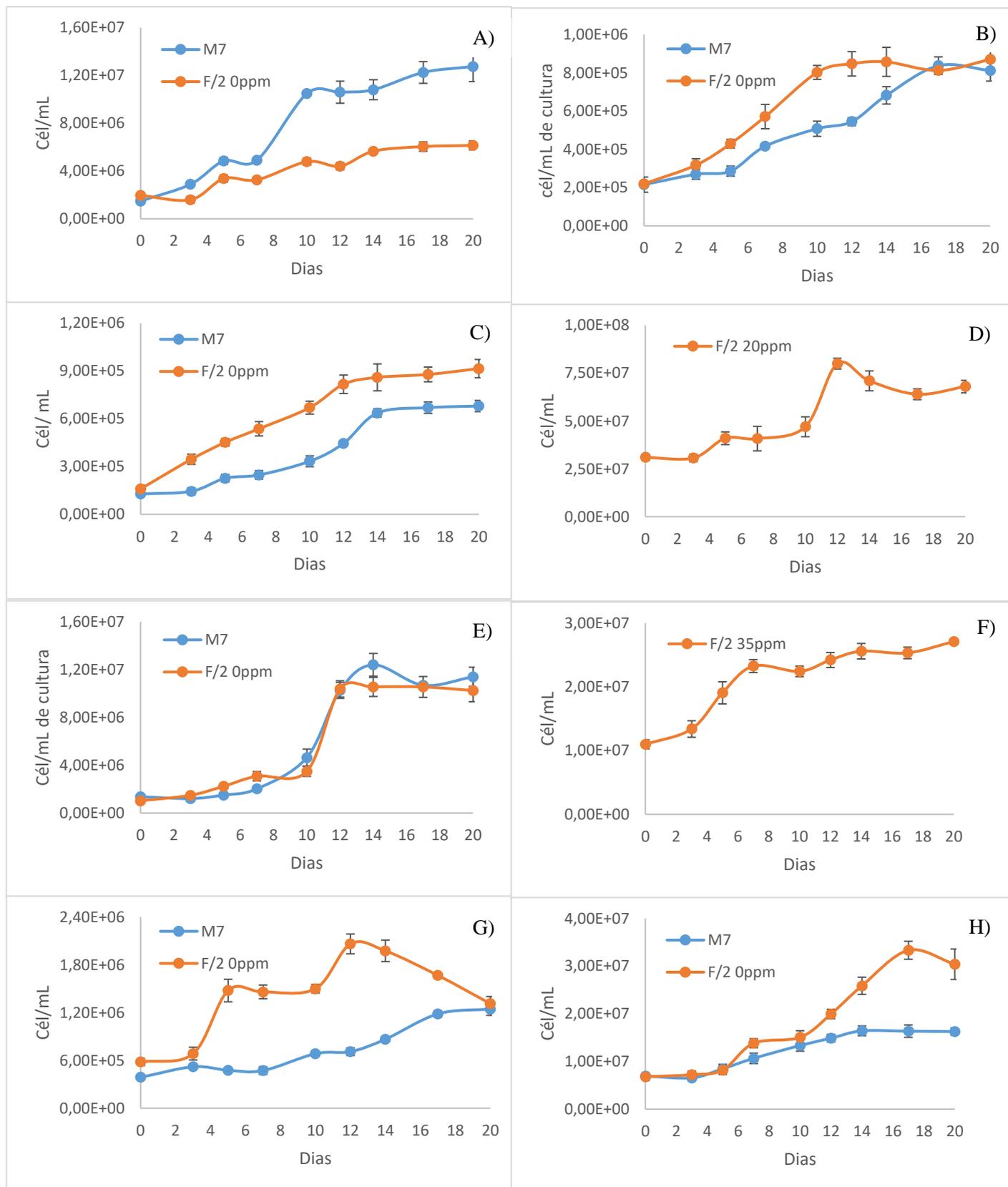


Figura 7 - Curvas de crescimento das 14 extirpes em estudo expressas em células/mL (média  $\pm$  desvio padrão). A) *Characiopsis aquilonaris* ACOI 2424; B) *Goniocholoris sculpta*

ACOI 1852; C) *Chlorobotrys regularis* ACOI 307; D) *Microchloropsis gaditana* CCMP 1775; E) *Dioxys* sp. ACOI 2029; F) *Microchloropsis salina* SAG 40.85; G) *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni; H) *Monodopsis subterranea* SAG 848-1.

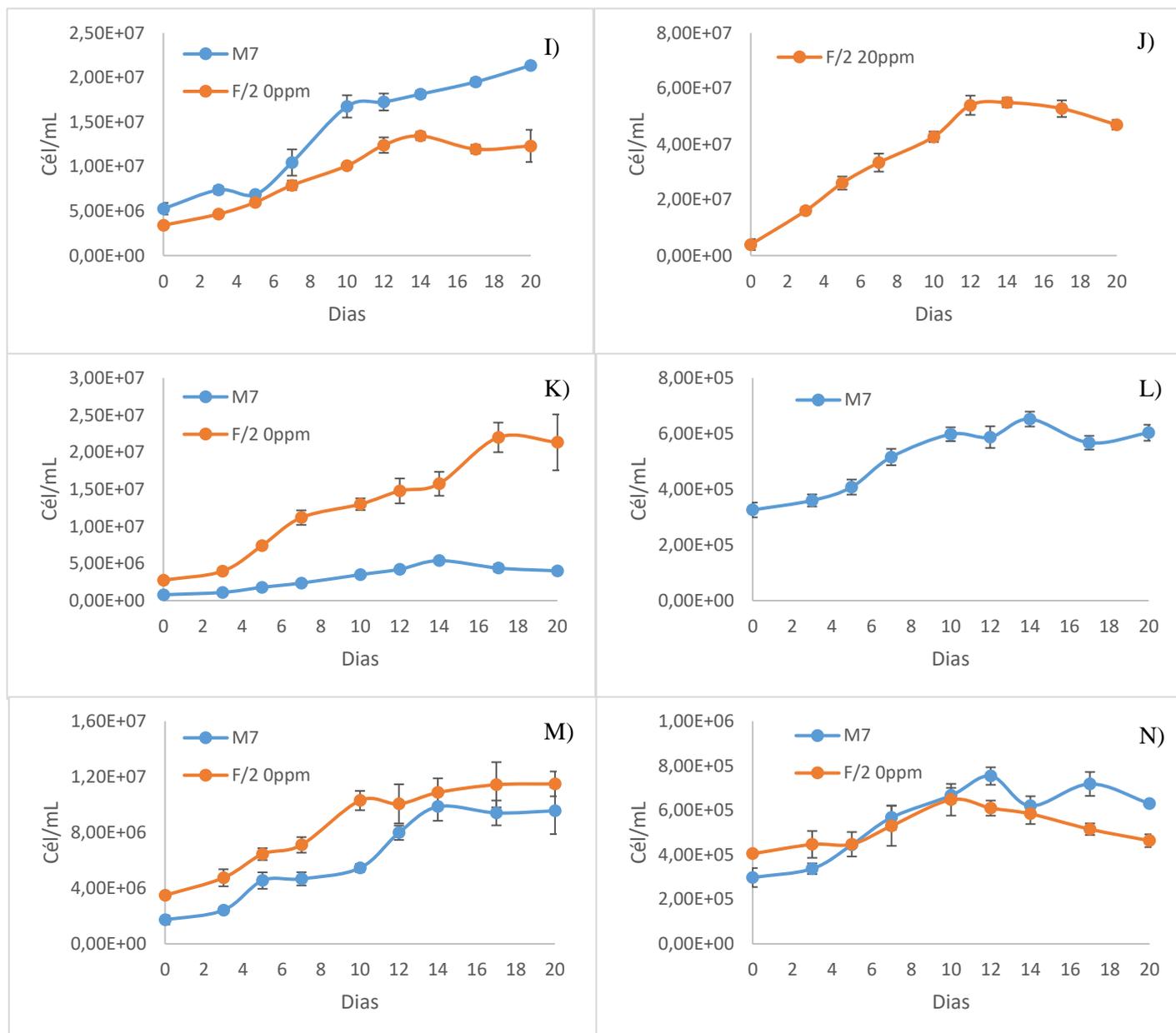


Figura 7 (continuação) – Curvas de crescimento das 14 extirpes em estudo expressas em células/mL (média  $\pm$  desvio padrão). I) *Monodopsis unipapilla* ACOI 2938; J) *Nannochloropsis oculata* SAG 38.85; K) *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83; L) *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni; M) *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni; N) *Vischeria helvetica* ACOI 299.

A fase estacionária também é observável em todas as culturas, com exceção de *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 que passa da fase exponencial diretamente para a fase de

declínio. Esta fase tem uma duração de 2-13 dias dependendo da estirpe, sendo a *M. gaditana* CCMP 1775 a estirpe que se mantém mais tempo nesta fase (13 dias). Apenas quatro das catorze estirpes estudadas apresentam fase de declínio. *V. helvetica* ACOI 299 é a única estirpe que apresenta fase de declínio em ambos os meios de cultura, ao passo que *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni apenas apresenta esta fase em meio F/2 a 0ppm, *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 e *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni em meio M7 ( $p < 0,05$ ).

Observando a Tabela 6 verifica-se que a microalga com maior taxa de multiplicação é *N. oculata* SAG 38.85 em meio F/2 20ppm, com um aumento do número de células de 13,7 vezes. Com exceção de *C. regularis* ACOI 307 e *M. subterranea* SAG 848-1, todas as estirpes apresentam maior taxa de multiplicação quando cultivadas em meio M7. *C. regularis* ACOI 307 em meio F/2 0ppm é a segunda estirpe com maior taxa de multiplicação (5,10 vezes). As estirpes com taxa de multiplicação mais baixa foram *M. subterranea* SAG 848-1 em meio M7 e *V. helvetica* ACOI 299 em meio F/2 0ppm.

Tabela 6 – Taxa de multiplicação das 14 estirpes em estudo. \* taxa de multiplicação é a divisão do nº de células no final da fase exponencial pelo nº de células no início da fase exponencial.

Estirpe	Microalga	Taxa de multiplicação* (meio M7)	Taxa de multiplicação* (meio F/2)
ACOI 2424	<i>Characiopsis aquilonaris</i>	3,62	3,54
ACOI 307	<i>Chlorobotrys regularis</i>	4,39	5,10
ACOI 2029	<i>Dioxys</i> sp.	1,68	1,38
ACOI 4864ni	<i>Eustigmatos</i> sp.	3,04	3,01
ACOI 1852	<i>Goniochloris sculpta</i>	2,92	1,87
CCMP 1775	<i>Microchloropsis gaditana</i>	-	1,70
SAG 40.85	<i>Microchloropsis salina</i>	-	1,74
ACOI 4769ni	<i>Monodopsis</i> (como <i>Monodus</i> na coleção) sp.	3,30	1,45
SAG 848-1	<i>Monodopsis subterranea</i>	1,25	4,07
ACOI 2938	<i>Monodopsis unipapilla</i> (como <i>Monodus</i> na coleção)	3,19	1,57
SAG 8.83	<i>Monodopsis unipapilla</i>	4,86	2,97
SAG 38.85	<i>Nannochloropsis oculata</i>	-	13,7
ACOI 2419ni	<i>Pseudostaurastrum</i> sp.	1,47	-
ACOI 299	<i>Vischeria helvetica</i>	1,68	1,18

## Rendimento de extração

Após a obtenção da biomassa, os compostos foram extraídos e para cada estirpe em cada meio de cultura os rendimentos de extração foram calculados. Na Tabela 7 observa-se que nas estirpes cultivadas em meio F/2 se obteve um rendimento de extração superior ao cultivo em meio M7 com exceção de *G. sculpta* ACOI 1852, *M. subterranea* SAG 848-1 e *M. unipapilla* SAG 8.83 em que se verificou o contrário. As estirpes em que se obteve um maior rendimento de extração foram *M. salina* SAG 40.85 em meio F/2 35ppm com rendimento de 30,32±4,12% seguida de *M. gaditana* CCMP 1775 em meio F/2 20ppm, *V. helvetica* ACOI 299 em meio F/2 0ppm, e *N. oculata* SAG 38.85 em meio F/2 20ppm, *M. subterranea* SAG 484-1 em meio M7 e *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni. A estirpe em que se obteve rendimento mais baixo foi *G. sculpta* ACOI 1852 em meio F/2 0ppm com 5,69±1,43%.

Tabela 7 – Rendimentos de extração das 14 estirpes em estudo após extração com diclorometano: metanol (1:1 v/v).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valores na mesma linha com diferentes letras sobscritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Estirpe	Microalga	Rendimento de extração	Rendimento extração
		(meio M7) ( $\bar{x} \pm DP$ )	(meio F/2) ( $\bar{x} \pm DP$ )
ACOI 2424	<i>Characiopsis aquilonaris</i>	14,58±1,92 <sup>a</sup>	16,22±1,15 <sup>a</sup>
ACOI 307	<i>Chlorobotrys regularis</i>	10,74±1,33 <sup>a</sup>	10,83±2,20 <sup>a</sup>
ACOI 2029	<i>Dioxys</i> sp.	15,43±0,54 <sup>a</sup>	17,06±0,65 <sup>a</sup>
ACOI 4864ni	<i>Eustigmatos</i> sp.	14,79±1,93 <sup>a</sup>	18,35±1,25 <sup>a</sup>
ACOI 1852	<i>Goniochloris sculpta</i>	11,23±1,94 <sup>a</sup>	5,69±1,43 <sup>a</sup>
CCMP 1775	<i>Microchloropsis gaditana</i>	-	25,42±3,34 <sup>a</sup>
SAG 40.85	<i>Microchloropsis salina</i>	-	30,32±4,12 <sup>a</sup>
ACOI 4769ni	<i>Monodopsis</i> (como <i>Monodus</i> na coleção) sp.	17,30±3,62 <sup>a</sup>	20,93±0,27 <sup>a</sup>
SAG 848-1	<i>Monodopsis subterranea</i>	20,66±2,38 <sup>b</sup>	10,88±1,58 <sup>a</sup>
ACOI 2938	<i>Monodopsis unipapilla</i> (como <i>Monodus</i> na coleção)	17,20±1,51 <sup>a</sup>	19,24±0,85 <sup>a</sup>
SAG 8.83	<i>Monodopsis unipapilla</i>	15,76±2,39 <sup>a</sup>	11,76±1,71 <sup>a</sup>
SAG 38.85	<i>Nannochloropsis oculata</i>	-	20,99±1,44 <sup>a</sup>

ACOI 2419ni	<i>Pseudostaurastrum</i> sp.	12,56±0,91 <sup>a</sup>	-
ACOI 299	<i>Vischeria helvetica</i>	19,60±1,21 <sup>a</sup>	25,13±1,41 <sup>a</sup>

## Potencial antioxidante

O potencial antioxidante das 14 estirpes em estudo foi determinado através de 3 metodologias diferentes, TEAC, DPPH e FRAP.

### Método de TEAC

Pelo método de TEAC o potencial antioxidante variou entre 3,01±0,77 µmol eq. trolox/g BS e 28,94±1,39 µmol eq. trolox/g BS (Figura 8). A estirpe que se destaca com maior valor antioxidante é *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 ( $p < 0,05$ ) e as estirpes com valor mais baixo são *G. sculpta* ACOI 1852 em meio F/2 0ppm com 3,01±0,77 µmol eq. trolox/g BS e *C. aquilonaris* ACOI 2424 em meio M7 com 4,27±0,31 µmol eq. trolox/g BS ( $p < 0,05$ ).

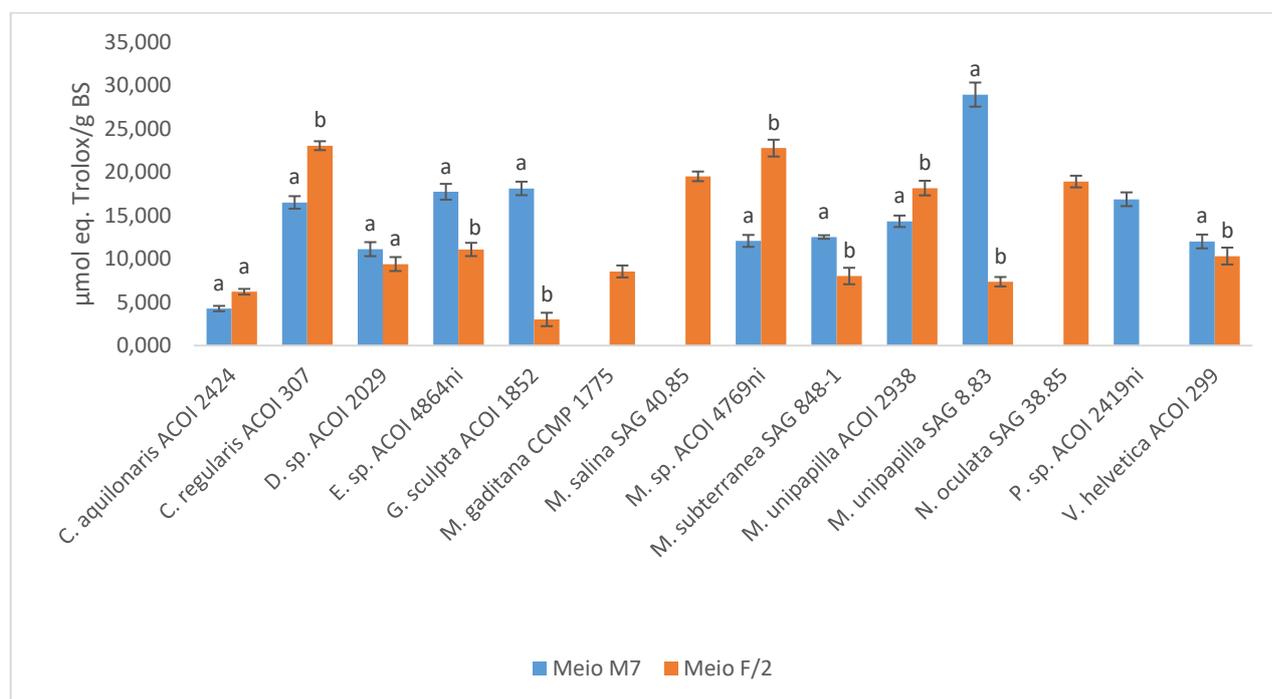


Figura 8 – Potencial antioxidante das 14 estirpes em estudo, nos meios de cultura M7 e F/2, através do método TEAC.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valores nas colunas da mesma estirpe com diferentes letras sobscritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Comparando os dois meios de cultivo, observa-se que o cultivo em meio M7 promove valores de potencial antioxidante superiores para a maioria das estirpes ( $p < 0,05$ ) com exceção de *C. aquilonaris* ACOI 2424, *C. regularis* ACOI 307, *M. unipapilla* ACOI 2938 e *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni. No meio M7 a estirpe com valor antioxidante mais elevado foi *M. unipapilla* SAG 8.83 ( $28,93 \pm 1,39$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e a de valor mais baixo foi *C. aquilonaris* ACOI 2424 ( $4,27 \pm 0,31$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ). No meio F/2 as estirpes com o valor antioxidante mais alto foram *C. regularis* ACOI 307 ( $23,04 \pm 0,51$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e *Monodopsis* sp. 4769ni ( $22,76 \pm 0,97$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e a estirpe com valor mais baixo foi *G. sculpta* ACOI 1852 ( $3,01 \pm 0,77$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ). Entre as estirpes de *Monodopsis* observam-se diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ), correspondendo o valor antioxidante mais alto à estirpe *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 sendo também esta estirpes em meio F/2 0ppm a que apresenta o valor antioxidante mais baixo. Nas estirpes de *Microchloropsis* também se observam diferenças estatisticamente significativas entre elas, sendo *M. salina* SAG 40.85 a que apresenta o valor antioxidante mais elevado.

### Método de DPPH

No método de DPPH os valores antioxidantes variaram entre  $2,91 \pm 0,74$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$  e  $14,63 \pm 0,50$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$  (Figura 9). Os valores de antioxidante mais altos ( $p < 0,05$ ) correspondem a *Eustigmatos* sp ACOI 4864ni. em meio F/2 0ppm ( $14,63 \pm 0,50$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ), *Monodopsis* sp. 4769ni em meio M7 ( $14,21 \pm 0,81$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e em meio F/2 0ppm ( $13,26 \pm 0,38$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ), *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 ( $14,20 \pm 0,79$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ), *M. unipapilla* ACOI 2938 em meio F/2 0ppm ( $13,67 \pm 0,83$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e a *V. helvetica* ACOI 299 em meio M7 ( $13,22 \pm 0,86$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e em meio F/2 0ppm ( $12,96 \pm 1,00$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ). O valor antioxidante mais baixo obtido corresponde a *G. sculpta* ACOI 1852 ( $2,91 \pm 0,74$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ).

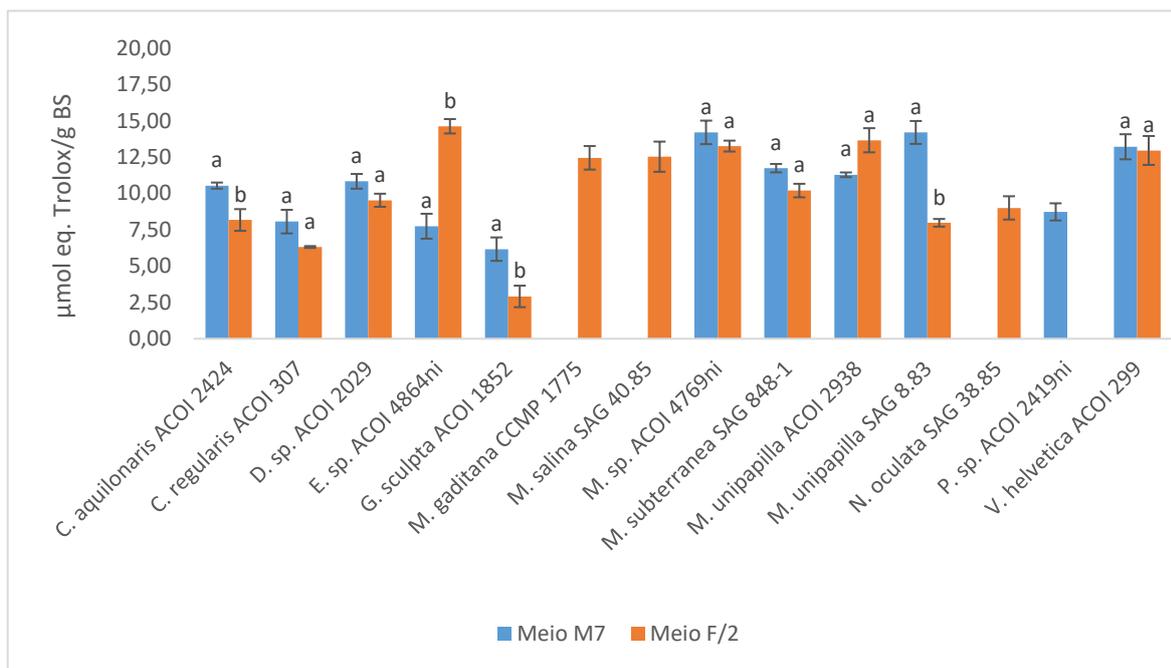


Figura 9 – Potencial antioxidante das 14 estirpes em estudo, nos meios de cultura M7 e F/2, através do método DPPH.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valores nas colunas da mesma estirpe com diferentes letras sobscritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Com exceção de *C. aquilonaris* ACOI 2424, *Eustigmatos* sp. ACO 4864ni, *G. sculpta* ACOI 1852 e *M. unipapilla* SAG 8.83 não se observam diferenças no potencial antioxidante das culturas nos dois meios de cultura diferentes. Das quatro culturas em que se observam diferenças entre os meios *M. unipapilla* SAG 8.83 ( $14,20 \pm 0,79$  µmol eq. trolox/g BS) é a que apresenta o valor antioxidante mais alto em meio M7 ( $p < 0,05$ ) e *G. sculpta* ACOI 1852 ( $2,91 \pm 0,74$  µmol eq. trolox/g BS) a que apresenta o valor mais baixo. No meio F/2 a estirpe com valor antioxidante mais elevado ( $p < 0,05$ ) é *Eustigmatos* sp. ( $14,63 \pm 0,50$  µmol eq. trolox/g BS) e a de valor mais baixo *G. sculpta* ACOI 1852 ( $6,17 \pm 0,81$  µmol eq. trolox/g BS). As estirpes de *Monodopsis* apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ), correspondendo os valores de antioxidante mais elevados a *M. unipapilla* ACOI 2938 em meio F/2 0ppm, *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 e *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni em meio M7 e F/2 0ppm e o valor mais baixo a *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio F/2 0ppm. Apenas uma das quatro estirpes de *Monodopsis* apresenta diferenças estatisticamente significativas entre os meios de cultura ( $p < 0,05$ ) (*M. unipapilla* SAG 8.83). Entre as estirpes de *Microchloropsis* não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

### Método de FRAP

No método de FRAP o potencial antioxidante variou entre  $4,54 \pm 0,25$  µmol eq. trolox/g BS e  $65,02 \pm 0,53$  µmol eq. trolox/g BS (Figura 10). Os melhores valores de FRAP ( $p < 0,05$ )

correspondem a *M. subterranea* SAG 848-1 em meio M7 e *M. unipapilla* ACOI 2938 em meio F/2 Oppm e o valor mais baixo ( $p < 0,05$ ) a *G. sculpta* ACOI 1852 em meio F/2 0ppm.

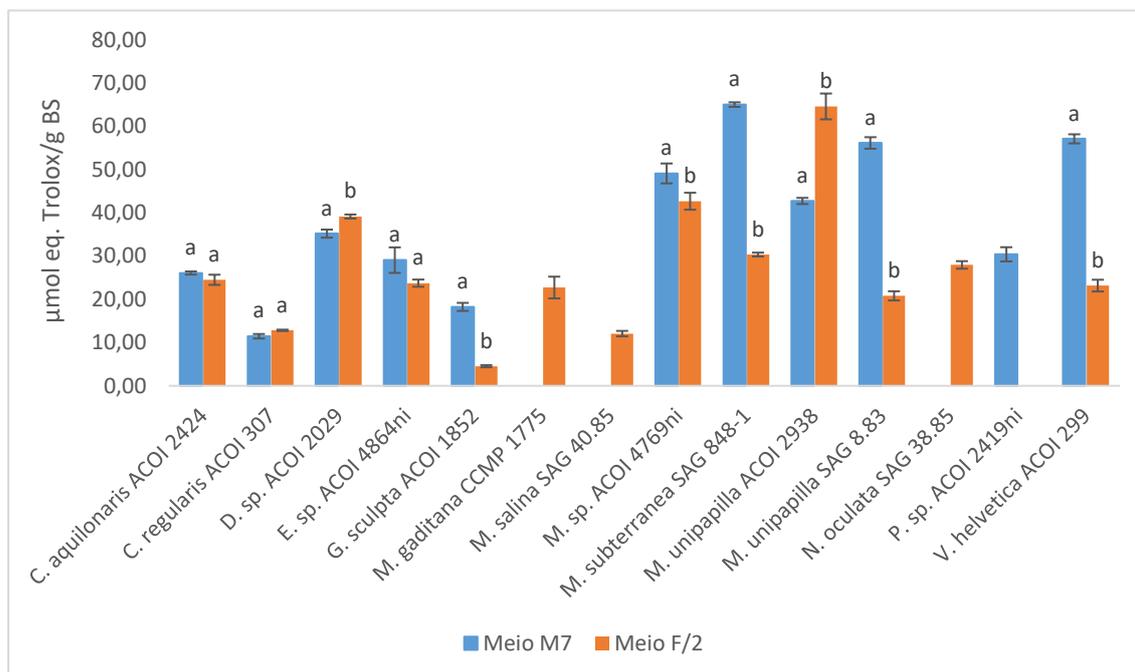


Figura 10 – Potencial antioxidante das 14 estirpes em estudo, nos meios de cultura M7 e F/2, através do método FRAP.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valores nas colunas da mesma estirpe com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Com exceção de *C. aquilonaris* ACOI 2424 e *C. regularis* ACOI 307 as estirpes apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os meios de cultura ( $p < 0,05$ ), sendo o meio M7 o que promove valores de antioxidantes mais elevados. O valor mais elevado ( $p < 0,05$ ) obtido no meio M7 foi  $65,02 \pm 0,53 \mu\text{mol eq. trolox/g BS}$  pela estirpe *M. subterranea* SAG 848-1 e o mais baixo pela estirpe *C. regularis* ACOI 307 ( $11,46 \pm 0,52 \mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ). No meio F/2 o valor antioxidante mais alto ( $p < 0,05$ ) foi obtido pela estirpe *M. unipapilla* ACOI 2938,  $64,60 \pm 2,98 \mu\text{mol eq. trolox/g BS}$  e o mais baixo pela estirpe *G. sculpta* ACOI 1852,  $4,54 \pm 0,25 \mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ . As estirpes de *Monodopsis* apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si correspondendo os valores mais elevados de antioxidantes a *M. subterranea* SAG 848-1 em meio M7 e *M. unipapilla* ACOI 2938 em meio F/2 Oppm e o mais baixo a *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio F/2 Oppm. As estirpes de *Microchloropsis* também apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, com *M. gaditana* CCMP 1775 a apresentar o valor antioxidante mais alto.

### Compostos fenólicos

O total de compostos fenólicos foi analisado pelo método de Folin. Os valores de fenóis totais variaram entre  $0,78 \pm 0,16 \text{ mg eq. ácido gálico/ g BS}$  e  $3,33 \pm 0,28 \text{ mg eq. ácido gálico/ g BS}$

(Figura 11). Os melhores valores ( $p < 0,05$ ) obtidos correspondem a *M. subterranea* SAG 848-1 em meio M7, *V. helvetica* ACOI 299 em meio M7 e em meio F/2 0ppm e *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni em meio M7. Os valores mais baixos ( $p < 0,05$ ) foram observados nas estirpes *M. subterranea* SAG 848-1 em meio F/2 0ppm, *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni em meio F/2 0ppm e *G. sculpta* ACOI 1852 em meio F/2 0ppm.

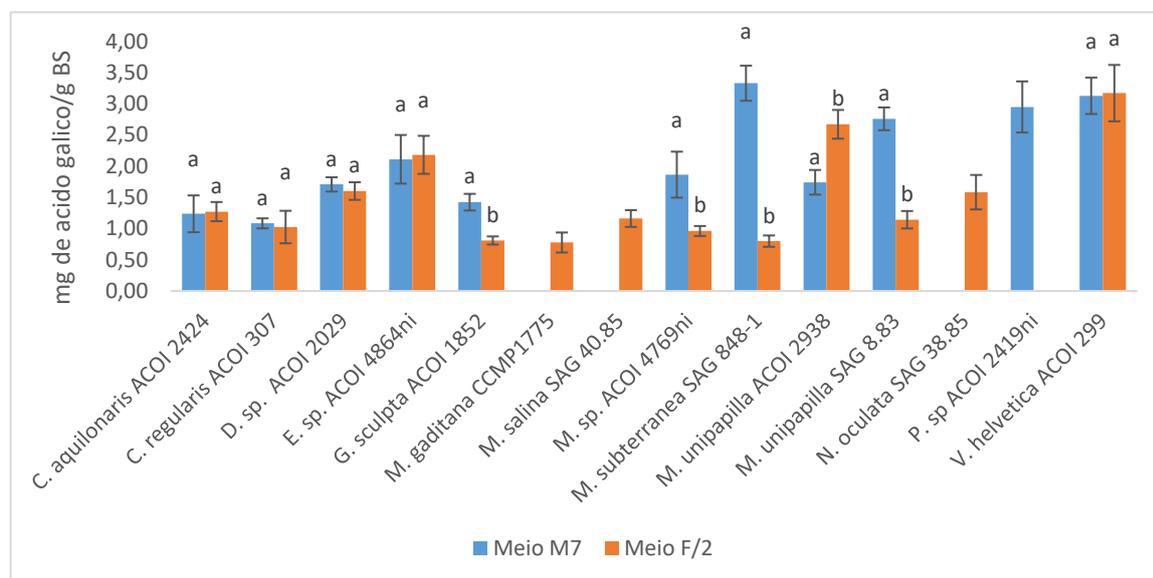


Figura 11 – Total de compostos fenólicos das 14 estirpes em estudo, nos meios de cultura M7 e F/2, através do método de Folin.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valores nas colunas da mesma estirpe com diferentes letras sobscritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Quando se observam diferenças entre os meios de cultura, com exceção de *M. unipapilla* ACOI 2938, os valores mais elevados ( $p < 0,05$ ) de compostos fenólicos foram obtidos em meio M7. Entre as estirpes de *Monodopsis* observam-se diferenças estatisticamente significativas entre as estirpes ( $p < 0,05$ ), com *M. subterranea* SAG 848-1 em meio M7 a apresentar o valor de mais alto de compostos fenólicos e *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio F/2 0ppm, *M. subterranea* SAG 848-1 em meio F/2 e *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni em meio F/2 0ppm a apresentar os valores mais baixos. No género *Microchloropsis* também se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as estirpes ( $p < 0,05$ ), correspondendo o valor mais elevado a *M. salina* SAG 40.85.

### Clorofila e carotenoides totais

A clorofila e os carotenoides totais foram quantificados. Os valores de clorofila total variaram entre  $0,68 \pm 0,19$  mg/ g BS e  $4,89 \pm 0,28$  mg/ g BS (Figura 12). Os melhores valores de ( $p < 0,05$ ) foram obtidos nas estirpes *M. subterranea* SAG 848-1, *V. helvetica* ACOI 299, *M. unipapilla* ACOI 2938, *M. unipapilla* SAG 8.83, *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni todas quando cultivadas em meio M7 e *M. sp.* ACOI 4769ni em meio F/2 0ppm.

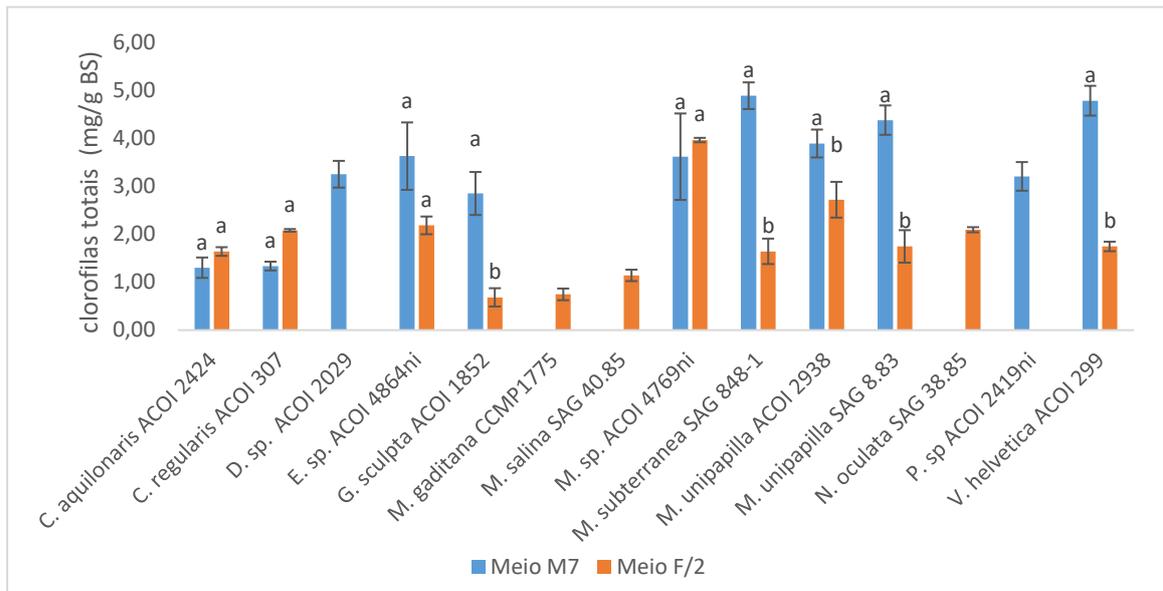


Figura 12 – Clorofilas totais das 14 estirpes em estudo, nos meios de cultura M7 e F/2.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valores nas colunas da mesma estirpe com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Comparando entre meio de cultura, os melhores valores de clorofila total foram obtidos nos cultivos em meio M7 ( $p < 0,05$ ). Entre as estirpes de *Monodopsis* observam-se diferenças estatisticamente significativas entre as elas ( $p < 0,05$ ), correspondendo os valores mais elevados de clorofila total a *M. subterranea* SAG 848-1 em meio M7, *M. unipapilla* ACOI 2938 em meio M7, *Monodopsis sp.* ACOI 4769ni em meio M7 e meio F/2 0ppm e *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7. Entre as estirpes de *Microchloropsis* não se observam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na quantidade de clorofila total.

Os carotenoides totais variaram entre  $0,14 \pm 0,05$  mg/ g BS e  $2,40 \pm 0,15$  mg/ g BS (Figura 13). Os melhores valores ( $p < 0,05$ ) correspondem a *V. helvetica* ACOI 299, *M. subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* ACOI 2938, *M. unipapilla* SAG 8.83, *Eustigmatos sp.* ACOI 4864ni, *Dioxys sp.* ACOI 2029 todas em meio M7 e *N. oculata* SAG 38.85 em meio F/2 20ppm.

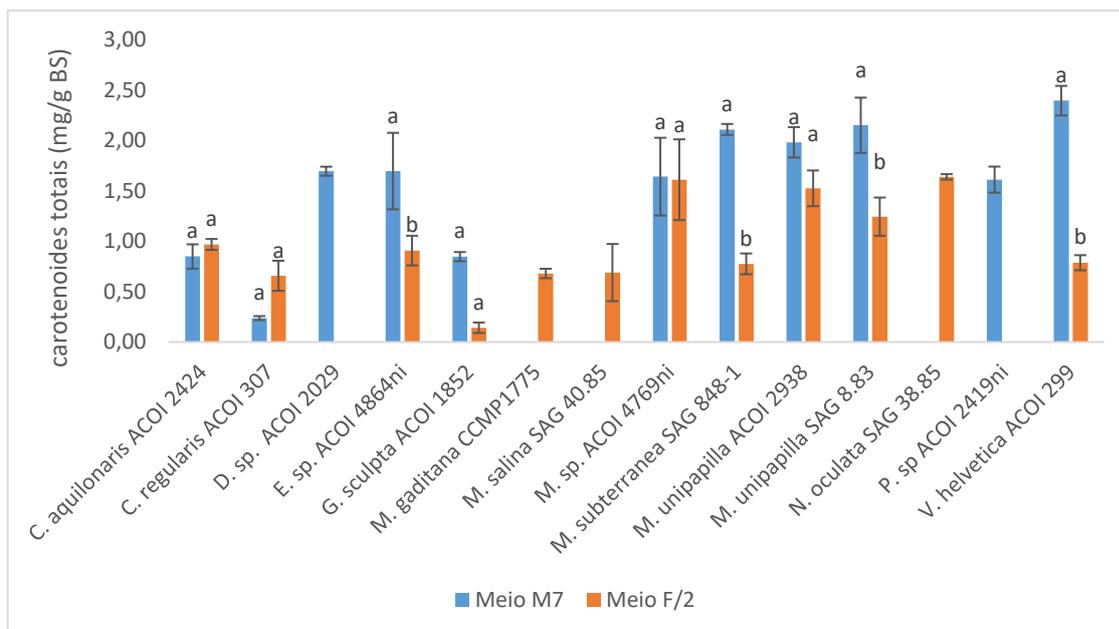


Figura 13 – Carotenoides totais das 14 estirpes em estudo, nos meios de cultura M7 e F/2.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valores nas colunas da mesma estirpe com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Comparando entre meios de cultura, os melhores valores de carotenoides totais, tal como nas clorofilas, foram obtidos no meio M7. No género *Monodopsis* observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as estirpes ( $p < 0,05$ ) *M. subterranea* em meio F/2 0ppm e *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio F/2 0ppm e as restantes, correspondendo estas aos valores mais baixos. No género *Microchloropsis* não se observam diferenças estatisticamente significativas entre as estirpes ( $p < 0,05$ ).

### Relação da atividade antioxidante com o total de fenóis, clorofila e carotenoides

A regressão linear múltipla (Tabela 8) indica que o conteúdo em clorofila contribui significativamente ( $p < 0,05$ ) para explicar a variação da atividade antioxidante no teste de TEAC. No entanto, o conteúdo em carotenoides também pode explicar alguma da variação, mas com uma significância marginal ( $p = 0,05$ ). No teste de DPPH verifica-se que apenas os carotenoides contribuem significativamente ( $p < 0,05$ ) para a variação do potencial antioxidante. Os valores de  $R^2$  da regressão múltipla para o TEAC ( $R^2 = 0,24$ ) e DPPH ( $R^2 = 0,29$ ) indicam que os compostos analisados apenas contribuem 24% e 29% para a atividade antioxidante detetada. Para o teste de FRAP observa-se que tanto os carotenoides como a clorofila contribuem significativamente ( $p < 0,05$ ) para a atividade antioxidante obtida, contudo, o conteúdo em compostos fenólicos também pode explicar alguma da variação, mas com uma significância marginal ( $p = 0,05$ ). Para o teste de FRAP o valor de  $R^2$  indica que a clorofila, os carotenoides e compostos fenólicos contribuem em cerca de 70% para a atividade antioxidante detetada.

Tabela 8 – Regressão linear múltipla do conteúdo em fenóis, clorofilas e carotenoides versus atividade antioxidante usando o teste-t para análise da significância.

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	Coeficientes	Desvio padrão	R <sup>2</sup>	Teste-t	Valor p
Fenóis		-0,51	0,57	0,24	-0,91	3,7x10 <sup>-1</sup>
Clorofilas	TEAC	3,39	0,56		6,08	<b>0,6x10<sup>-7</sup></b>
Carotenoides		-2,2	1,12		-1,96	5x10 <sup>-3</sup>
Fenóis		0,21	0,27	0,29	0,79	4,3x10 <sup>-1</sup>
Clorofilas	DPPH	0,36	0,25		1,42	1,6x10 <sup>-1</sup>
Carotenoides		1,72	0,49		3,5	<b>5,5x10<sup>-4</sup></b>
Fenóis		1,86	0,98	0,7	1,91	5,8x10 <sup>-3</sup>
Clorofilas	FRAP	4,4	1,03		4,26	<b>0,4x10<sup>-7</sup></b>
Carotenoides		11,74	2,02		5,82	<b>0,3x10<sup>-4</sup></b>

## Discussão

As estirpes *Nannochloropsis oculata* SAG 38.85, *Microchloropsis salina* SAG 40.85 e *M. gaditana* CCMP 1775 foram selecionadas para comparação de resultados. Esta escolha baseia-se na evidência de que a maioria dos estudos biotecnológicos realizados com organismos da classe Eustigmatophyceae são com o género *Nannochloropsis* (Sukenik et al., 2003; Fawley et al., 2015; Callejón et al., 2020) e que algumas espécies pertencentes a este género foram recentemente transferidas para o novo género *Microchloropsis* (Fawley et al., 2015).

### Monitorização do crescimento de culturas

O crescimento de microalgas em cultivo “Batch” é caracterizado principalmente por 6 fases: fase de latência, fase exponencial, fase linear do crescimento, fase de diminuição de crescimento, fase estacionária e fase de declínio (Lee et al., 2015). Neste trabalho apenas se consideraram 4 fases de crescimento (fases de latência, exponencial, estacionária e de declínio), englobando a fase exponencial as três fases descritas por Lee et al. (2015), a fase exponencial, a fase linear do crescimento e a fase de diminuição de crescimento.

Durante a fase de latência ocorre a adaptação dos organismos ao meio de cultura ou às novas condições de cultivo (Andersen, 2005; Lee et al., 2015). Neste trabalho verificou-se que as estirpes cultivadas em meio M7 tiveram uma fase de latência menor quando comparadas com o cultivo em meio F/2. Isto pode ser explicado pelo meio de cultura no qual as estirpes são mantidas. Estas estirpes são mantidas na coleção ACOI em meio M7 e, segundo Lee et al. (2015), a duração da fase de latência é menor quando as microalgas estão aclimatizadas ao meio em que estão a ser cultivadas. Contudo, apesar das estirpes *M. unipapilla* SAG 848-1 e *C. regularis* ACOI 307 serem mantidas em meio M7, demonstraram uma fase de latência mais curta em meio F/2, indicando que estas duas microalgas se aclimataram rapidamente a este meio de cultura demonstrando também alguma preferência por este. É de salientar que o inóculo a partir do qual se faz o cultivo a 20 dias advém de uma cultura mãe de 3 dias já cultivada no meio que se pretende estudar. O objetivo desta cultura mãe é garantir o bom estado fisiológico da cultura inicial (Andersen, 2005), o qual não controlado poderia influenciar a duração da fase de latência (Lee et al., 2015). Houve casos em que se observou total ausência de fase de latência, tanto em culturas em meio M7 (*M. unipapilla* ACOI 2938 e ACOI 4864ni) como em meio F/2 (*N. oculata* SAG 38.85 e *C. regularis* ACOI 307). Nestes casos podemos considerar que as estirpes tanto podem estar adaptadas ao meio de cultura (M7) como terem uma adaptação rápida que ainda ocorre na cultura mãe (F/2) e que as novas condições de cultivo (borbulhamento de ar) não as afeta. No caso da estirpe *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni o cultivo apenas foi feito em meio M7 uma vez que ao fim de três dias de cultura mãe em meio F/2 Oppm se observou que as células não estavam viáveis para posterior crescimento.

Na fase exponencial, a densidade celular das estirpes aumenta até um ponto máximo, iniciando a partir daí uma estabilização do número de células devido à influência de fatores limitantes, como por exemplo, diminuição de nutrientes, alterações do valor de pH, alterações do fornecimento de dióxido de carbono entre outros (Lee et al., 2015). Neste trabalho, a maioria das estirpes apresentaram maior duração da fase exponencial em meio M7, com exceção de *M. subterranea* SAG 848-1, em que esta fase foi mais longa em meio F/2. A duração desta fase está diretamente relacionada com a taxa de crescimento, quanto maior a duração da fase exponencial maior o número de células final (Lee et al., 2015). Comparando os resultados da taxa de multiplicação (Tabela 6) com a duração da fase exponencial observa-se que tendencialmente, a grande maioria das estirpes apresenta uma maior taxa de crescimento e maior duração de fase exponencial em meio M7. Contudo, este comportamento não é verificado em *M. unipapilla* SAG 8.83, em que a taxa de multiplicação foi maior em meio M7 e a fase exponencial mais longa em meio F/2. Isto pode ser explicado pela existência de duas parâmetros de crescimento durante a fase exponencial, com uma duração total de 7 dias. Se apenas for considerado o tempo em que esta estirpe se encontra na fase exponencial, não incluindo as parâmetros de crescimento, a relação da taxa de multiplicação e duração da fase exponencial é positiva. Estas parâmetros de crescimento não programadas observaram-se em mais estirpes, contudo não influenciaram a relação entre a taxa de multiplicação e a duração da fase exponencial. Uma possível explicação para a existência destas parâmetros de crescimento na fase exponencial poderá estar relacionada com a falta de controle do borbulhamento de ar, que poderá ter oscilado durante o cultivo, influenciando assim o crescimento das células. As estirpes cultivadas em meio F/2 a 0ppm, que demonstraram uma fase exponencial mais curta, são estirpes que de uma forma geral não possuíram uma taxa de multiplicação tão elevada como em meio M7, que esgotaram os nutrientes mais rápido e que entraram em fase estacionária mais cedo, podendo concluir-se que em meio F/2 as estirpes envelhecem mais rapidamente.

Em relação à fase estacionária, esta fase é fortemente marcada pela estabilização do crescimento uma vez que a taxa de divisão se aproxima de zero. Esta estabilização do crescimento é resultado da acumulação de produtos inibidores de metabolismo, diminuição de nutrientes essenciais disponíveis e desvio da energia fotossintética da divisão celular para a síntese e acumulação de hidratos de carbono e lípidos (Richmond e Hu, 2013; Chen et al., 2011) ao mesmo tempo que surge um aumento de produção de enzimas específicas para a adsorção de nutrientes (Piorreck et al., 1984; Hu et al., 2008; Yeh e Chang, 2012). É nesta fase que as células para sobreviverem iniciam a produção de compostos, entre eles metabolitos secundários, que as protegem contra o stress oxidativo gerado pelas condições adversas (biossíntese de compostos antioxidantes) (Andersen, 2005). Com exceção de *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 todas as estirpes apresentaram fase estacionária em ambos os meios de cultivo, com durações diferentes. As estirpes cultivadas em meio F/2 a 0ppm são as que de uma forma geral possuem uma fase

estacionária mais longa. *M. unipapilla* SAG 8.83 não apresentou fase estacionária, observando-se uma passagem direta da fase exponencial para fase de declínio, não possuindo a capacidade de sobreviver após o esgotamento de nutrientes.

A fase de declínio caracteriza-se por apresentar um crescimento negativo resultante da acumulação de produtos de excreção tóxicos, esgotamento de nutrientes, perturbação de pH ou contaminações (Barsanti e Gualtieri, 2006; Hu et al., 2008; Lee et al., 2015). Apenas se observou esta fase em *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7, *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni em meio F/2 a 0ppm, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni em meio M7 e *Vischeria helvetica* ACOI 299 em ambos os meios. Esta fase nem sempre ocorre visto que as células possuem capacidade de se manter viáveis por longos períodos de tempo devido às suas reservas endógenas (Richmond, 2003; Rocha et al., 2003).

### Rendimentos de extração

A eficiência do método de extração que permite a obtenção eficaz dos metabolitos das microalgas possui dois passos cruciais, a quebra da parede celular e a extração dos compostos (Lee et al., 2017). O método de quebra da parede celular utilizado neste trabalho foi anteriormente otimizado para um género da classe Eustigmatophyceae, por este possuir características da parede celular que a torna de difícil quebra (Fernandes, 2018). Desta forma, e com base nesse trabalho para a quebra da parede celular de todos os géneros em estudos conjugou-se a maceração com azoto líquido com o moinho com esferas de inox e, para a extração dos compostos, optou-se pela combinação dos solventes diclorometano: metanol. Para a extração dos compostos muitos solventes poderiam ter sido usados, dependendo do objetivo final do trabalho. Usualmente, nas microalgas são usados tanto solventes apolares (hexano, benzeno, tolueno, éter dietílico, clorofórmio) como solventes polares ( metanol, acetona, acetato de etilo e etanol) ou a combinação de vários (Alassali et al., 2016). Neste tipo de estudos, a mistura de solventes mais usada é clorofórmio: metanol por resultar em elevados rendimentos (Lee et al., 2010). Contudo, uma vez que os compostos antioxidantes variam na sua polaridade, havendo compostos com atividade antioxidante com características polares e outros apolares (a maioria) (Guedes et al., 2013a, Mubarak et al., 2015) e pelo facto do clorofórmio ser um solvente que produz vapores tóxicos, a combinação diclorometano: metanol foi a escolha para a extração de compostos, sendo que o diclorometano é uma alternativa mais segura para o operador (Mubarak et al., 2015). Outra das razões para a escolha da combinação de solventes foi o tipo de compostos usualmente presentes nas microalgas responsáveis pela atividade antioxidante. Dois dos principais compostos são os carotenoides e os compostos fenólicos (Goiris et al., 2015). Para a extração dos carotenoides, um solvente apolar deve ser aplicado (Galanakis, 2019), que na combinação escolhida corresponde ao diclorometano. Por outro lado, para a extração dos compostos fenólicos deve ser utilizado um solvente polar (Monteiro et al., 2019), que neste estudo foi o metanol. O método de extração

escolhido revelou-se eficaz para todas as estirpes em estudo, não havendo diferenças entre os rendimentos de extrato obtidos nos diferentes meios de cultura (Tabela 7), com exceção de *M. subterranea* SAG 848-1. Nesta estirpe observou-se uma grande diferença no rendimento de extrato obtido da biomassa cultivada em M7 e em F/2 0ppm, sendo muito superior o rendimento em meio M7. Uma explicação para esta diferença pode estar relacionada com o crescimento nos diferentes meios de cultura. Esta estirpe teve uma duração de fase exponencial muito curta em meio M7 entrando em fase estacionária muito cedo, permanecendo nesta fase durante 10 dias, ao passo que em meio F/2 0ppm teve uma fase exponencial longa e uma fase estacionária de apenas 3 dias. Uma vez que é na fase estacionária que as células para sobreviverem iniciam a produção de compostos, entre eles metabolitos secundários, que as protegem contra o stress gerado pela diminuição de nutrientes (Anderson, 2005), é de esperar que uma alga que esteve mais tempo em fase estacionária acumule mais metabolitos e conseqüentemente possua um rendimento de extrato superior. Entre estirpes observaram-se diferenças nos rendimentos dos extratos, indicando que a acumulação de metabolitos varia entre géneros, espécies (*M. gaditava* CCMP 1775 e *M. salina* SAG 40.85) e estirpes (*M. unipapilla* SAG 8.83 e *M. unipapilla* ACOI 2938). A estirpe que revelou maior rendimento de extrato foi *M. salina* em meio F/2 a 35ppm.

### Potencial antioxidante

Vários são os fatores que podem afetar a quantidade de compostos antioxidantes presentes nas microalgas, desde o meio de cultivo, que neste trabalho é uma variável, à fase de crescimento na qual a biomassa foi recolhida e os antioxidantes extraídos (Guedes et al., 2011; Shanab et al., 2012). Os métodos TEAC, DPPH e FRAP foram selecionados para avaliação do potencial antioxidante dos extratos das microalgas em estudo. Estes métodos foram escolhidos por serem os mais usados neste tipo de estudos e por serem os mais adequados para avaliar a capacidade antioxidante de frutas frescas, vegetais e plantas (Thaipong et al, 2006; Walker e Everette, 2009). O TEAC e o DPPH são métodos que determinam a capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos e o FRAP é um método com mais afinidade para compostos hidrofílicos (Prior et al, 2005). Contudo, é de notar que estes três métodos usam radicais sintéticos que não se assemelham aos radicais presentes no organismo humano, pelo que a interpretação dos resultados deve ser feita de forma cuidada, não extrapolando os resultados de forma precipitada (Brainina K. 2019). Cada antioxidante reage de forma diferente a cada tipo de radical, o que faz com que cada método apenas dê um resultado aproximado da capacidade antioxidante dos extratos (Müller. et al., 2011). Essa aproximação geralmente está associada ao tempo de reação do antioxidante ao radical ou à cinética de reação (Müller et al., 2011). Desta forma, para reduzir o erro é aconselhável o uso de dois ou mais testes de análise de antioxidantes (Prior, 2005; Müller et al, 2011).

Os carotenoides são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante das microalgas (Takaichi, 2011; Goiris et al., 2012) contudo, existem outros composto que também

contribuem para a atividade antioxidante, entre os quais os compostos fenólicos (fenóis e polifenóis), (Klejdus et al., 2010; Duval et al., 1999), as clorofilas (Lanfer-Marquez et al., 2005; Hosikian et al., 2010), vitaminas, ácidos gordos polinsaturados, entre outros (Guedes et al., 2013a).

Como expectável, nos três métodos utilizados os resultados de capacidade antioxidante foram diferentes entre si. O método de TEAC, como já referido anteriormente, quantifica a capacidade antioxidante por mecanismos de transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e transferência de eletrões (SET) e deteta a atividade antioxidante tanto de compostos hidrofílicos como lipofílicos (Prior et al., 2005). Por este método, a microalga com maior capacidade antioxidante foi *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 ( $28,94 \pm 1,39$ ). Não se encontraram estudos com estirpes de *Monodopsis* para comparação de resultados, contudo, os valores obtidos para esta estirpe são superiores aos detetados por Monteiro et al. (2019) para *Microchloropsis gaditana* (Sin. *Nannochloropsis gaditana*) ( $2,06 \pm 0,53 - 24,97 \pm 2,01$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) num estudo em que foi otimizado o método de extração de compostos. São também valores superiores ao detetados por Goiris et al. (2012) para *Nannochloropsis oculata* ( $20,16 \pm 0,98$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e *Nannochloropsis* sp. ( $25,83 \pm 1,09$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ). Os resultados obtidos para as estirpes de *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* não foram os mais interessantes obtidos no estudo, contudo, vão de encontro aos presentes na bibliografia (Monteiro et al., 2019). De uma maneira geral os resultados obtidos pelo método de TEAC vão de encontro aos encontrados na bibliografia para as microalgas (Monteiro et al., 2019; Goiris et al., 2012), correspondendo o melhor resultado obtido com *Monodopsis* ao melhor resultado obtido por Monteiro et al. (2019) para *Chlorella* sp. e ao melhor resultado obtido por Goiris et al. (2012) para *Parachlorella kessleri*. No estudo de Goiris et al. (2012) pelo método de TEAC obtiveram-se valores na ordem dos 60  $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$  para algumas microalgas em condições de cultivo não otimizadas, mas alteradas. Os valores obtidos neste estudo não podem ser comparados diretamente com os valores obtidos por Assunção et al. (2016), contudo, estes autores fizeram um *screening* que envolveu diversas estirpes ACOI da classe Eustigmatophyceae e ao contrário dos resultados obtidos no nosso trabalho, as estirpes que revelaram melhores valores pelo método de TEAC foram *Characiopsis aquilonaris* ACOI 2424 e *Vischeria. helvetica* ACOI 299. Estas mesmas estirpes no nosso trabalho revelaram-se as estirpes com valores mais baixos (*C. aquilonaris* ACOI 2424) ou com valores intermédios (*V. helvetica* ACOI 299) de capacidade antioxidante. Tratando-se das mesmas estirpes, as diferenças detetadas nos dois estudos poderão ser explicadas pelos diferentes métodos de cultivo e de extração utilizados. Este último, tal como os autores indicam, revelou-se não ser o melhor método de extração utilizado podendo, por isso, os valores de capacidade antioxidante obtidos não serem os mais reais.

O método de DPPH é um método cujos mecanismos de deteção de antioxidantes são iguais ao do método de TEAC, detetando a atividade antioxidante tanto de compostos hidrofílicos como lipofílicos (Prior et al., 2005). Por este método as estirpes com atividade antioxidante mais elevada

foram *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni em meio F/2 0ppm ( $14,63 \pm 0,50$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ), *Monodopsis* sp. 4769ni em meio M7 ( $14,21 \pm 0,81$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e em meio F/2 0ppm ( $13,26 \pm 0,38$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ), *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 ( $14,20 \pm 0,79$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ), *M. unipapilla* ACOI 2938 em meio F/2 0ppm ( $13,67 \pm 0,83$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e a *V. helvetica* ACOI 299 em meio M7 ( $13,22 \pm 0,86$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e em meio F/2 0ppm ( $12,96 \pm 1,00$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ). Tal como no método de TEAC a estirpe *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83 em meio M7 foi uma das estirpes com elevada capacidade antioxidante. Este resultado era o esperado, uma vez que os dois métodos de análise detetam o mesmo tipo de compostos (Prior et al., 2015). Mais uma vez não se encontraram estudos com estes géneros para comparação de resultados. Comparando com um estudo realizado com *M. gaditana* (Sin. *N. gaditana*) em que utilizam diferentes extratos feitos com diferentes métodos de extração (Monteiro et al., 2019) os valores obtidos são bastante superiores. Mesmo os valores obtidos para as estirpes *M. gaditana* CCMP 1775, *M. salina* SAG 40.85 e *N. oculata* SAG 38.85 são superiores aos obtidos para o género *Microchloropsis/Nannochloropsis* por Monteiro et al (2019). Comparando com as microalgas pertencentes a outros grupos, os valores obtidos pelo método de DPPH são superiores aos obtidos para *Chlorella* sp. (Monteiro et al., 2019) e para *Scenedesmus* sp. (Bulut et al., 2019). Mais uma vez, não fazendo a comparação direta dos valores de capacidade antioxidante, mas comparando quais os melhores resultados obtidos por Assunção et al. (2016) para a classe Eustigmatophyceae observa-se que apenas *V. helvetica* ACOI 299 é concordante nos dois estudos. Uma das desvantagens que tem sido apontada para este método é a interferência dos carotenoides (Prior et al., 2005) nos resultados obtidos, que posteriormente foi comprovada por Müller et al. (2011). Este autor analisou a capacidade antioxidante de vários carotenoides puros, que se sabem possuir elevado poder antioxidante, pelo método de DPPH e observou que por este método não era detetada capacidade antioxidante nestes compostos. Com este estudo, Müller et al. (2011) concluiu que a cor característica dos carotenoides, que absorvem entre 500 e 700nm, interfere na leitura do DPPH a 515nm. Mesmo sabendo que as estirpes estudadas possuem elevadas quantidades de carotenoides (Wang et al., 2018; Stoyneva-Gärtner et al., 2019a) no presente trabalho não se observou interferência com o DPPH. Isto pode ser explicado pela concentração de carotenoides presentes no extrato utilizado. No trabalho realizado por Müller et al. (2011) foi usada uma concentração de carotenoides de 100  $\mu\text{g/mL}$  e neste trabalho o valor mais alto de carotenoides detetado foi para *V. helvetica* ACOI 299 em meio M7 com  $2,40 \pm 0,15$   $\mu\text{g/mL}$  de carotenoides total, valor bastante inferior ao de Müller et al. (2011), concluindo-se que a concentração dos carotenoides é um elemento chave na interferência.

O método de FRAP, como já referido anteriormente quantifica a capacidade antioxidante por mecanismos de transferência de eletrões (SET) e deteta sobretudo a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos (Prior et al., 2005). Contudo, foi demonstrado recentemente que este método também pode detetar atividade antioxidante de carotenos e xantofilas específicos (compostos

lipofílicos) (Foo et al., 2017). Uma grande diferença deste método em comparação com os métodos anteriores é que em vez de ocorrer uma diminuição da absorvância à medida que o antioxidante reage com o radical, neste caso ocorre um aumento da absorvância (Apak et al., 2013). Neste método as microalgas que tiveram maior capacidade antioxidante foram *M. subterranea* SAG 848-1 em meio M7 ( $65,02 \pm 0,53$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e *M. unipapilla* ACOI 2938 em meio F/2 a 0ppm ( $64,60 \pm 2,98$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ). Mais uma vez não se encontraram estudos com o gênero *Monodopsis* para comparação de resultados. Comparando com os resultados obtidos por Goiris et al. (2012) para *Nannochloropsis oculata* ( $40,68 \pm 1,61$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) e *Nannochloropsis* sp. ( $40,80 \pm 1,05$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) observa-se que os valores de capacidade antioxidante obtidos para *Monodopsis* são bastante superiores, assim como comparando com outras microalgas, como *Scenedesmus* sp. (Bulut et al., 2019). Contudo, analisando os resultados obtidos para as estirpes de *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* observa-se que os valores são bastante inferiores aos obtidos por Goiris et al. (2012) para *N. oculata* e *Nannochloropsis* sp.. Os valores obtidos para o gênero *Monodopsis* correspondem ao melhor resultado obtido para *Chlorella vulgaris* ( $64,65 \pm 5,80$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$ ) no estudo de Goiris et al. (2012). O resultado mais elevado obtido por este autor no seu estudo, no método de FRAP, foi de  $89,70 \pm 1,43$   $\mu\text{mol eq. trolox/g BS}$  correspondente à diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* cultivada em fotobioreator.

Neste estudo, após a análise dos resultados obtidos pelos três métodos conclui-se que *Monodopsis* é um gênero muito mais interessante para antioxidantes do que *Nannochloropsis*/*Microchloropsis*, possuindo valores superiores aos encontrados na bibliografia para estirpes de *Microchloropsis* e *Nannochloropsis* (Goiris et al., 2012; Bulut et al., 2019; Monteiro et al., 2019). Uma observação interessante deste trabalho é que os valores mais baixos obtidos pelos três métodos correspondem a *Goniochloris sculpta* ACOI 1852 em meio F/2 a 0ppm. Esta estirpe foi também a que apresentou o valor mais baixo de rendimento de extrato em meio F/2 a 0ppm, demonstrando ser uma estirpe pouco interessante para antioxidantes, acumulando poucos metabolitos com interesse antioxidante na fase estacionária do crescimento, nas condições de cultivo utilizadas.

Comparando os dois meios de cultura testados observou-se que os melhores valores de capacidade antioxidante foram detetados no meio M7 tanto para o método de TEAC como para o método de FRAP ao passo que no método de DPPH não se observaram diferenças entre os meios de cultura. Com exceção de *M. unipapilla* SAG 8.83 em meio M7, *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni em meio F/2 0ppm, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni em meio M7 e *V. helvetica* ACOI 299 em ambos os meios que foram analisadas em fase de declínio do crescimento, todas as outras estirpes foram analisadas na fase estacionária do crescimento. É nesta fase que ocorre a acumulação de metabolitos secundários, que protegem as células contra o stress oxidativo gerado pelas condições adversas (biossíntese de compostos antioxidantes) (Andersen, 2005). Pelos resultados

obtidos conclui-se que é em meio M7 que a maioria das estirpes acumula metabolitos secundários responsáveis pela atividade antioxidante detetada.

Como referido anteriormente os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante das microalgas são os carotenoides e os compostos fenólicos (Takaichi, 2011; Goiris et al., 2012; Klejdus et al., 2010; Duval et al., 1999). Neste estudo foram quantificados os carotenoides e clorofilas totais, bem como os compostos fenólicos totais e tentou-se perceber qual a contribuição de cada um destes compostos na atividade antioxidante detetada pelos diferentes métodos através de uma regressão múltipla.

As eustigmatofíceas são um grupo de microalgas que apenas apresentam clorofila *a* (Eliš et al., 2017) na sua composição. Os melhores resultados de clorofila foram obtidos para as estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* cultivadas em meio M7. Por sua vez as estirpes de *Microchloropsis* foram as que apresentaram valores de clorofila total mais baixos. Alguns estudos já confirmaram a potencialidade da clorofila como antioxidante (Hosikian et al., 2010).

No que respeita aos carotenoides, tal como referido anteriormente, esta classe é reconhecida pelo seu elevado conteúdo em violaxantina, vaucherioxantina, astaxantina, cantaxantina, luteína e  $\beta$ -caroteno (Stoyneva-Gärtner, 2019a.). Os melhores valores de carotenoides totais correspondem mais uma vez às estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* cultivadas em meio M7 ( $1,64 \pm 0,39 - 2,15 \pm 0,27$  mg/g BS) e a *V. helvetica* ACOI 299 também cultivada em meio M7 ( $2,40 \pm 0,15$  mg/g BS). A comparação dos dados de carotenoides totais com outros estudos deve ser feita com precaução uma vez que o conteúdo e composição em carotenoides é influenciado pelas condições de cultivo e pela intensidade luminosa. Contudo, o conteúdo em carotenoides totais encontrados neste estudo vai de encontro aos detetados para os géneros *Nannochloropsis*/*Microchloropsis* (Goiris et al., 2012), caem dentro da faixa dada por Spolaore et al. (2006) para as microalgas no geral (1,0 a 2,0 mg/g BS) e são superiores aos detetados para *Scenedesmus* sp. no estudo feito por Bulut et al. (2019).

Comparado com os carotenoides, poucos estudos avaliam o conteúdo de fenóis totais em microalgas. Os valores de conteúdo em compostos fenólicos avaliado neste estudo ( $0,78 \pm 0,16$  mg eq. ácido gálico/g BS -  $3,33 \pm 0,28$  mg eq. ácido gálico/g BS) são comparáveis com os estudos de Goiris et al. (2012), Monteiro et al. (2019), Bulut et al. (2019), Hajimahmoodi et al. (2010), Li et al. (2007), Safafar et al. (2015) havendo alguns destes autores a detetar valores um pouco mais elevados (na ordem dos 5-6 mg/g BS) em algumas microalgas. Dos poucos estudos que existem há indicação de que as microalgas possuem fenóis de várias classes (Jaime et al., 2005; Herrero et al., 2006; Klejdus et al., 2010; Kovácik et al., 2010; Chaudhuri et al., 2014) contudo, a identificação dos compostos fenólicos deve ser uma prioridade no futuro por forma a perceber melhor a contribuição destes compostos na atividade antioxidante.

Segundo Goiris et al. (2012), os carotenoides e os compostos fenólicos são os compostos que mais significativamente contribuem para a atividade antioxidante detetada nas microalgas

enquanto que Safafar et al. (2015) indica que apenas os compostos fenólicos contribuem significativamente para a atividade antioxidante. No presente estudo não se confirmou nenhuma das premissas anteriores. Através da análise de regressão múltipla (Tabela 8) verificou-se que os carotenoides e as clorofilas explicam alguma da variação da atividade antioxidante detetada pelos métodos de TEAC e DPPH, contudo apenas contribuem em 30% para a atividade antioxidante detetada. Isto sugere que para além dos compostos fenólicos, dos carotenoides e das clorofilas totais, outros compostos presentes nas microalgas contribuem para a atividade antioxidante detetada. Tal como referido anteriormente exemplos destes outros compostos que possuem atividade antioxidante presentes nas microalgas são os polissacarídeos, os ácidos gordos polinsaturados  $\omega$ 3, as vitaminas, as ubiquinonas entre outros (Klein et al., 2012; Guedes et al., 2013a). No caso do método de FRAP, a análise de regressão múltipla demonstrou que as clorofilas e os carotenoides totais explicam grande parte da variação da atividade antioxidante detetada por este método, mas os compostos fenólicos também, contribuindo estes três grupos de compostos para explicar cerca de 70% da atividade antioxidante detetada pelo método. A atividade antioxidante detetada por testes específicos pode não estar apenas relacionada com a quantidade de compostos fenólicos e carotenoides, mas também com características físicas e químicas dos carotenoides e o tipo de polifenóis (Goiris et al., 2012; Müller et al., 2011).

Conclui-se, assim, que neste estudo, o conteúdo em carotenoides e em clorofilas contribuiu para explicar a atividade detetada pelos métodos de TEAC, DPPH e FRAP, enquanto que os compostos fenólicos apenas possuíram uma contribuição marginal para a atividade detetada pelo FRAP. Os carotenoides são compostos reconhecidos como antioxidantes, sendo que os carotenoides presentes nas eustigmatofíceas (violaxantina, vaucherioxantina, astaxantina, cantaxantina, luteína e  $\beta$ -caroteno) já demonstraram evidências científicas dessa atividade (Li et al., 2012a; Li et al., 2012b; Wang et al., 2018; Stoyneva-Gärtner et al., 2019a). As estirpes pertencentes à classe Eustigmatophyceae já foram apontadas como bastante promissoras em antioxidantes (Assunção et al., 2016), tendo este potencial sido confirmado neste estudo.

## Conclusões

Neste trabalho verificou-se que as estirpes cultivadas em meio de cultura M7 possuem uma fase exponencial mais longa e conseqüentemente uma maior taxa de multiplicação. Também foi neste meio de cultura que as estirpes demonstraram maior capacidade antioxidante. Nos três métodos de análise usados as estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* foram as que demonstraram maior capacidade antioxidante, provando terem um potencial superior aos reconhecidos géneros *Nannochloropsis* e *Microchloropsis*. Verificou-se também que todas as estirpes são boas produtoras de carotenoides e compostos fenólicos. Contudo, apenas o conteúdo em carotenoides e em clorofilas explica de forma estatisticamente significativa alguma da atividade antioxidante detetada, sugerindo que esta classe possui outros compostos com atividade antioxidante para além dos compostos fenólicos, dos carotenoides e das clorofilas totais.

Dentro do nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho que envolveu um estudo exaustivo do potencial antioxidante de diferentes géneros da classe Eustigmatophyceae e a sua relação com o total de pigmentos e compostos fenólicos. Este estudo contribuiu para o conhecimento do potencial biotecnológico de outros géneros dentro da classe, confirmando a possibilidade do uso de compostos antioxidantes derivados desta classe para o desenvolvimento de novos produtos.

Em síntese, este trabalho confirmou que as eustigmatofíceas são uma classe de microalgas com elevada capacidade de produção de compostos com atividade antioxidante.

## Bibliografia

Aburai N. & Abe K. 2015. Metabolic switching: synergistic induction of carotenogenesis in the aerial microalga, *Vischeria helvetica*, under environmental stress conditions by inhibitors of fatty acid biosynthesis. *Biotechnology Letters*, 37: 1073-1080.

Alassali A., Cybuska I., Brudecki G.P., Farzanah R., Thomsen M.H. 2016. Methods for Upstream Extraction and Chemical Characterization of Secondary Metabolites from Algae Biomass. *Biology & Medicine*, 4: 1-16.

Amaral R., Eliáš M., Santos L.M.A. 2019. *Characiopsis* Borzi belongs to the Eustigmatophyceae. Submitted to the *European Journal of Phycology*.

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

Antia N. J. & Cheng J.Y. 1982. The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal*, 17: 39-50.

Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M., Güçlü K. 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85: 957-998.

Assunção M.F.G., Amaral R., Martins C.B., Ferreira J.D., Ressurreição S., Santos S.D., Varejão J.M.T.B, Santos L.M.A. 2016. Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 29: 865-877.

Barsanti L. & Gualtieri P. (Editores). 2006. *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, 1ª edição. CRC Press, EUA.

Becker E.W. (Editor). 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. 1ª edição. Cambridge University Press, Reino Unido.

Bold H. C. & Wynne M. J. (Editores). 1978. *Introduction to the algae: structure and reproduction*. Prentice-Hall, USA.

Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z., Avissar Y., Richmond A. 1987. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*, 12: 37-47.

Brainina K., Stozhko N., Vidrevich M. 2019. Antioxidants: Terminology, Methods and Future Considerations. *Antioxidants*, 8: 1-8.

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

Braun R., Farré E. M., Schurr U., Matsubara S. 2014. Effects of light and circadian clock on growth and chlorophyll accumulation of *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Phycology*, 50: 515-525.

Bulut O., Akin D., Sönmez Ç., Öktem A., Yücel M., Öktem H.A. 2019. Phenolic Compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. *Journal of Applied Phycology*, 31: 1675-1683.

Caleja C., Barros L., Antonio A.L., Oliveira M.B.P.P., Ferreira I.C.F.R. 2017. A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216: 342-346.

Callejón M.J.J., Medina A.R., Sánchez M.D.M., Cerdán L.E., Moreno P.A.G., López E.N., Peña E.H., Grima E. M. (2020). Obtaining highly pure EPA-rich lipids from dry and wet *Nannochloropsis gaditana* microalgal biomass using ethanol, hexane and acetone. *Algal Research*, 45: 1-9.

Carocho M. & Ferreira I.C.F.R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51: 15-25.

Chaudhuri D., Baban N., Deb S., Panja S., Sarkar R., Rout J., Mandal N. 2014. Assessment of the phytochemical constituents and antioxidant activity of a bloom forming microalgae *Euglena tuba*. *Biological research*, 47: 24–27.

Chen F., Li H., Wong R.N. Ji B., Jiang Y. 2005. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 1064: 183-186.

Chen M., Tang H., Ma H., Holland T.C., Ng K.Y.S., Salley S.O. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102: 1649-1655.

Durmaz Y. 2007. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture*, 272: 717-722.

Duval B., Shetty K., Thomas W. H. 1999. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology*, 11: 559-566.

Eliaš M., Amaral R., Fawley K.P., Fawley M.W., Němcoá Y., Newstupa J., Příbyl P., Santos L. M., Ševčíková T. 2016. Eustigmatophyceae. In: Archibald J., Simpson A., Slamovits C. (Editores). *Handbook of the Protists*. Springer, Reino Unido.

Fang N., Wang C., Liu X., Zhao X., Liu Y., Liu X., Du Y., Zhang Z., Zhang H. 2019. *De novo* synthesis of astaxanthin: from organisms to genes. *Trends in Food Science & Technology*, 92: 162-171.

Fawley M.W., Jameson I., Fawley K.P. 2015. The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia*, 54: 545-552.

Fernandes I. 2018. Indução da quebra da parede celular de estirpes de *Chlorobotrys*. Relatório de estágio profissionalizante. ESAC.

Foo S.C., Yusoff F.M., Ismail M., Basri M., Yau S.K., Khong N.M.H., Chan K.W., Ebrahimi M. 2017. Antioxidant capacities of fucoxanthin producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *Journal of Biotechnology*, 241: 175-183.

Galanakis C.M. 2019. Carotenoids from microalgae. *In*: Galanakis C.M. (Editor). Carotenoids: Properties, Processing and Applications. Academic Press, Reino Unido.

Gao B., Yang J., Lei X., Xia S., Li A., Zhang C. 2016. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. *Journal of Applied Phycology*, 28: 821–830.

Goh L.P., Loh S.P., Fatimah M.Y. Perumal, K. 2009. Bioaccessibility of Carotenoids and Tocopherols in Marine Microalgae, *Nannochloropsis* sp. and *Chaetoceros* sp. *Malaysian Journal of Nutrition*, 15: 77-86.

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

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

Guedes A.C., Amaro H.M., Malcata F.X. 2011. Microalgae as sources of high added-value compounds – a brief review of recent work. *Biotechnology Progress*, 27: 597-613.

Guedes A.C., Gião M.S., Seabra R., Ferreira A.C.S., Tamagnini P., Moradas-Ferreira P., Malcata F.X. 2013b. Evaluation of the Antioxidant activity of Cell Extracts from Microalgae. *Marine Drugs*, 11: 1256-1270.

Guillard R.R.L. & Ryther J.H. 1962. Studies on Marine Planktonic Diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229-239.

Hajimahmoodi M., Faramarzi M.A., Mohammadi N., Soltani N., Oveisi M.R., Nafissi-Varcheh N. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Phycology*, 22: 43–50.

Hegewald E., Padisak J., Friedl T. 2007. *Pseudotetraedriella kamillae*: taxonomy and ecology of a new member of the algal class Eustigmatophyceae (Stramenopiles). *Hydrobiologia*, 586: 107-116.

Herrero M.J.L., Martin-Alvarez P.J., Cifuentes A., Ibanez E. 2006. Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5597–5603.

Hess L.J. 2017. Vitamin E,  $\alpha$ -Tocopherol. *In*: Alscher R. G., Hess J.L. (Editores) Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, USA.

Hibberd D. & Leedale G. 1970. Eustigmatophyceae—a New Algal Class with Unique Organization of the Motile Cell. *Nature*. 225: 758–760.

Hibberd D.J. 1990. Phylum Eustigmatophyta. *In*: Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M., Chapman D.J. (Editores). Handbook of Protoctista. Jones & Bartlett Learning, Reino Unido.

Hosikian A., Lim S., Halim R., Danquah M. K. 2010. Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010: 1-11.

Hu Q., Milton S., Jarvis E., Maria G., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 4: 621-629.

Illiev I., Petkov G., Lukavsky J., Furnadzhieva S., Andreeva R., Bankova V. 2010. The alga *Trachydiscus minutus* (*Pseudostaurastrum minutum*): Growth and composition. *General and Applied Physiology*, 36: 222-231.

Ishika T., Bahri P.A., Laird D.W. 2018. The effect of gradual increase in salinity on biomass productivity and biochemical composition of several marine, halotolerant, and halophilic microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 30: 1453-1464.

Jabs T. 1999. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology*, 57: 231-245.

Jaime L., Mendiola J.A., Herrero M., Soler-Rivas C., Santoyo S., Senorans F.J. 2005. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction TLC and HPLC-DAD. *Journal of Separation Science*, 28: 2111-2119.

Khan A.D., Alam M.N. 2019. Cosmetics and their associated adverse effects: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, 2: 1-6.

Khan I. M., Shin H. J., Kim J. D. 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17: 1-21.

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

Klejdus B., Lojková L., Plaza M., Snóblová M., Sterbová D. 2010. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7956-7965.

Klok A.J., Lamers P.P., Martens D.E., Draaisma R.B., Wiffels R.H. 2014. Edible oils from microalgae: insights in TAG accumulation. *Trends in Biotechnology*, 32: 521-528.

Kováčik J., Klejdus B., Backor M. 2010. Physiological responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light. *Photochemistry Photobiology*, 86: 612-616.

Lam M. K. & Lee K. T. 2012. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Applied Energy*, 94: 303-308.

Lanfer-Marquez U.M., Barros R.M.C., Sinnecker P. 2005. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, 38: 885-891.

Leão P.N., Costa M., Ramos V., Pereira A.R., Fernandes V.C, Domingues V.F., Gerwick W.H, Vasconcelos V.M., Martins R. 2013. Antitumor activity of hierridin B, a cyanobacterial secondary metabolite found in both filamentous and unicellular marine strains. *Plos One*, 29: 1-8.

Lee E., Jalalizadeh M., Zhang Q. 2015. Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, 12: 497-512.

Lee J., Yoo C., Jun S., Ahn C., Oh H. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101: 575-577.

Lee S.Y., Cho J.M., Chang Y.K., Oh Y. 2017. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244: 1317-1328.

Lee, R. E. 2008. *Phycology*, 4ª Edição. Cambridge University Press, Reino Unido.

Li H., Cheng K., Wong C., Fan K., Chen F., Jiang Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771–776.

Li Z., Ma X.Q., Li A.F., Zhang C. 2012a. A novel potential source of b-carotene: *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae) and pilot  $\beta$ -carotene production in bubble column and flat panel photobioreactors. *Bioresource Technology*, 117: 257–263.

Li Z., Sun M., Li Q., Li A., Zhang C. 2012b. Profiling of carotenoids in six microalgae (Eustigmatophyceae) and assessment of their  $\beta$ -carotene productions in bubble column photobioreactor. *Biotechnology Letters*, 34: 2049-2053.

Lichtenthaler H.K. & Buschmann C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-Vis. *In: Wrolstad R.E. (Editor). Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley and Sons, New York.

Lima S.A.C., Raposo M.F.J., Castro P.M.Z., Morais R.M. 2004. Biodegradation of p-chlorophenol by microalgae consortium. *Water Research*, 38: 97-102.

Lubián L. M., Montero O., Moreno-Garrido I., Huertas I. E., Sobrino C., Valle G. M., Parés G. 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12: 249-255.

Maadane A., Merghoub N., Ainane T., El Arroussi H., Benhima R., Amzazi S., Bakri Y., Wahby I. 2015. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, 215: 13-19.

Mahbouli S., Talvas J., der Vartanian A., Ortega S., Rougé S., Vasson M., Rossary A. 2018. Activation of antioxidant defences of human mammary epithelial cells under leptin depend on neoplastic state. *BMC Cancer*, 18: 1-13.

Marcilla A., Gómez-Siurana A., Gomis C.,Chápuli E., Catalá M.C. , Valdés F.J. 2009. Characterization of microalgal species through TGA/FTIR analysis: application to *Nannochloropsis* sp. *Thermochim Acta*, 484: 41-47.

Mercer E.I., London R.A., Kent I.S.A., Taylor A.J. 1974. Sterols, sterol esters, and fatty acids of *Botrydium granulatum*, *Tribonema aequale*, and *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 13: 845-852.

Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: a critical review and results. *Food Chemistry*, 130: 1036–1043.

Mobin S. & Alam F. 2017. Some promising microalgal species for commercial applications: A review. *Energy Procedia*, 110: 510-517.

Monteiro M., Santos R.A., Inglesias I., Couto A., Serra C.R., Gouvinhas I., Barros A., Oliveira Teles A., Enes P., Díaz-Rosales P. 2019. Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro- and microalgae extracts. *Journal of Applied Phycology*.

Morales M., Sánchez L., Revah S. 2018. The impact of environmental factors on carbon dioxide fixation by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, 365: 1-11.

Mostafa S.S.M. 2012. Microalgal biotechnology: prospects applications. *In: Dhal N.K., Sahu S.C. (Editores). Plant Science. InTech*.

Mubarak M., Shaija A., Suchithra T.V. 2015. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Alga Research*, 7: 117-123.

Müller L., Fröhlich K., Böhm V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129: 139-148.

Murthy K.N.C., Vanitha A., Rajesha M., Swamy M., Sowmya P.R., Ravishankar G.A. 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga. *Life Sciences*, 76: 1381-1390.

Mutaf T., Oz Y., Kose A., Elibol M., Oncel S.S. 2019. The effect of medium and light wavelength towards *Stichococcus bacillaris* fatty acid production and composition. *Journal Bioresource Technology*, 289: 1-9.

Nakayama T., Nakamura A., Yokoyama A., Shiratori T., Inouye I., Shida K.I. 2015. Taxonomic study of a new eustigmatophycean alga, *Vacuoliviride crystalliferum* gen. et sp. nov. *Journal of Plant Research*, 128: 249-257.

Neustupa J. & Nemcová Y. 2001. Morphological and taxonomic study of three terrestrial eustigmatophycean species. *Nova Hedwigia*, 123: 373-386.

Ott D.W., Oldham-Ott C.K., Rybalka N., Friedl T. 2015. Xanthophyte, Eustigmatophyte and Raphidophyte Algae. *In: Wehr J.D., Sheath R.G., Kociolekfresh J.P. (Editores). Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. Elsevier Academic Press, USA*.

Owens T. G., Gallagher J. G., Alberter R.S. 1987. Photosynthetic light-harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae). *Journal of Phycology*, 23: 79-85.

Paliwal C., Mitra M., Bhayani K., Bharadwaj S.V.V., Ghosh T., Dubey S., Mishra S. 2017. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244: 1216-1226.

Piorreck M., Baash K., Poiil P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23: 207-216.

Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

Procházková G., Brányiková I., Zachleder V., Brányik T. 2014. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26: 1359-1377.

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

Rao R.A., Dayananda C., Sarada R., Shamala T.R., Ravishankar G. A. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98: 560-564.

Renaud S.M. & Parry D.L. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 6: 347-356.

Richmond A. & Hu Q. 2013. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2<sup>a</sup> edição. Wiley Blackwell, USA.

Richmond A. 1986. Cell response to environmental factors. *In: Richmond A. (Editor). Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press Inc, USA.

Richmond A. 2003. Growth characteristics of ultrahigh-density microalgal cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 8: 349-353.

Rocha J.M.S., Garcia J.E.C., Henriques M.H.F. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20: 237-242.

Rosa A. P., Sher A., Sorbara J.O.B., Boemo L.S., Forgiarini J., Londero A. 2012. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poultry Science*, 91: 600-666.

Safafar H., von Wagenen J., Møller P., Jacobsen C. 2015. Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine Drugs*, 13: 7339-7356.

Santos R.R., Moreira D.M., Kunigami C.N., Aranda D.A.G., Teixeira C.M.L.L. 2015. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrasonic Sonochemistry*, 22: 95-99.

Santos, L.M.A. 1996. The Eustigmatophyceae: Actual Knowledge and research perspectives. *Nova Hedwigia*, 112: 391-405.

Schlösser U.G. 1994. SAG - Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen Catalogue of Strains. *Botanica Acta*, 107: 113-186.

Schnepf E., Niemann A., Christian W., 1996. *Pseudostaurastrum limneticum*, a Eustigmatacean alga with astigmatic zoospores: morphogenesis, fine structure, pigment composition and taxonomy. *Arch Protistenkd*, 146: 237-249.

Shalaby E. A. 2015. Algae as a Natural Source of Antioxidant Active Compounds. *In: Dubey N.K. (Editor). Plants as Source of Natural Antioxidants*. CABI, USA.

Shanab S.M.M., Mostafa S.S.M., Shalaby E.A., Mahmoud G.I. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2: 608-615.

Singh S.P. & Singh P. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50: 431-444.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 87-96.

Stoyneva-Gärtner M., Stoykova P., Uzunov B., Dincheva I., Atanassov I., Draganova P., Borisova C., Gärtner G. 2019a. Carotenoids in five aeroterrestrial strains from *Vischeria/Eustigmatos* group: updating the pigment pattern of Eustigmatophyceae. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33: 250-267.

Stoyneve-Gärtner M., Uzunov B., Gärtner G., Borisova C., Draganova P., Radkova M. Stoy K. P., Atanassov I. 2019b. Corrent bioeconomical interst in stramenopilic Eustigmatophyceae: a review. *Journal Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33: 302-314

Sukenik A., Livne A., Apt K.E., Grossman A.R. 2003. Characterion of a gene encoding the light harvesting violaxanthin-chlorophyll protein of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Journal of Phycology*, 36: 563-570.

Takaichi S. 2011. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs*, 9: 1101-1118.

Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. Byrne D.H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675.

Touloupakis E., Cicchi B., Benavides A.M.S., Torzillo G. 2016. Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poteroiochromonas* sp.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 1333-1341.

Veskoukis A.S., Tsatsakis A.M., Kouretas D. 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, 17: 11-21.

Volkman J.K. Brow M.R., Dunstan G.A., Jeffrey S. W. 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class eustigmatophyceae. *Journal of Phycology*, 29: 67-78.

Volkman J.K., Barrett S.M., Dunstan G. A., Jeffrey S.W. 1992. C30- C32 alkyl diols and unsaturated alcohols in microalgae of the class Eustigmatophyceae. *Organic Geochemistry*, 18: 131-138.

Walker R.B. & Everette J.D. 2009. Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1156-1161.

Wang F., Huang L., Gao B., Zhang C. 2018. Optimum Production Conditions, Purification, Identification, and Antioxidant Activity of Violaxanthin from Microalga *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae). *Marine Drugs*, 16: 1-13.

Whittle S. J. & Casselton P. J. 1975a. The chloroplast pigments of algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal*, 10: 179-191.

Whittle S. J. & Casselton P. J. 1975b. The chloroplast pigments of algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. II. Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal*, 10: 192-204.

Whittle S.J. 1976. The major chloroplast pigments of *Chlorobotrys regularis* (West) Bohlin (Eustigmatophyceae) and *Ophiocytium majus* Naegeli (Xanthophyceae). *British Phycological Journal*, 11: 111-114.

Wiernsperger N.F. 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metabolism*, 29: 579–585.

Wilson D.W., Nash P., Buttar H.S., Griffiths K., Singh R., De Meester F., Horiuchi R., Takahashi T. 2017. The Role of Food Antioxidants, Benefits of Functional Foods, and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person: An Overview. *Antioxidants*, 6: 1-20.

Xin L., Hong-ying H., Ke G., Ying-xue S. 2010. Effect of different nitrogen and phosphorus concentrations on freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101: 5494-5500.

Xuecheng X.N.Z. 2001. Effect of Temperature, Light Intensity and pH on the Growth and Fatty Acid Compositions of *Ellipsoidion* sp. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 31: 541-547.

Yeh K. & Chang J. 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105: 120-127.

Zhang J.J., Wan L.L., Xia S., Li A.F., Zhang C.W. 2013. Morphological and spectrometric analyses of lipids accumulation in a novel oleaginous microalga, *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36: 1125-1130.