



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXOPOLISSACARÍDEO E DA BIOMASSA DA
MICROALGA *PORPHYRIDIVM CRUENTUM*

por

Helena Patrícia Sousa de Vasconcelos

Dezembro 2017



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXOPOLISSACARÍDEO E DA BIOMASSA DA
MICROALGA *PORPHYRIDIVM CRUENTUM*

STUDIES ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXOPOLISACCHARIDE AND BIOMASS OF THE
MICROALGA *PORPHYRIDIVM CRUENTUM*

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para
obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

por

Helena Patrícia Sousa de Vasconcelos

Local: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Prof. Doutor Rui Morais

Co-orientação: Prof. Doutora Manuela Pintado

Dezembro 2017

RESUMO

Porphyridium sp. é uma microalga que se encontra encapsulada dentro de um gel de exopolissacarídeos sulfatados (EPS). Os EPS's possuem comportamentos de fluido dinâmico com produção de soluções altamente viscosas e de elevado peso molecular. Sabe-se que estes polissacarídeos possuem atividade biológica relevante em diversas aplicações, desde cosméticos, medicamentos e alimentação.

Com este trabalho pretende-se otimizar os parâmetros de cultura e produção da microalga marinha *Porphyridium cruentum*, nomeadamente o EPS por ela produzido. Para isso, a microalga foi cultivada em meio de cultura NTIP e estudou-se a suplementação do mesmo com sulfato de magnésio (NTIP-MgSO₄) e cloreto de magnésio (NTIP-MgCl₂). Com este teste verificou-se uma extensão da fase exponencial no meio NTIP-MgSO₄ quando comparado com o controlo (NTIP) e NTIP-MgCl₂.

Pretende-se também verificar a ação do EPS em relação a potenciais patogénicos humanos. Para isso, realizaram-se vários perfis de atividades biológicas, nomeadamente a capacidade antibacteriana, antifúngica e antibiofilme bacterianos. O EPS revelou capacidade antimicrobiana dependente da concentração. A 4% de EPS, o MRSA foi o que apresentou maior percentagem de inibição (~11%), seguido de *S. enteritidis* (~9%), *E. coli* (~7%) e *C. albicans* (~6%). *P. aeruginosa* foi o único microrganismo que não apresentou qualquer inibição em nenhuma das concentrações testadas. O EPS foi também testado para *M. canis* e *T. rubrum*, observando-se ausência de atividade antifúngica para o método testado.

Estudou-se também o perfil prebiótico do EPS para 9 bactérias probióticas. Quando colocadas em meio MRS com glucose adicionando EPS, as bactérias *L. plantarum*, *L. acidophilus* La-5 (aerobiose) e *L. acidophilus* Ki, foram as que apresentaram maiores percentagens de estimulação, ~5%, ~19% e ~22% respetivamente.

Relativamente ao estudo da capacidade antibiofilme bacteriano do EPS, testou-se para *P. aeruginosa* não se observando nenhuma atividade de antibiofilme por parte do EPS.

Foi também estudada a fração da biomassa de *P. cruentum* onde se verificou a inibição de *S. enteritidis* e *MSSA* em extratos de clorofórmio, hexano e etanol. Este último extrato revelou ser o mais eficaz pois foi o que apresentou maiores valores de percentagens de inibição.

Assim, *Porphyridium cruentum* demonstrou um efeito antimicrobiano seletivo, com potencial efeito prebiótico, assegurando assim um interesse elevado em aplicações alimentares, cosmética ou biomédicas.

ABSTRACT

Porphyridium sp. is a microalgia, which is encapsulated inside a gel of sulfated exopolysaccharides (EPS). EPS's have behaviors of dynamic fluid with production of highly viscous solutions and high molecular weight. It is known that these polysaccharides have relevant biological activity in various applications, from cosmetics and medicines to food.

With this work, it was intended to optimize parameters of culture and production of the marine microalgae *Porphyridium cruentum*, namely for its EPS. For this purpose, the microalgae was cultivated in NTIP medium and then studied with the supplementation of magnesium sulfate (NTIP-MgSO₄) and magnesium chloride (NTIP-MgCl₂). With this an extension of the exponential phase with the type NTIP-MgSO₄ when compared to control (NTIP) and NTIP-MgCl₂ was observed.

The aim was also to verify the action of EPS concerning potential human pathogens. For that, several profiles of biological activity were carried out, namely antibacterial capacity, antifungal and bacterial antibiofilm.

The EPS revealed antimicrobial activity dependent on concentration. At 4% EPS, *MRSA* showed the highest percentage of inhibition (~11%), followed by *S. enteritidis* (~9%), *E. coli* (~7%) and *C. albicans* (~6%). *P. aeruginosa* was the only microorganism that showed no inhibition in any of the concentrations tested. The EPS was also tested for *M. canis* and *T. rubrum*, but the results did not show antifungal activity for the tested method.

The prebiotic profile of EPS for 9 lactic bacteria has been studied. When cultured in the MRS medium with glucose and EPS, *L. plantarum*, *L. acidophilus* La-5 (aerobiose) and *L. acidophilus* Ki, have shown the highest stimulation, ~5%, ~19% and ~22%, respectively.

Regarding the study of the capacity of bacterial antibiofilm of EPS, it was tested for *P. aeruginosa*. The results obtained did not show any antibiofilm activity of the EPS.

The fraction of biomass of *P. cruentum* was also studied and it was analysed for its antibacterial performance in extracts of chloroform, hexane and ethanol. The inhibition of *S. enteritidis* and *MSSA* was observed, obtaining a bigger percentage of inhibition with ethanol extract.

Thus, *Porphyridium cruentum* demonstrated a selective antimicrobial effect, with potential prebiotic effect, thus assuring a high interest in applications, cosmetic or biomedical.

AGRADECIMENTOS

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

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu Professor Rui Morais, por todo o apoio, ensinamento e paciência que teve comigo durante o decorrer deste trabalho.

À Professora Manuela Pintado, pela ajuda na elaboração dos testes antimicrobianos e na restante elaboração da tese.

À Professora Filomena Raposo, por estar sempre disponível para me ajudar, pelas dicas e ajuda em todos os problemas que surgiram.

À Sara e ao Eduardo, pela ajuda na elaboração dos testes antimicrobianos e dicas de boas práticas laboratoriais.

À minha amiga Filipa, por estar sempre pronta a ajudar e pela grande amizade.

Agradeço muito à minha amiga, Margarida, por todo o apoio incondicional, pela força e motivação para que nunca desistisse. Pela compreensão dos meus desabafos e pela verdadeira amizade que para sempre será guardada.

À minha família, por todo o amor, carinho e palavras que me ajudaram a seguir em frente.

Aos meus pais, por todos os sacrifícios que fizeram ao longo desta jornada. Por acreditarem em mim permitindo a conclusão de mais uma fase da minha vida. Pelo amor incondicional com que sou presenteada todos os dias. Não há palavras suficientes para expressar o quanto vos agradeço.

Ao Nuno, pela paciência, pelas lágrimas limpas em momentos mais difíceis, pelo teu apoio e pelo “vai correr tudo bem”. Obrigada, obrigada, obrigada. Obrigada pelo teu amor e amizade incondicionais.

Agradeço a todos que não tive oportunidade de mencionar mas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
AGRADECIMENTOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
ABREVIATURAS E SIMBOLOS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Microalgas – Características gerais	1
1.2 Divisão <i>Rodophyta</i>	2
1.2.1 A microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	2
1.2.1.1 Taxonomia	2
1.2.1.2 Características celulares.....	2
1.2.1.3 Estrutura.....	3
1.2.2 Atividades biológicas	4
1.2.2.1 Atividade antioxidante.....	4
1.2.2.2 Atividade imunoestimulante.....	4
1.2.2.3 Atividade antiviral	5
1.3 Polissacarídeo	6
1.3.1 Aspetos gerais	6
1.3.2 Composição e estrutura.....	10
1.4 Principais patogénicos da pele	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais.....	15
2.1 Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Seleção da estirpe de <i>P.cruentum</i>	17
3.1.1 Condições de crescimento.....	17
3.2 Otimização do meio de cultura - Efeito do meio NTIP suplementado com Sulfato de Magnésio e Cloreto de Magnésio	18
3.3 Extração do exopolissacarídeo	19

3.3.1 Purificação - Precipitação e Diálise	20
3.4 Extração da biomassa	21
3.5 Avaliação de atividades biológicas	22
3.5.1 Microrganismos utilizados	22
3.5.2 Fração do exopolissacarídeo (EPS)	23
3.5.2.1 Avaliação da atividade antibacteriana	23
3.5.2.1.1 Preparação dos inóculos	23
3.5.2.1.2 Determinação da percentagem de inibição microbiana ...	23
3.5.2.2 Avaliação da atividade fúngica.....	24
3.5.2.2.1 Preparação dos inóculos	24
3.5.2.2.2 Método de microdiluição.....	24
3.5.2.2.3 Contagem de esporos.....	25
3.5.2.3 Avaliação do perfil prebiótico	26
3.5.2.3.1 Preparação dos inóculos	26
3.5.2.3.2 Método de microdiluição em microplaca	27
3.5.2.4 Avaliação do perfil inibitório de biofilmes bacterianos.....	28
3.5.2.4.1 Preparação dos inóculos	28
3.5.2.4.2 Método de microdiluição.....	28
3.5.3 Fração da biomassa.....	29
3.5.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	29
3.6 Parâmetros analíticos.....	30
3.6.1 Peso seco das amostras	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Curva de crescimento de <i>Porphyridium cruentum</i> em meio NTIP	31
4.2 Curva de crescimento de <i>Porphyridium cruentum</i> em meio NTIP (controlo), NTIP- MgCL ₂ e MgSO ₄	32
4.3 Rendimento/Produtividade	33
4.4 Avaliação de atividades biológicas	35
4.4.1 Fração do exopolissacarídeo (EPS)	35
4.4.1.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	35
4.4.1.2 Avaliação da atividade fungicida.....	38
4.4.1.3 Avaliação do perfil prebiótico	39
4.4.1.4 Avaliação do perfil inibitório de biofilmes bacterianos.....	43
4.4.2 Fração da biomassa.....	44

4.4.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	44
5. CONCLUSÃO.....	47
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
7. BIBLIOGRAFIA	53
ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Foto de <i>Porphyridium cruentum</i> (CCALA, 2013)	3
Figura 1.2 Estrutura dos oligossacarídeos obtidos da degradação parcial do polissacarídeo de <i>P. cruentum</i> (adaptado de Gloaguen <i>et al.</i> , 2004).	10
Figura 1.3 Estrutura da unidade de repetição ácida do exopolissacarídeo de <i>Porphyridium sp.</i> (adaptado de Geresh <i>et al.</i> , 2009); NOTA: R=H; SO ₂ O; Terminal GAL ou Terminal XYL, m=2 ou 3.	11
Figura 2.1 Diagrama resumo do trabalho experimental.	16
Figura 3.1 Réplicas de cultura de <i>Porphyridium cruentum</i> em crescimento numa câmara de cultura climatizada	18
Figura 3.2 Processo de extração do EPS. A) Sobrenadante de <i>P. cruentum</i> em repouso na <i>hotte</i> . B) Aquecimento do sobrenadante em banho-maria (80°C). C) Extração de EPS (precipitado branco) após junção de álcool etílico 99% (v/v).	20
Figura 3.3 Processo de purificação e diálise do EPS. A) Dissolução do EPS 5% liofilizado em água desionizada. B) e C) EPS em membrana de diálise	21
Figura 3.4 Evaporação no Rotavapor do solvente de Hexano em solução com a biomassa de <i>P. cruentum</i>	22
Figura 3.5 Visualização de crescimento de <i>Microsporum canis</i> (meio com tonalidade laranja) e <i>Tricophitum rubrum</i> (meio com tonalidade amarela) em meio DTM.	24
Figura 3.5.1 Preparação de Câmara de <i>Neubauer</i> para contagem direta de esporos	70
Figura 3.5.2 Área da contagem de esporos na Câmara de <i>Neubauer</i>	70
Figura 3.6 Processo de peso seco em filtros de papel. A) Cadinhos contendo filtros de biomassa filtrada, numa mufla. B) Papel de filtro com biomassa de <i>P. cruentum</i>	30
Figura 4.1 Curvas de crescimento da estirpe de <i>Porphyridium cruentum</i> obtida pelo método dos pesos secos, em meio de cultura NTIP	31
Figura 4.2 Curvas de crescimento da estirpe de <i>Porphyridium cruentum</i> obtida pelo método dos pesos secos, em três meios de cultura: meio NTIP (controlo), meio NTIP suplementado com sulfato de magnésio (0,021M) e meio NTIP suplementado com cloreto de magnésio (0,021M).	32
Figura 4.3 Rendimento da extração de EPS das culturas crescidas nos meios NTIP, NTIP suplementado com MgSO ₄ e NTIP suplementado com MgCl ₂ , todos na concentração de 0,021M	34

Figura 4.4 Percentagem de Inibição às 24 h de crescimento microbiano, por EPS na concentração de 4% (m/v).....	36
Figura 4.5 Percentagem de Inibição às 24 h de crescimento microbiano, por EPS na concentração de 3% (m/v).....	36
Figura 4.6 Percentagem de Inibição às 24 h de crescimento microbiano, por EPS na concentração de 2% (m/v).....	37
Figura 4.7 Visualização do crescimento fúngico em microplaca na presença de diferentes concentrações de EPS (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 e 2% (m/v)).....	39
Figura 4.8 Curvas de crescimento de <i>B. animalis</i> spp. <i>lactis</i> Bb-12® na presença e ausência de EPS 2% (m/v) (A) e <i>B.lactis</i> LAFTI® B94 na presença e ausência de EPS 2% (m/v) (B).40	
Figura 4.9 Curvas de crescimento de <i>L. acidophylus</i> LA-5® na presença e ausência de EPS 2% (m/v), em anaerobiose (A) e em aerobiose (B).....	41
Figura 4.10 Curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> D36 na presença e ausência de EPS a 2% (m/v) (A) e <i>L. acidophylus</i> Ki na presença e ausência de EPS 2% (m/v) (B).....	42
Figura 4.11 Avaliação da atividade antibiofilme em microplaca inoculada com <i>P. aeruginosa</i> e EPS com concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 4% e respectivos controles.....	44
Figura 4.12 Percentagem de inibição às 24 h de crescimento microbiano, por fração de biomassa de <i>P. cruentum</i> em extrato de etanol, clorofórmio e hexano.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Tipos de polissacarídeos produzidos pelas microalgas, principais açúcares e aplicações conhecidas (adaptado de Raposo <i>et al.</i> , 2013). EPS-exopolissacarídeos, sPS-polissacarídeos sulfatados	8
Tabela 3.1 Espécies de bactérias usadas para avaliação do perfil prebiótico de <i>P. cruentum</i> e respectivas fontes	27
Tabela 4.1 Rendimento da extração de EPS das culturas crescidas nos meios NTIP, NTIP suplementado com sulfato de magnésio (0,021M) e NTIP suplementado com cloreto de magnésio (0,021M)	34

ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

Abs	Absorvância
ASW	<i>Artificial seawater</i>
Atm	Atmosfera
<i>Bb</i>	<i>Bifidobacterium</i>
BHI	<i>Brain heart infusion (medium)</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cfu	Unidades formadoras de colónias
cm	Centímetro
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
CH ₃ NO ₂	Formiato de amónio
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
DO	Densidade ótica
DTM	<i>Dermatophyte test medium</i>
EPS	Exopolissacarídeo
ERO'S	Espécies reativas de Oxigénio
g	Grama
GAL	Galactose
h	Horas
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
H	Hidrogénio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
KDa	KiloDalton
L	Litro
<i>La</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
M	Molar
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MH	<i>Mueller-Hinton (medium)</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MRS	<i>de Man Rogosa e Sharpe (medium)</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus metilino-resistente</i>
MSSA	<i>Staphylococcus aureus metilino-sensível</i>
<i>M. canis</i>	<i>Microsporum canis</i>
Nº	Número
NaS	Sulfureto de sódio
nm	Nanómetro
PM	Peso molecular
PS	Polissacarídeo
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
rpm	Rotações por minuto
R-SO ₂ O	Sulfonato
SOD	Superóxido-dismutase
sPS	Polissacarídeo sulfatado
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enteritidis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
TSB	Caldo soja tripticaseína
<i>T. rubrum</i>	<i>Tricophyton rubrum</i>
UV	Ultra-violeta
Xyl	Xilose
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
α	Alfa
σ	Ómega
°C	Graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microalgas – Características gerais

O termo microalgas engloba microrganismos heterogêneos, microscópicos unicelulares, coloniais ou filamentosos que possuem clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, capazes de realizar fotossíntese oxigénica. Este termo é desprovido de qualquer significado taxonómico definido (Derner, *et al.*, 2006).

No ambiente natural, estes organismos são altamente adaptáveis a condições extremas impostas pelo meio que os rodeia. Fatores como temperatura, disponibilidade de nutrientes, concentração salina e iluminação, não são um condicionamento à sua sobrevivência, pois estes organismos são capazes de produzir metabolitos biologicamente ativos que permitem a sua subsistência (Plaza *et al.*, 2008).

O interesse pelas microalgas reside no seu potencial de utilização da biomassa produzida para produtos químicos, alimentação, rações animais, aplicações energéticas e tratamento de efluentes (Lourenço, 2006).

Visto que as microalgas possuem na sua estrutura, uma composição química diversa, estas apresentam um potencial para sintetizarem compostos com diversas capacidades biológicas. Além de sintetizarem toxinas, as microalgas possuem propriedades enzimáticas, imunoestimulantes, antibióticas, anti-tumorais, anti-inflamatórias, antivirais, entre outras aplicações farmacológicas (Minkova *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2006; Gardeva *et al.*, 2009; Plaza *et al.*, 2010). Estas propriedades podem ser derivadas de polissacarídeos presentes na biomassa e estão diretamente relacionadas com a estrutura química destes (Dvir *et al.*, 2009; Talyshinsky *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2001; Dvir *et al.*, 2000; Bonh e BeMiller, 1995). A grande variabilidade estrutural varia de acordo com as fases de crescimento, em função da família, género e até mesmo entre espécies da mesma classe (Talyshinsky *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2001).

1.2 Divisão *Rodophyta*

Segundo Tomaselli (2004), a caracterização das microalgas, implica alguns critérios, nomeadamente, pigmentação fotossintética (carotenos, carotenóides clorofilas e ficobilinas), constituintes da parede celular (disposição dos tilacóides) e natureza dos produtos de reserva (amido ou laminarana). No entanto, entre os representantes de cada divisão, sabe-se que são fisiologicamente idênticos, apesar de existirem diferenças estruturais e morfológicas. (Abalde *et al.*, 1995).

As algas da divisão *Rhodophyta*, também comumente denominadas de algas vermelhas (*gr. Rhodom* = vermelho), encontram-se maioritariamente no mar, em regiões equatoriais, em águas quentes e transparentes, existindo atualmente mais de 400 géneros, entre 4000 a 6000 espécies (Ragan *et al.*, 1994).

1.2.1 A microalga *Porphyridium cruentum*

1.2.1.1 Taxonomia

De acordo com o sistema de classificação de Hwan Su Yoon e seus colaboradores (2006) a microalga marinha *Porphyridium cruentum*, é uma espécie pertencente às algas vermelhas e ao domínio *Eukarya*, reino *Plantae*, subreino *Biliphyta*, filo *Rodophyta*, subfilo *Rhodophytina*, classe *Porphyridiophyceae*, ordem *Porphyridiales*, família *Porphyridiaceae* e ao género *Porphyridium* (Guiry, M. e Guiry, G., 2017).

1.2.1.2 Características celulares

A parede celular das microalgas vermelhas apresenta internamente uma fina camada de microfibrilas celulose e uma camada externa formada por polissacarídeos e mucilagem (carragenano e agár), substância que confere um aspeto viscoso (Ragan *et al.*, 1994).

O principal produto de reserva é o amido florídeo, um polissacarídeo derivado de glucose formado por ligações α -(1-4) substituído em O-6, que se acumula no citoplasma (Lourenço, 2006).

Os principais pigmentos encontrados na biomassa da microalga compreendem a clorofila *a* e *b*, as ficobilinas (ficoeritrina -b, -c e -r, ficocianina -c e -r e aloficocianina-c) e carotenóides sob a forma de xantofilas, zeaxantina, neoxantina, luteína e anteraxantina (Lourenço, 2006).



Figura 1.1 Foto de *Porphyridium cruentum* (CCALA, 2013).

1.2.1.3 Estrutura

A espécie *Porphyridium cruentum* representa células uninucleadas de forma esférica a ovóide. O diâmetro celular varia consoante a fase em que se encontra, podendo ser de 5-10 µm ou de 7-16 µm, que correspondem à fase de crescimento exponencial e estacionária, respetivamente. Geralmente as células encontram-se isoladas, mas por vezes, formam colónias irregulares com matrizes mucilaginosas mal definidas (Brody *et al.*, 1959).

Os cloroplastos assumem uma forma estrelar axial, contendo no centro, um pirenóide proeminente. Quanto aos restantes organelos estão dispostos em torno do cloroplasto, numa pequena fração do citoplasma. Contrariamente às células em fase estacionária, as células de fase de crescimento apresentam paredes mais espessas, bastantes cloroplastos, porém possuem pouco composto de reserva (amido) e glóbulos lipídicos (Vieira *et al.*, 2005).

A composição desta microalga é bastante rica em compostos bioquímicos, nomeadamente polissacarídeos sulfatados, ácidos gordos poli-insaturados (PUFA), ácido eicosapentenóico, pigmentos fotossintéticos e esteróis (Franke, H. 1994).

1.2.2 Atividades biológicas

1.2.2.1 Atividade antioxidante

As microalgas em geral, são fontes naturais de compostos antioxidantes, e estes são produzidos com a função de proteção contra as ERO'S - Espécies Reativas de Oxigênio - provenientes da ativação do oxigênio endógeno pela radiação UV ou até mesmo pelo calor (Garcia e Guerrero, 2008). Sabe-se que antioxidantes como carotenóides, ficobiliproteínas, polifenóis, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferóis) e a superóxido-dismutase (SOD), provenientes das microalgas, protegem o nosso organismo contra radicais livres e atuam contra o envelhecimento da pele e como proteção de fatores externos como os raios UV e a poluição. (Plaza *et al.*, 2008).

Os antioxidantes na indústria alimentar apresentam-se maioritariamente na forma de suplementos, e são usados para combater a peroxidação lipídica que está bastante associada a doenças degenerativas, como a diabetes, doenças cardiovasculares e cancro (Garcia e Guerrero, 2008). Estes antioxidantes também podem ser encontrados em produtos para a pele, mais precisamente em cremes anti-idade e de regeneração da pele (Spolaore *et al.*, 2006).

De acordo com Tannin-Spitz e outros colaboradores (2005), o EPS a partir de *Porphyridium sp.* revelou atividade antioxidante contra a auto-oxidação do ácido linoleico, referindo-se à possibilidade da glicoproteína contribuir para as propriedades antioxidantes. Além disso, também foram caracterizadas as estruturas químicas dos polissacarídeos de duas espécies marinhas de microalgas *Pavlova lutheri* e *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nageli, com alto potencial de apresentarem atividades biológicas como imunoestimulantes e antiviral respetivamente (Huheihel *et al.*, 2002; Talyshinsky *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2001).

1.2.2.2 Atividade Imunoestimulante

Nos últimos anos tem crescido o interesse científico de polissacarídeos, como o de *Porphyridium*, em diversos aspetos biológicos tais como: anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-metástica, anticoagulante e anti-trombótica (Boisson-Vidal *et al.*, 1995).

Matsui, M., e seus colaboradores (2003) mostraram que, quando há uma inflamação, a migração dos leucócitos para o local da lesão permite uma libertação de citocina e produção

de óxido nítrico. Isto faz com que a terapêutica seja mais eficaz nos processos inflamatórios. O papel do EPS do *Porphyridium* neste processo mostrou ser relevante, pois, *in vitro*, inibiu a migração dos leucócitos e, por conseguinte, inibiu o desenvolvimento de eritema *in vivo*.

Num estudo recente, Gardeva e colaboradores (2009) relataram a forte inibição *in vitro* e *in vivo* por parte de um polissacarídeo de *Porphyridium cruentum*, na proliferação do tumor mielóide de *Graffi*. Verificaram também que a atividade e a dose estavam correlacionadas e que o tempo de sobrevivência dos ratinhos foi aumentado de 10-16 dias. Em conclusão, sugeriram que a atividade anti-tumoral podia estar relacionada com as características imuno-estimulantes do polissacarídeo.

1.2.2.3 Atividade antiviral

Microalgas vermelhas como *Porphyridium sp.*, *Rhodella* e *Rhodorus*, constituem uma grande fonte de bioquímicos, particularmente exopolissacarídeos sulfatados (EPS), que inibem a infecção viral e/ou replicação, sem qualquer toxicidade para as células hospedeiras (Boisson Vidal *et al.*, 1995; Damonte *et al.*, 2004; Hasui *et al.*, 1995; Sahoo *et al.*, 1996). O elevado grau de sulfatação destas microalgas faz com que haja um efeito inibitório no início da infecção viral, promovendo uma interação entre a carga positiva destas com a carga negativa na superfície do vírus e, por isso, previnem a adsorção e penetração do vírus à célula hospedeira. (Huheihel *et al.*, 2002; Talyshinsky *et al.*, 2002; Huheihel *et al.*, 2002). No entanto também já foram descritos estudos em que esta sulfatação das microalgas também pode interferir num estágio mais avançado evitando a síntese de proteínas virais, nomeadamente da enzima transcriptase reversa contra um retrovírus, como o HIV. Estudos anteriores mostraram uma atividade promissora do EPS contra vírus como o *Herpes simplex* tipo 1 e 2, HIV tipo 1 e 2 e *Varicella zoster* (Baba *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 1998; Huleihel *et al.*, 2002; McClure *et al.*, 1992; Schaeffer e Krylov, 2000; Raposo *et al.*, 2014).

1.3 Polissacarídeo

1.3.1 Aspetos gerais

Polissacarídeos são macromoléculas naturais e podem ser definidos como polímeros formados por unidades simples monossacarídicas, ligadas por ligações glicosídicas (Aspinall, 1970). Os polímeros naturais são cada vez mais usados para fins biotecnológicos, pois possuem características que lhes confere excelentes condições de aplicabilidade, tais como: não são prejudiciais para o meio ambiente, são inertes, de baixo custo, biocompatíveis, biodegradáveis e facilmente são encontrados no meio ambiente (Guo *et al.*, 1998; Prajapati *et al.*, 2014).

Para além destas características, estes polímeros exercem um papel importante como gelificante, espessante, emulsionante e hidratante devido à solubilidade em água. (Rinaudo, 2006). Esta solubilidade é controlada por pontes de hidrogénio intra ou intermoleculares ricas em grupos hidróxidos (Rinaudo, 2004). Os polissacarídeos possuem uma estrutura de caráter semi-rígida de forma helicoidal quando em solução. A estabilidade da sua conformação depende de variados fatores, nomeadamente temperatura, pH, força iónica do meio, concentração de certas moléculas e se a estrutura do polissacarídeo possui ácido urónico ou substituintes iónicos. (Guo *et al.*, 1998; Prajapati *et al.*, 2014).

Os polissacarídeos podem ser divididos em três grupos, com base da sua localização na célula, em polissacarídeos da parede celular, polissacarídeos intracelulares e polissacarídeos extracelulares (Donot *et al.*, 2012; Dewapriya e Kim, 2014).

Na natureza, os polissacarídeos podem ser encontrados nos mais diversos organismos como nos animais, fungos, bactérias e plantas, incluindo as algas (Rinaudo, 2008; Cunha *et al.*, 2009). São exemplos o agár, alginato e carragenana extraídos de macroalgas, goma adragante, goma arábica e derivados de amido provenientes de plantas. Já os fungos são uma fonte de pulunano e as bactérias uma fonte de dextrano, gelano e xantano. Estes polissacarídeos atuam em funções reconhecidas como esquelética na parede celular, de reserva alimentar, de proteção, entre outros (Aspinall, 1972). Dentre estes organismos, os polissacarídeos das algas têm vindo a destacar-se devido às atividades biológicas e a sua abundância nos organismos marinhos. (Prajapati *et al.*, 2014, Rinaudo, 2008; Haroun-Bouhedja *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2004; Devillé *et al.*, 2007).

Dentro de todos estes microrganismos, os bacterianos são os mais estudados e os mais bem compreendidos pelo que se tornaram referência no estudo dos polissacarídeos. A pesquisa de espécies produtores de polissacarídeos, bem como a relação entre composição e propriedades do EPS, leva a uma abordagem interdisciplinar em que a genética, bioquímica, fisiologia e propriedades dos polissacarídeos são objeto de estudo (Yalpani, 1987).

Os polissacarídeos de microalgas oferecem vantagens em comparação com os polissacarídeos das plantas. As microalgas têm a capacidade de produzir polissacarídeos em poucos dias enquanto que as plantas só os produzem entre 3 a 6 meses; possuem boa digestibilidade global e poucas limitações no que diz respeito à sua aplicação no geral (Chacón-Lee e González-Mariño, 2010); utilizam CO₂ e resíduos industriais como substrato de carbono e ainda energia solar o que leva a uma produção eficaz.

Tabela 1.1 Tipos de polissacarídeos produzidos pelas microalgas, principais açúcares e aplicações conhecidas (adaptado de Raposo *et al.*, 2013). EPS-exopolissacarídeos, sPS-polissacarídeos sulfatados.

Microalgas	Tipo de polissacarídeo	Açúcares principais	Aplicações
<i>Cylindrotheca closterium</i>	sPS	Xilose e Glucose	_____
<i>Nevicula salinarum</i>	_____	Xilose e Glucose	_____
<i>Phacodactylum tricornutum</i>	EPS sulfatado	Glucose e Manose	Anti-inflamatórias; imunomodulador; bio-lubrificante
<i>Chlorella stigmatophora</i>	sPS	Glucose e Xilose	Anti-inflamatórias; imunomodulador.
<i>Tetrasebmis sp.</i>	sPS	_____	Bio-lubrificante
<i>Isochrysis sp.</i>	sPS	_____	_____
<i>Rhodella reticulata</i>	sPS	Xilose e Galactose	Antioxidante e anti-tumoral
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	sPS	Manose e Galactose	_____
<i>Gyrodinium impudicum</i>	sPS	Galactose	Anti-tumoral
<i>Arthrospira platensis</i>	Cálcio sulfatado	Ramnose e Frutose	Anti-tumoral
<i>Aphanothece halophytica</i>	EPS	Glucose e Fucose	_____
<i>Porphyridium cruentum</i>	EPS	Xilose e Galactose	Anti-inflamatórias; imunomodulador; Anti-tumoral; bio-lubrificante; Anti-

O polissacarídeo da espécie *P. cruentum* encontra-se na parede celular sob a forma de um gel. Durante o seu crescimento/cultivo o exterior do gel difunde-se no meio de cultura (exopolissacarídeo) ficando 50-70% de uma parte ligada à parede formando uma camada exterior que protege a célula de condições ambientais adversas (salinidade ou dessecação) (Pignolet *et al.*, 2013).

Qualitativamente as soluções de EPS a partir de *Porphyridium* caracterizam-se pelas suas características tixotrópicas com propriedades de um fluido não Newtoniano ou pseudoplástico que apresenta uma alteração dependente do tempo, na sua viscosidade (Esteshola *et al.*, 1996).

Sun e seus colaboradores (1998) mostraram que dependendo do grau de degradação, fragmentos de EPS de *Porphyridium* podem exibir características típicas Newtonianas. Além disso, verificaram que, quando expostos a temperaturas acima de 90°C, características como viscosidade e elasticidade causam modificações na conformação das cadeias de polímeros. Com isto também concluíram que, devido à elasticidade do EPS apresentar valores mais elevados do que a viscosidade, este possui uma fraca gelificação.

Outro estudo realizado por Esteshola (1998) demonstrou que para temperaturas acima dos 60°C, há um aumento de elasticidade, indicando assim que o calor promove a auto-associação do polímero em solução aquosa.

Devido à elevada viscosidade demonstrada por este polissacarídeo, composição de monossacarídeos e as suas complexas ligações, a parte do EPS que se encontra ligado à parede celular ainda não teve a sua estrutura totalmente caracterizada. Neste âmbito, uma técnica previamente descrita por Lau *et al.* (1987) foi aplicada num estudo realizado por Gloaguen *et al.* (2004) que utiliza fragmentos oligossacarídicos resistentes à fragmentação com lítio em etilenodiamina, levando à degradação seletiva de resíduos de ácido glicosilurónicos pela clivagem das ligações glicosídicas entre uma unidade de açúcar neutro e uma unidade de açúcar ácido. Este estudo mostrou a presença de dois oligossacarídeos principais (Figura 1.2), que compõem a estrutura do polissacarídeo que permanece ligado à parede celular.

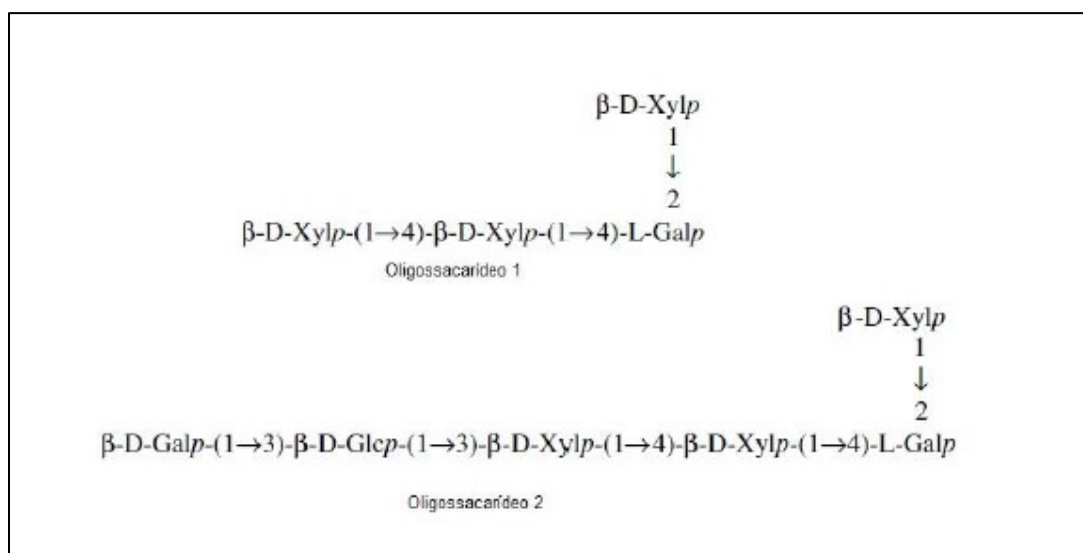


Figura 1.2 Estrutura dos oligossacarídeos obtidos da degradação parcial do polissacarídeo de *P. cruentum* (adaptado de Gloaguen *et al.*, 2004).

Nos géneros *Porphyridium*, *Rhodella* e *Rhodosorus* o EPS atua como forma de proteção contra a desidratação das células e provavelmente, como permutador e/ou reservatório iónico que permite criar um tampão à volta da célula de modo a protegê-la de condições extremas (Arad M.S., 1988). Por estas razões, a cultura destas microalgas é facilitada em meios baseados em água do mar, podendo crescer numa vasta gama de salinidade. (Ramus J., 1972).

1.3.2 Composição e Estrutura

O peso molecular do EPS produzido por esta espécie é de 4×10^6 Da, no entanto, noutras espécies encontram-se polissacarídeos de peso molecular superior como resultado da formação de complexos entre grupos funcionais aniónicos e catiões divalentes podendo variar entre 2×10^6 Da e 7×10^6 Da. A análise estrutural do polissacarídeo extracelular revelou que se trata de um heteropolímero (Geresh S. e Arad M., 1991) composto até 10 monossacarídeos constituído principalmente por três açúcares: xilose, galactose e glucose, revelando a presença de D-xilose (30.9 mol %), D- e L-galactose (38.7 mol %), D-glucose (24.9 mol %), além de sulfato (14 %) (Gloaguen V., 2004). A hidrólise ácida parcial deste heteropolímero revelou a

existência do dissacarídeo 3-O-(α -D-ácido glucopiranosilurónico)-L-galactopiranosose (Figura 1.3) já verificado noutras espécies de microalgas pelo que deverá ser um componente fundamental da estrutura (Geresh S. e Arad M., 1991).

Nos EPS bacterianos os monossacarídeos mais frequentes são a D-glucose, D-galactose e o ácido D-glucorónico (Sutherland, 1988). Algumas bactérias produzem heteropolímeros de grandes dimensões e heterogêneos, como o ácido colânico produzido por *Enterobacteriaceae*, o xantano, produzido por bactérias do género *Xanthomonas* e o gelano produzido pelo género bacteriano *Alcaligenes*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Moorhouse, 1987).

Quanto aos monossacarídeos contidos nos EPS de eucarióticas, podem ser variados, sendo mais comuns a D-galactose, D-manose, D-glucose e ácido urónico. Em procarióticas, no caso das Cianobactérias, os monossacarídeos são essencialmente D-ribose e D-xilose (Sutherland, 1988).

As propriedades aniónicas que apresenta deve-se à existência de ácidos urónicos e grupos ésteres sulfatados (Medcalf D., *et al.*, 1975; Percival E. e Foyle R., 1979) nas posições 6 e 3 dos mono-açúcares glucose e galactose. Estudos anteriores revelaram a existência de proteínas ligadas não covalentemente ao polissacarídeo de *Porphyridium sp.* Sendo a maior uma glicoproteína de 66 Kda (Shrestha R. *et al.*, 2004). Também em *P. cruentum*, num estudo realizado por Heaney-Kieras e colaboradores (1977), verificaram a presença de proteína ligada covalentemente ao biopolímero.

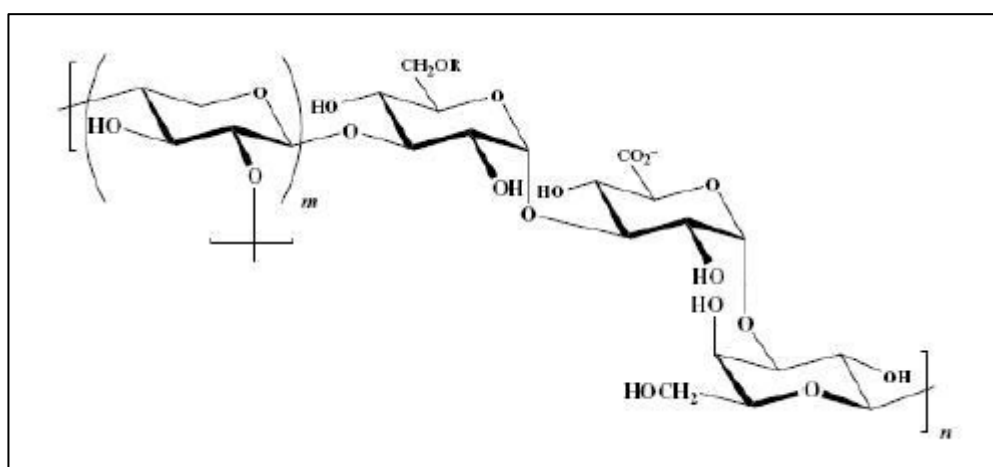


Figura 1.3 Estrutura da unidade de repetição ácida do exopolissacarídeo de *Porphyridium sp* (adaptado de Geresh *et al.*, 2009).

NOTA: R=H; SO₂O; Terminal GAL ou Terminal XYL, m=2 ou 3

Muitas modificações químicas têm sido testadas noutros polissacarídeos de algas e bactérias com o intuito de introduzir propriedades que aumentem o espectro de aplicação industrial. Geresh e seus colaboradores (2000) procuraram a quaternização do biopolímero de *Porphyridium sp.* sem que se tenha verificado degradação do mesmo. Como resultado obteve um polissacarídeo com viscosidade semelhante ao nativo mas com elasticidade maior.

À semelhança do verificado para as células de *Porphyridium* (Ucko M. *et al.*, 1994), a estabilidade do polissacarídeo, avaliada pela sua viscosidade, em soluções concentradas (1-2 g/L) mantém-se quando este é exposto a uma vasta gama de pH (2-9), temperatura (30-120°C) e salinidade (Eteshola *et al.*, 1996). Sabe-se também que as condições de cultura, como a privação de nitrato e sulfato, influenciam a quantidade, solubilização e qualidade do polissacarídeo produzido (Ucko *et al.*, 1994).

Outro fator que mostrou ser relevante na produção do EPS é a concentração de CO₂. Resultados anteriores mostram que afeta tanto o crescimento como a produção do EPS na parede celular. Influencia ainda a distribuição entre as frações do polissacarídeo que estão ligadas à parede como as que se encontram solúveis e modifica a composição do polissacarídeo (Eteshola E. *et al.*, 1996).

Kroen e Ramus (1990) sugerem que a produção do polissacarídeo é controlada pelo nível de fixação do carbono. No entanto, outros resultados mostram que a produção do EPS é controlada ao nível da divisão de carbono ao invés da carga total fotossintética (Friedman *et al.*, 1991; Arad *et al.*, 1992).

Estudos anteriores revelaram que a biomassa do *P. cruentum*, que contém cerca de 57% de hidratos de carbonos, quando combinada com o EPS desta microalga, poderiam fornecer potencialmente uma fonte de bio-combustível e farmacêutica (Razaghi *et al.*, 2014).

1.4 Principais patogénicos da pele

A flora cutânea é relativamente simples em comparação com as comunidades diversificadas de microrganismos que habitam a boca e trato digestivo, por exemplo. A flora da pele é constituída de bactérias do tipo cocos aeróbios, corineformes aeróbias e anaeróbias, bactérias Gram-negativas e leveduras. Estes microrganismos funcionam como uma excelente

barreira, fornecendo competição ecológica entre os microrganismos patogênicos e por hidrolização dos lípidos sebáceos e o ambiente gasoso. Muitos microrganismos podem causar infecções na pele, sendo os mais comuns de acordo com *New York State Department of Health*, as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Algumas pessoas têm um risco particular de desenvolver infecções da pele, são exemplos de pessoas com diabetes, pois o aumento de açúcar no sangue faz com que os leucócitos tenham a sua capacidade para combater as infecções mais reduzidas; pessoas com HIV ou outras doenças imunológicas, idosos ou crianças estão também em maior risco (Dhar, A. 2017).

Relativamente às infecções fúngicas, não são tão comuns como as bacterianas, mas a sua incidência é bastante relevante. Fungos como os dermatófitos usam a queratina presente na pele como fonte de nutrientes daí a sua boa adaptação na flora cutânea, contrariamente a outros fungos patogênicos. (Wagner e Sohnle, 1995).

A infecção pode ser uni ou polimicrobiana e a sua extensão geralmente é determinada pelo tipo de organismo, pela forma como estão presentes e pelas toxinas que libertam. As infecções podem ser relativamente superficiais ou atingir camadas mais profundas, como os tecidos moles adjacentes até à corrente sanguínea, podendo levar à septicemia (Dhar, A. 2017).

Os tratamentos das infecções cutâneas dependem da causa da infecção e da sua severidade. Alguns tipos de infecções virais não requerem tratamento, por outro lado, as infecções bacterianas são maioritariamente tratadas com antibióticos aplicados localmente, de modo a aumentar a sua eficácia, como por exemplo, sob a forma de biofilme (Dhar, A. 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

Existem muitos estudos em relação à atividade antiviral de *Porphyridium cruentum*, mas poucos estudos foram aprofundados no que diz respeito à sua função antibacteriana. Atualmente no mercado, produtos de cosmética e suplementos alimentares da microalga têm sido cada vez mais usados.

O que se pretendeu com este estudo foi testar algumas das potenciais atividades biológicas do exopolissacarídeo e da biomassa da microalga de modo a que futuramente possam ser utilizados para fins medicinais.

2.2 Objetivos específicos:

- Otimizar os parâmetros de cultura e produção da microalga marinha *Porphyridium cruentum* em meio NTIP, NTIP-MgSO₄ e NTIP-MgCl₂;

Da microalga *P. cruentum* separou-se a fração do exopolissacarídeo e da biomassa e analisaram-se os seguintes parâmetros:

Fração EPS:

- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica;
- Avaliar o perfil prebiótico;
- Avaliar o perfil inibitório de biofilmes bacterianos;

Fração da Biomassa:

- Avaliar a atividade antibacteriana em extratos de biomassa com hexano, clorofórmio e etanol.

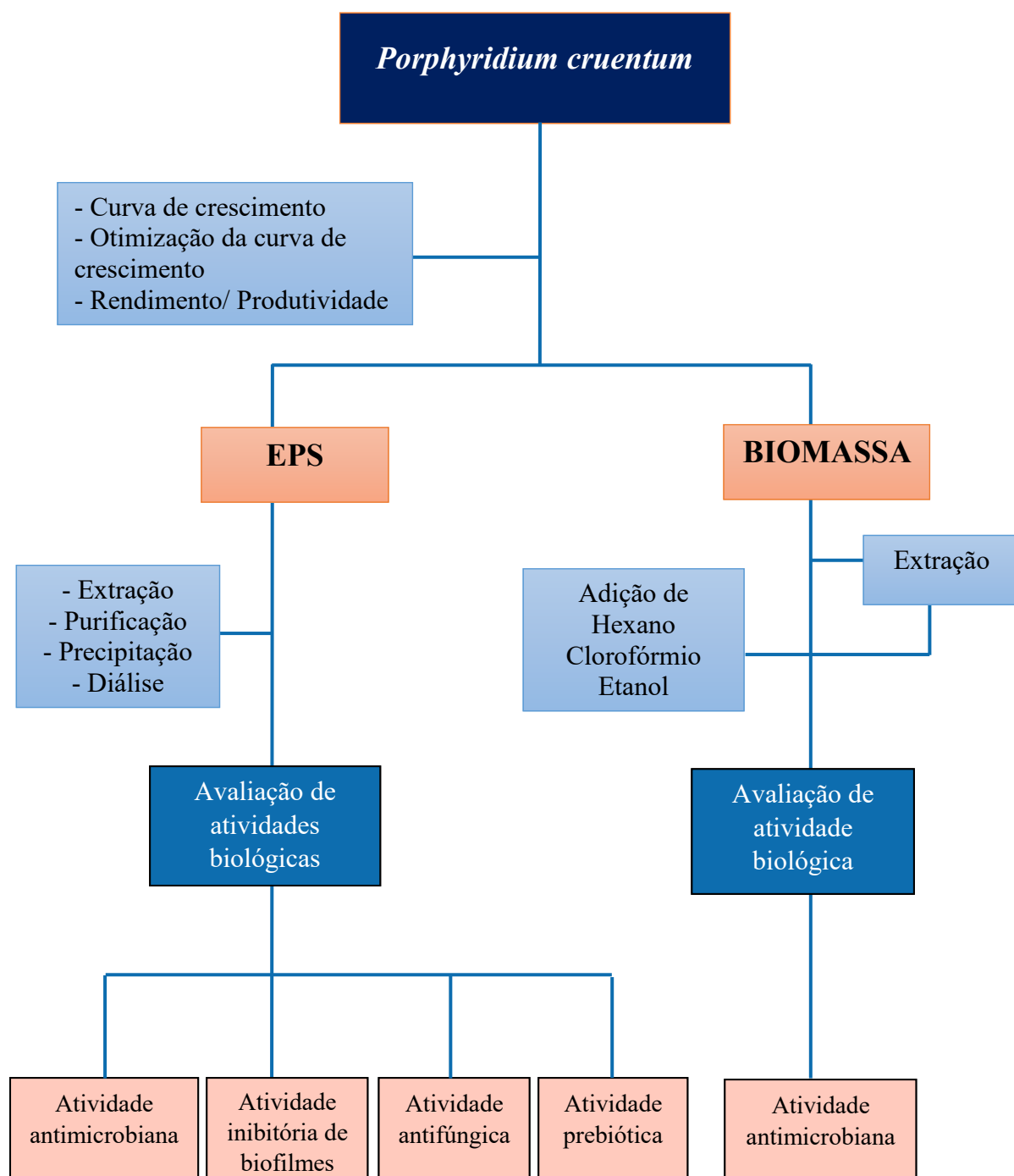


Figura 2.1 Diagrama resumo do trabalho experimental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção da estirpe *Porphyridium cruentum*

No decorrer deste projeto utilizou-se uma estirpe da microalga *Porphyridium cruentum*. A estirpe é israelita e foi providenciada pelo Laboratório de Biotecnologia das microalgas do Departamento de Engenharia Biotecnológica, da Universidade de Ben-Gurion, Negev, Israel. Trata-se de uma estirpe não axénica, que se revelou capaz de produzir em grandes quantidades um EPS solúvel no meio de cultura.

Trabalhos anteriores demonstraram a importância do uso de culturas semi-contínuas para a produção de microalgas marinhas pois estas são fáceis de manipular e existe a possibilidade de manipular a composição química da biomassa, quando se alteram parâmetros como a concentração de nutrientes. (Fábregas *et al.*, 1996)

3.1.1 Condições de crescimento

P. cruentum, crescido no meio de crescimento NTIP foi cultivado em meio artificial de água do mar (ASW), durante um mês. Este ASW contém sal (35 g/L), micronutrientes (1,5 mL/L), macronutrientes (1 mL/L) e por fim 45 uL/L de vitaminas (Anexo A). Depois de adicionadas estas soluções, o pH é mantido a 7 e a solução é filtrada sob vácuo.

As culturas colocadas em balões de cultura de 2 L foram mantidas a uma temperatura de 25 °C com arejamento de fundo de $1,25 \times 10^{-5} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, ar enriquecido com 1% de CO₂ e luminosidade contínua com luz branca fria ($20,92 \mu\text{moles s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), numa câmara fitoclima tipo *walk-in* (Figura 3.1). Sempre que o nível do meio de cultura baixasse 2 cm de altura, era adicionada água desionizada, previamente filtrada e esterilizada. Ao fim de um mês foram refeitas várias culturas, colocando 200 mL da cultura mãe para o meio ASW e foram colocados nas mesmas condições da cultura mãe. Ao longo do trabalho, depois de preparados, os meios de culturas foram sempre esterilizados em autoclave, durante 15 min, a 120 °C e 1.1 atm.



Figura 3.1 Réplicas de cultura de *Porphyridium cruentum* em crescimento numa câmara de cultura climatizada.

3.2 Otimização dos meios de cultura - Efeito do meio NTIP suplementado com Sulfato de Magnésio e Cloreto de Magnésio

Para avaliar a otimização do crescimento de *Porphyridium cruentum*, procedeu-se à monitorização das curvas de crescimento em meio NTIP (controlo) e em meio NTIP suplementado com Sulfato de magnésio (0,021 M; NTIP-MgSO₄) – e em meio NTIP com cloreto de magnésio (0,021 M; NTIP-MgCl₂) utilizando o método dos pesos secos. As culturas, em triplicado, foram crescidas em balões de cultura de 2 L nas condições descritas de acordo com Clesciers *et al.*, 1998). A recolha de amostras foi realizada em triplicado em intervalos de 7 dias. A inoculação e recolha das amostras foram realizadas assepticamente numa câmara de fluxo laminar (Faster Bio48).

Para a determinação do peso seco, inicialmente retiraram-se 10 mL de *P. cruentum* de cada cultura e respetivos triplicados, em duplicado e centrifugou-se a 4500 rpm durante 15 min na centrífuga (Universal 32DR Hettich Zentrifugen –Germany). Os dois sobrenadantes obtidos de cada cultura foram misturados. Quanto aos precipitados foram tratados separadamente; a ambos juntou-se 10 mL de água desionizada com 3,5% de sal e depois de homogéneo filtrou-se 4 mL desta solução, num sistema de *Buchner*, para um filtro (GF/C Whatman, com 47 µm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade). De seguida e para retirar o excesso de sal presente no filtro adicionou-se 15 mL de uma solução de Formiato de amónio (CH₅NO₂). Por fim colocou-se o filtro na estufa a 105 °C durante 12 h, e deixou-se arrefecer

no exsicador, sob vácuo, durante 24 h, sendo depois pesados numa balança analítica. Posteriormente colocou-se na mufla a 550 °C durante 30 min (tempo de rampa até que se atinja a temperatura de trabalho). Por fim, deixou-se arrefecer no exsicador, sob vácuo, durante 24 h, sendo depois pesados numa balança analítica, de modo a determinar o peso seco livre de cinzas, expresso em g/L.

3.3 Extração do exopolissacarídeo – EPS (sobrenadante)

A extração do EPS foi efetuada de acordo com o método adaptado de Brevet d’Invention (1989). Culturas de crescimento de *P. cruentum*, ao atingir a fase estacionária de crescimento, foram centrifugadas a 8000 rpm, durante 20 min à temperatura ambiente (Sorvall Instruments Du Pont – RC 5C), de forma a separar o precipitado do sobrenadante.

Após centrifugação, o sobrenadante foi deixado em repouso na *hotte* durante 4 dias (Figura 3.3.1A). Para a extração do EPS, o sobrenadante é aquecido em banho-maria durante 1 h a 80 °C sob constante agitação, sendo posteriormente filtrado sob vácuo. De seguida, coloca-se o filtrado do sobrenadante em contacto com etanol 99% (v/v) previamente refrigerado, numa proporção de 1:1, durante 24 h a ~ 10 °C. Passadas 24 h verifica-se a presença de um precipitado branco que é retirado e colocado no congelador a -20 °C para depois ser liofilizado (Figura 3.2C). Ao resto do sobrenadante é colocado novamente álcool etílico de modo a extrair o máximo possível de EPS. Depois de liofilizado o EPS é purificado.

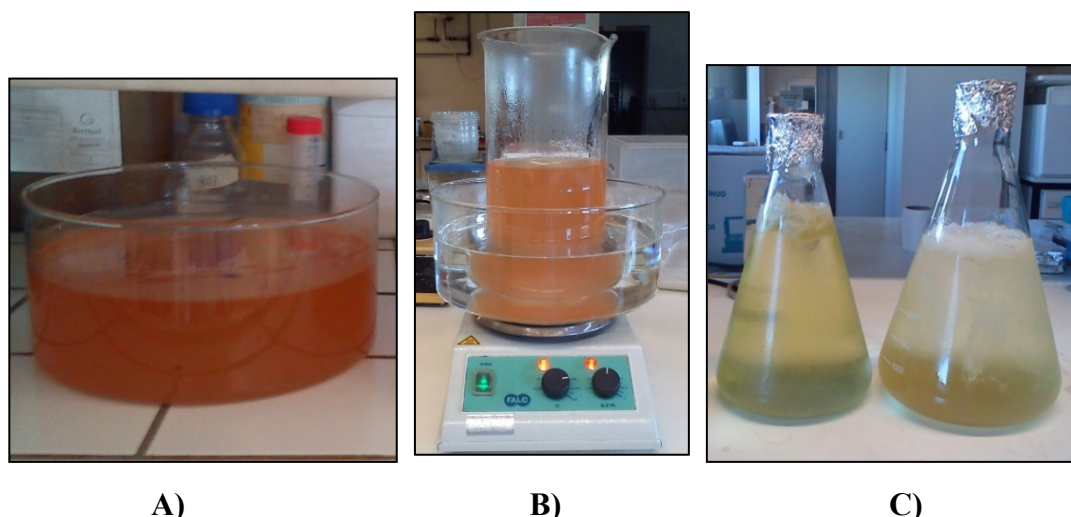


Figura 3.2 Processo de extração do EPS. **A)** Sobrenadante de *P. cruentum* em repouso na *hotte*. **B)** Aquecimento do sobrenadante em banho-maria (80°C). **C)** Extração de EPS (precipitado branco) após junção de álcool etílico 99% (v/v).

3.3.1 Purificação – Precipitação e Diálise

Para a purificação do EPS, recorreu-se à diálise com membrana de celulose (SIGMA) de 27 mm de diâmetro que tem como função reter a maioria das proteínas de peso molecular igual ou superior a 12000 Da. O primeiro passo deste procedimento foi a preparação da membrana segundo as instruções do fabricante. Para isso foi removida a glicerina, lavando com água corrente durante 3 h. De seguida procedeu-se à remoção dos compostos de enxofre, lavando com solução sulfureto de sódio (NaS) 0,3% (w/v) durante 1 min a 80 °C. De seguida lavou-se com água desionizada a 60 °C durante 2 min. Em terceiro lugar acidificou-se a membrana com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,2% (v/v), durante 1 min. Por fim lavou-se novamente a membrana com água desionizada aquecida (60 °C), durante 2 min para remover o ácido.

Depois da membrana já preparada procedeu-se à diálise, colocando-se nesta, uma capacidade máxima de EPS de 175 mL/ft, com o tamanho de 40 cm por 100 mL (Figura 3.3B). A membrana já preenchida com 5% EPS, foi colocada numa tina com água desionizada durante 12 h (Figura 3.3C). Passadas estas horas retirou-se a água desionizada que se encontrava no recipiente e colocou-se novamente água bidestilada durante mais 12 h,

repetindo-se este passo mais uma vez. O passo seguinte à diálise foi a liofilização do EPS que se encontrava previamente congelado, a -20 °C.

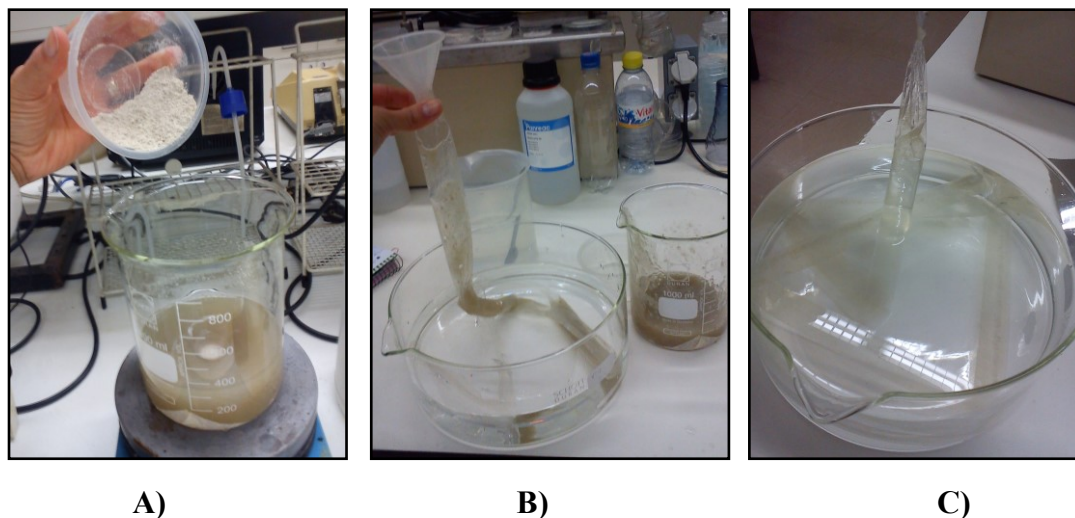


Figura 3.3 Processo de purificação e diálise do EPS. **A)** Dissolução do EPS 5% liofilizado em água desionizada. **B)** e **C)** EPS em membrana de diálise.

3.4 Extração da Biomassa

O precipitado, obtido da centrifugação das culturas, foi congelado para depois ser liofilizado. Três porções de 5 g cada, foram extraídas, respetivamente com 50 mL, dos seguintes solventes: Hexano, Etanol e Clorofórmio, ficando em repouso durante 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente, cada sobrenadante de cada solução foi separado e colocado em balões de destilação. Ao *pellet* que ficou de cada solução foram adicionados novamente 50mL dos respetivos solventes, repetindo-se este procedimento num total de 3 vezes, obtendo no balão de destilação o resultado de três extrações.

De modo a eliminar restos de biomassa nas extrações procedeu-se a uma filtração com o auxílio de uma bomba de vácuo utilizando um papel de filtro (GF/C Whatman, com 47 µm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade). Por fim, cada balão de destilação com os respetivas soluções, foi colocado no rotavapor de forma a evaporar os solventes e a se obter um extrato (Figura 3.4).

O extrato presente nos balões de destilação, antes da sua utilização, é armazenado em atmosfera de azoto e colocado a uma temperatura de -20 °C.



Figura 3.4 Evaporação no rotavapor do solvente de hexano em solução com a biomassa de *P.cruentum*.

3.5 Avaliação de atividades biológicas

3.5.1 Microrganismos utilizados

Foram fornecidos os seguintes microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 8739 (*E. coli*), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (*B. cereus*), *Salmonella enteritidis* ATCC 3076 (*S. enteritidis*), *Listeria innocua* NTCT 11286 (*L. innocua*), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes LMG 15975 (MRSA), *Candida albicans* CCGU 49242 (*C. albicans*), *Microsporum canis*, *Tricophyton rubrum*.

3.5.2 Fração do exopolissacarídeo (EPS)

3.5.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.5.2.1.1 Preparação dos inóculos

As bactérias utilizadas foram cedidas pela Universidade e estavam em *vials* a -80 °C de modo a preservar a bactéria. Para obter a bactéria foram feitos inóculos para cada estirpe. Os inóculos usados para o crescimento das bactérias foram feitos a partir do meio *Brain Heart Infusion* (BHI) *broth*. Passadas 24 h a incubar a 37 °C, as estirpes foram semeadas em meios de cultura sólidos. As culturas utilizadas encontravam-se puras, pois foi feito o reconhecimento da sua morfologia pelo microscópio ótico numa objetiva de 40 vezes.

3.5.2.1.2 Determinação da percentagem de inibição microbiana

O exopolissacarídeo liofilizado foi diluído em água desionizada estéril a 4% (concentração máxima testada possível de dissolução) e posteriormente é esterilizado de modo a eliminar qualquer contaminante presente na solução.

A análise foi realizada numa câmara de fluxo laminar, previamente limpa e esterilizada com UV. O EPS foi colocado em *eppendorfs* em diferentes concentrações, 4%, 3%, 2%, 1% e 0,5% (m/v). De acordo com as concentrações, foi também adicionado meio de cultura *Mueller-Hinton broth* (MHB) e culturas puras de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* metilcilina-resistentes (MRSA), *Staphylococcus aureus* metilcilina-sensíveis (MSSA) e *Candida albicans*. Posteriormente, cada solução de cada *eppendorf* é colocada nos poços da microplaca de 96 poços em duplicado de modo a proceder à sua leitura da absorvância a um comprimento de onda de 660 nm, ao longo de 25 ciclos (25 h) no leitor a 37 °C. Foram feitos controlos negativos de meio MHB, EPS e MHB com EPS e controlos positivos de MHB inoculado com microrganismo em estudo. A leitura do controlo foi considerada como 100% de crescimento bacteriano. A inibição do crescimento bacteriano pelo EPS foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibi\c{c}\~ao} = \frac{(\text{Abs ap\~os crescimento com EPS} - \text{Abs controle})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

3.5.2.2 Avalia\c{c}\~ao da atividade f\~ungica

3.5.2.2.1 Prepara\c{c}\~ao dos in\~oculos

Para testar a atividade antif\~ungica do EPS, foram utilizados *Microsporum canis* e *Tricophyton rubrum*. Estes microrganismos foram cultivados num meio seletivo para dermat\~ofitos [DTM: SDA com 0,055% de L (+) tart\~arico (Sigma, St. Louis, MO, EUA), ciclo-heximida (0,4 g/L, Sigma), cloranfenicol (0,05 g/L, Sigma) e 0,2 g/L de vermelho de fenol], durante 14 dias a 30 °C.

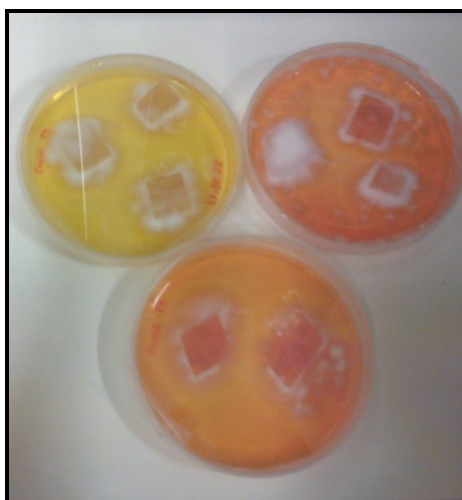


Figura 3.5 Visualiza\c{c}\~ao de crescimento de *Microsporum canis* (meio com tonalidade laranja) e *Tricophyton rubrum* (meio com tonalidade amarela) em meio DTM.

3.5.2.2.2 M\~etodo de microdilui\c{c}\~ao

De modo a testar a atividade antif\~ungica em rela\c{c}\~ao ao EPS, recorreu-se ao m\~etodo de microdilui\c{c}\~ao. Inicialmente, procedeu-se \~a prepara\c{c}\~ao dos in\~oculos. Para isso, cobriram-se as placas cultivadas com os fungos, com 3 mL de *Tween* 20 a 0,1% (solu\c{c}\~ao Sigma) e com o

auxílio de um pipeta de Pasteur de vidro dobrada raspavam-se por cima dos esporos de modo a estes serem libertos. A solução aquosa da junção de *Tween* 20 com os esporos foi colocada para um tubo estéril de 25 mL.

Este processo foi repetido para todas as placas com o fungo *Microsporum canis* e *Tricophyton rubrum*, transferindo toda a solução aquosa para o tubo estéril.

Posteriormente num *ependorf* colocou-se 1 mL do inóculo presente no tubo estéril e noutra *ependorf* colocou-se 1mL de uma diluição de 10 vezes deste inóculo (900 µL *Tween* 20 + 100 µL de inóculo).

3.5.2.2.3 Contagem de esporos

Depois dos inóculos já preparados procedeu-se à contagem de esporos em 5 regiões demarcadas na Câmara de *Neubauer*, conforme Figura 3.5.1 (Anexo B). A Câmara de *Neubauer* permite uma contagem direta dos microrganismos, possibilitando assim a contagem de células por determinação do número de microrganismos encontrados numa região demarcada da câmara que contém um determinado volume de cultura, segundo Vieira (2005).

Por fim, contaram-se os microrganismos no microscópio, numa objetiva de 40x, numa área dos quadrados principais da câmara (Figura 3.5.2 - Anexo B) e procedeu-se aos seguintes cálculos:

$$C \text{ (n}^\circ \text{ células/mL)} = n / (q \times A \times H)$$

Onde: C – Concentração celular (nº células por cm³) da amostra

n – número total de células contadas

q – número de quadrados considerados

A – área dos quadrados considerados (em cm²)

h – profundidade da Câmara de Neubauer (em cm)

Depois de se saber o número de esporos presentes no inóculo, preparou-se outro inóculo a colocar na microplaca e de acordo com as concentrações pretendidas acharam-se os volumes a colocar nos *eppendorfs*, de acordo com as Tabelas 3.6 e 3.7 do Anexo C. Sendo assim, misturou-se em cada *eppendorf*, inóculo, meio *Sabauraud* e seis diferentes concentrações diluídas do EPS a 2% e 5%, nomeadamente, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% e 0,1%.

De seguida colocaram-se nos poços da microplaca 300 µL de cada solução em triplicado, incluindo os controlos positivo (meio de cultura inoculado com os fungos) e negativos (meio de cultura e outro somente com EPS) de modo a verificar se as condições de esterilização se mantêm. As placas foram por fim incubadas durante 14 dias a 25 °C de modo a poder-se obter a CMI que é definida como a menor concentração em que não se observa crescimento.

Como se observou crescimento em todos os poços não foi possível determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

3.5.2.3 Avaliação do perfil prebiótico

3.5.2.3.1 Preparação dos inóculos

Foram testados microrganismos 4 espécies do género *Bifidobacterium* e 7 espécies do género *Lactobacillus* (Tabela 3.1). Estes microrganismos estavam armazenados em culturas *stocks* a -80 °C em glicerol (Fisher Chemical, Loughborough, Reino Unido), que foram produzidas em caldo MRS contendo 1% de glucose, após crescimento a 37 °C, durante 24 h.

Tabela 3.1 Espécies de bactérias usadas para avaliação do perfil prebiótico de *P. cruentum* e respetivas fontes.

Espécie	Fonte
<i>Bifidobacterium lactis</i> LAFTI® B94	DSM (Moorebank, NSW, Australia)
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb-12®	Christian Hansen (Hørsholm, Denmark)
<i>Bifidobacterium animalis</i> B ₀	CSK (Ede, Netherlands)
<i>Bifidobacterium breve</i> NCIMB 702258	NCIMB (Aberdeen, Scotland)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Ki	CSK (Ede, Netherlands)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI® L10	DSM (Moorebank, NSW, Australia)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5®	Christian Hansen (Hørsholm, Denmark)
<i>Lactobacillus casei</i> 01	Christian Hansen (Hørsholm, Denmark)
<i>Lactobacillus casei</i> 431®	Christian Hansen (Hørsholm, Denmark)
<i>Lactobacillus plantarum</i> D36	Persimmon isolate (ESB-UCP, Portugal)
<i>Lactobacillus brevis</i> D24	Persimmon isolate (ESB-UCP, Portugal)

3.5.2.3.2 Método de microdiluição em microplaca

Em tubos de 15 mL estéreis, colocou-se 10 mL de meio MRS (controlo negativo), 10 mL de meio MRS com 1% de Glucose (controlo positivo), 10 mL de meio MRS com 1% de EPS e 10 mL de meio MRS com 1% de Glucose e 1% de EPS. O EPS foi esterilizado previamente. Para testar os microrganismos do género *Bifidobacterium*, para além do método de microdiluição também foi adicionado 100 µL de cisteína a 0,05% em cada um dos tubos, de modo a fornecer um ambiente anaeróbio. Ao microrganismo LA-5 foi também testado em ambiente anaeróbio, visto este ser microaerofílico.

De cada tubo de 15 mL preparados anteriormente retirou-se 980 µL para 6 *ependorfs* e adicionou-se 20 µL das culturas.

Em seguida, 250 µL das culturas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* LA-5 diluídas foram colocados em orifícios da microplaca estéril (Nunc-Immuno™ plates), e completou-se com uma gota de cortisol, de modo a proporcionar um ambiente anaeróbio. Para as culturas restantes, incluindo LA-5, colocaram-se 300 µL em cada orifício. Por fim, a placa de microdiluição foi colocada no leitor, incubada a 37 °C ao longo de 25 ciclos (25 h). A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 600 nm. Esse procedimento foi realizado em triplicado e repetido duas vezes, fazendo-se os controles necessários.

As curvas de crescimento foram construídas em função das médias aritméticas das leituras de densidade ótica em relação aos intervalos de tempo previamente estabelecidos.

Determinou-se ainda a percentagem de estimulação, calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Percentagem de estimulação} = \frac{(\text{Abs após crescimento com EPS} - \text{Abs controle})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

3.5.2.4 Avaliação do perfil inibitório de biofilmes bacterianos

3.5.2.4.1 Preparação dos inóculos

Para testar a possibilidade do EPS inibir biofilmes produzidos por bactérias, este foi testado com *Pseudomonas aeruginosa*. Este microrganismo estava armazenado em culturas *stock* a -80 °C que foi produzido após crescimento a 37 °C, durante 24 h, em caldo peptonado, fazendo um inóculo forte e pôs-se a incubar a 37 °C durante 24 h. Depois transferiu-se 1 mL deste inóculo para 9 mL de TSB com 1 % de glucose.

3.5.2.4.2 Método microdiluição

Em *ependorfs* colocaram-se 500 µL de EPS com 5 concentrações diferentes (4%, 3%, 2%, 1% e 0,5% (m/v)), juntando a cada um, 490 µL de meio de cultura TSB com 1 % de glucose (m/v) e 10 µL de inóculos de *P. aeruginosa* (ca. 10⁸ CFU ml⁻¹). Depois de agitados no vortex, de cada *ependorf* colocou-se 200 µL das soluções para uma microplaca estéril de

96 poços (Nunc-Immuno™ plates). Esta microplaca foi incubada a 37 °C, durante 48 h. Esse procedimento foi realizado em triplicado e repetido duas vezes, incluindo controle positivo com meio de cultura inoculado com o microrganismo em estudo e controles negativos, usando meio de cultura esterilizado e EPS.

Passadas 48 h, procedeu-se ao teste para verificar se o EPS tem algum perfil inibitório no biofilme produzido pelos microrganismos testados. Para isso, com o auxílio de uma micropipeta num ambiente não estéril, retirou-se toda a solução existente nos orifícios da microplaca e substituiu-se com água da torneira. Seguidamente retirou-se a água e colocou-se álcool 99,9% (v/v) de modo a haver uma melhor aderência. Aguardaram-se 3 min e retirou-se o álcool todo. Posteriormente para ser possível visualizar a existência ou não de biofilme colocou-se 200 µL de cristal violeta deixando atuar por 3 min. O excesso do corante cristal violeta foi retirado com água corrente.

No dia seguinte, após secagem total da microplaca, visualizaram-se e compararam-se os orifícios com as soluções de diferentes concentrações de EPS e os controles. Esta visualização foi feita com base na quantidade de biofilme corado dentro do orifício.

3.5.3 Fração da biomassa

3.5.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para testar a atividade microbiana de cada extrato, começou-se por diluir o extrato em DMSO 4% (v/v) e depois foi filtrado em filtros com porosidade de 0,22 µm.

Os extratos diluídos são então adicionados em *eppendorfs* em diferentes concentrações, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, 0,3% e 0,1% (m/v). Foram também adicionados meio de cultura *Mueller Hinton broth* e culturas bacterianas, nomeadamente *Staphylococcus aureus* metilicina-sensíveis ATCC 6538 (MSSA) e *Salmonella enteritidis* ATCC 3076 (*S. enteritidis*). Posteriormente, cada extrato, microrganismos e meio de cultura foram colocados numa microplaca de 96 poços em duplicado de modo a proceder à sua leitura de Abs ao longo de 25 ciclos (25 h) no leitor de microplacas a 37 °C. Foram lidos também controles de meio MHB, MHB inoculado com microrganismo em estudo e extratos, igualmente em duplicado. Por fim, determinou-se a percentagem de inibição da biomassa segundo a fórmula descrita anteriormente.

3.6 Parâmetros analíticos

3.6.1 Peso seco das amostras

O crescimento das culturas foi estimado por pesagens da biomassa em cadinho, como se descreve de seguida, no início e no final do cultivo, em triplicado, e o peso seco da biomassa calculado pela diferença entre os pesos final e inicial do cadinho. Para a determinação do peso seco das amostras, utilizou-se um filtro AP 25 *Millipore* previamente pesado após secagem na estufa (50 a 105 °C) e também após secagem na mufla (505 °C). Foram utilizados 20 mL do caldo de cultura, ao qual se centrifugou e ao *pellet* extraído juntou-se 10 mL de água destilada com 3,5% de salinidade. Desta solução retiraram-se 4 mL e juntou-se 15 mL de Formiato de amónio (CH_5NO_2). As amostras foram filtradas e os filtros pesados após secagem na estufa e na mufla (Figura 3.8). O uso de CH_5NO_2 permite evitar a interferência do polissacarídeo solúvel, uma vez que ele é parcialmente hidrolisado passando, assim, mais facilmente através do filtro.

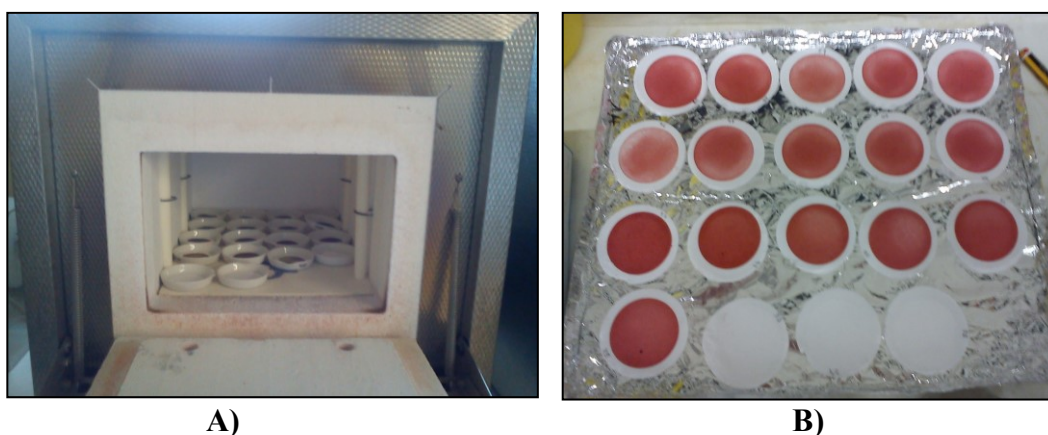


Figura 3.6 Processo de peso seco em filtros de papel. **A)** Cadinhos contendo filtros de biomassa filtrada, numa mufla. **B)** Papel de filtro com biomassa de *P. cruentum*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva de crescimento de *Porphyridium cruentum* em meio NTIP

Este ensaio teve como objetivo estabelecer a curva de crescimento para a microalga *P. cruentum*. Após o crescimento da biomassa procedeu-se à determinação do seu peso seco durante 42 dias (Figura 4.1).

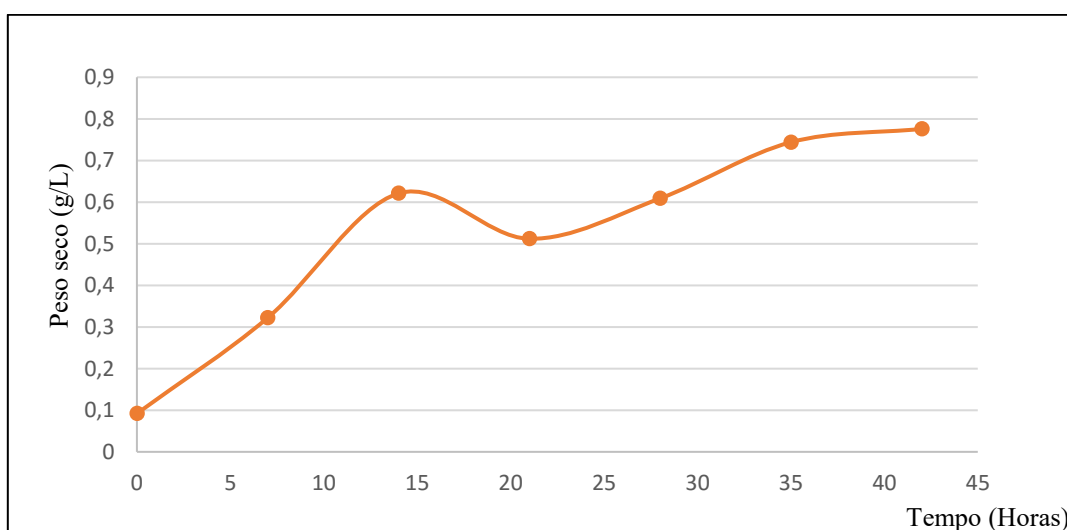


Figura 4.1 Curvas de crescimento da estirpe de *Porphyridium cruentum* obtida pelo método dos pesos secos, em meio de cultura NTIP.

A curva de crescimento obtida no meio de cultura NTIP indica um crescimento exponencial até ao 14º dia, seguindo-se de uma diminuição pouco significativa. Após o 20º dia verificou-se um crescimento menos acentuado que foi monitorizada até ao 42º dia.

4.2 Curva de crescimento de *Porphyridium cruentum* em meio NTIP (controle), NTIP-MgCl₂ e NTIP-MgSO₄

Com o intuito de verificar a influência da concentração de sulfato realizou-se a curva de crescimento em meio NTIP (controle) e meio NTIP suplementado com sulfato de magnésio (0,021 M; NTIP-MgSO₄). Como controle do aumento do catião magnésio, ou seja, de modo a permitir inferir se qualquer variação verificada no crescimento e/ou produção e qualidade de polissacarídeo se deve exclusivamente ao aumento do ião sulfato ou, por outro lado, ao aumento do ião magnésio, realizou-se também a curva de crescimento em meio NTIP suplementado com cloreto de magnésio (0,021 M; NTIP-MgCl₂). Para verificação do crescimento recorreu-se somente ao método dos pesos secos e traçaram-se as curvas de crescimento (Figura 4.2).

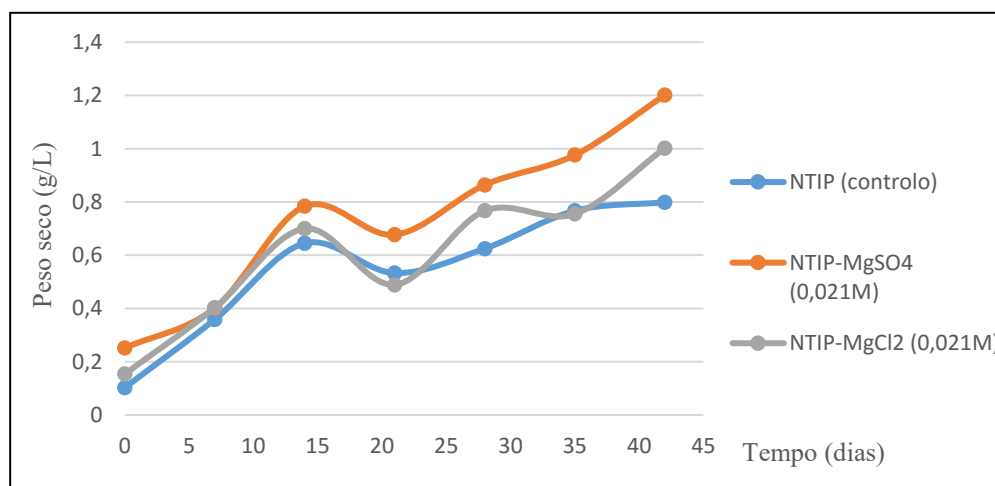


Figura 4.2 Curvas de crescimento da estirpe de *Porphyridium cruentum* obtida pelo método dos pesos secos, em três meios de cultura: meio NTIP (controle), meio NTIP suplementado com sulfato de magnésio (0,021 M) e meio NTIP suplementado com cloreto de magnésio (0,021 M).

De acordo com a Figura 4.2, verifica-se que até ao 14º dia, o perfil de crescimento de *P. cruentum* foi muito semelhante nos três meios. A produção de biomassa apresentou diferenças significativas ao longo dos 42 dias em que decorreu a experiência e, consequentemente, o

meio NTIP-MgSO₄ parece ser o mais indicado. Verifica-se que após o 20º dia o crescimento de *P. cruentum* aumentou significativamente mais na presença do íon sulfato do meio NTIP-MgSO₄ quando comparado com os outros meios. Já o meio com o íon cloreto (NTIP-MgCl₂) embora não tenha uma diferença significativa com o meio controle, verificou-se que houve uma maior produção de biomassa de *P. cruentum*. Assim sendo, no que respeita à produção de biomassa, o meio MgSO₄ parece ser o mais indicado. Segundo Tiquia-Arashiro e Mormile (2013), o catião Mg²⁺ é um fator importante no que diz respeito à atividade enzimática e na produção da clorofila, daí a sua elevada influência no crescimento das microalgas. Estes investigadores observaram que ao aumentarem a concentração de Mg²⁺ no meio, aumentava também significativamente a produção de biomassa de *P. cruentum* e por conseguinte este acumulava maiores quantidades de lípidos. O anião SO₄²⁻ no meio de cultura afetou positivamente o crescimento da microalga quando comparado com MgCl₂. É importante referir que os ésteres de sulfato presentes na microalga são principalmente de glucose e galactose sulfatada (Lupescu *et al.*, 1991) e como afirmado anteriormente, estes grupos sulfato estão relacionados com a atividade antimicrobiana que o EPS possui (Arad e Levy-Ontman, 2010).

4.3 Rendimento/Produtividade

Durante a monitorização do crescimento da microalga verificou-se uma maior viscosidade no meio NTIP suplementado com o íon sulfato, seguido do meio com o íon cloreto e por último verificou-se uma viscosidade mais baixa no meio NTIP. Segundo Ramus (1972) e Medcalf e colaboradores (1975), o polissacarídeo próximo da membrana é qualitativamente idêntico ao solubilizado no meio. Assim, e considerando que se trata de um polissacarídeo de elevada viscosidade (Savins, 1978 e Ramus *et al.*, 1989) pode atribuir-se este aumento da viscosidade à solubilização do biopolímero da membrana celular no meio de cultura. A determinação do rendimento de extração de EPS permitiu confirmar esta observação (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Rendimento da extração de EPS das culturas crescidas nos meios NTIP, NTIP suplementado com sulfato de magnésio (0,021 M) e NTIP suplementado com cloreto de magnésio (0,021 M).

Meio de cultura	Massa (g)	Volume suspensão (L)	mEPS / Vsuspensão (g/L)
NTIP (controlo)	0.766	1.650	0.464
NTIP-MgSO ₄ (0,021 M)	1.170	1.650	0.709
NTIP-MgCl ₂ (0,021 M)	0.992	1.650	0.601

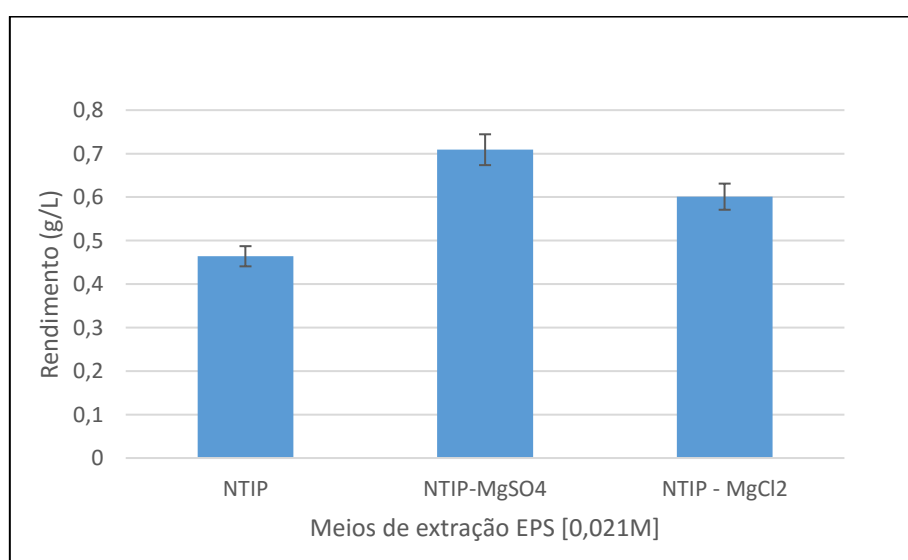


Figura 4.3 Rendimento da extração de EPS das culturas crescidas nos meios NTIP, NTIP suplementado com MgSO₄ e NTIP suplementado com MgCl₂, nas concentrações de 0,021 M.

A extração do EPS foi realizada durante 45 dias em cada meio. Tendo em conta os rendimentos obtidos, verifica-se que para a mesma concentração, 0,021 M, o meio NTIP suplementado com MgSO₄ obtém uma maior produtividade de biomassa e de polissacarídeo. O meio NTIP-MgCl₂ obteve um rendimento maior que o meio NTIP no entanto parece que o

ião cloreto não afeta significativamente na produção de EPS, quando equiparado com o ião sulfato. O aumento verificado no rendimento da extração no meio com o ião sulfato aponta que o meio NTIP-MgSO₄ é o mais indicado.

4.4 Avaliação de atividades biológicas

A atividade antimicrobiana do *Porphyridium cruentum* foi testada através do EPS e da biomassa.

4.4.1 Fração do exopolissacarídeo (EPS)

A atividade antimicrobiana do polissacarídeo foi testada para diversas estirpes microbianas, nomeadamente: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Microsporum canis*, *Tricophyton rubrum*, *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.* e *Candida albicans*.

4.4.1.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

O método utilizado foi o das diluições em meio líquido e foi realizado em duplicado para todos os ensaios. Para estes ensaios utilizou-se o EPS em meio NTIP-MgSO₄ (0,021 M) numa concentração de 4%, 3%, 2%, 1% e 0,5% (m/v).

Os microrganismos utilizados foram: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

O EPS usado neste estudo, em diferentes concentrações, apresentou uma inibição sobre o crescimento de alguns microrganismos, em percentagem, que variou de valores negativos a 100%, na última hora das 24 h de incubação. Nos resultados apresentados de modo a diminuir a probabilidade de interferências foram subtraído os valores de absorvância do EPS.

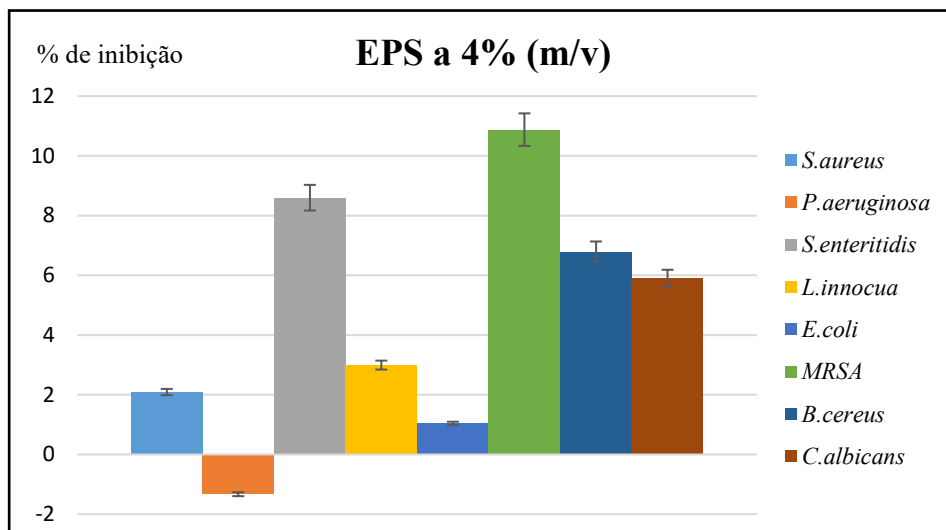


Figura 4.4 Percentagem de inibição às 24 h de crescimento microbiano, por EPS na concentração de 4% (m/v).

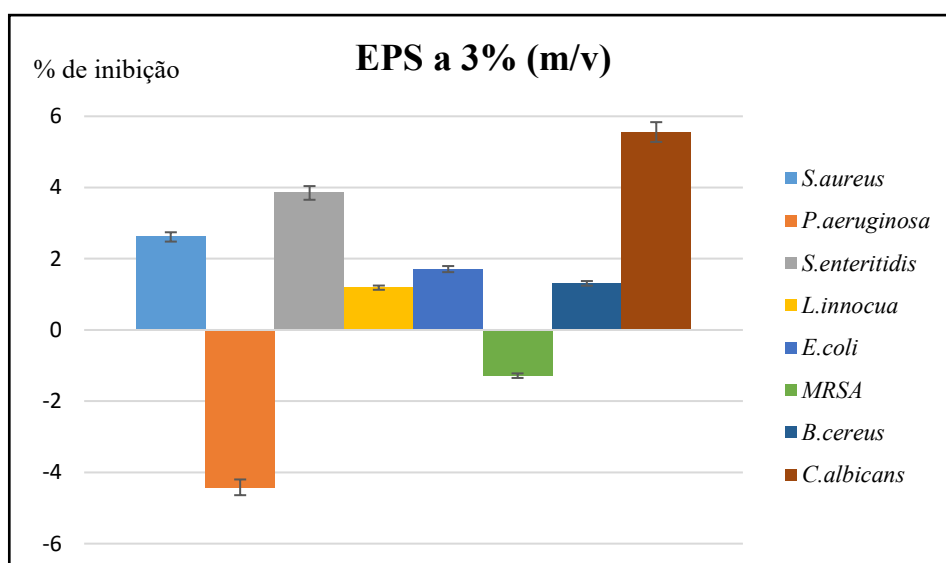


Figura 4.5 Percentagem de inibição às 24 h de crescimento microbiano, por EPS na concentração de 3% (m/v).

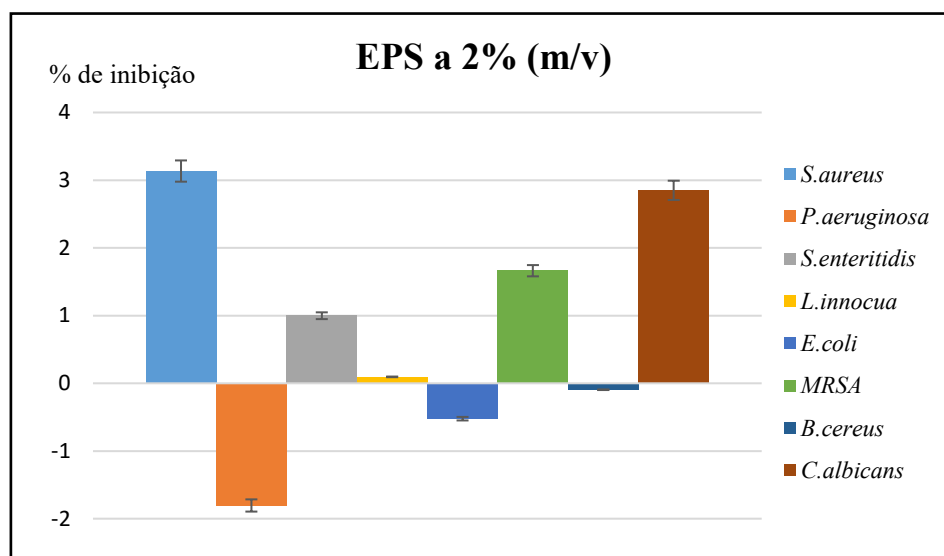


Figura 4.6 Percentagem de inibição às 24 h de crescimento microbiano, por EPS na concentração de 2% (m/v).

Foi constatado que o EPS numa concentração de 4% (m/v), com o atual grau de purificação exerce uma maior atividade inibidora nas 24 h de incubação, embora que pouco acentuada, para a maioria dos microrganismos, atingido um máximo de ~11% para *MRSA*, seguido de dois *Gram* negativos, *S. enteritidis* (~9%) e *E. coli* (~7%) e da levedura *C. albicans* (~6%).

Relativamente à *Pseudomonas aeruginosa* não se observou qualquer inibição em nenhum meio na presença de EPS. É importante realçar também que à medida que diminui a concentração de EPS a percentagem de inibição de *S. aureus* aumenta.

Testou-se ainda para concentrações de EPS a 1% e 0,5% (m/v), em que houve apenas inibição de *MRSA* na presença de 1% (m/v) de EPS e inibição pouco acentuada de *S. enteritidis*, *E. coli* e *B. cereus* na presença de 0,5 % (m/v) de EPS. Estes resultados vão ao encontro do do estudo de Raposo e colaboradores (2014), em que mostraram que EPS a 1% (m/v) inibiu 19% de unidades formadoras de colónias de *S. enteritidis* e que para *S. aureus* e *E. coli* revelou ser menos sensível. Yamashita *et al.*, (2001), já tinha mostrado que as carrageninas, polissacárido semelhante ao de *P. cruentum*, apresentava efeitos inibitórios sobre o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *S. enteritidis*. As diferentes reações dos microrganismos face a diferentes extratos e respetivas concentrações pode ser explicada pela diversidade da maquinaria enzimática que pode hidrolisar o EPS e utilizar alguns dos

açúcares. Michael *et al.*, (2002) refere que a composição da parede celular dos microrganismos, a ausência de estruturas específicas ou a possibilidade dos microrganismos mudarem a estrutura química do polissacarídeo, são fatores importantes para explicar a diversidade no efeito inibitório deste EPS face aos microrganismos estudados.

Estes resultados podem sugerir que a viscosidade do meio pode ser um dos fatores importantes no que diz respeito à inibição dos microrganismos. Verifica-se que à medida que aumenta a percentagem de EPS, aumenta também a viscosidade do meio e por conseguinte como este retém mais água reduz a mobilidade dos microrganismos, podendo levar à sua inibição.

Os diferentes comportamentos das várias bactérias estudadas ao EPS indicando diferentes atividades antibacterianas, podem ser devidos, de acordo com vários autores, à composição da parede celular bacteriana, à ausência de uma estrutura específica na bactéria, ou também à capacidade das bactérias de mudar a estrutura química do EPS (Michael *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos permitem sugerir que o EPS de *Porphyridium cruentum* tem potencialidade para ser considerado um antibacteristático natural. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados de caracterização química, toxicológica, e farmacológica deste EPS, visando garantir o seu uso racional, permitindo até mesmo aumentar a sua atividade inibidora.

4.4.1.2 Avaliação da atividade fungicida

A concentração fungicida mínima foi determinada com base na metodologia de Santurio *et al.* (2007). Nas microplacas inoculadas com os Fungos *M. canis* e *T. rubrum* verificou-se que em todos os poços apresentavam crescimento fúngico visível (Figura 4.7) o que significa que o EPS não apresentou atividade antifúngica no método de microdiluição testado.

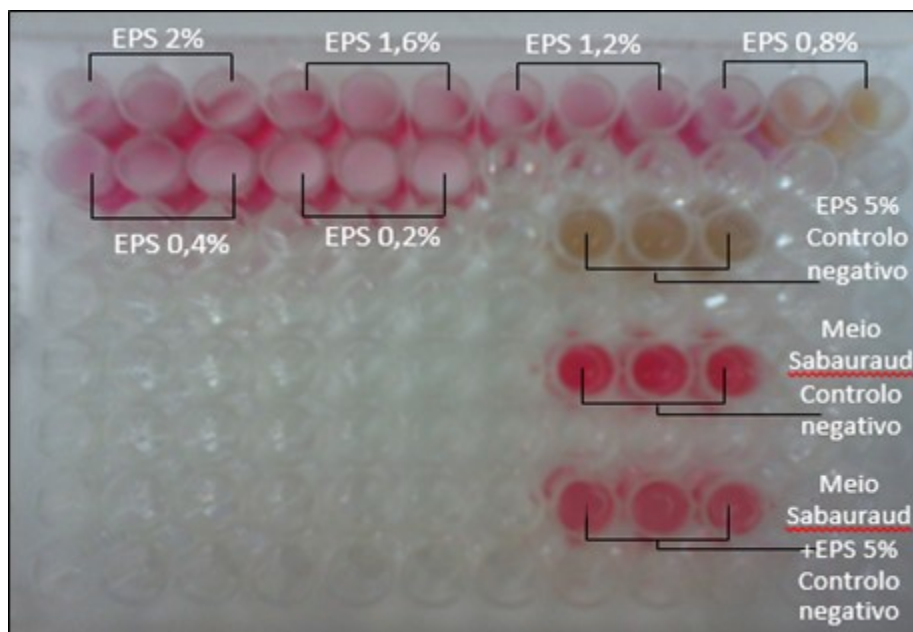


Figura 4.7 Visualização do crescimento fúngico em microplaca na presença de diferentes concentrações de EPS (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 e 2% (m/v)).

Este facto pode ser devido ao elevado PM do EPS que pode não se ter dissolvido no meio de agar. Uma vez que foram observadas algumas dificuldades na dissolução deste em água é possível que a sua dissolução em meio sólido não se verifique. Este também é um teste em que a leitura dos resultados, pois uma leitura de inibição não completa, não permite uma fácil quantificação.

4.4.1.3 Avaliação do perfil prebiótico

De modo a avaliar o perfil prebiótico do EPS foram testadas 9 espécies de bactérias prebióticas. Estas bactérias foram testadas em meio MRS com 1% de glucose e sem glucose. Durante 36 h verificou-se que todas as bactérias juntamente com EPS em meio com glucose apresentavam um crescimento exponencial seguida de uma fase estacionária quando comparadas com os seus crescimentos em meio sem glucose.

É importante referir que em todos os dados foi retirado o valor da Abs relativa apenas ao EPS, eliminando assim qualquer interferência deste.

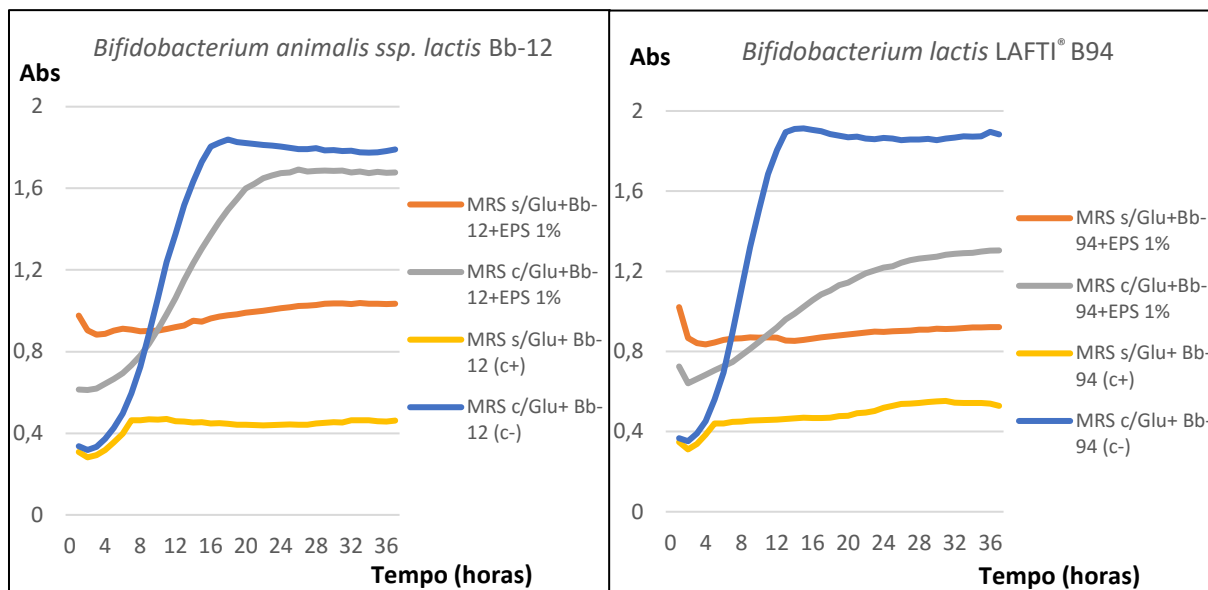


Figura 4.8 Curvas de crescimento de *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb-12® na presença e ausência de EPS a 2% (m/v) (A) e *Lactobacillus lactis* LAFTI® B94 na presença e ausência de EPS a 2% (m/v) (B).

Relativamente às bactérias da espécie *Bifidobacterium*, Bb-12 e B94 (Figura 4.8), verificou-se que em meio com glucose quando se colocou EPS, houve um menor crescimento destas quando comparado com o controlo. Este comportamento verificou-se de igual forma para *Lactobacillus acidophilus* LAFTI® L10, *Lactobacillus casei* 431® e *Lactobacillus brevis* D24. O *Lactobacillus* LA-5® como é um microrganismo aeróbio e anaeróbio testou-se nas duas condições e verificou-se que em aerobiose no meio com glucose e com EPS o microrganismo tem um maior crescimento quando comparado com o controlo, obtendo uma percentagem de estimulação de 19%. Já em anaerobiose verificou-se a mesma situação da espécie *Bifidobacterium*.

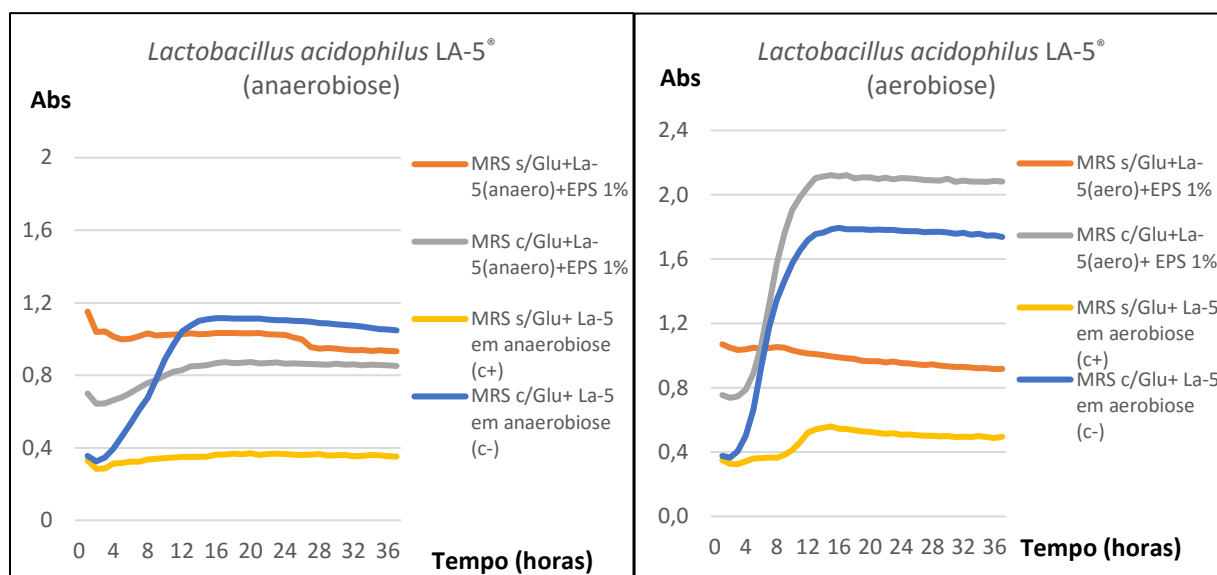


Figura 4.9 Curvas de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® na presença e ausência de EPS a 2% (m/v), em anaerobiose (A) e em aerobiose (B).

Quanto ao *Lactobacillus plantarum* D36 verificou-se que em meio com glucose, a adição do EPS aumentou ligeiramente o seu crescimento, obtendo-se uma % estimulação de 5%, quando comparado com o controlo.

O *Lactobacillus acidophilus* Ki foi o que obteve maior crescimento em meio com glucose com adição de EPS quando comparado com o controlo, obtendo assim uma % estimulação de 22%.

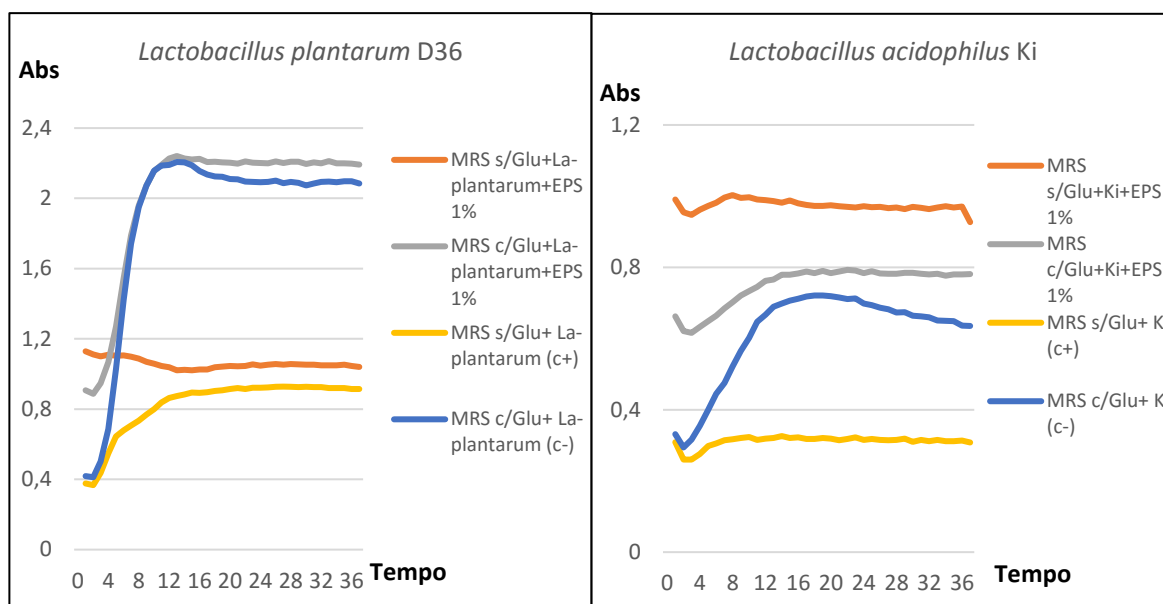


Figura 4.10 Curvas de crescimento de *Lactobacillus plantarum* D36 na presença e ausência de EPS a 2% (m/v) (A) e *Lactobacillus acidophilus* Ki na presença e ausência de EPS a 2% (m/v) (B).

Verificou-se assim, que todas as espécies de bactérias probióticas estudadas apresentavam maior crescimento quando colocadas em meio com glucose do que sem glucose, o que é normal pois a glucose é o açúcar de mais fácil assimilação e metabolização. Para as bactérias lácticas *Lactobacillus plantarum* D36, *Lactobacillus acidophilus* LA-5® em condições aeróbias e *Lactobacillus acidophilus* Ki, a adição do EPS permitiu que estas revelassem um crescimento superior quando comparadas com o seu controlo, permitindo assim obter percentagem de estimulação de ~5%, ~19% e ~22%, respetivamente. Contudo, a % de EPS apenas foi testado a 1%, o que pode condicionar os resultados, já que com compostos mais puros é comum usar concentrações de 2 a 3%.

Altieri *et al.* (2005) constatarem com um polissacarídeo semelhante ao EPS, a quitosana, um pequeno estímulo em relação à multiplicação de bactérias ácido-láticas, em queijo mozzarella, sem comprometer a funcionalidade tecnológica exercida a este produto. Outro estudo, de Martinez-Castellanos *et al.* (2007) reportou que *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *Lactobacillus* sp. podem ser impregnados em películas de quitosana conservando a sua viabilidade mesmo em concentrações elevadas deste polissacarídeo (20 g/L). Sendo assim, o uso de biofilmes de EPS associado a bactérias lácticas é um grande potencial, visto

que *Lactobacillus*, para além de ser um importante prebiótico, produz também ácido láctico e outros compostos que inibem o desenvolvimento de microrganismos patogénicos. Assim a criação de filmes ou revestimentos com este EPS para aplicar na superfície de alimentos, que possam veicular *Lactobacillus* para *in situ* inibir potenciais patogénicos ou contaminantes, pode ser uma das aplicações relevantes para o nosso EPS.

4.4.1.4 Avaliação do perfil inibitório de biofilmes bacterianos

Alguns microrganismos têm a capacidade de viver em condições extremas pois possuem estruturas complexas, denominadas biofilmes, formadas por agregados celulares únicos e/ou multiespécies (Costeron *et al.*, 1987). Esta capacidade permite que o microrganismo mude a sua estrutura de acordo com as condições, devido à regulação genética e padrões que fornecem flexibilidade (Stoodley *et al.*, 2004). Estas estruturas são muito importantes para que haja uma disseminação do microrganismo patogénico pois implicam a aderência a uma superfície e conseqüentemente a sua propagação (Meira *et al.*, 2012). Como tal, o estudo da inibição da formação de biofilmes pelo EPS de *P. cruentum* torna-se uma particularidade importante.

Este procedimento é baseado na inspeção visual dos resultados, o que implica a ocorrência de possíveis falsos negativos, pois bactérias com capacidades fracas de produção de biofilme podem não ser visíveis. Stepanovic *et al.*, (2004) mostrou que é possível que os nutrientes fornecidos pelo meio *Muller-Hinto broth*, particularmente quando suplementados com glucose, podem ser responsáveis pela falta de formação de biofilme (Elhariry, 2011).

Neste estudo não se verificou nenhuma atividade de antibiofilme por parte do EPS quando este foi testado com *P. aeruginosa* (Figura 4.11).

Considerando a importante relação do mecanismo de antibiofilmes e a membrana das bactérias, é provável que as diferenças estruturais a parede celular de bactérias sejam pelo menos parcialmente responsáveis pela ausência de atividade (de Paz *et al.*, 2010).

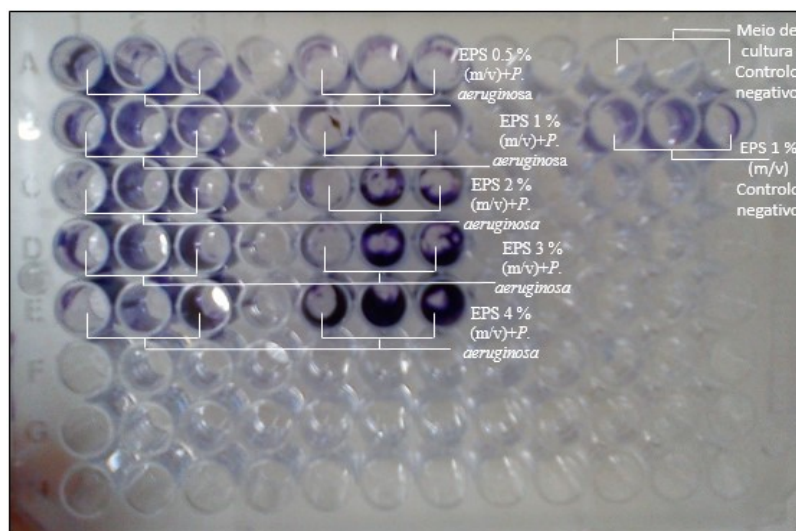


Figura 4.11 Avaliação do perfil inibitório de biofilme em microplaca inoculada com *P. aeruginosa* e EPS com concentrações de 0.5, 1, 2, 3 e 4 % (m/v) e respectivos controlos.

4.4.2 Fração de Biomassa

A atividade antimicrobiana da biomassa de *P. cruentum* foi testada para as estirpes: *Staphylococcus aureus* metilino sensíveis (MSSA) e *Salmonella enteritidis*.

4.4.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

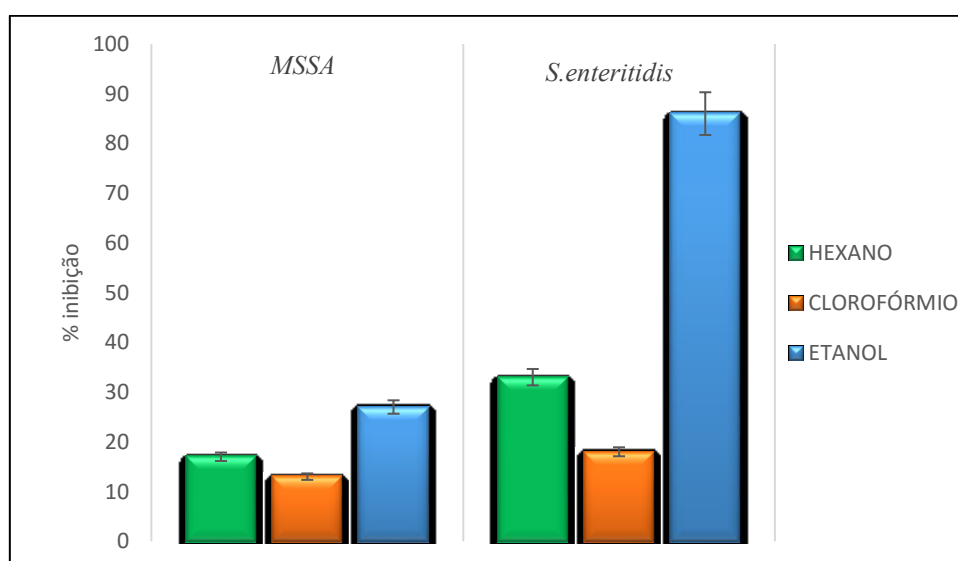


Figura 4.12 Percentagem de inibição às 24 h de crescimento microbiano, por fração de biomassa de *P. cruentum* em extrato de hexano, clorofórmio e etanol.

Os extratos da microalga *P. cruentum* foram fracionados com solventes orgânicos: hexano, clorofórmio e etanol e apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. enteritidis* e *MSSA*. O etanol como possui uma maior polaridade (Figura 4.12), significa que extrai mais constituintes da biomassa e por conseguinte estes constituintes, como ácidos gordos, podem ser os responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano. De acordo com Cowan (1999), a atividade antimicrobiana de substâncias fenólicas pode estar ligada à capacidade que estas possuem de complexarem-se a proteínas extracelulares da membrana bacteriana, provocando a sua morte.

5 CONCLUSÃO

A microalga *Porphyridium cruentum* estudada ao longo deste trabalho foi selecionada devido à sua capacidade de produzir, em condições conhecidas, elevadas quantidades de EPS que segundo Huheihel *et al.*, (2002), Talyshinsky *et al.*, (2002) e Bao *et al.*, (2001), possui atividade antimicrobiana e anti-viral contra diversos patogénicos. Ao iniciar este trabalho já era conhecida esta sua capacidade biossintética em condições de cultura padronizada para outras estirpes, tendo sido preliminarmente caracterizada a composição do EPS produzido em termos de açúcares principais (galactose, glucose e arabinose).

No âmbito deste trabalho foi possível estabelecer uma curva típica de crescimento e produção de EPS. A otimização do processo permitiu concluir que o método de pesos secos revelou ser o indicado para monitorizar o crescimento das culturas de microalgas de *P. cruentum* em diferentes meios.

Ao longo deste trabalho experimental verificou-se que as aplicações biotecnológicas dos EPS são limitadas devido aos problemas relacionados com as suas propriedades reológicas como, por exemplo, a viscosidade que dificulta o preparo de soluções concentradas mais homogêneas. A viscosidade destas soluções, varia de acordo com alguns fatores físico-químicos, como pH, temperatura, concentração do EPS, massa molecular, solubilidade (Cunha, 2009). Segundo Ramus (1972) e Medcalf e colaboradores (1975) o polissacarídeo contíguo à membrana é qualitativamente idêntico ao solubilizado no meio. Assim, e considerando que se trata de um polissacarídeo de elevada viscosidade (Savins J. G., 1978 e Ramus, J. *et al.*, 1989) pode atribuir-se este aumento de viscosidade à solubilização do biopolímero da membrana celular no meio de cultura. No entanto, para confirmar esta situação seria necessário recorrer a análises reológicas o que permite avaliar a variação da viscosidade de acordo com os diferentes meios de cultura.

A otimização da produção de polissacarídeos está baseada na influência do meio de cultura. Deste modo, pretendeu-se testar diferentes meios de cultura e avaliar o seu impacto na quantidade e qualidade do polissacarídeo produzido. O meio de cultura NTIP foi selecionado por ser um meio ideal para uma aclimatização de espécies que leva a uma estabilização da microalga sem grandes alterações bruscas o que mantém as culturas ativas mas sem o intuito de induzir um crescimento mais ativo.

Relativamente à otimização do crescimento de *P. cruentum*, os resultados obtidos indicaram que NTIP-MgSO₄ [0,021 M] afeta positivamente o crescimento e a produção de

polissacarídeo em relação aos meios NTIP (controle) e meio NTIP-MgCl₂. Durante a monitorização do crescimento da microalga nestes meios, foi notória que o meio com sulfato de magnésio aparentemente apresentava uma maior viscosidade, seguido do meio com cloreto de magnésio e, por fim, o meio NTIP (controle).

Relativamente ao estudo da capacidade antimicrobiana, verificou-se que nas percentagens de EPS estudadas alguns dos microrganismos mostraram inibição, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*. Na concentração testada mais elevada (4%), verificaram-se percentagens de inibição mais elevadas para MRSA (~11%), seguido de *S. enteritidis* (~9%), *E. coli* (~7%) e *C. albicans* (~6%). Em todas as concentrações de EPS testadas, *P. aeruginosa* foi o único microrganismo que não apresentou qualquer inibição. Ainda assim, seriam necessários mais ensaios acerca destes microrganismos em relação ao EPS de modo a alcançar explicação mais conclusivas.

O crescimento bacteriano foi baseado em leituras de absorvância, e embora se tenha subtraído o valor de Abs do EPS nos resultados, a sua elevada viscosidade pode ainda assim ser um fator que influencie os mesmos. Por isso seria mais viável que a percentagem de inibição fosse calculada utilizando o método de contagem de células viáveis em vez do método de microdiluição em microplaca.

Nos ensaios de atividade antifúngica, no método de microdiluição testado, verificou-se que em todos os poços da microplaca os crescimentos fúngicos de *M. canis* e *T. rubrum* eram visíveis, concluindo-se assim que para este método o EPS não apresentou atividade antifúngica.

O perfil prebiótico do EPS revelou um grande interesse pois verificou-se que as bactérias lácticas *Lactobacillus plantarum* D36, *Lactobacillus acidophilus* LA-5® em condições aeróbias e *Lactobacillus acidophylus* Ki obtiveram percentagem de estimulação de ~5%, ~19% e ~22%, respetivamente, o que sugere a impregnação de EPS em alimentos com prebióticos, tal como realizada com outro polissacarídeo semelhante, a quitosana.

P. aeruginosa foi relatada em estudos anteriores por ser uma bactéria com elevada capacidade de produzir biofilmes e, consequentemente, os resultados observados para essas bactérias poderiam ser esperados (Arciola *et al.*, 2012 e Huang *et al.*, 2009). Para averiguar se o EPS possuía alguma atividade antibiofilme bacteriano testou-se em microplaca e verificou-se que o EPS não possui atividade antibiofilme para esta bactéria, que também pode estar relacionada com a sua ausente inibição antimicrobiana sobre este microrganismo.

Relativamente à fração da biomassa, pode concluir-se que os extratos da microalga *P. cruentum* fracionados com solventes orgânicos: hexano, clorofórmio e etanol, apresentaram

atividade antibacteriana frente a *MSSA* e *S. enteritidis*, tendo este último apresentado uma percentagem de inibição maior quando fracionado com etanol (~86%).

O período proposto para este projeto revelou ser insuficiente para a obtenção de resultados conclusivos, pois devido à literatura pouco aprofundada em relação às diversas atividades biológicas testadas com *P. cruentum*, tornou mais difícil selecionar quais os microrganismos em estudo e de que modo poderia o EPS atuar.

Podemos concluir que tanto o EPS como a biomassa de *P. cruentum* se distinguiram deste trabalho pelo interessante potencial em diversas atividades biológicas apresentadas que estão de acordo com alguns estudos já realizados. No entanto, muito trabalho resta ainda por realizar em particular o teste deste EPS e da biomassa noutras atividades biológicas possíveis.

6 PERSPETIVAS FUTURAS

Durante as suas primeiras fases de crescimento, as algas são extremamente sensíveis às variações externas, tais como: intensidade da luz, variações de temperatura, níveis de oxigenação e fenómenos de competição. E por isso, a continuação da otimização de métodos de cultivo, de forma a avaliar não só a produtividade das algas para estes métodos de cultivo mas também para determinar qual a melhor forma (método de cultivo/estágio do ciclo de vida) para obter maiores concentrações de biocompostos de interesse, no caso, polissacarídeos sulfatados.

A fim de compreender completamente os diferentes usos e aplicações dos polissacarídeos extracelulares, devem ser tidos em conta também a estrutura e as características físico-químicas, nomeadamente propriedades reológicas, e peso molecular, uma vez que estes parâmetros parecem ser relevantes para a sua função e comportamento. Por exemplo, como Geresh e colaboradores (1991) relataram que a caracterização do EPS de *Porphyridium* depende de vários fatores, tais como, o número de açúcares, a resistência do biopolímero à digestão enzimática, o peso molecular elevado e a viscosidade. Segundo Eteshola (1998), quanto maior for a concentração de $MgSO_4$, menor é a viscosidade do EPS, o que pode ser explicado pela diminuição das dimensões das cadeias como resultado das repulsões eletrostáticas intra-cadeias, e por isso seria importante verificar para diferentes concentrações de meio, visto que a viscosidade do EPS foi um fator com influência nos resultados obtidos.

Relativamente à extração do EPS pode revelar-se necessária a introdução de mais passos de purificação que poderão passar por filtração molecular em coluna de Sepharose CL-6B.

O mecanismo pelo qual o EPS e a biomassa de *P. cruentum* inibem o crescimento de certos microrganismos, ainda não está bem esclarecido e por isso seria interessante dar seguimento a uma variedade de testes que poderiam ser realizados em continuação a este projeto para testar as diferentes bioatividades destas frações de *P. cruentum*, tais como: testar a capacidade antioxidante – utilizando as técnicas de DPPH ou FRAP e realização de estes anti-inflamatórios e anti-tumorais.

Seria importante determinar o grau de inibição pela enumeração de microrganismos de modo a se poder determinar com maior precisão a percentagem de inibição que o EPS e/ou a

biomassa de *P. cruentum* possuem, pois dado as baixas taxas de inibição o método em microplaca não assegura a melhor qualidade de resultados.

7 BIBLIOGRAFIA

A

- Abalde, J. *et al.* 1995. Microalgas: cultivo e aplicaciones. España: Universidade da Coruña, **26**: 210.
- Altieri, C., Scrocco, C., Sinigaglia, M., Del Nobile, M.A. 2005. *J. Dairy Sci.* **88**: 2683
- Antelo, F.S., Anschau, A.; Costa, J.A.V.; Kailil, S.J. 2010. Extraction and Purification of Chycocyanin from *Spirulina platensis* in Conventional and Integrated Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **21**(5): 921-926.
- Arad, (Malis) S. 1988. Production of sulphated polysaccharides from red unicellular algae. In: Algal biotechnology (Eds. Stadler, T., Mollion, J., Verduzet, M.C.), Elsevier, Applied Science, London. pp. 65–87.
- Arad (Malis), S., Levy-Ontman, O. 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Curr Opin Biotechnol* **21**: 358-364.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., Costerton, J. W. 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* **33**(26): 5967-5982.
- Ascencio, F., Fransson, L.A., Wadström, T. 1993. Afinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *Journal of Medical Microbiology* **38**: 240-244.
- Aspinall G. O. 1979. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: The biochemistry of plants (Eds. Preiss, J.) Academic Press, New York, pp.473-500.

- Bao, X. K., Liu, C., Fang, J., Li, X. 2001. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) *Carbohydrate Research* **332**: 67-74.
- Baba, M., Schols, D., De Clereq, E., Pauwels, R., Nagy, M., Györgyi-Edelínyi, J., Löw, M., Görog, S. 1990. Novel sulfated polymers as highly potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication and giant cell formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 134-138.
- Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N. 2008. Wound healing dressings and drug delivery systems. *Review. J. Pharm. Sci.* **97**: 2892–2923.
- Boisson-Vidal, C., Haroun, F., Ellouali, M., Blondin, C., Fischer, A. M., Agostini, A., Jozefonvicz, J. 1995. Biological activities of polysaccharides from marine algae. *Drugs of the Future* **20**: 1237-1249.
- Borowitzka, M.A. 1993. Products from microalgae. *Infofish International* **5**: 21-26.
- Bohn, J.A., BeMiller, J.N. 1995. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* **28**: 3-14.
- Brevet d’Invention da République Française. 1989. BOPI «Brevets» n°14 du 7 Avril
- Brody, M., Vatter, E. 1959. Observations on cellular structures of *Porphyridium cruentum*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **5**(2), 289–94. [Online] Disponível na Internet: <https://doi.org/10.1083/jcb.5.2.289> [Data de acesso: 25/1/2017].
- Bruno, J.J. 2001. Edible microalgae: a review of the health research. *Pacifica: Center for Nutritional Psychology* **3**: 56.

C

- CCALA (Culture collection of Autotrophic Organisms). 2013. “Porphyridium cruentum”. [Online] Disponível na Internet: <http://ccala.butbn.cas.cz/cs/node/13643> [Data de acesso: 24/5/2017].
- Certik, M., Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**(1): 1-14.
- Chácon-Lee, T.L., González-Mariño, G.E. 2010. Microalgae for “healthy” foods-possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety* **9**: 256-264.
- Chatelet, C., Damour, O., Domard A. 2001. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **22**: 261-268.
- Clescers, L. S., Eaton, A. D., Greenberg, A. E. 1998. Standard Methods for the Examination of water and wastewater, 20th edition. APHA, AWWA, WEF.
- Costeron, J.W., Cheng, K.J., Geesu, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology* **41**:435-464.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol.* **12**: 564 – 582.
- Cunha, P. L. R., De Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A. 2009. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor económico. *Química. Nova* **32**(3): 649-660.

D

- Damonte, E. B., Matulewicz, M. C., CEREZO, A.S. 2004. Sulphated seaweed polysaccharides as antiviral agentes. *Curr Med Chem* **11**(18): 2399-2419.

- de Paz, L. E. C., Bergenholtz, G., Svensäter, G. 2010. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *Journal of Endodontics* **36**(1): 70-77.
- Derner, R. B., Ohse, M., Villela, S. M., de Carvalho, Fett, R. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural* **36**(6): 1959-1967.
- Devillé, C., Gharbi, M., Dandrifosse, G., Peulen, O. 2007. Study on the effects of laminarin, a polysaccharide from seaweed, on gut characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 1717–1725.
- Dewapriya, P., Kim, S. 2014. Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. *Food Research International* **56**: 115-125.
- Dhar, A. 2017. Overview of bacterial skin infection - Merck Manuals. [Online] Disponível na Internet: <http://www.merckmanuals.com/home/skin-disorders/bacterial-skin-infections/overview-of-bacterial-skin-infections> [Data de acesso: 20/01/2017]
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Schorr-Galindo, S. 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* **87**: 951-962.
- Dvir, I., Stark, H. A., Chayoth, R., Madar, Z., Arad (Malis), S. 2009. Hypocholesterolemic Effects of Nutraceuticals Produced from the Red Microalga *Porphyridium sp* in Rats. *Nutrients*. **1**: 156-167.
- Dvir, I., Chayoth, R., Sod-Moriah, U., Shany, S., Nyska, A., Stark, H. A., Madar, Z., Arad (Malis), S. 2000. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium sp.* alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *British Journal of Nutrition* **84**: 469-476.

E

- Elhariry, H. M. 2011. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. *Food Microbiology* **28**(7): 1266-1274.
- Eteshola, E., Gottlieb, M., Arad (Malis), S. 1996. Dilute solution viscosity of red microalga exopolysaccharide. *Chem. Eng. Sci.* **51**(9): 1487-1494.
- Eteshola, E., Karpasas, M., Arad (Malis), S., Gottlieb, M. 1998. Red microalga exopolysaccharides: Study of the rheology, morphology and thermal gelation of aqueous preparations. *Acta Polymers* **49**: 549-556.

F

- Fábregas, J., Patriño, M., Morales, E. D., Dominguez, A., Otero, A. 1996. Distinctive control of metabolic pathways by *Chlorella* autotrophic in semicontinuous culture, *Canadian Journal of Microbiology* **42**(11): 1087.
- Franke, H. 1994. Polyunsaturated fatty acids from microalgae. *International food ingredients* **4**: 46-52.
- Friedman, O., Dubinsky, Z., Arad (Malis), S. 1991. Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green *Rhodophyta* unicells. *Bioresour. Technology* **38**: 105-110.

G

- Garcia, I. R., Guerrero, J. L. G. 2008. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgae species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry* **108**: 1023-1026.
- Gardeva, E., Toshkova, R., Minkova, K., Gigova, L. 2009. Cancer protective action of polysaccharide, derived from red microalga *Porphyridium cruentum* - a biological background. *Biotechnol. & Biotechnol* **23**: 783-78.

- Geresh, S., Adin, I., Yarmolinky, E., Karpasas, M. 2002. Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium sp.*: molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydrate Polymers* **50**: 183-189.
- Geresh, S. Arad (Malis), S. 1991. The extracellular polysaccharide of the red microalgae: Chemistry and Rheology. *Biores Technol* **38**:195-201.
- Gloaguen, V., Ruiz, G., Morvan, H., Mouradi-Givernaud, A., Maes, E., Krausz, P., Strecker, G. 2004. The extracellular polysaccharide of *Porphyridium sp.*: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydrate Research* **339**: 97-103.
- Grobbelaar, J.U. 2004. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. *South African Journal of Botany* **70**(1): 140-144.
- Guiry, M. D., Guiry, G. M. 2017. AlgaeBase. *World-wide electronic publication, National University of Ireland Galway* [Online]. Disponível na Internet: <http://www.gbif.org/species/2653975> [acedido a 2/10/216].
- Guo, J. H., Skinner, G. W., Harcum; W. W., Barnum, P. E. 1998. Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers. *Pharmaceutical science & technology today* **1**(6): 254-261.

H

- Hansen, J., Sato, M., Glascoe, J., Ruedy, R. 1998. A common sense climate index: Is climate changing noticeably. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 4113-4120.
- Haroun-Bouhedja, F., Elloualli, M., Siquin, C., Boisson-Vidal, C. 2000. Relationship between Sulfate Groups and Biological Activities of Fucans. *Thrombosis Research* **100**: 453-459.

- Hasui, M., Matsuda, M., Okutani, K., Shigeta, S. 1995. *In vitro* antiviral activities of sulphated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped virus. *Int J Biol Macromol* **17**(5): 293-297.

- Heaney-Kieras, J., Roden, L., Chapman, D. J. 1976. The covalent linkage of protein to carbohydrate in the extracellular protein-polysaccharide from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochem. J.* **165**: 1-9.

- Heikens, E., Bonten, M. J. M., Willems, R. J. L. 2007. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of Bacteriology* **189**(22): 8233-8240.

- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food by products, algae and microalgae a review. *Food Chemistry*. **98**: 136-148.

- Huang, C.Y., Hsieh, S.P., Kuo, P.A., Jane, W.N. Tu, J., Wang, Y.N., Ko, C.H. 2009. Impact of disinfectant and nutrient concentration on growth and biofilm formation for a *Pseudomonas* strain and the mixed cultures from a fine papermachine system. *International Biodeterioration & Biodegradation* **63**(8): 998-1007.

- Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad (Malis), S. 2002. Activity of *Porphyridium* sp. Polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J. Biochem. Biophys. Methods* **50**: 189-200.

- Hwan Su Yoon, K. M., Müller, R. G., Sheath, F. D. 2006. Defining the major lineages of red algae (*Rhodophyta*). *Journal of Phycology* **42**: 482-492.

J

- Jourdan, J.P. 1996. Cultivez votre spiruline – manuel de culture artisanale [Online]. Disponível na Internet <http://www.spirulinasource.com/cultivez> [acedido a 2/11/216].

K

- Khor, E., Lim, L.Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **24**: 2339-2349.
- Kirk, E.A., Behrens, P.W. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology* **35**: 215-226.

L

- Lau, M. J., Mcneil, M., Darvill, G., A., Albersheim, P. 1987. Selective degradation of the glycosyluronic acid residues of complex carbohydrates by lithium dissolved in ethylenediamine. *Carbohydrate Research* **168**: 219-243.
- Leman, J. 1997. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. *Advances in Applied Microbiology* **51**: 195-243.
- Lourenço, S. O. 2006. Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações. Rima Editora, São Carlos, SP **606**: 158-168.
- Lupescu, N., Geresh, S., Arad (Malis), S., Bernstein, M., Glaser, R. 1991. Structure of some sulphated sugars isolated after acid hydrolysis of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium sp.* unicellular red alga. *Carbohydr Res* **210**: 349-52.

M

- Martinez-Castellanos G, Diaz-Sobac R, Perez Flores L, Shirai K “Viabilidad de bacterias lacticas en pelculas de quitosano para su aplicación en alimentos”. En: Resumos do *IV Simposio Íbero-americano de Quitina (IV SIAQ)* 2007. Natal (Brasil): Sociedade Iberoamericana de Quitina, 2007, Resumo II-11-C.
- Matsui, M. S., Muizuddin, N., Arad (Malis), S., Marenus, K. 2003. Sulfated polysaccharides from red microalgae have anti-inflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied Biochemistry Biotechnology* **104**: 13-22.

- McClure, S. J., Emery, D. L., Wagland, B. M., Jones, W. O. 1992. A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. *Int. J. Parasitol* **22**: 227-234.
- Medcalf, D. G., Scott, J.R., Brannon, J. H., Hemerick, G. A., Cunningham, R. L., Chesson, J. H., Shah, J. 1975. Some structural features and viscometric properties of the extracellular polysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Research* **44**: 87-96.
- Meira, Q. G. S., Barbosa, I. M., Athayde, A. J. A. A., Siqueira-Júnior, J. P., Souza, E. L. 2012. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control* **25** (2): 469-475.
- Michael, T.M., John, M.M., Jack, P. 2002. Brock microbiology of microorganisms. 10th ed. New Jersey: Prentice Hall.
- Minkova, K., Michailov, Y., Toncheva-Panova, T., Houbavenska, N. 1996. Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. *Pharmazie* **51**: 3-7.
- Moorhouse, R. 1987. Structure/property relationships of a family of microbial polysaccharides. In Industrial Polysaccharides (Eds. Yalpani, M.), Elsevier, New York, pp. 187-206.

O

- Ofek, I., Beachey, E.H., Sharon, N. 1978. Surface sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. *Trends in Biochemical Sciences* **3**: 159-160.

P

- Percival, E., Foyle, R. 1979. The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. *Carbohydrate Research* **72**: 165-176.

- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., Michaud, P. 2013. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **40**: 781-796.
- Plaza, M., A. Cifuentes, Ibañez, E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* **19**: 31-39.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G. G. B., Herrero, M., Señoránis, F. J., Ibañez, E. 2010. Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses* **51**(2): 450-455.
- Prajapati, V. D., Maheriya, P. M., Jani, G. K., Solanki, H. K. 2014. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate polymers* **105**: 97-112.

R

- Ragan, M. A., Bird, E. L., Rice, R. R., Gutell, C. A., Singh, R. K. 1994. A molecular phylogeny of the marine red algae (*Rhodophyta*) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7276-7280.
- Razaghi, A., Godhe, A., Albers, E. 2014. Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*. *Central European Journal of Biology* **9**(2): 156-162. [Online] Disponível em: <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0248-z> [Data de acesso: 13/12/2016].
- Ramus, J. 1972. The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red algae *Porphyridium aerugineum*. *J. Physiol.* **8**: 97-111.
- Ramus, J., Kenney, B. E., Shaughnessy, E. J. 1989. Drag reducing properties of microalgal exopolymers. *Biotechnology bioengineering* **34**: 1203-1208.

- Raposo, M., Oliveira, S., Castro, P., Bandarra, N., Morais, R. 2010. On the utilization of microalgae for brewery effluent treatment and possible applications of the produced biomass. *J Inst Brew* **116**(3): 285-292.
- Raposo, M., Morais, R., Morais, A. 2013. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *A review. Mar drugs* **11**(1): 233-252.
- Raposo, M., Morais, A., Morais, R. 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci* **101**:56-63.
- Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, pp.566.
- Richmond, A. 1988. Spirulin. In: Micro-algal biotechnology (Eds. Borowitzka, M.A., Borowitzka, L J., Cambridge: Cambridge University. pp. 85-121.
- Rinaudo, M. 2004. Role of Substituents on the Properties of Some Polysaccharides, *Biomacromolecules* **5**: 1155-1165.
- Rinaudo, M. 2006. Non-Covalent Interactions in Polysaccharide Systems. *Macromolecular Bioscience* **6**: 590–610.
- Rinaudo, M. 2008. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* **57**: 397-430.
- Rocha, H. A. O., Farias, E. H. C., Bezerra, L. C. L. M., Albuquerque, I. R. L., Medeiros, V. P., Queiroz, K. C. S., Leite, E. L. 2004. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. *Infarma* **16**(1-2): 82-87.

S

- Sahoo, P. K., Chattopadhyay, S. K., Sikdar, A., 1996. Immunosuppressive effects of induced aflatoxicosis in rabbits. *J. Appl. Anim. Res.* **9**(1): 17-26.

- Santos, J. E., Soares, J. P., Dockal, E. R. 2003. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polimeros: Ciência e Tecnologia* **13**(4): 242-249.
- Santurio, M. J., Santurio, D. F., Pozzati, P., Moraes, C., Franchin, P. R., Alves, S. H. 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégão, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. *Ciência Rural, Santa Maria* **37**(3): 803-808.
- Savins, J. G. 1978. Oil recovery process employing thickened aqueous Driving fluid. *Mobil Oil Corporation*. **4**: 544.
- Schaefer, D. J., Krylov, V. S. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicology Environmental Safety* **45**: 208-227.
- Silva, S. S., Luna, S. M., Gomes, M.E. 1998. Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. *Macromolecular Bioscience* **8**: 568-576.
- Spolaore, P., Joannis-Cassen, C., Duran, E., Isabert, A. 2006. Commercial applications of microalgae: A Review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **101**(2): 87-96.
- Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L. and Švabic-Vlahovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. *Letters in Applied Microbiology* **38**(5): 428-432.
- Stoodley, L. H., Costeron, J. W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 95-108.
- Shrestha, R. P., Weinstein, Y., Bar-Zvi, D., Arad (Malis), S. 2004. A glycoprotein noncovalently associated with cell-wall polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). *Journal of Phycology* **40**: 568–580.
- Sutherland, I. W. 1988. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *International Review of Cytology* **113**: 187-231.

- un, Z., Cunningham, F. X., Gantt, E. 1998. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**:11482-11488.

T

- Talyshinsky, M., Souprun, Y., Huleihel, M. 2002. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell International* **2**:156-158.
- Tiquia-Arashiro, S.M., Mormile, M. 2013. Sustainable technologies: bioenergy and biofuel from biowaste and biomass. *Environ Technol* **34**(13–14): 1637–1638.
- Tomaselli, L. 2004. The microalgal cell. In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology (Eds. Richmond, A.) Oxford: Blackwell Science, pp. 3-19.
- Tannin-Spitz, T., Bergmann, M., Van-Moppes, D., Grossman, S., Arad (Malis), S. 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalgae *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology* **17**(3): 215-222.

U

- Ucko, M., Geresh, S., Simon-Berkovitch, B., Arad (Malis), S. 1994. Predation by a Dinoflagellate on a red microalga with cell wall modified by sulfate and nitrate starvation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **104**(3): 293-298.

V

- van Wamel, W. J. B., Hendrickx, A. P. A., Bonten, M. J. M., Top, J., Posthuma, G., Willems, R. J. L. 2007. Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infection and immunity* **75**(2): 924-931.

- Vieira, C., Cuiné, S., Rouhier, N., Rey, P. 2005. The Arabidopsis plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant Physiol* **138**: 909-922.

W

- Wagner, D. K., Sohnle, P. G. 1995. Cutaneous Defenses against Dermatophytes and Yeasts. *Clinical Microbiology Reviews* **8**: 317-355.
- Wen, Z., Jiao-Jiao, L., Kaixiang, J., Wenlong, L., Xuefeng, Q., Chenrui, L. 2015. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. *Mater. Sci. Eng.* **59**: 1181-1194.

Y

- Yalpani, M., Brooks, D. E. 1987. In: Industrial Polysaccharides, (Eds. Stivala, V., Crescenzi, I. C. M.) Dea, Gordon & Breach, New York, pp. 145-156.
- Yamashita, S., Sugita-Konishi, Y., Shimizu, M. 2001. *In vitro* bacteriostatic effects of dietary polysaccharides. *Food Sci Technol Res* **7**(3): 262–264.

Anexo A – Composição do meio NTIP para microalgas

Meio de cultura utilizado para o crescimento da microalga *Porphyridium cruentum*, implementado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.

I - Preparação da solução stock:

- **Solução de Sais principais:**

Tabela 7.1 Composição da Solução 1 presente no meio NTIP

Solução 1	m (g) por 1 L de água desionizada
NaNO ₃	300
KH ₂ PO ₄	30
NH ₄ Cl	20

- **Solução de Microelementos** (Solução composta por 10 mL da solução 1 + 10 mL da Solução 2 + 10 mL da solução 3 + 100 mL da solução 4, por litro de água desionizada):

Tabela 7.2 Composição da Solução 1 presente no meio NTIP

Solução 1	m (g) por 50 mL de água desionizada
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,50
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,25
CoSO ₄ .7H ₂ O	1,50
MnSO ₄ .H ₂ O	1,00

Tabela 7.3 Composição da solução 2 presente no meio NTIP

Solução 2 a 5%	m (g) por 50 mL de água desionizada
$\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,50

Tabela 7.4 Composição da solução 3 presente no meio NTIP

Solução 3	m (g) por 50 mL de água desionizada
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,25

Tabela 7.5 Composição da solução 4 presente no meio NTIP

Solução 4	m (g) por 50 mL de água desionizada
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25,0

- **Solução de vitaminas** (Solução composta por 1 mL da solução 1 + 1 mL da Solução 2 + 1 mL da solução 3, por 100 mL de água desionizada):

Tabela 7.6 Composição da solução 1 presente na solução de vitaminas do meio NTIP

Solução 1	m (g) por 50 mL de água desionizada
Vitamina B12	5,00

Tabela 7.7 Composição da solução 2 presente na solução de vitaminas do meio NTIP

Solução 1	m (g) por 50 mL de água desionizada
Biotina	5,00

Tabela 7.8 Composição da solução 3 presente na solução de vitaminas do meio NTIP

Solução 1	m (g) por 50 mL de água desionizada
Tiamina	5,00

Para preparar o meio de cultura foram utilizadas as seguintes soluções:

1. 1 mL de solução de sais principais;
2. 1,5 mL de solução de microelementos
3. 45 μ L de solução de vitaminas;
4. 3,5 % de sal grosso;
5. Perfazer com 1 L de água desionizada;
6. Acertar o pH para aproximadamente 7,00.

Anexo B – Contagem de esporos de fungos

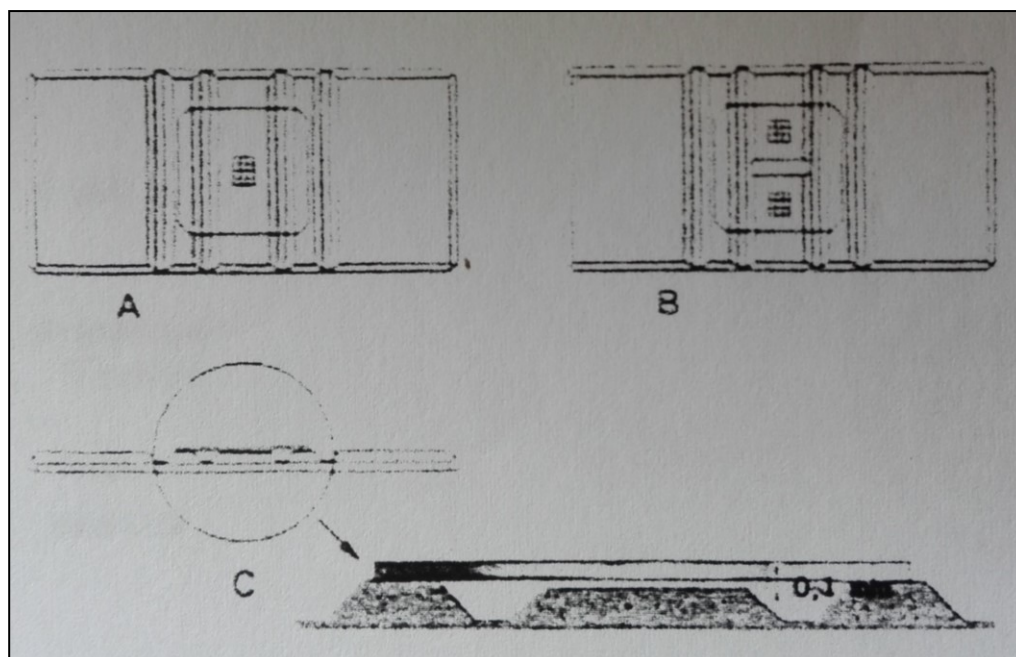


Figura 3.5.1 Preparação de Câmara de Neubauer para contagem direta de esporos.

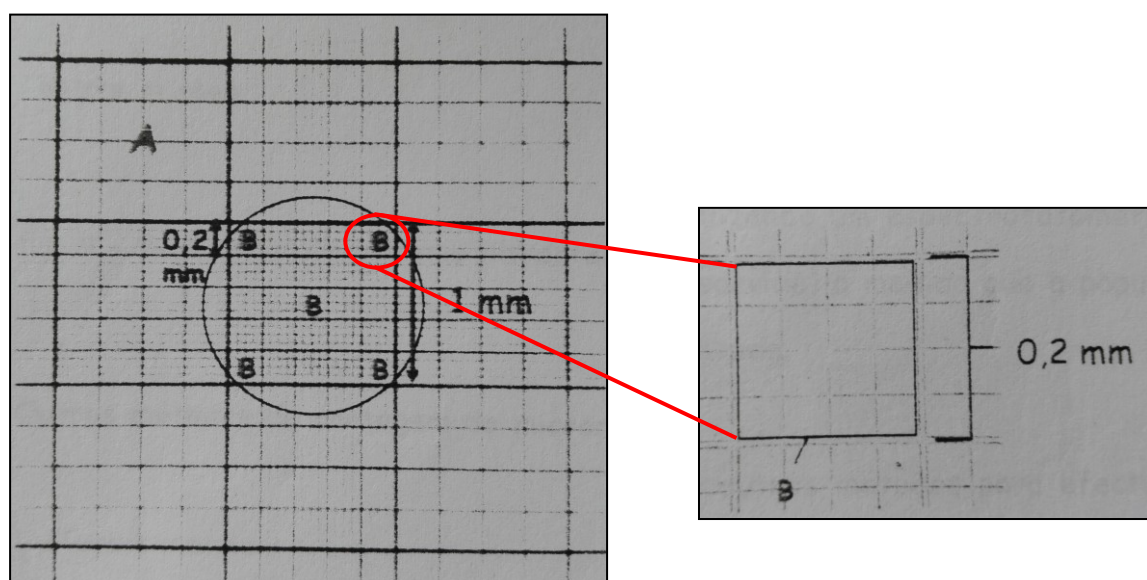


Figura 3.5.2 Área da contagem de esporos na Câmara de Neubauer

$$\text{Área B} = 0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} = 0,04 \text{ mm}^2$$

$$C \text{ (nº células/mL)} = n / (q \times A \times H)$$

$$C = n / (5 \times 0,04 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}^2) = n / 0,02 \text{ mm}^3 = n / 0,02 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 = n \times 50000$$

▪ **Contagem de esporos de *Microsporium canis***

Contagem da câmara de cima: 123 esporos (1)

Contagem da câmara de baixo: 136 esporos (2)

$$C(x) = \text{nº esporos} \times 50000$$

$$C(1) = 6,15 \times 10^6 \text{ esporos/mL}$$

$$C(2) = 6,80 \times 10^6 \text{ esporos/mL}$$

$$C(\text{total}) = 6,48 \times 10^6 \text{ esporos/mL}$$

▪ **Contagem de esporos de *Trichophyton rubrum***

Contagem da câmara de cima: 127 esporos (1)

Contagem da câmara de baixo: 251 esporos (2)

$$C(x) = \text{nº esporos} \times 50000$$

$$C(1) = 6,40 \times 10^6 \text{ esporos/mL}$$

$$C(2) = 12,60 \times 10^6 \text{ esporos/mL}$$

$$C(\text{total}) = 9,50 \times 10^6 \text{ esporos/mL}$$

Anexo C – Preparação de diluições de EPS a 2% (m/v) para avaliação da atividade anti-fúngica

Tabela 3.6 Exemplos de preparação de diluições de EPS a 2% (m/v) a partir de uma solução-mãe de *Microsporum canis*.

Solução mãe (mg/mL)	Volume EPS (mL)	Concentração pretendida (mg/mL)	Volume total do <i>eppendorf</i> (mL)	Volume do meio de cultura (mL)
20	0,90	1,00	1.8	0,60
20	0,45	0,50	1.8	1,05
20	0,36	0,40	1.8	1,14
20	0,27	0,30	1.8	1,23
20	0,18	0,20	1.8	1,32
20	0,09	0,10	1,8	1,41

Tabela 3.7 Exemplos de preparação de diluições de EPS a 5 % (m/v) a partir de uma solução-mãe de *Trichophyton rubrum*.

Solução mãe (mg/mL)	Volume EPS (mL)	Concentração pretendida (mg/mL)	Volume total do <i>eppendorf</i> (mL)	Volume do meio de cultura (mL)
20	0,36	1,00	1.8	1.14
20	0,18	0,50	1.8	1,32
20	0,14	0,40	1.8	1,36
20	0,11	0,30	1.8	1,40
20	0,07	0,20	1.8	1,43
20	0,04	0,10	1,8	1,47