

**Instituto Superior De Engenharia de Lisboa
Área Departamental De Engenharia Química**



Recuperação de compostos bioativos da alga *Fucus vesiculosus* por ultrafiltração/diafiltração e avaliação da ação biológica em doenças cardiovasculares

Ana Margarida Marques Lopes

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professora Doutora Rita Pacheco

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Júri:

Presidente: Professor Doutor Teodoro Trindade

Vogais: Professora Doutora Marília Clemente Velez Mateus

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Agradecimentos

Um agradecimento muito especial aos meus orientadores Professores Doutores Rita Pacheco e Luís Miguel Minhalma, obrigado por toda a aprendizagem que me transmitiram, por sempre que foi necessário estarem dispostos a ajudar e por terem tornado possível a realização desta dissertação.

Ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), que tornou possível toda esta caminhada de aprendizagem, a todos os meus professores da Licenciatura e do Mestrado, pois cada um deles teve um papel fundamental no meu percurso e deram-me um gosto ainda maior pela Engenharia Química e Biológica.

Nos últimos meses tive o prazer de desenvolver uma parte desta dissertação num laboratório da Faculdade de Ciência da Universidade de Lisboa (FCUL) da Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro, a quem quero agradecer a forma como fui recebida e a sua preciosa ajuda. Da mesma instituição queria agradecer ao Professor Doutor Ricardo Melo pela apanha das algas no Rio Tejo e à Professora Doutora Helena Gaspar pela disponibilização do seu equipamento.

Ainda do laboratório da FCUL gostaria de agradecer a todos os colegas pelo seu bom acolhimento e ajuda com as novas técnicas e equipamentos utilizados, um agradecimento especial à Laura Guedes, à Ana Rita Ferraz e à Rebeca Esperança.

Do ISEL tenho que agradecer a todos os meus colegas que me apoiaram e ajudaram a superar esta etapa, em especial à minha colega de dissertação Márcia Rodrigues pela paciência, amizade e entre ajuda.

A realização desta Dissertação só foi possível graças à ajuda dos meus pais, a eles devo este curso e o incentivo para continuar. Em especial tenho que agradecer à maior entusiasta e orgulhosa na sua menina, Mãe dedico-te esta dissertação, apesar de hoje já não estares entre nós foste tu a grande responsável por esta etapa.

Um agradecimento a toda minha família, em especial à minha irmã por todo apoio e orgulho, ao meu namorado pela compreensão, força e amor e ao meu avô por todos os dias se lembrar de perguntar como vai isso.

Resumo

Devido à crescente preocupação com as doenças cardiovasculares, estando apontadas como uma das principais causas de morte a nível mundial, e sabendo que a hipercolesterolemia é um fator de risco ao seu desenvolvimento, a implementação de um estilo de vida saudável é uma das medidas principais para prevenção e redução dos níveis de colesterol, sendo por vezes necessário a integração de alimentos funcionais a esta dieta de modo a potenciar a diminuição do colesterol.

Neste trabalho, estudou-se a alga *Fucus vesiculosus*, que é um recurso abundante na costa portuguesa, pretendendo-se avaliar as suas atividades biológicas, e para além disto tentar entender quais os compostos bioativos responsáveis por essas atividades. De modo a enriquecer o extrato de *F. vesiculosus* em compostos bioativos, fez-se um fracionamento do mesmo, através da tecnologia de membranas usando membranas de ultrafiltração, operando em modo de diafiltração, na qual foram obtidas diferentes frações.

Caracterizaram-se os extratos e as frações através da sua análise em cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), e foi ainda feita a determinação dos fenóis totais, dos taninos, das proteínas, dos glúcidos e do manitol. Relativamente às atividades biológicas, foram quantificadas a capacidade antioxidante, a inibição da acetilcolinesterase (AChE), da 3-hidroxi-3-metilglutarul coenzima A redutase (HMGR) e determinada a citotoxicidade em células do carcinoma humano hepatocelular (Hep-G2).

Dos extratos estudados, o que demonstrou melhores resultados em termos de atividade foi o extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) obtendo-se uma concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante de 0.447 mg extrato seco/mL solução, uma concentração de extrato que origina 50% inibição da AChE de 8.226 mg extrato seco/mL solução e da HMGR de 1.590 mg extrato seco/mL solução.

Para as frações obtidas através da tecnologia de membranas, as frações que ganharam atividade biológica em relação ao extrato inicial, foram a do permeado da membrana de maior limite de exclusão molecular (MWCO), C_{35_p}, e a do concentrado da membrana de menor MWCO (C_{25_c}). Tendo em conta as pequenas diferenças observadas entre estas duas frações, optou-se por aprofundar o estudo na fração do permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}), para a qual se identificaram os componentes por LC-MS verificando-se um enriquecimento da fração em manitol e em derivados do floroglucinol, designados por florotaninos.

Em termos da citotoxicidade tanto o extrato da decocção (AD) como o permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}) não demonstraram toxicidade para as células Hep-G2, apresentando mais de 100% de viabilidade celular para a maioria das concentrações estudadas.

Concluiu-se que o extrato da *F. vesiculosus*, apresentou uma atividade antioxidante promissora, assim como a sua possível aplicação no tratamento/prevenção em doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

Abstract

Due to the growing preoccupation with cardiovascular diseases, which are pointed as one of the main causes of death worldwide, and knowing that hypercholesterolemia is a risk factor, the implementation of healthy habits is one of the important behaviours that should be acquired to prevent and reduce the cholesterol levels. Sometimes it is necessary to integrate functional foods in this healthy diet in order to enhance the lowering of cholesterol.

In this work, the *Fucus vesiculosus* alga, which is an abundant resource in the Portuguese coast, was studied in order to evaluate their biological activities, and to try to understand which are the bioactive compounds. In order to obtain a bioactive compounds enrichment, the *F. vesiculosus* extract was fractionated by membrane technology, using ultrafiltration membranes operating in diafiltration mode, generating different fractions with different characteristics.

The characterization of the extracts and fractions was made by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis. It was also determined the content of total phenols, of tannins, of proteins, of carbohydrates and of mannitol. Regarding the biological activities, the antioxidant activity, inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and 3-hydroxy-3-methylglutarul coenzyme A reductase (HMGR) were assessed, and it was also determined the cytotoxicity in hepatocellular carcinoma cells (Hep-G2).

The extract that presented the best results in terms of bioactivity was the decoction at a pressure of 2 bar (AD) extract, with an extract concentration that originates 50% antioxidant activity of 0.447 mg dry extract/mL solution, an extract concentration that originates 50% AChE inhibition of the 8,226 mg dry extract/mL solution and the HMGR of 1,590 mg dry extract/mL solution.

For the fractions obtained by the membrane technology, the ones that show a gain in biological activity, compared with the initial extract, were the permeate of the large molecular weight cut-off (MWCO) membrane, C_{35_p}, and the concentrate of the smaller MWCO membrane, C_{25_c}. Considering the small differences between these two fractions, it was decided to extend the study of the permeate of the large MWCO membrane (C_{35_p}), by identifying by LC-MS the compounds that were enriched, and they were the mannitol and phloroglucinol derivatives, called phlorotannins.

In terms of cytotoxicity, the decoction extract (AD) and the permeate of the membrane with larger MWCO (C_{35_p}) showed no toxicity to Hep-G2, presenting more than 100% cell viability for most of the studied concentrations.

In conclusion, the extract of *F. vesiculosus* present a promising antioxidant activity, as well as a possible application in the treatment/prevention cardiovascular and neurodegenerative diseases.

PALAVRAS CHAVE / KEYWORDS

Algas marinhas; *Fucus vesiculosos*; Membranas; Ingredientes bioativos; doenças cardiovasculares

Marine algae; *Fucus vesiculosos*; Membranes; Bioactive ingrediente;, Cardiovascular diseases

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract.....	III
Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas.....	XI
Lista de Siglas	XIII
1. Introdução teórica	17
1.1 Algas	17
1.1.1 <i>Fucus vesiculosus</i>.....	17
1.2 Potencial biológico dos compostos bioativos.....	22
1.2.1 Atividade Antioxidante	22
1.2.2 Inibição da Acetilcolinesterase	24
1.2.3 Inibição da HMGR.....	25
1.3 Filtração por membranas	26
1.3.1 Membranas	27
1.3.2 Caracterização das Membranas.....	29
1.3.3 Modos de Operação	32
1.3.4 Dificuldades na Filtração por Membranas	34
1.3.5 Novas áreas de aplicação de membranas.....	36
2 Objetivo.....	37
3 Materiais e Métodos	38
3.1 Equipamentos	38
3.2 Reagentes	38
3.3 Preparação dos extratos da <i>F. vesiculosus</i>	39
3.3.1 Extrato da Digestão Gástrica	39
3.3.2 Extrato da Digestão Pancreática.....	40
3.3.3 Extrato da Digestão Completa	40
3.3.4 Extrato da Decocção a uma pressão de 2 bar	40
3.4 Extração das mucilagens	41
3.5 Quantificação dos fenóis totais.....	41
3.6 Quantificação dos Taninos	42
3.7 Quantificação das proteínas	42
3.8 Quantificação de glúcidos	42
3.9 Quantificação do manitol.....	43
3.10 Atividade antioxidante.....	43

3.11	Inibição da acetilcolinesterase (AChE).....	44
3.12	Inibição da HMGR	46
3.13	Análise dos extratos e frações por HPLC-DAD	46
3.14	Análise dos extratos e frações por LC- QTOF-MS.....	47
3.15	Ensaio em linhas celulares do carcinoma hepatocelular	47
3.16	Fracionamento do extrato usando a filtração por membranas	48
3.16.1	Preparação das membranas	49
3.16.2	Caracterização das membranas.....	50
3.16.2.1	Determinação da permeação hidráulica	50
3.16.2.2	Determinação do coeficiente de rejeição aparente de solutos orgânicos de referência.....	50
3.16.3	Permeação do Extrato da decocção a uma pressão de 2 bar – Recuperação das frações pequena, média e grande.....	50
3.17	Análise estatística	52
4	Resultados e Discussão	53
4.1	Caracterização dos extratos obtidos	53
4.1.1	Quantificações dos Fenóis	53
4.1.2	Quantificações das Proteínas	54
4.1.3	Caracterização dos extratos por HPLC-DAD.....	55
4.1.4	Atividade Antioxidante	60
4.1.5	Inibição da AChE.....	61
4.1.6	Comparação estatística dos Resultados, por Análise dos Componentes Principais (PCA)	62
4.1.7	Caracterização do extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD)	66
4.2	Processos de Isolamento dos Compostos Bioativos	67
4.2.1	Caracterização das frações da extração das mucilagens.....	67
4.2.2	Filtração por membranas	72
4.2.2.1	Caracterização das membranas preparadas	72
4.2.2.1.1	Determinação da permeabilidade hidráulica.....	72
4.2.2.1.2	Determinação do limite de exclusão molecular (MWCO)	73
4.2.2.2	Fracionamento do extrato da Decocção (AD) pela filtração por membranas	
	74	
4.3	Análise e caracterização das frações obtidas pela filtração por membranas.....	78
4.3.1	Quantificações dos Fenóis Totais	79
4.3.2	Quantificações dos Taninos.....	80
4.3.3	Quantificações das Proteínas	81
4.3.4	Quantificação dos Glúcidos	82

4.3.5	Atividade antioxidante.....	83
4.3.6	Inibição da AChE.....	84
4.3.7	Caracterização das frações e comparação com padrões por HPLC-DAD	85
4.3.8	Comparação estatística dos Resultados, por Análise dos Componentes Principais (PCA)	89
4.3.9	Caracterização da fração do permeado da primeira membrana (C _{35_p})	92
4.4	Citotoxicidade	93
4.5	Identificação de compostos da <i>Fucus vesiculosus</i> por LC-QTOF-MS	94
4.5.1	Análise dos cromatogramas	95
4.5.2	Identificação de compostos.....	100
5	Conclusões e Perspetivas Futuras	103
	Referências Bibliográficas	105
	Anexos	113

Índice de Figuras

Figura 1.1 - <i>Fucus vesiculosus</i> , evidenciando os aerocistos.[24]	18
Figura 1.2 - Localização geográfica da <i>F. vesiculosus</i> marcada a amarelo[22].	18
Figura 1.3 – Estrutura do fucoidano presente na <i>F. vesiculosus</i> , os CH ₃ podem ser substituídos por monossacáridos como a glucose, a galactose, a manose e a xilose, que podem estar ligados a cadeia de L-fucose sulfonada.[40]	20
Figura 1.4 – Estrutura da fucoxantina, adaptada de[41].	20
Figura 1.5 – Diferentes tipos de florotanos derivados do floroglucinol, adaptado de[44].	21
Figura 1.6 – Via metabólica do acetato-malonato, adaptado de[47].	22
Figura 1.7 – Estrutura da acetilcolinesterase humana, proteína globular dimérica[74].	24
Figura 1.8 - Tetrâmero da HMGR ligado a quatro moléculas de atorvastatina, os locais da ligação estão identificados com um círculo e o “r” representa o raio da ligação[85].	26
Figura 1.9 – Tamanho relativo dos diferentes solutos a remover por cada uma das classes das membranas, consoante o seu tamanho de poro, adaptado de[92].	29
Figura 1.10 - Representação gráfica do fluxo de permeação em função da pressão transmembranar, para a determinação da permeabilidade hidráulica, adaptado de[97].	31
Figura 1.11 - Representação do gráfico para a determinação do MWCO[97].	32
Figura 1.12 - Esquema da diafiltração, para a membrana CA onde H ₂ O indica a adição de água ao sistema, obtendo-se assim a partir da solução a purificar um concentrado e um permeado, adaptado de[98].	33
Figura 1.13 – Gradiente de concentração de um soluto num processo de membranas, adaptado de[92].	35
Figura 3.1 – Reação que ocorre entre o floroglucinol e o molibdênio componente do reagente Folin-Ciocalteu, adaptada de[103],[105].	41
Figura 3.2 – Mecanismo reacional da capacidade de redução do radical DPPH na presença das amostras das quais se quer estudar a capacidade antioxidante, adaptado de[103].	44
Figura 3.3 - Reação de Ellman para determinar a atividade da acetilcolinesterase, adaptado de[113].	45
Figura 3.4 – Redução do MTT para formazan, adaptado de[115].	48
Figura 3.5 - Módulo de membranas de ultrafiltração, modelo Ray-Flow, Tech Sep.	49
Figura 3.6 – Esquema da diafiltração utilizado no trabalho, onde C ₃₅ representa a membrana de maior MWCO, C ₂₅ a membrana de menor MWCO e as letras _A, _P e _C representam a alimentação, o permeado e o concentrado de cada uma das membranas, já no caso das letras G, M e P representam as frações grande, média e pequena.	51
Figura 4.1 – Concentração de fenóis totais determinada para os extratos da decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).	53
Figura 4.2 – Concentração de proteínas para os extratos da decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).	54
Figura 4.3 – Cromatograma do extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD), e das digestões gástrica (ADG), pancreática (ADP) e completa (ADC).	56
Figura 4.4 – Cromatograma dos sucos digestivos, suco gástrico (SG), suco pancreático (SP) e suco da digestão completa (SC), junção do suco gástrico e pancreático.	57

Figura 4.5 – Cromatograma do extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) a uma concentração de 5 mg/mL, pelo método 2 e identificação numérica dos picos mais intensos e bem definidos.	58
Figura 4.6 – Sobreposição dos cromatogramas do extrato da decocção (AD), com os cromatogramas dos padrões ácido quínico e floroglucinol, no caso deste último a sua absorvância está apresentada no eixo secundário.	59
Figura 4.7 – Atividade antioxidante, determinada para os extratos da decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC). 60	
Figura 4.8 – Inibição da acetilcolinesterase para os extratos da decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).	61
Figura 4.9 – Representação dos componentes e da importância de cada um dos resultados em estudo, Conteúdo em fenóis totais (Fenois), Conteúdo em proteínas (Proteinas), atividade antioxidante (DPPH) e inibição da acetilcolinesterase (AChE).	64
Figura 4.10 – Componentes e determinação da posição dos diferentes extratos, decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).	64
Figura 4.11 – Concentração de fenóis para as frações sem mucilagens extrato da alga decocção (sm_AD), sem mucilagens extrato da alga digestão gástrica (sm_ADG), sem mucilagens controlo da alga digestão gástrica (sm_ACG), sem mucilagens extrato da alga digestão pancreática (sm_ADP), sem mucilagens controlo da alga digestão pancreática (sm_ACP), sem mucilagens extrato da alga digestão completa (sm_ADC), sem mucilagens controlo da alga digestão completa (sm_ACC), mucilagens extrato da alga decocção (m_AD), mucilagens extrato da alga digestão gástrica (m_ADG), mucilagens extrato da alga digestão pancreática (m_ADP), mucilagens controlo da alga digestão pancreática (m_ACP), mucilagens extrato da alga digestão completa (m_ADC) e mucilagens controlo da alga digestão completa (m_ACC).	68
Figura 4.12 – Atividade antioxidante para as frações sem mucilagens extrato da alga decocção (sm_AD), sem mucilagens extrato da alga digestão gástrica (sm_ADG), sem mucilagens controlo da alga digestão gástrica (sm_ACG), sem mucilagens extrato da alga digestão pancreática (sm_ADP), sem mucilagens controlo da alga digestão pancreática (sm_ACP), sem mucilagens extrato da alga digestão completa (sm_ADC), sem mucilagens controlo da alga digestão completa (sm_ACC), mucilagens extrato da alga decocção (m_AD), mucilagens extrato da alga digestão gástrica (m_ADG), mucilagens extrato da alga digestão pancreática (m_ADP), mucilagens controlo da alga digestão pancreática (m_ACP), mucilagens extrato da alga digestão completa (m_ADC) e mucilagens controlo da alga digestão completa (m_ACC), a uma concentração de 1mg/mL.	69
Figura 4.13 – Inibição da acetilcolinesterase para as frações sem mucilagens extrato da alga decocção (sm_AD), sem mucilagens extrato da alga digestão gástrica (sm_ADG), sem mucilagens controlo da alga digestão gástrica (sm_ACG), sem mucilagens extrato da alga digestão pancreática (sm_ADP), sem mucilagens controlo da alga digestão pancreática (sm_ACP), sem mucilagens extrato da alga digestão completa (sm_ADC), sem mucilagens controlo da alga digestão completa (sm_ACC), mucilagens extrato da alga decocção (m_AD), mucilagens extrato da alga digestão gástrica (m_ADG), mucilagens extrato da alga digestão pancreática (m_ADP), mucilagens controlo da alga digestão pancreática (m_ACP), mucilagens extrato da alga digestão completa (m_ADC) e mucilagens controlo da alga digestão completa (m_ACC).....	70

Figura 4.14 – Cromatograma obtido para as frações sem mucilagens (sm_AD) e mucilagens (m_AD).....	71
Figura 4.15 – Fluxo de permeação normalizado a 25°C em função da variação de pressão, para determinação da permeabilidade hidráulica, da membrana C ₃₅ com maior MWCO e da membrana C ₂₅ com menor MWCO.....	72
Figura 4.16 – Representação gráfica para a determinação do limite de exclusão molecular da membrana C ₃₅ com maior MWCO.....	73
Figura 4.17 – Representação gráfica para a determinação do limite de exclusão molecular da membrana C ₂₅ com menor MWCO.....	74
Figura 4.18 – Evolução do processo de diafiltração em termos da condutividade do permeado para a membrana C ₃₅ com maior MWCO.....	75
Figura 4.19 – Evolução do processo de diafiltração em termos da condutividade do permeado para a membrana C ₂₅ com menor MWCO.....	75
Figura 4.20 – Fluxo de permeação em função do tempo, para membrana de maior MWCO C ₃₅	76
Figura 4.21 – Fluxo de permeação em função do volume, para membrana com maior MWCO C ₃₅	76
Figura 4.22 – Fluxo de permeação em função do tempo, para a membrana de menor MWCO C ₂₅	77
Figura 4.23 - Fluxo de permeação em função do volume, para a membrana de menor MWCO C ₂₅	77
Figura 4.24 – Concentração de fenóis totais, determinada para a alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}).....	79
Figura 4.25 – Quantificação dos fenóis totais antes do tratamento com PVPP, para a alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}), para as soluções obtidas pelas membranas.....	80
Figura 4.26 – Concentração de taninos, determinada para a alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}), na concentração de partida obtida pelas membranas.....	81
Figura 4.27 – Concentração de proteínas determinada para a alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}).....	82
Figura 4.28 – Concentração de glúcidos para a alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}).....	83
Figura 4.29 – Atividade antioxidante determinada para a alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}).....	84
Figura 4.30 – Inibição da acetilcolinesterase para a alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}).....	85

Figura 4.31 – Cromatograma das frações obtidas para a primeira membrana utilizada, com maior MWCO, alimentação, permeado e concentrado (C _{35_A} , C _{35_P} e C _{35_C}), a uma concentração 5 mg/mL.	86
Figura 4.32 – Cromatograma das frações obtidas para a segunda membrana utilizada, com menor MWCO, alimentação, permeado e concentrado (C _{35_P} , C _{25_P} e C _{25_C}), a uma concentração de 5 mg/mL.....	87
Figura 4.33 – Espectros UV-Vis para as frações do permeado da membrana de maior MWCO (C _{35_P}), concentrado da membrana de menor MWCO (C _{25_C}) e padrão de floroglucinol, obtidos através dos respetivos cromatogramas, nos instantes 9.629, 9.522 e 9.469 minutos, respetivamente.....	88
Figura 4.34 – Representação dos componentes e da importância de cada um dos resultados em estudo, fenóis totais (Fenóis), proteínas (Proteínas), hidratos de carbono (Glúcidos), atividade antioxidante (DPPH) e inibição da acetilcolinesterase (AChE).....	90
Figura 4.35 – Componentes e determinação da posição das diferentes frações, sendo elas a alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}), tendo em conta os ensaios realizados.	91
Figura 4.36 – Viabilidade celular das Hep-G2 colocadas em contacto com o extrato da decocção (AD) e com a fração do permeado da primeira membrana (C _{35_P}) a diferentes concentrações.	94
Figura 4.37 – Cromatograma da cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa em modo negativo, para o extrato da decocção (AD) e para a fração do permeado da primeira membrana (C _{35_P}), tendo-se dividido o cromatograma em duas partes, a primeira para o tempo de 0.6 a 8.2 minutos e na segunda de 8.0 a 18.5 minutos.....	95
Figura 4.38 – Cromatograma da cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa em modo positivo, para o extrato da decocção (AD) e para a fração do permeado da primeira membrana (C _{35_P}), tendo-se dividido o cromatograma em duas partes, a primeira para o tempo de 0.8 a 9.0 minutos e a segunda para o tempo de 9.0 a 19.2 minutos.	95

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Diferentes tipos de membranas.[92]	28
Tabela 1.2 - Diferentes processos de filtração por membranas.[96], [97]	30
Tabela 1.3 - Módulos de membranas e as suas diferentes características operacionais.[92],[91]	34
Tabela 3.1 - Método usado para determinação dos cromatogramas dos extratos iniciais e seus derivados.....	46
Tabela 3.2 – Método usado para a determinação dos cromatogramas das frações purificadas e padrões.	47
Tabela 3.3 - Método usado no LS-MS.	47
Tabela 3.4 – Quantidade dos reagentes utilizados na preparação das membranas.....	49
Tabela 4.1 – Dados analisados com o componente principal, diferentes conteúdos em fenóis, proteínas, atividades antioxidante e inibição da acetilcolinesterase para os extratos decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).....	63
Tabela 4.2 – Variância total explicada para os 2 componentes principais extraídos por PCA dos dados da Tabela 4.1.	63
Tabela 4.3 – Influência de cada um dos ensaios em estudo, nos dois componentes escolhidos.	63
Tabela 4.4 – Conteúdo de fenóis totais, proteínas, glúcidos e manitol para o extrato decocção (AD), tendo em conta a concentração de extrato.	66
Tabela 4.5 – Concentração de fenóis totais e taninos, para a alimentação e permeado da membrana de maior MWCO (C _{35_A} e C _{35_P}) e para a alimentação e permeado da membrana de maior MWCO (C _{25_A} e C _{25_P}).	78
Tabela 4.6 – Rejeição aparente (f) para os taninos e fenóis totais, tendo em conta as suas concentrações na alimentação e no permeado determinadas anteriormente para cada uma das membranas C ₃₅ com maior MWCO e C ₂₅ com menor MWCO.	78
Tabela 4.7 – Dados analisados através da análise do componente principal, para os diferentes ensaios conteúdos em fenóis, proteínas, glúcidos, atividades antioxidante e inibição da acetilcolinesterase para as frações alimentação da primeira membrana (C _{35_A}), permeado da primeira membrana (C _{35_P}), concentrado da primeira membrana (C _{35_C}), permeado da segunda membrana (C _{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C _{25_C}).	89
Tabela 4.8 – Variância total explicada dos 5 componentes, permitindo assim proceder à escolha dos componentes mais importante, com intuito de fazer a análise e comparação dos resultados.....	90
Tabela 4.9 – Influência de cada um dos ensaios sobre os componentes.	90
Tabela 4.10 – Conteúdo de fenóis totais, proteínas, glúcidos e manitol para a fração do permeado da primeira membrana (C _{35_P}), tendo em conta a quantidade de extrato seco.....	93
Tabela 4.11 – Massas de 100.0000 a 199.9999 m/z, para os espectros de massa em modo negativo do extrato de partida (AD) e purificado (C _{35_P}), tendo em conta as respetivas intensidades.	96
Tabela 4.12 – Massas de 200.0000 a 299.9999 m/z, para os espectros de massa em modo negativo do extrato de partida (AD) e purificado (C _{35_P}), tendo em conta as respetivas intensidades.	97

Tabela 4.13 – Massas de 300.0000 a 399.9999 m/z, para os espectros de massa em modo negativo do extrato de partida (AD) e purificado (C _{35_p}), tendo em conta as respetivas intensidades.	98
Tabela 4.14 - Massas de 400.0000 a 699.9999 m/z, para os espectros de massa em modo negativo do extrato de partida (AD) e purificado (C _{35_p}), tendo em conta as respetivas intensidades.	99
Tabela 4.15 – Identificação dos compostos com intensidade diferente do purificado (C _{35_p}) em modo negativo.....	101

Lista de Siglas

A	Área da membrana
A.A.	Atividade antioxidante
Abs	Absorvância
AC	Acetato de celulose
ACC	Extrato da Alga controlo da digestão completa
Acetil-CoA	Acetil-coenzimaA
ACG	Extrato da Alga controlo da digestão gástrica
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de acetilcolina
ACN	Acetonitrilo
ACP	Extrato da Alga controlo da digestão pancreática
AD	Extrato da Alga decocção a uma pressão de 2 bar
ADC	Extrato da Alga digestão completa
ADG	Extrato da Alga digestão gástrica
ADP	Extrato da Alga digestão pancreática
BSA	Albumina de soro bovino
C ₂₅	Membrana com 25 % p/p de formamida
C ₂₅ _A	Alimentação da membrana com 25 % p/p de formamida
C ₂₅ _C	Concentrado da membrana com 25 % p/p de formamida
C ₂₅ _P	Permeado da membrana com 25 % p/p de formamida
C ₃₅	Membrana com 35 % p/p de formamida
C ₃₅ _A	Alimentação da membrana com 35 % p/p de formamida
C ₃₅ _C	Concentrado da membrana com 35 % p/p de formamida
C ₃₅ _P	Permeado da membrana com 35 % p/p de formamida
C _{Aa}	Concentração do soluto A na alimentação
C _{Am}	Concentração do soluto A na superfície adjacente à membrana
C _{Ap}	Concentração do soluto A no permeado
CAT	Catálase

C _{fenóis}	Concentração de fenóis totais
C _{glúcidos}	Concentração de glúcidos
C _{lípidos}	Concentração de lípidos
C _{manitol}	Concentração de manitol
COT	Carbono orgânico total
C _{proteínas}	Concentração de proteínas
DA	Doença de Alzhiemer
DEX	Dextrano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DPPH-H	2,2-difenilpicril-hidrazina
DTNB	5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenóico)
f	Coeficiente de rejeição aparente
FBS	Soro fetal bovino
FLG	Floroglucinol
FPVD	Fluoreto de polivinilideno
G	Compostos com massa molecular maior
GSH	Glutationo
GST	Glutationo S-transferase
GTx	Glutationo peroxidase
HDL	lipoproteínas de elevada densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutarul coenzima A
HMGR	Enzima 3-hidroxi-3-metilglutarul coenzima A redutase
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de elevada resolução com detetor de fotodíodos
I. AChE	Inibição da acetilcolinesterase
I. HMGR	Inibição da 3-hidroxi-3-metilglutarul coenzima A redutase
Jp	Fluxo de permeação
LA	Ácido lipóico
LC-MS	Cromatografia líquida com espectrometria de massa
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
Lp	Permeabilidade hidráulica

M	Compostos com massa molecular média
m	Mucilagens
m_ACC	Mucilagens controlo da alga digestão completa
m_ACG	Mucilagens controlo da alga digestão gástrica
m_ACP	Mucilagens controlo da alga digestão pancreática
m_AD	Mucilagens Extrato da alga decocção a uma pressão de 2 bar
m_ADC	Mucilagens Extrato da alga digestão completa
m_ADG	Mucilagens Extrato da alga digestão gástrica
m_ADP	Mucilagens Extrato da alga digestão pancreática
ManDH	Manitol desidrogenase
MeOH	Metanol
MF	Microfiltração
MM	Massa molecular
Mp	Massa de permeado recolhido
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio
MWCO	Limite de exclusão molecular
MW	Massa Molecular
m/z	Razão massa/carga do ião
NAC	N-acetil cisteína
NAD ⁺	Forma oxidada dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH	Forma reduzida dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NF	Nanofiltração
NMDA	N-metil-D-aspartato
OI	Osmose Inversa
P	Compostos com massa molecular pequena
Δ P	Pressão transmembranar
PA	Poliamida
PAN	Poliacrilonitrila
PEG	Polietilenoglicol

PEI	Polieterimida
PES	Polietersulfona
PP	Polipropileno
PPA	Proteína precursora amilóide
PSU	Polisulfona
PTFE	Politetrafluoretano
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SC	Suco completo (Suco gástrico + suco pancreático)
SG	Suco gástrico
sm	Sem mucilagens
sm_ACC	Sem mucilagens controlo da alga digestão completa
sm_ACG	Sem mucilagens controlo da alga digestão gástrica
sm_ACP	Sem mucilagens controlo da alga digestão pancreática
sm_AD	Sem mucilagens Extrato da alga decocção a uma pressão de 2 bar
sm_ADC	Sem mucilagens extrato da alga digestão completa
sm_ADG	Sem mucilagens extrato da alga digestão gástrica
sm_ADP	Sem mucilagens extrato da alga digestão pancreática
SOD	Superóxido dismutase
SP	Suco pancreático
TFA	Ácido trifluoracético
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
UF	Ultrafiltração
UV-Vis	Ultravioleta visível
V.C.	Viabilidade celular

1. Introdução teórica

1.1 Algas

As algas são taxonomicamente classificadas de vermelhas (*Rhodophyta*), castanhas (*Phaeophyta*) ou verdes (*Chlorophyta*) dependendo da natureza dos pigmentos que as compõem. As algas multicelulares macroscópicas, designadas por macroalgas, têm sido muito usadas na alimentação, com especial tradição de consumo na Ásia[1], no entanto nos países Europeus começaram a ser consumidas nas últimas décadas.[2]

As algas são nutricionalmente interessantes, sendo constituídas por várias vitaminas[3], minerais, polissacáridos[4], proteínas[5], compostos fenólicos[6], ácidos gordos, lípidos[7], esteróis[8], alcaloides[9] e flavonoides[10]. Por este motivo nas últimas décadas começou a surgir um elevado interesse no estudo das algas, promovido ainda por estudos que apontam para propriedades bioativas de alguns dos seus compostos, no entanto o conhecimento sobre todos os constituintes das algas ainda não está muito consolidado, sendo que muito dos seus compostos são ainda desconhecidos.[2]

Estão reportadas como exibindo atividades antioxidantes[11], antitumorais[12], antimicrobiais[13], anti-inflamatórias[14] e propriedades antidiabéticas[15], considerando-se assim as algas como um recurso para o desenvolvimento de novas drogas ou para o uso como alimentos funcionais.[2] Para além da aplicação na remediação de águas, produção de biomassa e biofuel.[16]

As macroalgas, crescem rapidamente no oceano, o que resulta numa elevada produção de biomassa, por este motivo o aproveitamento dos seus compostos bioativos é bastante interessante do ponto de vista da valorização destas algas para aplicações biológicas e não biológicas.[17] As algas castanhas são organismos dominantes em varias zonas costeiras a nível mundial, capazes de formar florestas subaquáticas de elevada biodiversidade[18], este tipo de algas acumula uma grande variedade de polifenóis, que são compostos por unidades de floroglucinol, chamados também de florotaninos, os quais têm demonstrado potencial como ingredientes bioativos, promovendo variados benefícios para a saúde.[19], [20]

Neste trabalho foi analisado o potencial da alga castanha *Fucus vesiculosus*, que é uma alga existente em quantidade abundante na costa portuguesa, tendo como objetivo valorizar os seus compostos bioativos.

1.1.1 *Fucus vesiculosus*

A *F. vesiculosus* (**Figura 1.1**) é uma alga marinha castanha multicelular macroscópica e é caracterizada no seu estado adulto por talos divididos por uma nervura central, por pequenos aerocistos com gás que ocorrem em pares, um de cada lado da nervura [21], que permitem que a alga flutue quando está submersa, facilitando assim a fotossíntese.[22] A nervura central estende-se até ao substrato e a alga agarra-se ao mesmo por um disco de fixação.[21] A *F. vesiculosus* cresce em zonas de maré média com elevada salinidade, águas frias e substrato rochoso especialmente no hemisfério norte (**Figura 1.2**).[22]

Esta espécie de alga também exhibe diferenças ao nível sexual, possuindo assim órgãos sexuais diferentes, no caso das fêmeas oogónia que são geralmente constituídas por 8 óvulos, e

dos machos anterídio constituído por filamentos ramificados de células, sendo possível determinar o sexo da alga ao microscópio.[21] A reprodução da *F. vesiculosus* é bastante interessante visto que os zigotos se desenvolvem fora do corpo da mãe, os gametas são libertados para a água, onde os óvulos são fecundados e os zigotos germinam, sendo que 9 dias após a germinação o corpo da alga está formado.[23]



Figura 1.1 - *Fucus vesiculosus*, evidenciando os aerocistos.[24]



Figura 1.2 - Localização geográfica da *F. vesiculosus* marcada a amarelo[22].

A composição química da *F. vesiculosus* é variável, consoante a sua maturidade, habitat e condições ambientais, portanto é normal a existência de diferenças na quantidade e nos compostos presentes na alga.[25] Tendo em conta várias fontes foram identificados lípidos[26], aminoácidos[25], minerais[27], polissacáridos[28], vitaminas, pigmentos[29] e compostos fenólicos, como os florotaninos[30].

Relativamente aos lípidos, as algas castanhas como a *F. vesiculosus* têm menor quantidade de lípidos que outros tipos de algas e plantas superiores.[26] Tendo em conta o perfil de ácidos gordos desta alga, a maioria dos ácidos gordos são polinsaturados (48.19 %), seguindo-se os ácidos gordos saturados (29.26 %) e por fim os monoinsaturados (22.33 %). Os ácidos gordos em maior quantidade são o ácido oleico (19.94 %), ácido araquidónico (15.86 %), ácido palmítico (14.66 %), ácido mirístico (11.38 %) e ácido eicosapentaenoico (9.95 %). A presença deste tipo de compostos e a existência de elevada quantidade de ómega-3, pode apresentar benefícios na prevenção de certas doenças, nomeadamente das doenças cardiovasculares.[25]

Em termos proteicos, neste tipo de algas a quantidade de proteínas é geralmente baixa.[22] Um estudo demonstrou que a constituição em aminoácidos da *F. vesiculosus* é de 11.90 g/100 g de peso seco, sendo que 40.99 % deste valor são aminoácidos essenciais. Os principais aminoácidos não essenciais encontrados foram o ácido glutâmico, a asparagina, a alanina, a glicina e a serina, já no caso dos essenciais foi a leucina, a lisina e treonina.[25]

A quantidade em minerais nas algas é geralmente alta, sendo maior que na maioria das plantas terrestres. Foram encontrados diferentes tipos de minerais, existindo em maior quantidade o sódio, o potássio, o cálcio e o magnésio, e em menores quantidades o ferro, o zinco, o manganês e o cobre. A ingestão destes pode ser benéfica na colmatação da carência de alguns destes minerais. [27]

Quanto aos hidratos de carbono estes são muitas vezes componentes estruturais nas algas. As algas castanhas produzem diferentes polissacáridos como o alginato, o fucoídano e a laminarina.[31]

Para além destes, as algas castanhas tem apresentado uma constituição em manitol, que pode variar entre 1 a 25 % do peso seco da alga, sendo dos hidratos de carbono de baixo peso molecular existentes em maior quantidade neste tipo de algas, podendo ter um papel de controlo osmótico das células.[32] Outra classe de polissacáridos existentes nas algas são as mucilagens, que estruturalmente são muito variáveis e têm várias funções fisiológicas, tendo como principal característica a sua elevada viscosidade. Podendo estar associados a proteínas, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e glicoproteínas.[33]

O alginato é um polissacárido linear que constituído por monómeros de β -D-manurônico e α -L-glucurônico com ligação (1 \rightarrow 4), está geralmente associado ao sódio e ao cálcio, o que lhe confere uma elevada viscosidade. O alginato extraído de algas encontra aplicação industrial devido à sua elevada viscosidade, sendo usado como espessante, mas também devido à sua capacidade de se ligar a metais. [31] No entanto, devido à facilidade que tem em se ligar a iões metálicos, leva a uma absorção elevada de metais, incluindo metais pesados, que têm efeitos citotóxicos. [34] Por este motivo, o uso desta alga para fins medicinais e alimentares pode estar condicionado por possíveis contaminações com poluentes, principalmente metais pesados, sendo desaconselhado o seu uso ou apresentando necessidade do uso de um passo de purificação para garantir a inexistência de metais pesados.[35]

Na *F. vesiculosus* tem sido reportado com frequência a existência de fucoídano (**Figura 1.3**), que é um polissacárido complexo composto maioritariamente por fucose e sulfato, e por monossacáridos como a glucose, a galactose, a manose e a xilose.[28] Este polissacárido tem demonstrado atividades biológicas relevantes entre as quais atividade antioxidante[28], propriedades anticoagulantes[36], efeitos antitumorais e antiproliferativos[37], ação antiviral[38] e imunomodulador[39].

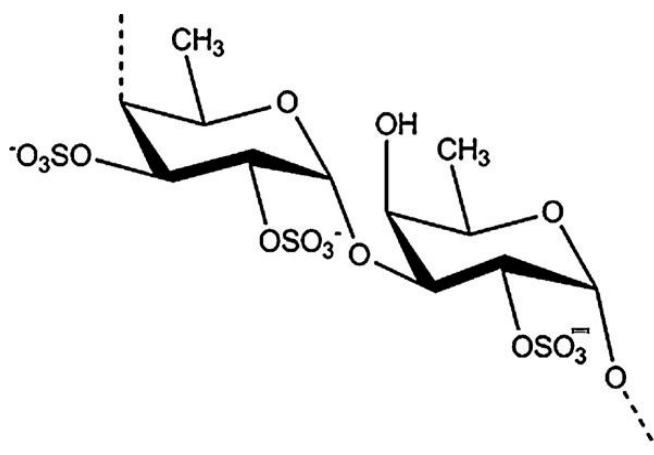


Figura 1.3 – Estrutura do fucoidano presente na *F. vesiculosus*, os CH₃ podem ser substituídos por monossacáridos como a glucose, a galactose, a manose e a xilose, que podem estar ligados a cadeia de L-fucose sulfonada.[40]

No grupo dos pigmentos, a *F. vesiculosus* tem diferentes carotenoides como o β -caroteno, a fucoxantina, a violaxantina, o tocoferol (vitamina E), a zeaxantina e a luteína. Dos carotenoides encontrados nas algas castanhas a fucoxantina (**Figura 1.4**) é o mais abundante e, está muitas vezes associada aos seus metabolitos o fucoxantanol, a amarouciaxantina A e a halocintiaxantina[41], no entanto a concentração deste pigmento num extrato de *F. vesiculosus* é muito baixa.[42]

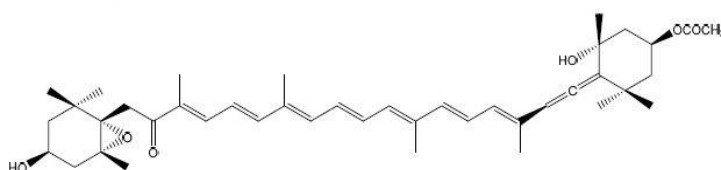


Figura 1.4 – Estrutura da fucoxantina, adaptada de[41].

A composição em compostos fenólicos nas algas castanhas é maioritariamente florotaninos, estes polifenóis são constituídos por unidades de floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno), com diferentes graus de polimerização e, têm sido alvo de bastante interesse a nível científico devido à elevada atividade antioxidante reportada.[43] Num estudo com a *F. vesiculosus* foi encontrado uma maior quantidade de florotaninos de baixa polimerização de entre 4 a 8 unidades de floroglucinol (497 a 993 Da) e em quantidades vestigiais foram encontrados também florotaninos de elevada polimerização até 18 unidades de floroglucinol (de aproximadamente 2000 Da).[44]

Os florotaninos têm uma elevada diversidade estrutural podendo ser classificados consoante o tipo de ligação entre as unidades de floroglucinol, sendo estes designados fucóis, floretois, fucofloretois e eckols (**Figura 1.5**). Os fucóis são caracterizados por ligações fenil (C-C) na posição *meta*, como o trificol, os floretois ligam-se por ligações aril-éter (C-O-C) podendo ocorrer em todas as posições do anel, como o difloretoil, os fucofloretois são uma mistura dos dois tipos de ligações anteriores, como o difucofloretoil, e os eckols possuem pelo menos uma ligação dibenzodioxina, como o dieckol.[30],[44] Apesar da sua semelhança, têm uma grande diversidade estrutural, os florotaninos têm sido difíceis de identificar e purificar.[45]

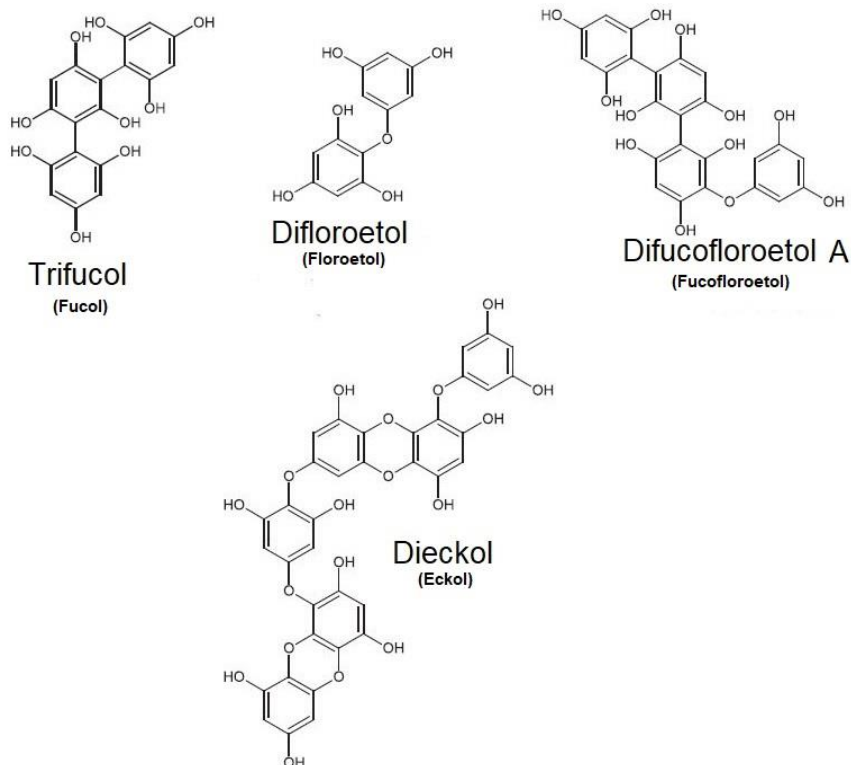


Figura 1.5 – Diferentes tipos de florotaninos derivados do floroglucinol, adaptado de[44].

As unidades de floroglucinol presentes nas células da *F. vesiculosus* são sintetizadas pela via metabólica do acetato-malonato. Esta via é comum às plantas, os compostos fenólicos são sintetizados por condensação das unidades de acetato, envolvendo como intermediários a acetil Coenzima A e a malonil Coenzima A.[41],[44]

Esta via metabólica permite a formação de outros metabolitos celulares, tais como, ácidos gordos, macrólidos e compostos aromáticos (**Figura 1.6**), no entanto no caso dos aromáticos apenas ocorre uma reação denominada de condensação de Claisen que forma um β -ceto éster, que é alongado até ao tamanho pretendido, dando lugar a um poli- β -ceto éster que após ciclização, aromatização e outras reações e rearranjos químicos forma os florotaninos.[47]

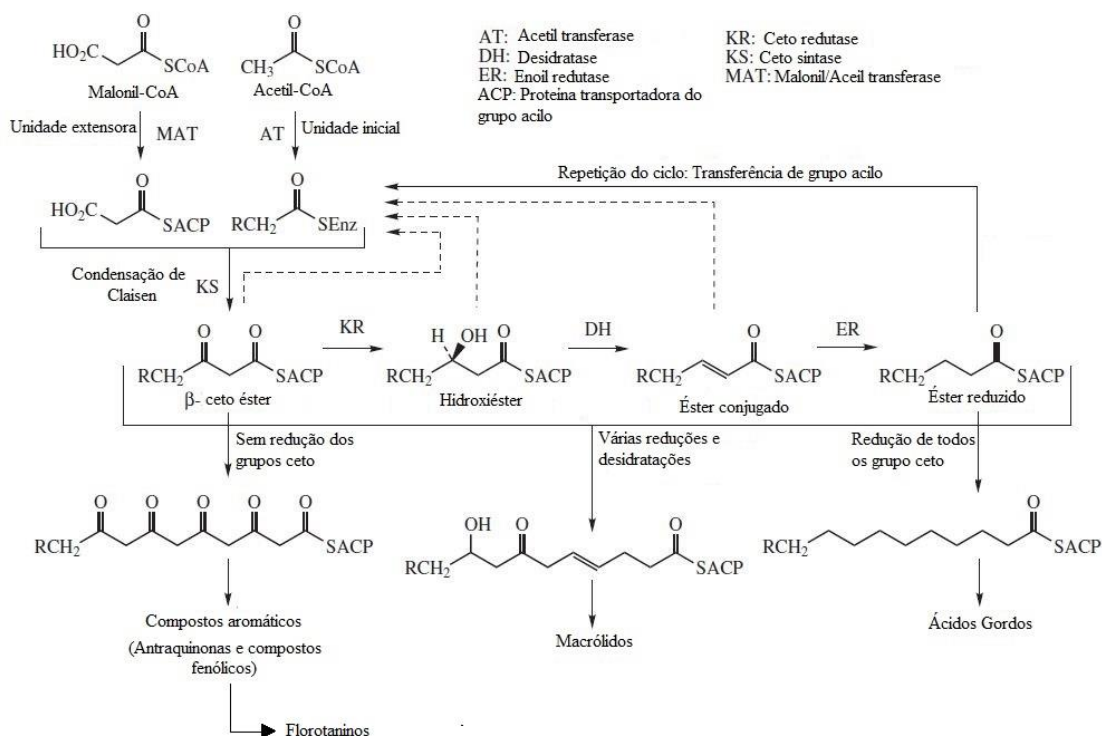


Figura 1.6 – Via metabólica do acetato-malonato, adaptado de[47].

Nas algas, a função dos florotaninos é frequentemente atribuída à proteção contra condições de stress ambiental e contra predadores.[19] Uma das razões pelas quais estes compostos têm sido tão estudados, é porque demonstraram atividades antioxidantes elevadas. Um estudo demonstrou que esta atividade antioxidante é influenciada pelo grau de polimerização dos florotaninos, neste caso os florotaninos com menores graus de polimerização exibem no geral superior atividade antioxidante.[30] Esta capacidade de reduzir o stress oxidativo, pode-se refletir em benefícios para a saúde muito promissores.[43]

Adicionalmente, um estudo feito em pessoas que ingeriram a alga *F. vesiculosus* antes de ingestão de uma determinada quantidade de hidratos de carbono, demonstrou uma diminuição dos níveis de insulina e da glucose no sangue, o que se atribuiu à inibição da α -amilase e α -glucosidase pelos florotaninos, reduzindo deste modo a degradação de polissacáridos e a absorção da glucose.[48]

Um extrato de *F. vesiculosus* preparado em água demonstrou também atividade anti-inflamatória, promovendo uma inibição da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B).[49] Foram ainda documentados efeitos anti tumorais [50]; anti fúngicos[51]; anti bacterianos especialmente contra bactérias gram positivas[52]; anti-hipertensivos[53]; e fotoprotetor devido a capacidade dos florotaninos absorverem a radiação UV.[54]

1.2 Potencial biológico dos compostos bioativos

1.2.1 Atividade Antioxidante

O stress oxidativo é definido pela falta de equilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigénio (ROS) e azoto (RNS) e a capacidade de o organismo eliminar estes radicais, evitando assim os seus efeitos negativos.[55]

O stress oxidativo é caracterizado por a existência de espécies reativas, as quais podem afetar diferentes biomoléculas, doando ou aceitando elétrons com as espécies reativas. As biomoléculas que podem sofrer estas reações são os lípidos, as proteínas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, criando novos radicais que podem continuar a reagir, levando a danos celulares. [56]

As espécies reativas são normalmente produzidos em resultado do metabolismo celular ou por fontes externas de dano celular, como a exposição à poluição, a metais pesados, a radiação e a compostos químicos.[57] As espécies reativas mais comuns são os radicais de oxigénio e azoto, radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), o superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), o peroxil ($\text{ROO}\cdot$), o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e o dióxido de azoto ($\text{NO}_2\cdot$); e na forma não radicalar, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o ozono (O_3), o oxigénio simples ($1/2 \text{O}_2$), o ácido nitroso (HNO_2), o peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), o trióxido de dinitrogénio (N_2O_3) e o ácido hipocloroso (HOCl).[58]

As ROS e RNS são espécies químicas altamente reativas, estes compostos podem interagir com as biomoléculas provocando vários tipos de reações de oxidação redução com o DNA, lípidos, proteínas, hidratos de carbono e outros tipos de metabolitos, como aminoácidos. [55] As principais consequências destas reações estão relacionadas com a função das biomoléculas no organismo. Por exemplo, os lípidos pertencem maioritariamente às membranas celulares, e a sua alteração por via das espécies reativas leva a alterações na sua fluidez e permeabilidade das mesmas, podendo mesmo levar à rutura; as proteínas podem sofrer alterações em termos da sua função ou até sofrer proteólise; no caso do DNA pode haver alteração das suas bases, provocando mutações.[56]

Algumas doenças têm vindo a ser relacionadas com os danos celulares provocados pelo stress oxidativo entre as quais tem-se doenças respiratórias, como a asma[57]; doenças neurodegenerativas como Alzheimer [59], Parkinson[60] e esclerose múltipla[61], cataratas[62], artrite reumatoide[63], arteriosclerose [64], doenças cardiovasculares [65], diabetes tipo 2[66] e vários tipos de cancro[67].

Para manter a homeostase celular, os organismos têm defesas antioxidantes, sendo elas enzimas endógenas, compostos químicos celulares e ainda algumas proteínas de ligação a metais. Em termos, das enzimas endógenas são: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatióno peroxidase (GTX) e a glutatióno S-transferase (GST). Já os compostos químicos celulares que permitem diminuir o stress oxidativo são o glutatióno (GSH), o ácido lipóico (LA), a N-acetil cisteína (NAC) e o ácido úrico.[68]

Outra fonte importante de compostos antioxidantes advém da dieta pela ingestão de alimentos com compostos como vitaminas, β -caroteno, vitamina C e E, entre outros. [69] Tem vindo a ser demonstrado que uma dieta rica em antioxidantes é importante para manutenção do sistema de defesa contra radicais livres no organismo prevenindo as doenças associadas ao stress oxidativo. [43]

Os compostos fenólicos que têm vindo a ser apontados como os maiores contribuintes para a atividade antioxidante dos alimentos, nomeadamente legumes, verduras e frutas.[70] Para além destes, os polifenóis estão presentes na constituição de várias algas usadas na alimentação humana, como é o caso da *F. vesiculosus*. [43] Os compostos fenólicos são capazes de atuar diretamente sobre os radicais doando elétrons ou átomos de hidrogénio, conseguem também modelar a atividade das defesas endógenas, melhorando o funcionamento das suas enzimas, inibindo ou reduzindo a formação de radicais livres e dos seus precursores.[70]

1.2.2 Inibição da Acetilcolinesterase

A doença de Alzhiemer (DA) é uma das formas de demência mais comum, caracterizada pela perda da capacidade cognitiva, alterações de personalidade, dificuldade de realização de tarefas do quotidiano e perda de memória.[71]

Os neurotransmissores são compostos químicos, que funcionam como mensageiros e possibilitam a transmissão dos impulsos nervosos e geralmente são armazenados nas vesículas sinápticas, tendo como função principal estabelecer a conexão através da fenda sináptica, transmitindo assim os impulsos nervosos.[71] A hipótese colinérgica explica que uma das possíveis causas da DA, é a destruição do neurotransmissor de acetilcolina, provocando assim distúrbios na transmissão dos impulsos nervosos. [72]

A síntese de acetilcolina (ACh) dá-se a partir da colina e acetil-coenzimaA (Acetil-CoA), na zona pré-sináptica e é catalisada pela enzima colinacetiltransferase (ChAT). Após a sua libertação é mediada pelos recetores nicotínicos e muscarínicos, podendo ser ativada ou inibida e a sua inibição dá-se na fenda sináptica, onde a enzima acetilcolinesterase (AChE) destrói a acetilcolina (ACh).[72]

A enzima acetilcolinesterase (AChE), pode ser dividida em duas formas moleculares: forma assimétrica que se encontra geralmente nas junções neuromusculares e a forma globular que pode estar sobe a forma monomérica, dimérica (**Figura 1.7**) e tetramérica, esta forma molecular pode ser encontrada nervos, músculos, eritrócitos e linfócitos.[73]

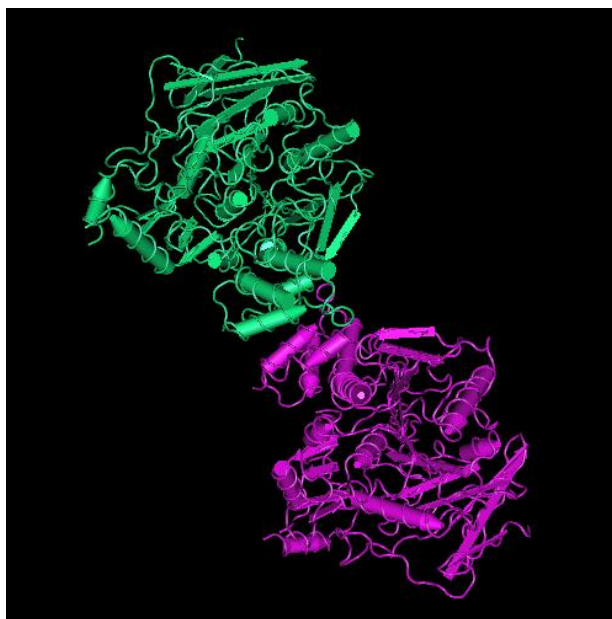


Figura 1.7 – Estrutura da acetilcolinesterase humana, proteína globular dimérica[74].

A doença de Alzheimer é uma doença sem cura, em 1997 surgiu o cloridrato de donepezil um fármaco que atua ao nível sintomático, melhorando as funções cognitivas do paciente não sendo hepatotóxica, atua ao nível da inibição da AChE. Baseados no mesmo mecanismo têm-se a galantamina, a rivastigmina.[71]

Os medicamentos baseados na hipótese colinérgica, inibem a enzima acetilcolinesterase (AChE), evitando assim a destruição do neurotransmissor acetilcolina (ACh). O que provoca um aumento a quantidade da acetilcolina (ACh), contribuindo para melhorias a nível sintomático da

DA. Contudo o inibidor deve conseguir ligar-se à acetilcolinesterase de forma reversível, pois caso contrário pode levar à morte do paciente. Existem ainda efeitos secundários associados ao uso deste tipo de medicamentos, pois para além do cérebro esta inibição vai afetar outros órgãos e processos bioquímicos, nomeadamente a nível gastrointestinal, pois a inibição da AChE provoca ainda o aumento da contração muscular, devido ao facto de se localizar nas junções neuromusculares.[75]

Já o neurotransmissor acetilcolina é responsável pela contração muscular e a elevada quantidade deste neurotransmissor provoca um desequilíbrio da atividade peristáltica na parede intestinal, ocorrendo assim uma inibição ou estimulação da motilidade gastrointestinal, e estes distúrbios provocando obstipação[76], tendo vindo a ser reportado este tipo de efeitos secundários com uso prolongado destes medicamentos.[77]

Por este motivo são necessárias alternativas a estes fármacos, tendo sido estudados vários extratos de plantas para inibir a atividade da acetilcolinesterase[78], [79], [80] e os compostos fenólicos são bons candidatos, especialmente os polifenóis.[75] Alguns dos exemplos que têm apresentado inibição da AChE são a quercetina, que é um flavonoide[81], o floroglucinol e seus derivados poliméricos.[82] E alguns autores defendem que uma dieta rica nestes compostos pode prevenir a demência e assim inibir a AChE, diminuindo ou substituindo o uso dos fármacos que provocam efeitos secundários prejudiciais. [75]

1.2.3 Inibição da HMGR

As doenças cardiovasculares são doenças que afetam o coração e os vasos sanguíneos e são uma das principais causas de morte,[83] podem ser provocadas por uma dieta desequilibrada rica em gorduras e desordens metabólicas como obesidade e fatores genéticos.[84] Uma das patologias mais comuns é a hipercolesterolemia,[83] que provoca aterosclerose, que resulta da acumulação de lipoproteínas nas artérias, estreitamento ou entupimento das mesmas.[84] A implementação de uma alimentação saudável pode ser uma solução para estes problemas, mas nem sempre é suficiente, especialmente em desordens metabólicas, onde não se consegue controlar a biossíntese ou a absorção do colesterol.[83]

O colesterol tem uma função estrutural na membrana celular e é um precursor da vitamina D, ácidos biliares e de outras hormonas, por este motivo a maioria do colesterol no corpo humano provem da sua biossíntese interna e o restante é absorvido através da alimentação.[83]

A produção endógena do colesterol dá-se pela via do mevalonato nas células eucariotas e em alguns procariotas, ocorre então a produção de um precursor o 5-difosfato de isopentenilo a partir da molécula acetil-Coenzima A, que inicia a síntese de várias biomoléculas importantes entre elas a do colesterol. A 3-hidroxi-3-metilglutarul coenzima A redutase (HMGR) humana é uma glicoproteína transmembranar, que catalisa a reação que transforma a 3-hidroxi-3-metilglutarul coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato[85], é uma enzima chave na biossíntese de colesterol e por este motivo tem sido o maior alvo para o tratamento da hipercolesterolemia.[83]

Assim sendo, para combater a hipercolesterolemia em termos farmacêuticos têm-se seguido duas vias a inibição da síntese endógena, que pressupõe a inibição da HMGR a medicação utilizada para este efeito são as Estatinas que são altamente reconhecidas pelos seus efeitos benéficos no controlo do colesterol.[85] A outra via que pode ser usada é diminuir a

absorção de colesterol proveniente da dieta e da biossíntese no intestino usando-se como fármaco o ezetimiba.[86]

As estatinas baixam os níveis de LDL-colesterol devido à sua inibição da HMGR, por este motivo os recetores de LDL no fígado aumentam a sua atividade de absorção do mesmo, sendo por este motivo importante manter uma dieta equilibrada [87], para além disto, a enzima HMGR é responsável pela biossíntese de outros isoprenoides não esteroides essenciais para as funções celulares o que contribui para os efeitos secundários como fraqueza muscular, dor de cabeça, insuficiência renal, distúrbios sensoriais, problemas hepáticos e depressão, tendo crescido a procura de inibidores desta enzima provenientes de alimentos, com objetivo da sua implementação numa alimentação saudável diminuindo assim os possíveis efeitos adversos.[83]

A enzima HMGR é um tetrâmero, na **Figura 1.8** está apresentada a sua ligação com quatro moléculas de atorvastatinas, que se localizam nas interfaces entre os dois monómeros adjacentes.[85]

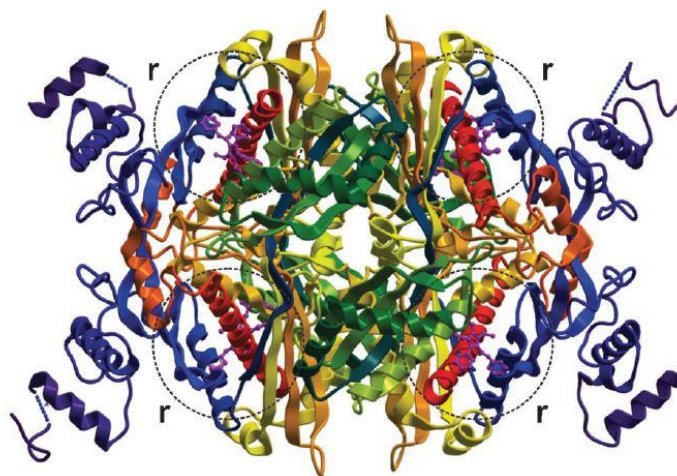


Figura 1.8 - Tetrâmero da HMGR ligado a quatro moléculas de atorvastatina, os locais da ligação estão identificados com um círculo e o “r” representa o raio da ligação[85].

Vários estudos sobre a ingestão de chá preto e verde[88], uvas[89] e sumos de pêssigo e ameixa[90], demonstraram o poder inibitório que a ingestão destes alimentos pode ter na inibição da HMGR, e maioritariamente estes extratos estudados são compostos por polifenóis, flavonoides e antocianinas.[90] Sabendo então destes resultados é expectável que o extrato da *F. vesiculosus*, apresente também um potencial efeito inibitório da atividade da enzima HMGR.

1.3 Filtração por membranas

Com vista a concentrar e fracionar os compostos bioativos do extrato da *F. vesiculosus*, utilizou-se a tecnologia de membranas que permite separar diferentes espécies químicas, consoante a sua massa molecular, interações com a membrana, diferenças de concentração e de potencial elétrico, dependendo do processo e força motriz utilizados.[91]

A tecnologia de membranas tem vindo a ganhar expressão no mundo da indústria química devido às suas várias aplicações e possibilidade de controlo da taxa de permeação das espécies químicas através da membrana. Até ao início do século XX, as membranas não eram usadas na indústria, eram apenas ferramentas de laboratório para determinar características físico-

químicas. Após alguma investigação as membranas de nitrocelulose ganharam alguma relevância, devido ao facto de poderem ser feitas de modo reproduzível podendo selecionar-se o tamanho de poro, sendo este aferido pelo teste da bolha, na década de 1930 estas membranas estavam disponíveis para venda e uso comercial. [92]

Com o passar dos anos foram testados outros polímeros para a concessão das membranas, nomeadamente o acetato de celulose, e nesta altura também ocorreu uma das primeiras utilizações significativas desta tecnologia, a filtração da água durante a segunda guerra mundial, para garantir a segurança da água ingerida. No entanto, esta tecnologia continuava a não ser muito usada na indústria devido a ser lenta, pouco seletiva e cara. Foi então que no início dos anos 1960, foram desenvolvidas as membranas assimétricas de osmose inversa de acetato de celulose por Loeb e Sourirajan, onde se conjugavam elevados fluxos com uma elevada seletividade devido a uma superfície seletiva ultrafina (camada ativa) que se apoiava numa camada suporte microporosa mais espessa e mais permeável. Com o avanço do estudo nesta área outras técnicas começaram a ganhar preponderância, nomeadamente a nanofiltração, a ultrafiltração e a microfiltração. [92]

As aplicações das membranas começaram a surgir primeiramente para dessalinização da água, tendo-se posteriormente expandido a sua aplicação a outras áreas como o tratamento de águas, a aplicação na indústria alimentar e farmacêutica e o seu uso para fins médicos como em órgãos e tecidos artificiais, biossensores e purificação de proteínas. [92], [93]

1.3.1 Membranas

Existem diferentes tipos de membranas sintéticas, que diferem na sua composição e modo de operação, estas servem para moderar a permeação de espécies químicas que são postas em contacto com a mesma. [92]

A estrutura das membranas pode ser homogénea, o que leva a uma composição e estrutura uniforme que são chamadas de membranas simétricas, por outro lado pode ser constituída por uma fina camada seletiva e outra de suporte mecânico sendo classificadas como membranas assimétricas, os diferentes tipos estão apresentados na **Tabela 1.1**. [92], [93]

Tabela 1.1 - Diferentes tipos de membranas.[92]

Tipo de membrana	Definição
Membranas Microporosas isotópicas	Similares aos filtros convencionais, estrutura rígida com poros distribuídos aleatoriamente e interconectados. Tamanho de poro entre 0.01 e 10 μm , sendo rejeitadas todas as partículas com tamanho superior ao dos poros. Portanto é eficaz quando o tamanho das partículas é muito diferente.
Membranas densas, não porosas	Um filme denso que permeia e transporta por difusão, usando como força motriz a pressão, a concentração ou o gradiente de potencial elétrico. A separação dos compostos está relacionada com a sua taxa de transporte através da membrana, que depende da sua difusão e solubilidade no material da membrana.
Membranas eletricamente carregadas	Podem ser densas ou microporosas, mas é mais usual serem microporosas, com os poros carregados positivamente ou negativamente. Podendo ser chamadas de membranas de troca aniónica, ligando-se a ela aniões do meio circundante, ou membrana de troca catiónica, que por sua vez liga catiões do meio circundante. Portanto a separação é feita com base na carga das partículas e em menor grau pelo tamanho do poro.
Membranas anisotrópicas	Neste caso, a taxa de transporte através da membrana é inversamente proporcional à espessura da membrana, como se pretende elevadas taxas de permeação as membranas devem ser o mais finas possível, o que torna esta técnica uma das mais económicas. Estas membranas são constituídas por uma camada superficial extremamente fina suportada por uma subestrutura muito espessa e porosa. Estas duas camadas podem ser formadas separadamente ou pelo mesmo processo, e tem geralmente diferentes polímeros na sua constituição. As propriedades de separação e taxa de permeação são determinada exclusivamente pela camada superficial. Devido a poderem ser usados elevados fluxos este tipo de membranas é o mais utilizado comercialmente.
Membranas líquidas, metálicas e cerâmicas	As membranas de cerâmica são microporosas e são usadas para ultrafiltração e microfiltração, tendo resistência a solventes e à temperatura. Quanto às membranas metálicas são geralmente de paládio, para separar o hidrogénio de misturas gasosas. Por fim, as membranas líquidas foram criadas para facilitar o processo de transporte.

Têm vindo a aumentar o número de polímeros usados na realização das membranas poliméricas, assim como o seu modo de produção. Os modos de produção mais usados são: o modelo de lixiviação usado na produção de membranas de vidro poroso, no qual se usam dois componentes diferentes que formam uma mistura homogénea e por lixiviação um destes é removido seletivamente; o alongamento de um filme polimérico que consiste numa película polimérica densa que pode ser esticada gerando assim um filme com poros, usado em membranas semipermeáveis; o revestimento de membranas que consiste em revestir membranas porosas com um filme polimérico, o qual determina as propriedades de separação; a polimerização interfacial, que consiste em preencher os poros com um polímero e depois imergir a membrana num reagente formando um novo polímero entre a interface do primeiro e do banho, formando assim uma camadas seletiva; e por fim, o método de inversão de fases, que foi usado neste trabalho.[93]

O método de inversão de fases é uma técnica muito comum para preparar membranas assimétricas, sendo adequado a um largo espectro de filtrações desde a microfiltração até à permeação gasosa. É uma técnica muito versátil conseguindo-se fazer subestruturas porosas com ou sem um filme denso/poroso com tamanhos de poro bem definidos.[93]

O processo de inversão de fases é um processo conduzido termodinamicamente, onde inicialmente se prepara uma solução polimérica, constituída pelo polímero e por um sistema de dois solventes (um forte e outro fraco promotor de poros). Após a mistura da solução esta é espalhada numa placa de vidro a uma temperatura constante, após um tempo definido de espera, onde se dá a evaporação do solvente mais volátil, a placa é colocada num banho frio de coagulação que provoca um arrefecimento rápido do filme polimérico, dando-se a precipitação deste e a troca de água pelos solventes formando assim a subestrutura porosa.[93], [94] A face superior, que está em contacto com o ar, dá origem à camada ativa e a face que está em contacto com o vidro dá origem à camada suporte. [93]

Alguns dos polímeros que compõem as membranas preparadas pelo método de inversão de fases são o acetato de celulose (AC), a poliamida (PA), a poliacrilonitrila (PAN), polisulfona (PSU), poliétersulfona (PES), fluoreto de polivinilideno (FPVD), politetrafluoreto (PTFE), polieterimida (PEI) e polipropileno (PP).[95], [96]

1.3.2 Caracterização das Membranas

O tipo de membrana usada deve ser adequada ao processo de permeação para que se destina, ou seja, ao que deve permear e concentrar, por este motivo existem diferentes processos de filtração por membranas, onde a força motriz é a pressão, que são a osmose inversa, a nanofiltração, a ultrafiltração e a microfiltração (**Figura 1.9**).[92]

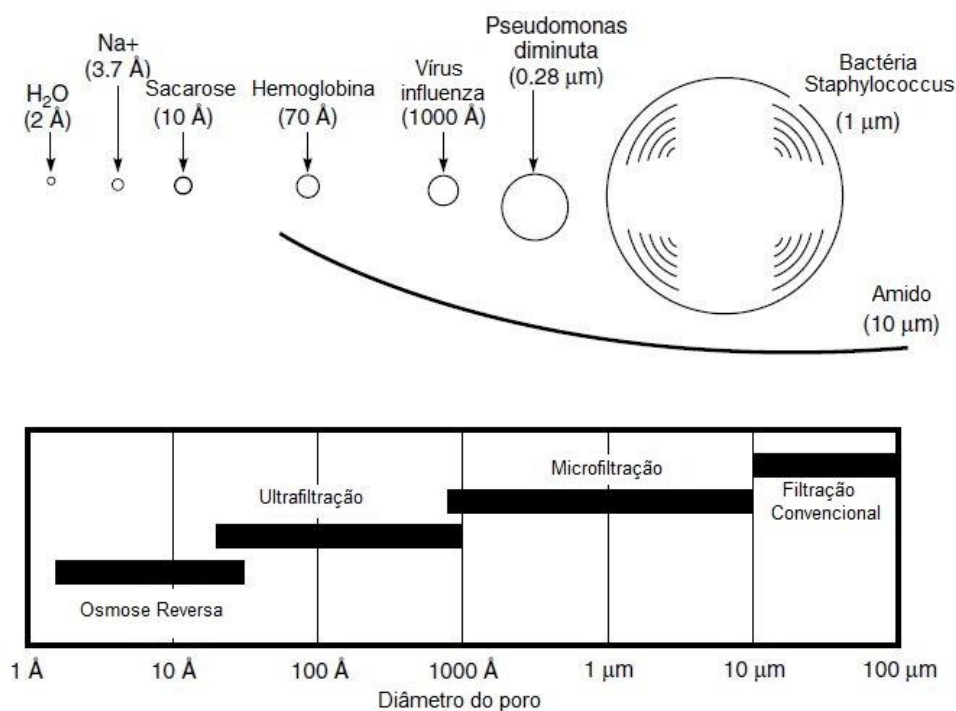


Figura 1.9 – Tamanho relativo dos diferentes solutos a remover por cada uma das classes das membranas, consoante o seu tamanho de poro, adaptado de[92].

Ao realizar a caracterização das membranas é possível determinar os processos em que podem ser empregues. Na **Tabela 1.2** têm-se os diferentes processos de filtração por membranas, em que a força motriz é a pressão, e suas características.

Tabela 1.2 - Diferentes processos de filtração por membranas.[96], [97]

Processo de Separação	Tipo de membrana	Força Motriz	Limite de exclusão molecular (Da)	Aplicações
Osmose Inversa (OI)	Assimétrica/ Filme Denso	20 – 100 bar	< 100	Separação de sais e microsolutos
Nanofiltração (NF)	Assimétrica/ Filme Denso	10 – 40 bar	100 – 500	Separação parcial de sais e solutos orgânicos
Ultrafiltração (UF)	Assimétrica/ Microporosa	0.5 – 5 bar	500 – 100 000	Separação de macromoléculas
Microfiltração (MF)	Microporosa	0.1 – 1 bar	> 100 000	Esterilização, clarificação

A caracterização primária das membranas é feita através da determinação da permeabilidade hidráulica e do limite de exclusão molecular da membrana (*Molecular Weight Cut-Off* (MWCO)).

A permeabilidade hidráulica (L_p) é a permeação de uma membrana para com a água pura, e representa assim a quantidade de água permeada por unidade de tempo, área superficial e pressão transmembranar. A determinação deste parâmetro é feita pela determinação do declive numa representação gráfica do fluxo de permeação (J_p) em função da pressão transmembranar aplicada (ΔP), expressão **(1)**. [97]

$$J_p = L_p \times \Delta P \quad (1)$$

A determinação do fluxo de permeação é dada pela razão do peso do permeado coletado (M_p), pela área útil das membranas (A) e pelo tempo de permeação (t), usando se a expressão **(2)**. [98]

$$J_p = \frac{M_p}{A \times t} \quad (2)$$

No entanto, a comparação entre fluxos de permeação (J_p) só pode ser feita se estes forem referentes à mesma temperatura, uma vez que a temperatura influencia a viscosidade e os fenómenos de transferência de massa presentes. É, portanto, necessário normalizar os J_p para uma mesma temperatura, geralmente 25 °C. A expressão **(3)** permite a normalização do fluxo de permeação para 25 °C, onde J_p (ensaio) é o fluxo volumétrico de permeação calculado com a expressão **(2)** e T_{ensaio} é a temperatura registada durante o ensaio. [97]

$$J_p(25\text{ °C}) = \frac{J_p(\text{ensaio})}{0.901} \times e^{\left(-6.96 + \frac{2044}{273.15 + T_{\text{ensaio}}}\right)} \quad (3)$$

Determinando então do fluxo de permeação (J_p) corrigido para a temperatura de 25 °C e tendo em conta a pressão transmembranar (ΔP) aplicada é possível fazer a representação linear destes parâmetros **Figura 1.10**, e determinar o declive que é o valor da permeabilidade hidráulica (L_p), tendo como unidade kg/h/m²/bar.[97]

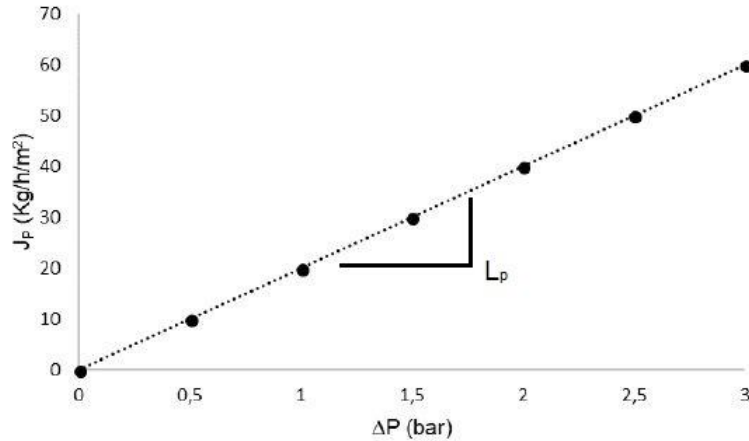


Figura 1.10 - Representação gráfica do fluxo de permeação em função da pressão transmembranar, para a determinação da permeabilidade hidráulica, adaptado de[97].

Para calcular o limite de exclusão molecular é importante calcular o coeficiente de rejeição aparente da membrana a solutos orgânicos modelo. A rejeição aparente é medida tendo em conta o soluto, a membrana, a pressão e a hidrodinâmica do sistema, e representa assim a capacidade de a membrana rejeitar preferencialmente determinados solutos, sendo uma das características mais importantes das membranas. O coeficiente de rejeição aparente (f) pode ser calculado pela expressão (4), onde C_{Aa} é a concentração do soluto A na alimentação e C_{Ap} é a concentração do soluto A no permeado. [97],[98]

$$f = \frac{C_{Aa} - C_{Ap}}{C_{Aa}} \quad (4)$$

O limite de exclusão molecular diz respeito à massa molecular de um soluto de referência com uma rejeição aparente de aproximadamente 91%, este parâmetro é determinado pela interceção da linha $\log \frac{f}{1-f}$ vs massa molecular dos diferentes solutos de referência (MW) com a reta $y= 1$. Este processo está representado na **Figura 1.11**. [97],[98]

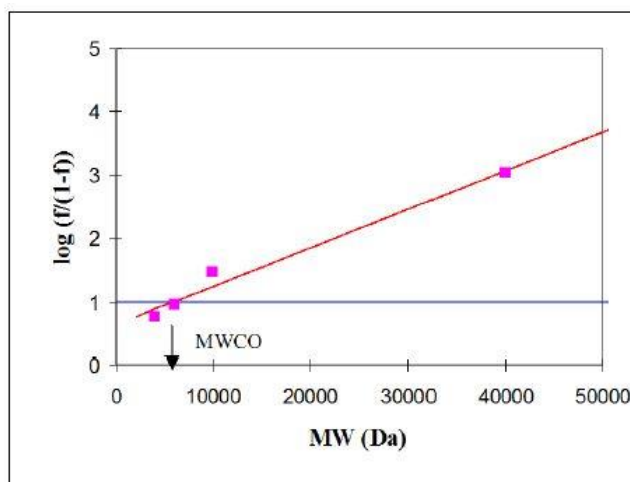


Figura 1.11 - Representação do gráfico para a determinação do MWCO[97].

1.3.3 Modos de Operação

Na maioria dos casos a força motriz do processo das membranas é a pressão transmembranar, no entanto, em casos como a diálise, a força motriz é a diferença de concentração de um soluto em cada um dos lados da membrana e, no caso da eletrodialise, a força motriz é a diferença de potencial elétrico[95]

A permeação pode ocorrer em recirculação total, onde o permeado e o concentrado são recirculados para o tanque de alimentação; ou em modo de concentração, onde apenas a corrente de concentrado é recirculada para o tanque de alimentação e o permeado é continuamente retirado; e por diafiltração que é um modo de operação onde é adicionada água ao sistema, na mesma proporção do permeado retirado.[98]

O modo de operação utilizado neste trabalho foi a diafiltração que é uma técnica que faz uso de membranas de ultrafiltração, para remover ou baixar a concentração de sais ou solventes de soluções contendo proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas. É um processo seletivo que permite separar os componentes da solução com base no seu tamanho molecular, pois este tipo de membranas retém moléculas maiores que os poros da membrana (na corrente de concentrado) e as mais pequenas como sais, solventes e água são permeadas através dos poros da membrana (na corrente de permeado).[99]

Neste processo é muito importante ter em conta o MWCO, para garantir a permeabilidade dos compostos de interesse, se o MWCO for muito próximo do composto a purificar, existe uma maior probabilidade de existirem perdas. Outro dado importante a considerar é o fator tempo em função daquilo que se quer recuperar, muitas vezes poros pequenos levam a tempos de permeação muito longos, devendo encontrar-se um compromisso entre esses dois fatores, pode ainda aumentar-se a área útil da membrana para acelerar o processo.[99] Na **Figura 1.12** encontra-se um esquema da diafiltração.

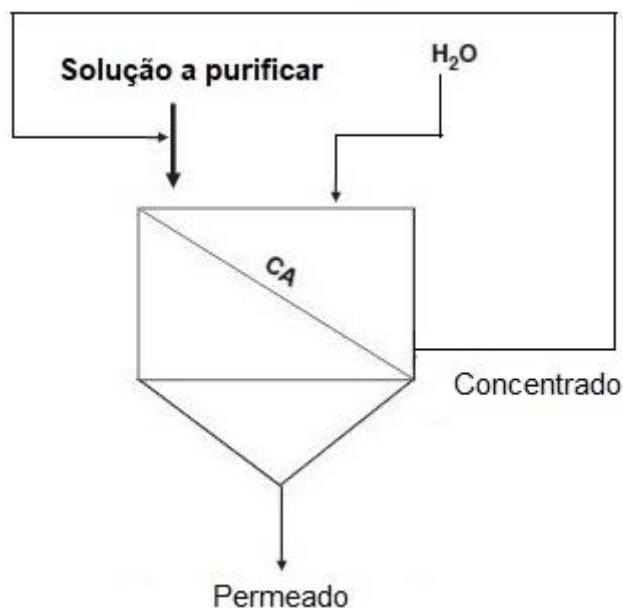


Figura 1.12 - Esquema da diafiltração, para a membrana CA onde H₂O indica a adição de água ao sistema, obtendo-se assim a partir da solução a purificar um concentrado e um permeado, adaptado de[98].

As vantagens da diafiltração são o fato desta ser uma técnica simples e conveniente na remoção de sais e solventes, e minimiza o risco de perda ou contaminação da amostra. Esta técnica pode ser feita em modo contínuo, quando se adiciona água ou outro tampão à alimentação na mesma proporção que o fluxo de permeação, assim o volume e a concentração dos solutos retidos não variam ao longo do tempo, permitindo que os fluxos de permeação se mantenham elevados ao longo do processo. Com a adição de água, a concentração na corrente de concentrado de sais e solutos mais pequenos que o MWCO vai-se reduzindo permitindo reter no concentrado os solutos com maior massa molecular. No modo descontínuo a amostra é diluída com água ou tampão para um volume definido e posteriormente volta a ser concentrada até ao volume inicial, devendo repetir-se o processo até que os sais ou solventes de menor massa molecular sejam recuperados no permeado.[99]

Os processos industriais onde o uso da tecnologia de membranas é empregue, têm vindo a aumentar, não só pelos seus bons resultados em termos de seletividade e permeação, mas também porque existem equipamentos modulares, cada vez mais baratos, capazes de serem aplicados industrialmente, com grandes áreas de membrana e com processos mais simples. Os diferentes módulos de membranas estão apresentados na **Tabela 1.3**. [92]

Tabela 1.3 - Módulos de membranas e as suas diferentes características operacionais.[92],[91]

Módulo	Processo de Separação	Custo/Área	Custos de manutenção	Consumo de Energia	Controlo da Acumulação de Sujidade/Polarização da Concentração	Volume de Retenção
Plano	Versátil para qualquer processo	Elevado	Baixo	Médio	Razoável	Médio
Tubular	MF	Elevado	Elevado	Elevado	Muito Bom	Elevado
Fibras Ocas	OI	Baixo	Moderado	Baixo	Mau	Baixo
Enrolado em espiral	OI/UF	Baixo	Baixo a moderado	Médio	Razoável	Médio

Mais recentemente, surgiu um novo tipo de módulo, o de vibração e rotação, onde as membranas se movem mais rápido que o fluido que as atravessa. Estes movimentos das membranas criam uma agitação interior na superfície da membrana impedindo assim a colmatação, por este motivo podem ser usados em processos de ultrafiltração de soluções muito concentradas e viscosas que não podem ser filtrados nos outros módulos. No entanto uma das desvantagens deste módulo é ser extremamente caro e consumir muita energia.[92]

A escolha do módulo, deve ter em conta o seu custo, que varia bastante com o tipo de módulo, e o processo de filtração, é relevante considerar os parâmetros/características da alimentação e de cada um dos módulos para perceber se são adequados ao processo em causa, em termos do volume que são capazes de processar, a sua resistência à pressão e controlo da polarização da concentração e da colmatação.[92]

1.3.4 Dificuldades na Filtração por Membranas

Um dos maiores problemas na tecnologia de membranas é a polarização da concentração, que consiste na acumulação dos solutos na interface membrana/alimentação, formando um gradiente de concentração.[95]

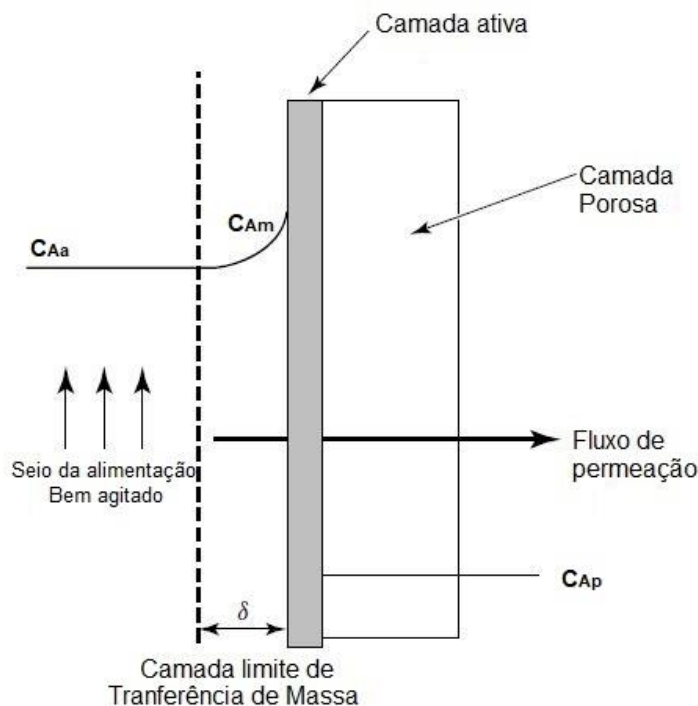


Figura 1.13 – Gradiente de concentração de um soluto num processo de membranas, adaptado de[92].

Na **Figura 1.13**, está representado o fenómeno da polarização de concentração, onde se tem a variação da concentração dos solutos desde o seio da solução (C_{Aa}) até chegar à superfície adjacente à membrana (C_{Am}) que é mais elevada, devido à rejeição e acumulação dos solutos. As estratégias para minimizar este problema passam por aumentar a turbulência da alimentação, aumentando o caudal da alimentação, que vai diminuir a camada limite de transferência de massa, ou por trabalhar a pressões transmembranares mais baixas, levando assim à diminuição da concentração dos solutos na superfície da membrana.[92]

Outra perturbação do sistema de membranas é a colmatação, que consiste na deposição de partículas na superfície externa da membrana ou no interior dos poros. Esta é uma das maiores limitações para a aplicação das membranas na indústria, pois terá de se parar o processo de filtração para remover os depósitos. Esta deposição pode ocorrer de diferentes formas por absorção, interação química, formação de bolo e partículas que bloqueiam os poros.[96] A colmatação reduz a área útil da membrana e leva a uma redução do fluxo da membrana, os principais parâmetros que influenciam este problema são: a natureza e concentração da solução, o tipo de membrana usado, o tamanho do poro e a sua distribuição, as características do material que compõe as membranas e a hidrodinâmica do módulo de membranas. Este problema pode ser eliminado/minimizado usando pré-tratamentos adequados.[96]

A tecnologia de membranas começou como sendo uma técnica cara e que consumia muita energia, no entanto este custo tem vindo a diminuir. Outros fatores a ter em conta são: i) os módulos de membranas em termos do seu fabrico e características que podem não estar adequadas a todos os processos; ii) o uso de todas as correntes formadas neste processo, geralmente apenas uma tem valor comercial e outra pode ser descartada, devendo arranjar-se estratégias de reaproveitar as duas para um processo amigo do ambiente e por fim iii) há a

necessidade de especialização para trabalhar e desenhar estes processos, tornando assim esta técnica mais cara e em termos de recursos humanos.[96]

1.3.5 Novas áreas de aplicação de membranas

As membranas têm sido cada vez mais aplicadas na indústria, para além da aposta na investigação e desenvolvimento de materiais com variada aplicação e elevado tempo de vida, também tem sido investigado novos módulos de membranas e modos de controlo do processo para o tornar mais fácil de operar. No entanto, ainda é necessária maior investigação em algumas áreas, para deixar de ser uma aplicação potencial e passar a ser efetivamente usada.[90],[94]

As novas aplicações abrangem a indústria química, alimentar, farmacêutica e biomédica. Na indústria alimentar é aplicada em diversos processos como na esterilização a frio, na clarificação, na secagem e espessamento, na dessalinização, no fracionamento e concentração, na recuperação de produtos e na remoção de álcool. Já na indústria farmacêutica tem vindo a ser implementado na purificação de anticorpos monoclonais, na filtração de vírus, na filtração de produtos da fermentação e como reatores biológicos. No caso da indústria química na filtração de compostos químicos, reatores de membrana, reciclagem de efluentes e na indústria biomédica em equipamentos de diagnóstico, fígado e rim artificial. [91],[96]

Para além destas aplicações tem sido estudada a aplicação desta tecnologia no tratamento dos resíduos industriais de modo a serem reutilizados ou valorizados.[96] Têm vindo a ser estudada a hipótese de valorizar efluentes industriais, permitindo possível a reutilização da água residual e aproveitando a sua carga orgânica, que tem elevado impacto a nível ambiental e toxicológico, para obtenção de compostos bioativos com potencial farmacológico, como é o caso das águas residuais da indústria da cortiça.[98]

2 Objetivo

Este trabalho tem por base a valorização de compostos bioativos marinhos presentes na alga *Fucus vesiculosus* que é muito abundante em várias regiões, inclusive em Portugal. Existindo já algumas evidências de que os seus compostos têm atividades biológicas interessantes, este trabalho pretende aprofundar esta temática, incluindo-se neste âmbito a sua capacidade antioxidante e os seus efeitos sobre doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, em particular ao nível da hipercolesterolemia.

Neste trabalho efetuou-se uma abordagem inovadora aplicando-se o fracionamento do extrato da alga por tecnologia de membranas, a fim de obter um produto enriquecido em compostos de elevado valor, ditos como os mais bioativos. Usou-se a ultrafiltração para a purificação do extrato, num processo de diafiltração/concentração da amostra, obtendo-se diferentes frações que foram avaliadas relativamente ao seu potencial biológico.

Com este trabalho pretendeu-se ainda identificar alguns dos compostos presentes no extrato e permeados, como o objetivo de clarificar o papel destes compostos sobre as atividades exibidas pelos extratos de algas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Equipamentos

Na preparação dos extratos e na precipitação das mucilagens foi utilizada a centrífuga Beckman® J2-21M/E com o rotor JA-20.1 e JA-14, para a preparação das amostras para o HPLC-DAD e para o LC-MS e também em alguns ensaios de quantificação usou-se a centrífuga Minispin® 5415D da Eppendorf, quanto ao HPLC-DAD este é da marca VWR® HITACHI Autosampler L-2200 e o LC-MS é da Bruker® Elute autosampler UHPC.

Para a realização dos ensaios colorimétricos usou-se o espectrofotômetro Shimadzu® UV-160A, para o ensaio da citotoxicidade foi utilizado um leitor de microplacas TECAN® Sunrise. Nos ensaios que era necessário uma agitação vigorosa usou-se o vortex Heidolph® REAX 2000, ou o ultra-sons Elma® Transsonic 460/H.

Para a realização das pesagens usaram-se duas balanças, sendo que a balança Sartorius® BP 1200 foi usada apenas na pesagem da alga seca e na aferição do peso das amostras a centrifugar, já a balança Sartorius® BP 110 S foi utilizada na maioria dos ensaios, devido à sua maior precisão.

O medidor de pH é da HANNA® Edge^{PH} e a placa de aquecimento e agitação Agimatic-N JP Select, para a concentração das mucilagens e para o ensaio da quantificação dos lípidos, foi utilizado o evaporador rotativo Büchi® R-200, acoplado com um sistema de vácuo Büchi® B-169 e um banho Büchi® B-490, para a incubação dos extratos usou-se o banho GFL® 1083 e para a secagem dos mesmos usou-se o liofilizador Heto® PowerDry LL 3000 emparelhado com uma bomba Edward RV3.

No passo de purificação deste trabalho usou-se uma instalação de ultrafiltração da ORM-tecnologia e ciência, que é constituída por uma bomba da Leroy Somer® um rotâmetro da Georg Fischer e um suporte para as membranas com uma área útil de membrana de 147,8 cm². Para a verificação da temperatura e condutividade usou-se um multímetro da WTW® Multi 340i/SET. Para a pesagem dos reagentes e permeados recolhidos usou-se a balança Kern® P8, já o HPLC-IR usado para determinar a concentração dos solutos orgânicos de referência, é constituído por um cromatógrafo da DIONEX® (Ultimate 3000) e um detetor de índice de refração da Shodex® (RI-101), sendo utilizado o programa CHROMELEON® (Chromatography Management System, versão 6.70) para determinação da área dos picos.

Para o ensaio da citotoxicidade, para garantir as condições assépticas usou-se a câmara de fluxo laminar Esco® Class II Biohazard Safety Cabinet, as células foram incubadas numa estufa da Sheldon Mfg.Inc® Shel Lab CO₂ Series e para visualização das células usou-se o microscópio ótico MOTIC® AE21.

3.2 Reagentes

Para a realização dos extratos usou-se pepsina da Fluka e a pancreatina da Sigma, para a retirada das mucilagens utilizou-se etanol a 96% da Riedel-de HaënTM. Para as análises em HPLC-DAD usou-se ácido trifluoracético (TFA) da Panreac, o acetonitrilo (ACN) da Carlo Erba, o metanol (MeOH) da Riedel-de HaënTM e água Millipore (resistividade 18.2 MΩ cm, A 25°C) que se retirou de um sistema de água Milli-Q da Academic Merk. Na análise por espectrometria de massa usou-se acetonitrilo (ACN), 2-propanol e ácido acético da Fisher Scientific, OptimaTM, já a água Milli-Q e o ácido fórmico da Merk. Quanto aos padrões usados nos dois métodos anteriores

o floroglucinol, ácido gálico, ácido cafeico da Sigma-Aldrich, D-manitol da Carlo Erba, ácido quinico da Merk e o ácido vanílico da Fluka.

Para os diferentes ensaios de quantificação e determinação da atividade usou-se o reagente de Folin-Ciocalteu, o floroglucinol, o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), a acetilcolinesterase (AChE), o iodeto de acetilcolina (AChI), o tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), a albumina de soro bovino (BSA) e o polivinilpolipirrolidona (PVPP) da Sigma-Aldrich. O cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) da Panreac, já o 5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenóico) (DTNB) da VWR, o metanol da Riedel-de Haën™ e o reagente para o ensaio das proteínas da Bio-Rad e a glucose da HiMedia, quanto ao ácido sulfúrico, carbonato de sódio (Na_2CO_3) e clorofórmio são da Merk.

Os kits utilizados foi o da quantificação do D-Manitol que é da Megazyme e o da inibição da HMG-CoA redutase que é da Sigma-Aldrich.

Quanto às membranas utilizou-se acetato de celulose 50 000 g/mol da Sigma-Aldrich, acetona comercial e formamida p.a. da Scharlau. Os solutos orgânicos de referência utilizados foram os polietilenoglicóis (PEG) de 3 000 g/mol, 6 000 g/mol e 10 000 g/mol da Merk, o PEG 20 000 g/mol da Fluka, o dextrano (DEX) 40 000 g/mol da Sigma-Aldrich e o DEX 70 000 g/mol da Panreac.

Para a determinação da citotoxicidade utilizou-se brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) da Sigma, o meio RPMI, o soro bovino fetal (FBS), a tripsina (10x) e a L-glutamina (2 mM) da Lonza, o metanol da Riedel-de Haën™ e o antimicótico (100x, com 10 000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomomicina e 25 µg/mL de anfotericina B).

3.3 Preparação dos extratos da *F. vesiculosus*

Para a realização do trabalho a alga, *Fucus vesiculosus*, foi recolhida do Rio Tejo (Lat 38 7822 N, Long 9 0913 W) em Outubro, seguidamente foi colocada em água com uma pequena quantidade de lixívia para garantir uma melhor higienização e depois lavada em água corrente, este processo foi repetido por três vezes, entre cada uma das lavagens foram escolhidas as algas em melhores condições e com menos sujidade.

As algas foram cortadas em fragmentos, colocadas em frascos e secas no liofilizador. Após a secagem foi reduzida a pó, num moinho. Foram então preparados diferentes extratos da alga, realizando três extrações para simular a ingestão da alga, a digestão gástrica (ADG), a digestão pancreática (ADP) e a digestão gástrica seguida de pancreática, designada completa (ADC), sendo também realizados os respetivos controlos destas digestões, ou seja, sem uso das enzimas digestivas, controlo da digestão gástrica (ACG), controlo da digestão pancreática (ACP) e o controlo da digestão completa (ACC), estas técnicas foram baseadas no artigo de *Falé et al.* [100]. Foi ainda realizado um extrato da alga por decocção a uma pressão de 2 bar (AD).

3.3.1 Extrato da Digestão Gástrica

Preparou-se uma solução de pepsina de 3.2 mg pepsina/mL em solução NaCl 2 mg/mL a pH 1.2, sendo esta a solução de suco gástrico (SG).

Para realizar a digestão foi então feita uma solução de 0.3 g alga seca/mL solução de suco gástrico que foi diluído 1:3 em água destilada, agitou-se a solução e esta foi colocada a incubar

a 37 °C durante 2 horas. O controlo desta digestão foi feito do mesmo modo, mas substituiu-se a solução de suco gástrico por água destilada.

Por fim, centrifugou-se a 3 500 g, durante 30 minutos a uma temperatura de 4 °C e retirou-se o sobrenadante que é o extrato da digestão gástrica (ADG) e o seu respetivo controlo (ACG).

3.3.2 Extrato da Digestão Pancreática

Preparou-se uma solução de pancreatina de 25 mg pancreatina/mL em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 8, sendo esta solução de suco pancreático (SP).

Para realizar a digestão pancreática foi feita uma solução de 0.3 g de alga seca/mL de solução de suco pancreático que foi diluída 1:3 em água destilada, agitou-se a solução e esta foi colocada a incubar a 37 °C durante 2 horas. O controlo desta digestão foi feito do mesmo modo, no entanto adicionou-se água destilada em vez de suco pancreático.

Por fim, centrifugou-se a 3 500 g, durante 30 minutos a uma temperatura de 4 °C e retirou-se o sobrenadante que é o extrato da digestão pancreática (ADP) e o seu respetivo controlo (ACP).

3.3.3 Extrato da Digestão Completa

Para a digestão completa foram usados primeiramente o suco gástrico, e de seguida o suco pancreático, sendo que esta mistura forma o suco da digestão completo (SC). Primeiramente preparou-se uma solução 0.3 g de alga seca/mL de solução de suco gástrico, após agitação da mistura este foi incubado a 37 °C durante 2 horas. Seguidamente diluiu-se a solução anterior numa proporção 1:3 com a solução de suco pancreático, misturou-se e voltou a incubar-se a 37 °C durante 2 horas. O controlo desta digestão foi feito do mesmo modo, alterando-se as soluções de sucos por água destilada.

Por fim, centrifugou-se a 3 500 g, durante 30 minutos a uma temperatura de 4 °C e retirou-se o sobrenadante que é o extrato da digestão completa (ADC) e o seu respetivo controlo (ACC).

3.3.4 Extrato da Decocção a uma pressão de 2 bar

Para efetuar a decocção a uma pressão de 2 bar teve-se por base o artigo de *Trinh et al.* [101], preparou-se uma solução 0.1 g de alga seca/mL de água destilada, uniformizou-se a mistura e foi colocada no autoclave a 121 °C durante 30 min.

De seguida procedeu-se a uma filtração da solução com gaze de modo a retirar os maiores fragmentos e de seguida centrifugou-se a 3 500 g, durante 30 minutos a uma temperatura de 4 °C e retirou-se o sobrenadante que é o extrato da decocção (AD).

3.4 Extração das mucilagens

Com vista a tentar uma purificação primária dos extratos retirou-se as mucilagens e alguns compostos poliméricos, com vista a melhorar os resultados das atividades biológicas, tendo por base o artigo Ghanem et al.[102].

Procedeu-se à diluição de cada um dos extratos preparadas numa proporção de 1:4 em etanol, agitou-se a solução e deixou-se “overnight” no frigorífico a 4 °C. Centrifugou-se a solução a 3 500 g durante 30 minutos a 4 °C, retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado água destilada e depois voltou-se a repetir todo este procedimento.

Os sobrenadantes obtidos, foram concentrados no evaporador rotativo a 37 °C, ressuspendeu-se em água destilada e terminou-se a secagem no liofilizador, sendo então designados por extratos sem mucilagens (sm).

Os precipitados foram secos no liofilizador e designados por mucilagens do extrato (m).

3.5 Quantificação dos fenóis totais

O método de *Folin-Ciocalteu* é um método simples para a determinação da concentração de fenóis em amostras e tem sido usado para detetar polifenóis em produtos naturais. Neste método ocorre uma reação de oxidação-redução com os grupos fenólicos os quais são oxidados pelo ião metálico do reagente *Folin*, molibdênio (Mo^{6+}), e o meio reacional muda de cor passando de amarelo para azul, pode ver-se um esquema da reação que ocorre representada abaixo na **Figura 3.1** adaptada ao uso de floroglucinol, tendo em atenção que a estrutura de complexação do Mo^{5+} é desconhecida, sendo esta adaptação apenas uma proposta do que poderá acontecer.[103], [104], [105]

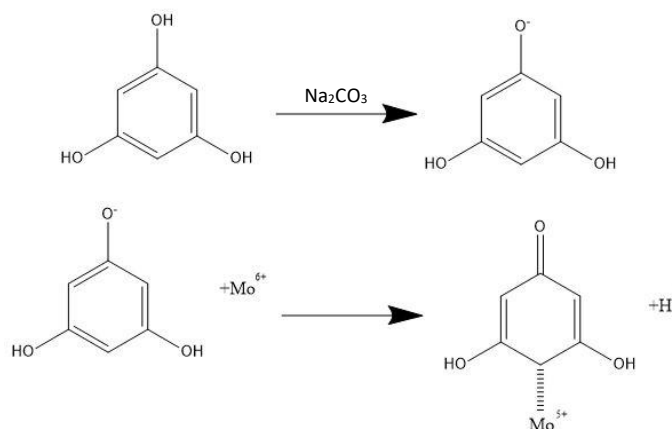


Figura 3.1 – Reação que ocorre entre o floroglucinol e o molibdênio componente do reagente *Folin-Ciocalteu*, adaptada de[103],[105].

Para a quantificação dos fenóis totais dos extratos e das frações foi usado o método de *Folin-Ciocalteu* descrito por *Oktay et al.* [106], no entanto realizou-se uma alteração ao procedimento a reta de calibração foi feita usando um padrão de floroglucinol (FLG) com concentração de 0 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ descrito por *Parys et al.* [107].

Para a realização da reta de calibração foi usada 30 μL da solução do padrão para cada uma das concentrações, à qual foi adicionada 1350 μL de água destilada e 30 μL do reagente *Folin-*

Ciocalteu, agitou-se a solução no vortex e esperou-se 3 minutos e por fim adicionou-se 90 µL de uma solução de Na₂CO₃ a 2 % m/v. Incubou-se a mistura durante 1 hora sob agitação a 4 °C e leu-se a absorvância a 760 nm contra o respetivo ensaio em branco.

Para a realização dos cálculos da concentração de fenóis totais usou-se a **Equação (5)** da reta de calibração do floroglucinol (**Anexo 1**). Sendo que Abs_{760 nm Cor.} representa absorvância a 760 nm corrigida (U.A.) e C_{fenóis} é a concentração de fenóis totais em equivalentes de floroglucinol (FLG), tendo como unidades (µg FLG/mL).

$$\text{Abs}_{760 \text{ nm Cor.}} = 0.0088 C_{\text{fenóis}} - 0.0057 \quad (5)$$

3.6 Quantificação dos Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos complexos com vários tipos de estruturas, este método gravimétrico faz uso de polivinilpolipirrolidona (PVPP) que se complexa com os taninos e por centrifugação remove-se o PVPP assim como os taninos. Seguindo o método descrito em 3.5 e fazendo a diferença entre os fenóis totais e os fenóis não taninos, obtém-se a concentração de taninos existentes na amostra.[108] Para a quantificação dos fenóis totais usou-se o método de *Folin-Ciocalteu* para determinar, como referido, os fenóis totais e os fenóis depois de realizar a extração dos taninos que foi feita tendo por base o artigo de *Makkar et al.*[108]. Foi então usado 2 mL de amostra e adicionou-se 100 mg de PVPP, agitou-se a mistura e esta foi incubada por 15 minutos a 4 °C, centrifugou-se 12 000 g por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante que foi quantificado pelo método de *Folin-Ciocalteu* de acordo com o procedimento descrito em 3.5, a concentração de taninos é dada pela diferença entre os fenóis totais e os fenóis não taninos.

3.7 Quantificação das proteínas

O método de Bradford baseia-se na ligação das proteínas ao azul de Coomassie G-250 e esta ligação faz com que a absorvância máxima do corante se desloque para os 595 nm, ou seja, o aumento da absorvância a este comprimento de onda indica a presença de proteína. É um método reprodutível e rápido, pois basta 2 minutos para a ligação ocorrer entre a proteína e o corante, e este complexo é estável durante aproximadamente 1 hora.[109]

Foi utilizado o método de Bradford de acordo com o procedimento descrito pela Bio-Rad [110], sendo necessário realizar uma reta de calibração, onde se usou padrões de BSA de concentração entre 0 a 0.01 mg/mL.

Para o cálculo da concentração de proteínas no extrato, usou-se a reta de calibração da absorvância a 595 nm corrigida (Abs_{595nm Cor.}) em função da concentração dos padrões de BSA (C_{proteínas}) em (mg proteína/mL) (**Anexo 2**), representada na **Equação (6)**.

$$\text{Abs}_{595 \text{ nm Cor.}} = 47.466 C_{\text{proteínas}} + 0.0029 \quad (6)$$

3.8 Quantificação de glúcidos

O método da antrona é um teste colorimétrico, que se baseia no aquecimento da solução de antrona mais a amostra/padrão a 100 °C, o que facilita a hidrólise dos polissacáridos, e posteriormente a ligação covalente dos monossacáridos formados à molécula de antrona, este complexo formado tem uma cor azul-esverdeada que absorve aos 620 nm.[111]

Para a determinação da quantidade de glúcidos usou-se o método da antrona descrito em *Xu et al.*[112]. Para cada uma das concentrações, extratos e frações foram diluídos de 1:5 na solução de antrona 0,2 % (m/v) em H₂SO₄ a 95 %. Seguidamente agitou-se a mistura, esta foi incubada durante 10 minutos a 100 °C e depois 10 minutos em banho de gelo. Deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente, e mediu-se a absorvância a 620 nm contra o branco.

Para o cálculo da concentração de glúcidos no extrato, usou-se a reta de calibração da absorvância a 625 nm corrigida ($Abs_{625\text{ nm Cor.}}$) em função da concentração de glucose ($C_{\text{glúcidos}}$) (mg glucose/mL) (**Anexo 3**), representada na **Equação (7)** entre 0 a 0.02 mg/mL.

$$Abs_{625\text{ nm Cor.}} = 42.678 C_{\text{glúcidos}} - 0.0078 \quad (7)$$

3.9 Quantificação do manitol

Usou-se o Kit para a determinação da quantidade de D-Manitol da Megazyme, a quantificação foi realizada tendo em conta o descrito no kit.

Para o cálculo da concentração usa-se a **Equação (8)**:

$$C_{\text{Manitol}} = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad (8)$$

Onde C_{Manitol} é concentração de manitol (g manitol/L), V é o volume final em mL, MW é o peso molecular do D-manitol (182.17 g/mol), ϵ é o coeficiente de extinção do NADH a 340 nm (6300 L/mol.cm), d é o percurso ótico (1 cm), v é o volume da amostra em mL e ΔA é a diferença entre as duas absorvância medidas neste método.

3.10 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) que tem uma cor purpura, ao interagir com espécies antioxidantes este radical é reduzido obtendo-se o 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) que tem uma cor amarela, o que provoca uma diminuição na absorção a 517 nm, permitindo assim calcular a atividade antioxidante.[103]

A reação baseia-se na neutralização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) pela amostra (**Figura 3.2**).

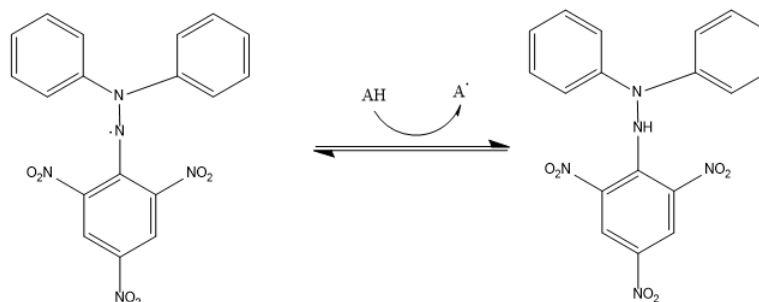


Figura 3.2 – Mecanismo reacional da capacidade de redução do radical DPPH na presença das amostras das quais se quer estudar a capacidade antioxidante, adaptado de[103].

Utilizou-se o método que estuda a capacidade de redução do DPPH descrita em *Falé et al.*[100], realizou-se uma solução de 0.002 % (m/v) de DPPH em metanol.

Para um volume de 1 mL de solução de DPPH adicionou-se 10 μ L dos extratos/frações e 50 μ L para os extratos sem mucilagens/mucilagens. Seguidamente incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente e em um local sem luz, lendo-se de seguida a absorvância a 517 nm contra o ensaio em branco, que é denominado de controlo, pois é adicionada água destilada em vez das amostras.

Na **Equação (9)** está expressa a forma de cálculo da atividade antioxidante (A.A.):

$$A. A. (\%) = \frac{Abs_{517 \text{ Controlo}} - Abs_{517 \text{ Amostra}}}{Abs_{517 \text{ Controlo}}} \times 100 \quad (9)$$

Onde $Abs_{517 \text{ Controlo}}$ é a absorvância a 517 nm corrigida do controlo e $Abs_{517 \text{ Amostra}}$ é a absorvância a 517 nm corrigida da amostra.

Foi feita uma estimativa da concentração responsável por 50% da atividade antioxidante, tendo por base a concentração do extrato e a sua atividade antioxidante.

3.11 Inibição da acetilcolinesterase (AChE)

Neste método calcula-se a velocidade da reação a tiocolina com o 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) através do método de Ellman (**Figura 3.3**), que provoca o aparecimento do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de cor amarela, e cujo aumento de absorvância pode ser seguido por volta dos 405 nm.[113]

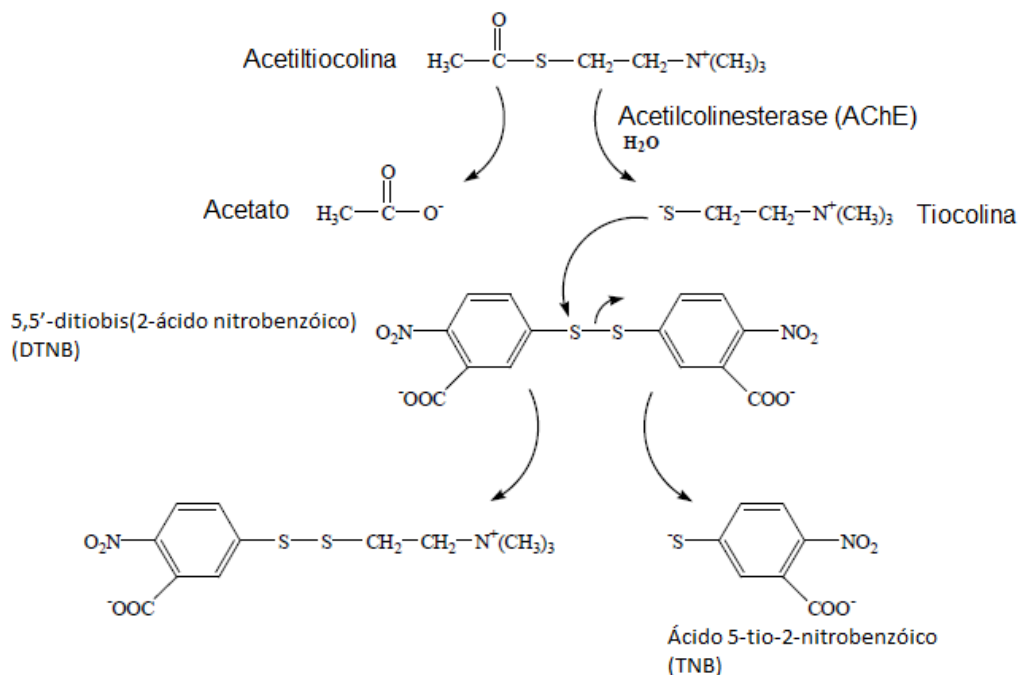


Figura 3.3 - Reação de *Ellman* para determinar a atividade da acetilcolinesterase, adaptado de[113].

Para estudar a inibição da acetilcolinesterase usou-se o método descrito em *Falé et al.*[100], usou-se uma cuvete com a amostra onde se adicionou 325 μL de Tampão Tris 50 mM sem sais pH 8, 100 μL de amostra e 25 μL solução de AChE (1.33 U/mL), esta mistura foi agitada e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, e de seguida adicionou-se 75 μL de uma solução de AChI (0.33 mg/mL em água) e 475 μL da solução de DTNB (1.2 mg/mL em tampão Tris com sais (0.1 M NaCl e 0.02 M MgCl_2)), após a mistura da solução leu-se a absorvância a 405 nm durante 4 minutos. Na cuvete de controlo, a diferença foi a não colocação da solução de AChE, e em vez desta adicionou-se 25 μL de Tampão Tris 50 mM sem sais pH 8.

Para além das amostras é necessário determinar da enzima a 100%, onde se adiciona 100 μL de água destilada, em vez das amostras a analisar, sendo importante garantir que esta atividade inicial da enzima seja entre 0.10-0.12 UA/min.

Para calcular a percentagem de inibição da AChE (I. AChE), usou-se a **Equação (10)**:

$$\text{I. AChE (\%)} = 100 - \frac{V_{r \text{ Amostra}}}{V_{r \text{ Controlo}}} \times 100 \quad (10)$$

Onde $V_{r \text{ Controlo}}$ é a velocidade da reação para atividade a 100% e $V_{r \text{ Amostra}}$ é a velocidade da reação do ensaio usado a amostra.

Foi feita uma estimativa da concentração responsável por 50% da inibição da AChE, tendo por base a concentração do extrato e a sua inibição para com a AChE.

3.12 Inibição da HMGR

Para o estudo da inibição da enzima HMGR, usou-se um kit da Sigma, e foi seguido o procedimento descrito pelo mesmo.

Foi realizado um ensaio para a atividade de 100% da HMGR, para um inibidor presente no kit e para a amostra, sendo necessário corrigir os valores da velocidade da reação obtidos pelos respetivos brancos. Calculou-se a inibição da HMGR (I. HMGR) pela **Equação (11)**:

$$I. HMGR (\%) = 100 - \frac{V_r \text{ Amostra}}{V_r \text{ Atividade 100\%}} \times 100 \quad (11)$$

Onde $V_r \text{ Amostra}$ é a velocidade da reação da amostra e $V_r \text{ Atividade 100\%}$ é a velocidade da reação sem inibidor ou amostra, ou seja, atividade máxima da enzima.

Foi feita uma estimativa da concentração responsável por 50% da inibição da HMGR, tendo por base a concentração do extrato e a sua inibição para com a HMGR.

3.13 Análise dos extratos e frações por HPLC-DAD

Na análise por HPLC usou-se uma fase móvel constituída por um sistema binário composto por acetonitrilo e 0.05 % v/v de TFA em água. Em cada corrida foi injetado 25 μ L de amostra e a deteção foi feita entre os 200 e os 600 nm, sendo feito dois métodos distintos um deles com duração de 60 minutos e outro com duração de 55 minutos, usando-se também diferentes colunas.

- Método 1

Neste primeiro método, foram analisados os extratos iniciais, extratos sem mucilagens e mucilagens usou-se a coluna uma coluna LiChroCART® RP-8, 100 Å, 250 x 4 mm, 5 μ m (Merck). As condições da corrida foram as descritas na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 - Método usado para determinação dos cromatogramas dos extratos iniciais e seus derivados.

Tempo (min)	% Acetonitrilo	% Água + 0.05 % TFA
0.0	0	100
40.0	28	72
50.0	55	45
54.0	0	100
60.0	0	100

- Método 2

No segundo método foram analisadas as frações purificadas, extrato de partida e padrões usou-se uma coluna LiChroCART® RP-18, 100 Å, 250 x 4 mm, 5 μ m (Merck). As condições da corrida foram as descritas na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2 – Método usado para a determinação dos cromatogramas das frações purificadas e padrões.

Tempo (min)	% Acetonitrilo	% Água + 0.05 % TFA
0.0	0	100
30.0	30	70
40.0	80	20
45.0	80	20
50.0	30	70
52.0	0	100
55.0	0	100

Por este método foram ainda analisados os padrões floroglucinol, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido protocatecuico com uma concentração de 0.1 mg/mL e padrão de ácido quinico com uma concentração de 1 mg/mL.

3.14 Análise dos extratos e frações por LC- QTOF-MS

Os extratos e frações foram analisados a uma concentração de 0.1 mg/mL, por espectrometria de massa de elevada resolução usando o Impact II da Bruker® e usou-se uma coluna Intensity Solo 2 C18 RP, 100 x 2.1 mm, 2 µm da Bruker®, quanto ao método usado está descrito na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3 - Método usado no LS-MS.

Tempo (min)	% Água + 0.1% Ácido Fórmico	% Acetonitrilo + 0.1% Ácido Fórmico
0.0	95	5
1.5	95	5
1.5-13.5	25	75
13.5-18.5	0	100
21.5	0	100
21.5-23.5	95	5
30.0	95	5

Os padrões floroglucinol, manitol, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido protocatecuico e ácido quinico com uma concentração de 0.05 mg/mL, foram analisados pelo mesmo procedimento.

3.15 Ensaios em linhas celulares do carcinoma hepatocelular

O ensaio de citotoxicidade é um ensaio colorimétrico, onde se usa o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), que é um composto com cor amarela que ao ser reduzido forma o produto formazan que é um composto de cor violeta. Este método permite então a determinação das células vivas, pois o MTT é reduzido pelas redutases celulares em células vivas formando o formazan, que para além da sua cor diferente é insolúvel em água formando então cristais.[114], [115]

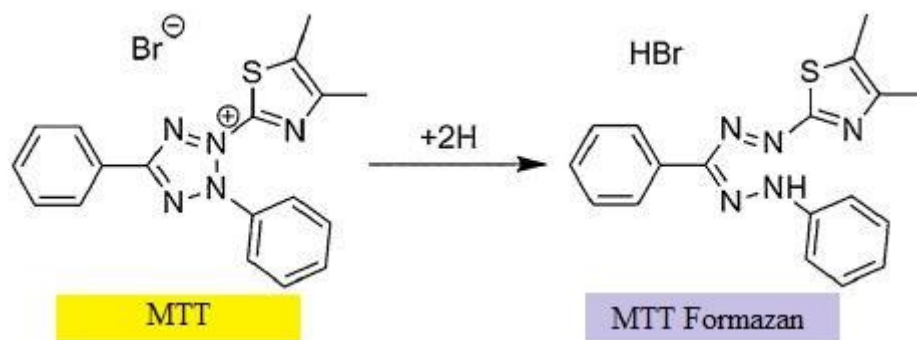


Figura 3.4 – Redução do MTT para formazan, adaptado de[115].

Utilizou-se a linha celular Hep-G2 (ATCC®HB-8065) do carcinoma hepatocelular humano, para testar a toxicidade do extrato tendo por base o artigo de *Mosmann et al.*[116]. Primeiramente, as células cresceram em meio RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de antimicótico e 1 % de L-glutamina, numa estufa a 37 °C, com atmosfera de 5 % de CO₂. Foram colocadas a crescer em frascos T25, trocou-se o meio a cada 48/72h, até se atingir uma confluência de aproximadamente 80 %.

Quando se atingiu a confluência, retirou-se o meio e lavaram-se as células com PBS 1x, seguidamente adicionou-se 500 µL de tripsina 2x e incubou-se na estufa a 37 °C e com atmosfera de 5 % de CO₂, durante 5/10 minutos, de modo a ressuspender as células.

Seguidamente contou-se as células num hemocitômetro e adicionou 100 µL de 50x10⁴ células/mL em microplacas de 96 poços tendo estas sido incubadas por 72h, nas mesmas condições referidas anteriormente. Após o crescimento celular, retirou-se o meio de cada poço e adicionou-se 100 µL das soluções dos extratos a diferentes concentrações dissolvidos em meio RPMI e dois controlos apenas com meio RPMI, voltando-se a incubar a microplaca por 24 h.

Após o contacto das células com os extratos durante 24 h, retira-se o meio de cultura e este foi substituído por uma solução de MTT (0.5 mg/mL) dissolvido em meio RPMI, o qual é incubado nas mesmas condições referidas anteriormente por 2/3 h. Para finalizar este processo retirou-se o MTT e adicionou-se 100 µL metanol em cada um dos poços, para dissolver os cristais de formazan formados e leu-se a absorvência a 595 nm, com referência a 630 nm, num leitor de microplacas.

Para calcular a percentagem de viabilidade celular usou-se **Equação (12)**:

$$V. C. (\%) = \left(\frac{Abs_{Amostra}}{Abs_{Controlo}} \right) \times 100 \quad (12)$$

Onde V. C. (%) é a percentagem de viabilidade celular, Abs_{Amostra} é absorvência obtida para as células que estiveram em contacto com o extrato e Abs_{Controlo} é a absorvência registada para as células controlo. A partir da **Equação (12)** pode calcular-se $C (\%) = 100 - V. C.$, onde C (%) é a percentagem da citotoxicidade.

3.16 Fracionamento do extrato usando a filtração por membranas

Foi usado um módulo de membranas de ultrafiltração, o qual é constituído por um tanque de alimentação, uma bomba e uma válvula que permitem regular o caudal e a pressão dentro

do módulo, dois manómetros um antes da entrada na placa das membranas e outro para a pressão à saída da membrana, sendo que a média dos dois dá a pressão média do sistema, esta placa das membranas comporta 2, com área útil de 147,8 cm² cada uma, e um rotâmetro que dá a informação do caudal do sistema, na **Figura 3.5** pode ver-se a instalação de ultrafiltração usada.



Figura 3.5 - Módulo de membranas de ultrafiltração, modelo Ray-Flow, Tech Sep.

3.16.1 Preparação das membranas

Foi necessário a preparação de duas membranas de acetato de celulose, com diferentes porosidades. Na preparação das membranas usou-se o método de inversão de fases descrito em *Kunst et al.*[94]. Para a realização do método preparam-se então as soluções polimérica descritas na **Tabela 3.4**.

Tabela 3.4 – Quantidade dos reagentes utilizados na preparação das membranas.

Reagentes	C ₂₅ (%p/p)	C ₃₅ (%p/p)
Acetato de celulose	17	17
Formamida	25	35
Acetona	58	48

Pesaram-se os reagentes para um frasco pela ordem descrita na **Tabela 3.4**, fechou-se a tampa do frasco e vedou-se a mesma com parafilme, com intuito de não permitir a perda de acetona por evaporação. Deixou-se o frasco sobre agitação durante 24 horas, e por fim obteve-se o fluido homogéneo e viscoso com o qual foram feitas as várias membranas.

Fazendo uso de um vidro e de uma faca metálica com uma ranhura calibrada (0.25 mm), iniciou-se então o processo de preparação das membranas.

Colocou-se uma quantidade de solução polimérica na faca, e deslizou-se a faca a uma velocidade uniforme sobre o vidro, deixou-se evaporar durante 30 segundos à temperatura ambiente, findo este tempo mergulhou-se o vidro em banho de água destilada com temperatura entre os 0 e os 3°C.

Depois de alguns minutos retirou-se o filme do vidro e identificou-se a face ativa da membrana, a conservação das membranas foi feita em água destilada até à sua utilização.

Por fim, observaram-se as membranas em contraluz com objetivo de se selecionar as duas em melhores condições, foram então cortadas nas dimensões da placa, assim como dois pedaços de papel de filtro, e colocados no módulo de membranas sendo que as membranas ficam com a camada ativa virada para o exterior.

Para poder usar estas membranas instaladas é necessário fazer a sua compactação, que consiste na recirculação de água destilada em recirculação total durante 2 horas, com caudal de 180 L/h e pressão de 3 bar.

3.16.2 Caracterização das membranas

3.16.2.1 Determinação da permeação hidráulica

A caracterização das membranas foi feita tendo por base os procedimentos descritos em *Gomes et al.* [98], neste método da determinação da permeação hidráulica fez-se a recirculação de água destilada com um caudal de 180 L/h e realizaram-se 5 ensaios a diferentes pressões (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 bar), para cada um dos ensaios pesou-se e identificou-se um erlenmeyer, sendo que para cada ensaio encheu-se aproximadamente 100 mL de permeado e registou-se o peso, o tempo de recolha e a temperatura.

3.16.2.2 Determinação do coeficiente de rejeição aparente de solutos orgânicos de referência

Para a caracterização de cada tipo de membranas foram utilizados diferentes solutos orgânicos de referência, para a C₂₅ usaram-se soluções de polietilenoglicóis (PEG 3 000, PEG 6 000, PEG 10 000) a 600 ppm, já para a C₃₅ usaram-se soluções de polietilenoglicóis e dextranos (PEG 20 000, DEX 40 000, DEX 70 000) a 600 ppm. Cada uma das soluções foi permeada a 1 bar e a um caudal de alimentação de 180 L/h, lavou-se a instalação com água destilada entre cada uma das soluções de referência.

Para cada uma das soluções retirou-se uma amostra da alimentação inicial, deixou-se o sistema entrar em equilíbrio (15 min.) e retirou-se uma amostra do permeado e da alimentação final, registou-se ainda o tempo de permeação, o peso do permeado e a temperatura.

Para determinar a concentração dos solutos de referência, usou-se um HPLC-IR onde para cada um dos padrões de PEG e DEX se realizou uma reta de calibração (**Anexo 4, Anexo 5, Anexo 6, Anexo 7, Anexo 8 e Anexo 9**) tendo a área dos picos em função da concentração de soluto. Este procedimento permitiu calcular as concentrações de cada uma das amostras, e subsequentemente calcularam-se os coeficientes de rejeição, pela expressão **(4)**, e os MWCO, representando $\log \frac{f}{1-f}$ em função da massa molecular (MM) dos respetivos solutos de referência, e depois igualar a reta obtida com a reta $y=1$.

3.16.3 Permeação do Extrato da decocção a uma pressão de 2 bar – Recuperação das frações pequena, média e grande

A permeação do extrato foi feita através de um processo de diafiltração sequencial, no qual foram usadas as duas membranas preparadas, C₂₅ e C₃₅, para cada uma das membranas o extrato

foi permeado a um caudal de 180 L/h e a uma pressão 1 bar. A **Figura 3.6** representa o esquema do processo seguido, onde o permeado da membrana C₃₅ constitui a alimentação da membrana C₂₅, dando origem à fração grande (concentrado da membrana C₃₅), à fração média (concentrado da membrana C₂₅) e à fração pequena (permeado da membrana C₂₅).

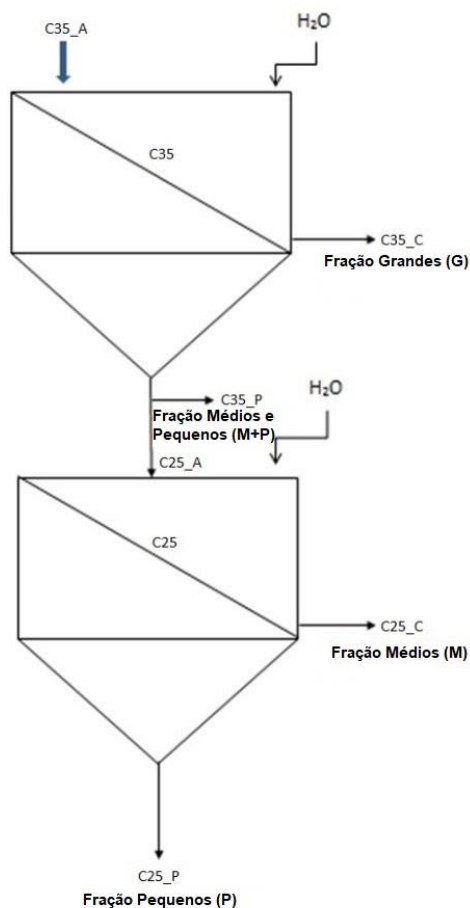


Figura 3.6 – Esquema da diafiltração utilizado no trabalho, onde C₃₅ representa a membrana de maior MWCO, C₂₅ a membrana de menor MWCO e as letras _A, _P e _C representam a alimentação, o permeado e o concentrado de cada uma das membranas, já no caso das letras G, M e P representam as frações grande, média e pequena.

Primeiramente realizou-se o ensaio de diafiltração com a membrana de maior MWCO, a C₃₅. Após o período de estabilização do sistema (15 min.), começou-se a permeação do extrato da decoção (C_{35_A}), e ao longo do tempo foram-se recolhendo tomas de permeado, aproximadamente 100 mL, até que a variação da condutividade fosse nula, sendo que por cada toma retirada era adicionada a mesma quantidade de água destilada à alimentação. O tempo de permeação, a condutividade e a temperatura do permeado foram também registados. Obteve-se então um concentrado (C_{35_C}) com as moléculas de maiores dimensões purificadas e um permeado (C_{35_P}) com as moléculas de dimensão média e pequena.

Para a membrana com menor MWCO, C₂₅, foi feito o mesmo procedimento, sendo a alimentação o permeado obtido pela membrana anterior (C_{25_A}), obtendo-se então um concentrado (C_{25_C}) com a fração média e um permeado (C_{25_P}) com a fração pequena.

3.17 Análise estatística

Para a análise estatísticas dos resultados obtidos utilizou-se o software Excel (versão do Microsoft Office 365) e o IBM SPSS Statistics 25 – Análise de Componentes Principais (PCA).

A análise do componente principal (PCA), pressupõe diminuir um conjunto de dados mais complexo os quais podem incluir diferentes medições e variáveis, sendo esta redução feita de modo a reter a maioria da informação que consta no conjunto inicial de dados, o que permite relacionar os dados, de uma forma mais simples.[117],[118] Para a redução do conjunto de dados o PCA encontra combinações lineares dos mesmos, que se chamam componentes principais e cada um destes tem uma variância associada, consoante a quantidade de informação que têm do conjunto de dados inicial. Na análise feita existiam diferentes unidades no conjunto de dados por este motivo foi necessário usar uma matriz de correlação, para evitar dificuldades na interpretação dos componentes principais, e permitir uma padronização das diferentes unidades.[118]

4 Resultados e Discussão

Para perceber o potencial biológico da *F. vesiculosus*, os extratos foram preparados de acordo com o descrito em 3.3.

Os extratos foram caracterizados em termos de composição e analisados relativamente às suas atividades biológicas. Selecionou-se o extrato que exibiu as melhores atividades biológicas para ser fracionado por aplicação de tecnologia de membranas, a fim de conseguir fracionar/purificar os compostos biológicos presentes e que possam ser responsáveis pelas atividades benéficas desta alga no tratamento/prevenção de diversas doenças, nomeadamente neurodegenerativas e cardiovasculares.

4.1 Caracterização dos extratos obtidos

Com o objetivo de selecionar o extrato que apresentava melhor atividade biológica, realizaram-se diversas análises com intuito de comparar os extratos preparados, nomeadamente os extratos obtidos por decocção (AD), digestão gástrica (ADG), digestão pancreática (ADP), digestão completa (ADC) e os respetivos controlos, controlo da digestão gástrica (ACG), controlo da digestão pancreática (ACP) e controlo da digestão completa (ACC). Para cada uma das quantificações e determinação das bioatividades foram realizados três replicados.

4.1.1 Quantificações dos Fenóis

Para a quantificação de fenóis usou-se o método de *Folin-Ciocalteu* tendo em conta o procedimento descrito em 3.5. As concentrações de fenóis totais em equivalentes de floroglucinol ($\mu\text{g FLG}/\mu\text{L}$ de extrato) estão apresentados na **Figura 4.1**.

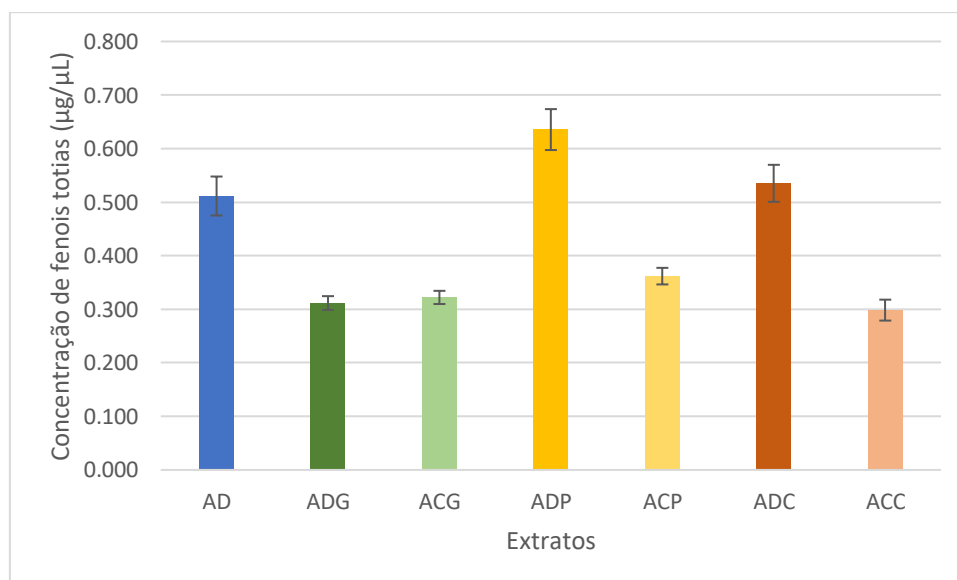


Figura 4.1 – Concentração de fenóis totais determinada para os extratos da decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).

Ao analisar a **Figura 4.1** observa-se que a maior quantidade de fenóis totais foi obtida para o extrato da digestão pancreática (ADP), $0.64 \pm 0.04 \mu\text{g}$ de FLG/ μL de extrato, seguido pelo extrato

digestão completa (ADC), de 0.54 ± 0.04 μg de FLG/ μL de extrato e, seguidamente pelo extrato decocção (AD), onde se obteve 0.51 ± 0.04 μg de FLG/ μL de extrato.

Os restantes extratos, digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), controlo da digestão pancreática (ACP) e controlo da digestão completa (ACC), apresentam concentrações de fenóis totais muito semelhantes, de aproximadamente 0.30 μg de FLG/ μL de extrato. A maioria dos extratos com valores inferiores são os controlos das digestões, ACG, ACP e ACC, o que era expectável uma vez que estes são obtidos de modo semelhante no que diz respeito à forma de extração, no entanto na ausência de quaisquer enzimas digestivos. O outro extrato com menor concentração de fenóis totais é o extrato da digestão gástrica (ADG) o que mostra que esta técnica parece não ser ideal para a extração dos compostos fenólicos da amostra.

4.1.2 Quantificações das Proteínas

Para a quantificação de proteínas usou-se o método de Bradford descrito em 3.7. A concentração de proteína (mg /mL de amostra) nos extratos está apresentada na **Figura 4.2**. Geralmente a quantidade de proteína da *F. vesiculosus* varia entre 3 - 10 % do seu peso seco, esta variação tão grande deve-se ao fatores ambientais a que alga está sujeita.[119]

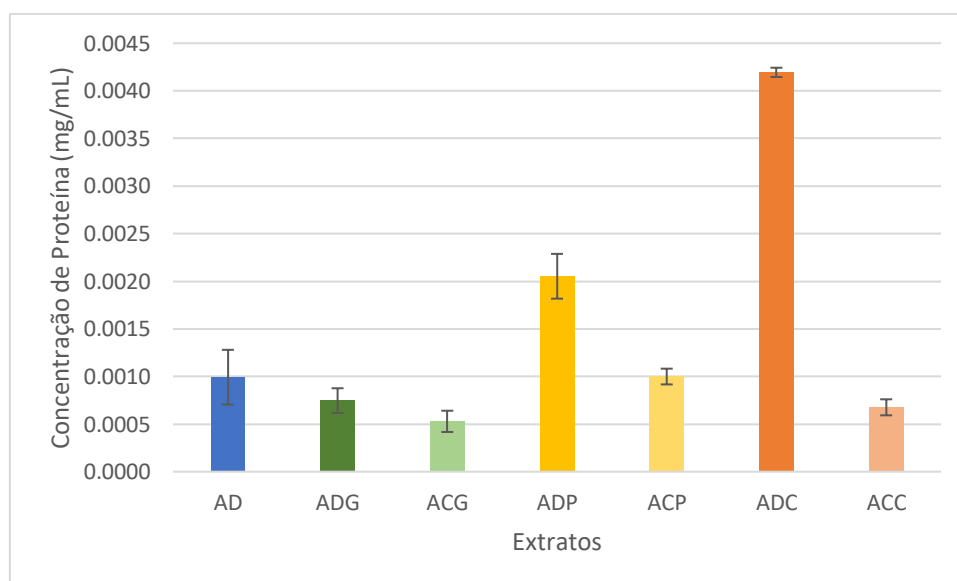


Figura 4.2 – Concentração de proteínas para os extratos da decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).

Na **Figura 4.2** é visível que a maior quantidade de proteína foi obtida para o extrato da digestão completa (ADC) e seguidamente para o extrato da digestão pancreática (ADP). Os restantes extratos apresentam uma concentração de proteína entre 0.0005 e 0.0010 mg /mL de extrato.

Evidências apontam que extrações a valores de pH alcalino, promovem extrações de maior quantidade de proteínas, uma vez que este é o caso da extração da digestão pancreática (ADP). Segundo o mesmo estudo, outra extração que mostrou uma maior quantidade de proteína foi a extração ácida seguida de uma alcalina, que é caso da extração da digestão completa

(ADC).[120] Isto pode ser responsável, por os maiores valores de proteína existentes nestes dois extratos.

Para além disso, existem evidências que a biodisponibilidade das proteínas nas algas, pode ser comprometida devido às fibras que constituem a matriz celular. Neste sentido o uso de enzimas digestivas poderá facilitar a digestão destas fibras e assim aumentar a extração das proteínas.[121] Sabendo ainda que na digestão gástrica (ADG) se usa a pepsina, no suco gástrico, e esta é uma protease, é normal que não seja tão eficiente na quebra das fibras[122], no caso da digestão pancreática (ADP) usa-se e a pancreatina por uma mistura de amilases, lipases e proteases, formando-se assim o suco pancreático.[123]

Assim sendo ao usar estas enzimas digestivas em especial a pancreatina, no caso do extrato da digestão pancreática (ADP), é provável que ocorra a quebra das fibras que constituem a estrutura celular, pois neste caso estão presentes diferentes enzimas, que facilitam a extração das proteínas. Para o caso do extrato da digestão completa (ADC), este é feito em duas fases na primeira com suco gástrico e na segunda com suco pancreático, e assim sendo este primeiro tratamento pode levar a uma mais fácil atuação por parte da pancreatina do suco pancreático, o que pode facilitar a extração das proteínas.

Quanto dos extratos dos controlos das digestões (ACG, ACP e ACC) têm quantidades de proteína idênticas. O extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) também está na ordem de grandeza dos controlos, o que pode sugerir que não é um método ideal para a extração de proteína. Já no caso, das digestões o uso de enzimas facilitou a extração das proteínas.

4.1.3 Caracterização dos extratos por HPLC-DAD

A análise dos extratos por HPLC-DAD teve por base o descrito em 3.13, usando-se o método 1 (**Tabela 3.1**). Estão representados os extratos da decocção (AD), da digestão gástrica (ADG), da digestão pancreática (ADP) e da digestão completa (ADC) na **Figura 4.3**. Sendo que no **Anexo 10** se encontram o perfil dos extratos controlo da digestão gástrica (ACG), da digestão pancreática (ACP) e da digestão completa (ACC).

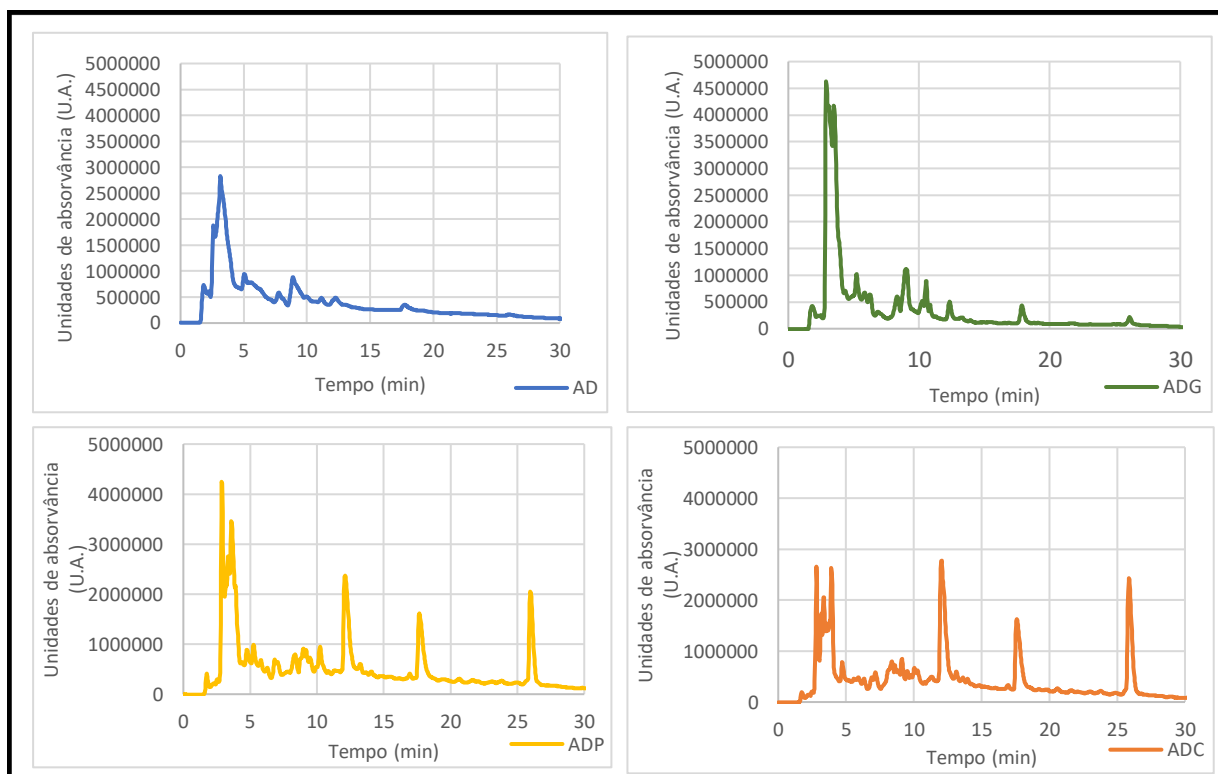


Figura 4.3 – Cromatograma do extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD), e das digestões gástrica (ADG), pancreática (ADP) e completa (ADC).

Na **Figura 4.3** é visível que maioria dos compostos presentes nos extratos são eluídos nos instantes iniciais, especialmente para o extrato da decocção (AD), havendo assim uma sobreposição de picos até aproximadamente os 5 minutos, levando a uma má resolução destes picos.

No caso dos cromatogramas dos extratos da digestão gástrica (ADG), digestão pancreática (ADP) e digestão completa (ADC) são idênticos ao do extrato da decocção (AD) até aproximadamente aos 10 minutos, no entanto apresentam uma maior intensidade, mostrando assim que possuem maiores concentrações em compostos.

A partir dos 10 minutos de corrida cromatográfica, é visível o surgimento de novos picos mais pronunciados no caso da digestão pancreática (ADP) e completa (ADC). Ao analisar os extratos dos controlos da digestão pancreática (ACP) e completa (ACC) (**Anexo 10**), estes picos não aparecem. O que levou à hipótese destes picos por volta dos 12, 18 e 26 minutos se deverem a interferências dos sucos usados na extração, na **Figura 4.4** têm-se os cromatogramas do suco gástrico (SG) da digestão gástrica (ADG), do suco pancreático (SP) da digestão pancreática (ADP) e do suco completo (SC) uma mistura dos dois anteriores da digestão completa (ADC).

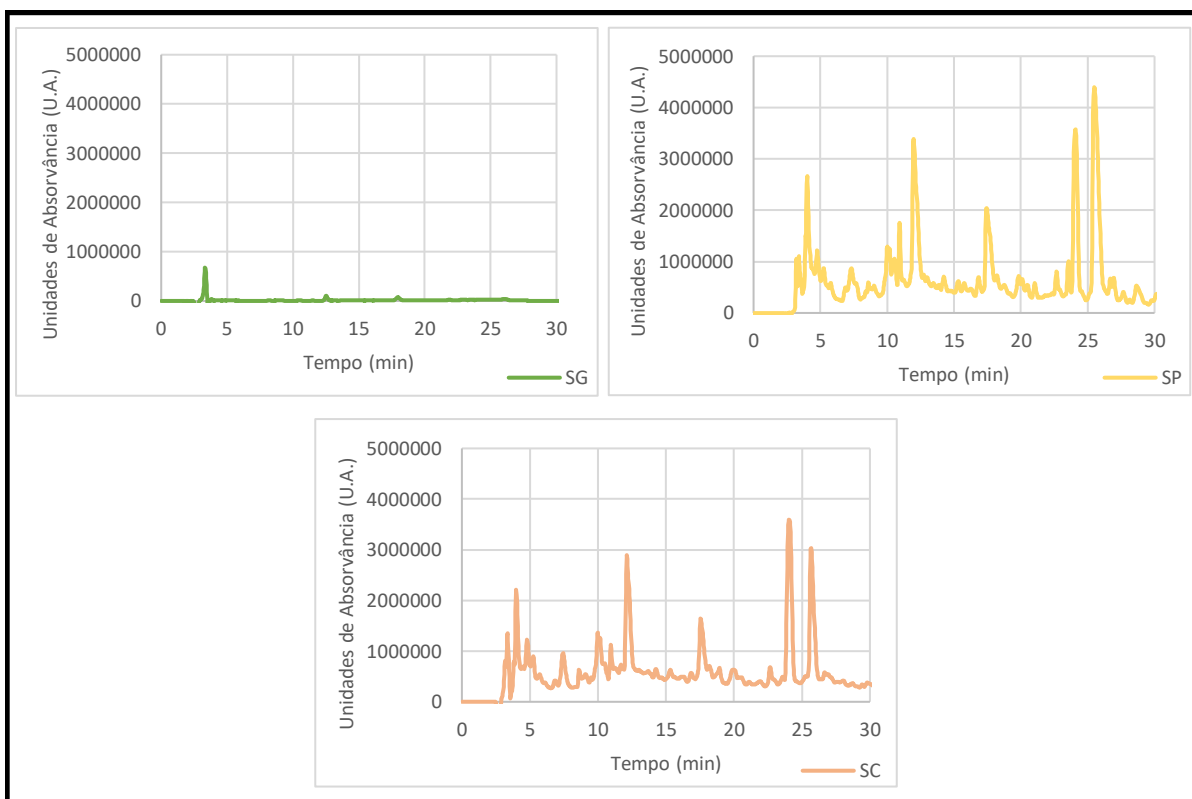


Figura 4.4 – Cromatograma dos sucos digestivos, suco gástrico (SG), suco pancreático (SP) e suco da digestão completa (SC), junção do suco gástrico e pancreático.

Na **Figura 4.4** é notório a existência dos picos aos 12, 18 e 26 minutos, o que fortalece a possibilidade de nos extratos da digestão pancreática (ADP) e completa (ADC), estes picos se deverem aos sucos pancreático (SP) e completo (SC). De modo a perceber, se efetivamente se tratavam dos mesmos compostos foram traçados os espectros UV-Vis, dos picos dos extratos e dos sucos e as semelhanças eram visíveis para além da absorvância a 280 nm característica das proteínas.

No caso do suco gástrico (SG) da digestão gástrica (ADG), é claro que não existe qualquer interferência devido à baixa intensidade do cromatograma do SG.

Para tentar identificar os compostos do extrato da decoção (AD), usou-se o método 2 (**Tabela 3.2**), com objetivo de melhorar a análise por HPLC deste extrato, estando então na **Figura 4.5** representado o cromatograma deste extrato, onde foram numerados os picos mais importantes.

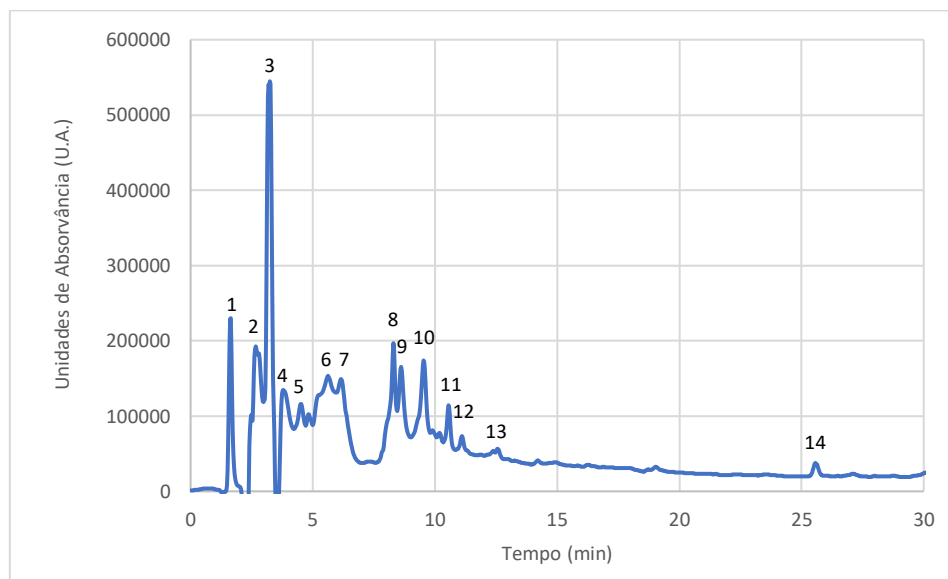


Figura 4.5 – Cromatograma do extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) a uma concentração de 5 mg/mL, pelo método 2 e identificação numérica dos picos mais intensos e bem definidos.

Na **Figura 4.5** são visíveis diferentes picos, com uma maior eluição de compostos nos instantes iniciais até aos 10 minutos, no entanto neste caso a resolução do cromatograma está bastante melhorada, sendo possível ver vários picos bem definidos, os quais foram numerados. Para cada um deles foi feito o espectro de UV-Vis, e foram ainda passados os diferentes padrões referidos anteriormente.

Verificou-se que no caso do pico 3 e 10 ocorre uma sobreposição com os cromatogramas dos padrões ácido quínico e floroglucinol, respetivamente (**Figura 4.6**).

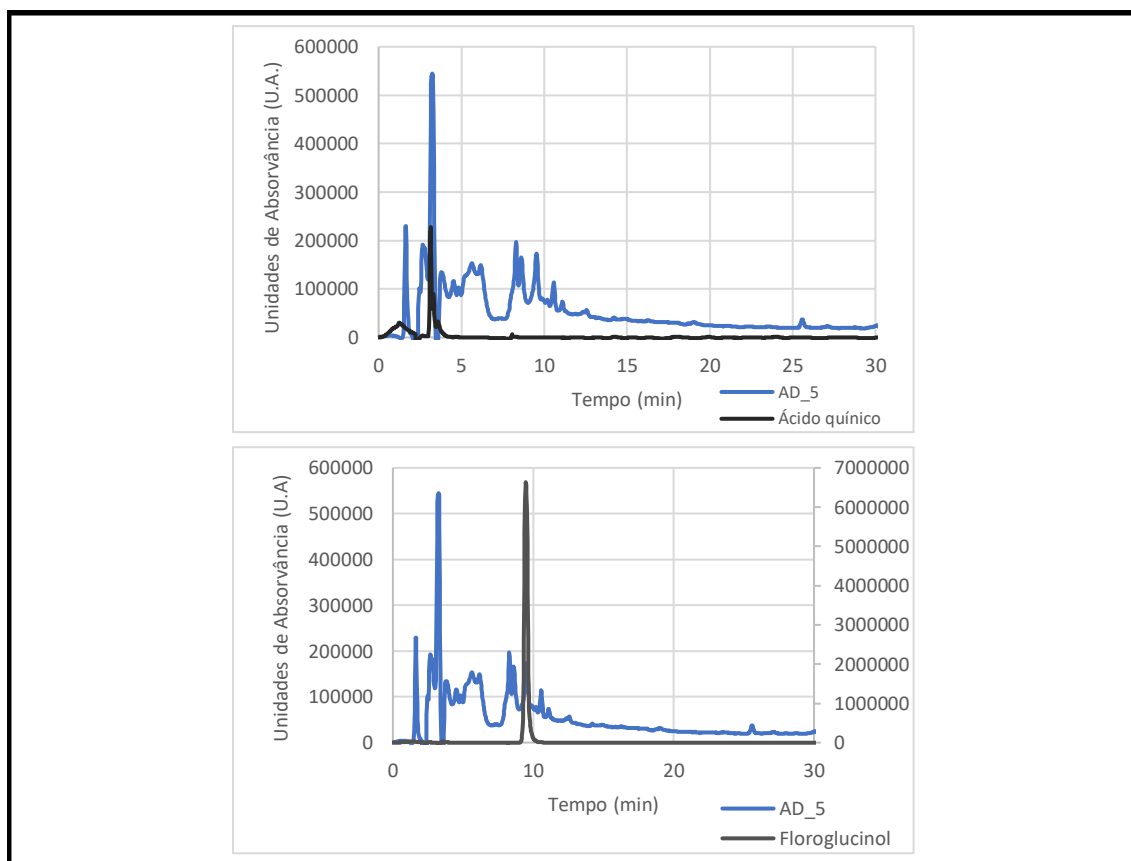


Figura 4.6 – Sobreposição dos cromatogramas do extrato da decocção (AD), com os cromatogramas dos padrões ácido quínico e floroglucinol, no caso deste último a sua absorvância está apresentada no eixo secundário.

Os resultados da **Figura 4.6** não garantem que os picos do cromatograma do extrato da decocção (AD) correspondam exatamente a estes compostos, podem ser compostos idênticos ou com tempos de retenção semelhantes.

No caso do ácido quínico é muito pouco provável que se trate do composto responsável pelo pico 3, pois este composto têm uma fraca deteção com o detetor usado nesta técnica, o que significa que são necessárias elevadas concentrações para ser detetado. Como é visível a intensidade no caso do padrão é muito menor do que no extrato, o que implica que o extrato tenha uma elevada concentração de ácido quínico. Para retirar todas as dúvidas traçaram-se os espectros UV-Vis para o padrão de ácido quínico e para o pico 3, e as suas diferenças apontam para que efetivamente não se trata do mesmo composto (**Anexo 11**).

Para o padrão do floroglucinol a sobreposição com o pico 10 é notória, e as diferenças de intensidades são normais uma vez que no caso do extrato da decocção existem diferentes compostos o que implica uma menor concentração em floroglucinol, do que o padrão. Traçou-se o UV-Vis do padrão de floroglucinol e do pico 10 (**Anexo 12**) e os resultados estão muito próximos, o que indica que possivelmente este pico diz respeito ao próprio floroglucinol, que é a unidade constituinte dos flortaninos, ou pode ser algum ser mesmo algum dos seus derivados.

Sabendo que a maioria dos flortaninos tem um pico de absorvância entre os 270-280 nm [124], estudou-se os espectros UV-Vis de todos os picos numerados na **Figura 4.5**, tendo em conta o padrão floroglucinol é visível que este resultado de máximo de absorvância pode estar ligeiramente abaixo dos valores da referencia. Ao traçar os espectros UV-Vis dos picos apenas

dois apresentaram semelhanças em termos do máximo de absorvância dos florotaninos, sendo estes o pico 2 e o pico 9 (**Anexo 13**), isto pode significar que possivelmente nestes instantes se tenha este tipo de compostos. No entanto, existem compostos com características de UV-Vis semelhantes, sendo necessário implementar outro estudo para a identificação mais concreta dos compostos.

4.1.4 Atividade Antioxidante

Para determinar a atividade antioxidante estudou-se a capacidade de redução do DPPH, para cada um dos extratos, esta determinação foi feita tendo em base o procedimento descrito em 3.10. Os resultados obtidos para cada um dos extratos, estão representados na **Figura 4.7**.

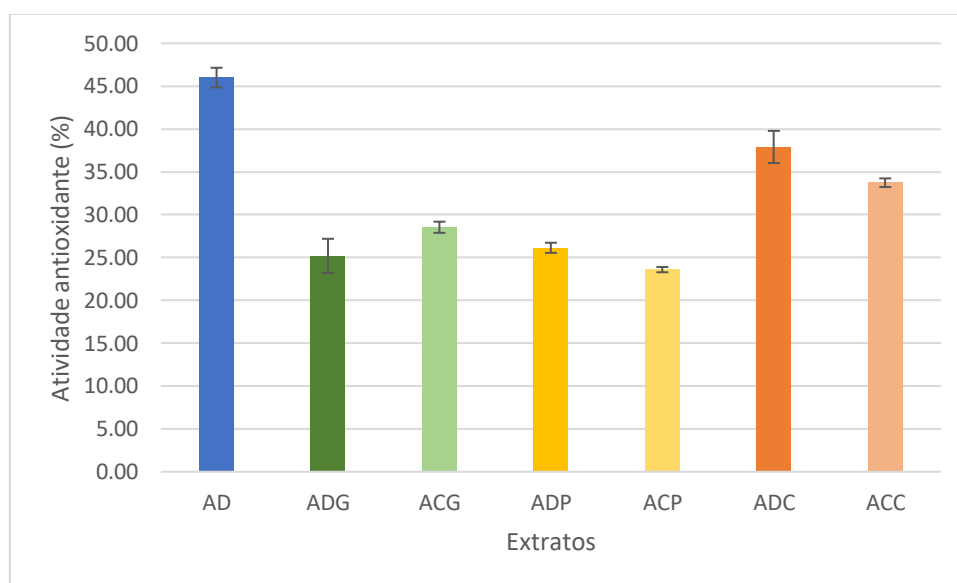


Figura 4.7 – Atividade antioxidante, determinada para os extratos da decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).

Como se pode ver na **Figura 4.7** a maior atividade antioxidante foi obtida para o extrato da decocção (AD) (46 ± 1 %), seguido do extrato digestão completa (ADC) (38 ± 2 %) e do extrato do controlo da digestão completa (ACC) (33.7 ± 0.5 %). Esta atividade biológica é bastante importante para a neutralização dos radicais livres, e nitidamente o extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) foi onde se obteve melhores resultados, apesar de não apresentar maior quantidade em fenóis totais, relativamente ao extrato da digestão pancreática (ADP) e digestão completa (ADC), como referido anteriormente (**Figura 4.1**). O extrato da decocção (AD) possui uma capacidade antioxidante superior aos restantes extratos, podendo sugerir que os compostos fenólicos extraídos no extrato da decocção são mais bioativos em termos de capacidade antioxidante.

Com cerca dos 30 % de atividade antioxidante têm-se o extrato da digestão completa (ADC) e o seu controlo (ACC). Comparando este último extrato com o extrato da decocção (AD) que também foi feito com água, pode dizer-se que a extração de *F. vesiculosus* a baixa temperatura e por mais tempo, também permite a recuperação de compostos bioativos.

Os restantes extratos da digestão gástrica e pancreática (ADG, ADP) e os seus controlos (ACG, ACP) obtiveram atividades antioxidantes de aproximadamente 20 %, sendo das menores

atividades antioxidantes relativamente às outras extrações, querendo dizer que estas extrações com enzimas não são relevantes para a recuperação dos compostos bioativos.

Com vista a testar os possíveis interferentes dos processos de extração, no caso das digestões gástrica (ADG), pancreática (ADP) e completa (ADC), aferiu-se as atividades antioxidantes dos respetivos sucos gástrico (SG), pancreático (SP) e completo (SC), de modo a perceber se podem ter alterado os resultados dos extratos. Foram obtidas atividades antioxidantes de aproximadamente 5 % para os diferentes sucos, o que indica que a interferência que possa existir seja baixa.

Foram ainda analisados dois compostos que se sabem que existem na *F. vesiculosus*, o manitol e o floroglucinol, no caso deste último é a unidade constituinte dos florotaninos. Os resultados obtidos para o manitol, demonstraram que este não tem influência nos resultados dos extratos, obtendo-se uma atividade antioxidante nula para uma concentração de 0.0842 mg manitol/mL.

Para o floroglucinol obteve-se uma atividade antioxidante de 34.6 ± 0.9 % em 0.0495 mg floroglucinol/mL. Considerando que os extratos têm uma quantidade de fenóis totais inferior à concentração de floroglucinol usada, este resultado não justifica as boas atividades encontradas nos extratos, o que quer dizer que os compostos bioativos dos extratos são possivelmente mais ativos do que o floroglucinol.

4.1.5 Inibição da AChE

Neste estudo foi ainda quantificada a inibição da acetilcolinesterase (AChE) para os extratos, segundo o que está descrito em 3.11. Os resultados obtidos para os diferentes extratos estão apresentados na **Figura 4.8**.

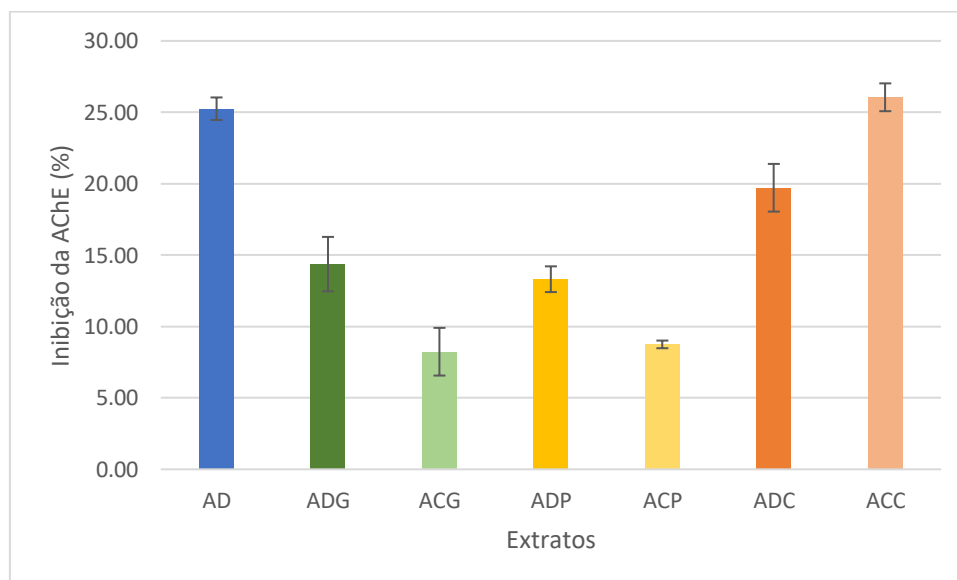


Figura 4.8 – Inibição da acetilcolinesterase para os extratos da decoção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).

Ao observar a **Figura 4.8** a inibição da acetilcolinesterase mais pronunciada foi obtida para os extratos da decoção (AD) (25.3 ± 0.8 %) e do controlo da digestão completa (ACC) (26 ± 1 %) apresentando valores muito idênticos. O extrato da digestão completa (ADC) demonstrou uma

inibição de $(20 \pm 2 \%)$, enquanto os extratos das restantes digestões gástrica (ADG) e pancreática (ADP) e os respetivos controlos, ACG e ACP apresentam uma inibição da acetilcolinesterase abaixo de 15 %.

Para confirmar se existem interferências dos sucos gástrico (SG), pancreático (SP) e completo (SC), nos respetivos extratos da digestão gástrica (ADG), pancreática (ADP) e digestão completa (ADC), analisou-se a inibição da AChE para cada um dos sucos. Para a digestão gástrica (ADG), a interferência do suco gástrico é nula uma vez que este não inibe a AChE. Já no caso da digestão pancreática (ADP), pode haver interferência uma vez que suco pancreático (SP) apresenta uma inibição da AChE de $9.0 \pm 0.8 \%$, o que indica que no caso do extrato deve haver um inflacionamento desta atividade biológica. Por fim, no caso da digestão completa (ADC) existe uma grande influencia por parte do suco completo (SC), o qual tem uma inibição da AChE de $21.9 \pm 0.4 \%$, que acaba por ser maior que no caso do próprio extrato, indicando então que esta atividade pode ser desconsiderada uma vez que provavelmente se deve ao suco completo e não aos compostos extraídos.

O extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) como referido anteriormente apresentou a maior atividade antioxidante (**Figura 4.7**) e simultaneamente maior inibição da acetilcolinesterase, o que indica que é dos extratos mais promissores a nível de atividades biológicas.

O extrato do controlo da digestão completa (ACC), apresentou um valor elevado de inibição da AChE, sabendo que este extrato, tal como extrato da decocção (AD), foram feitos apenas com água e alga seca, pode sugerir que o uso de temperaturas mais baixas durante um maior tempo de extração, obtêm bons resultados na recuperação de compostos bioativos. Já no caso das digestões gástrica (ADG), pancreática (ADP) e completa (ADC), o uso de enzimas não é eficiente na recuperação dos compostos bioativos responsáveis pela inibição da AChE.

Ao analisar os dois compostos que geralmente estão presentes na *F. vesiculosus*, obteve-se novamente uma contribuição nula do manitol para uma concentração de 0.85 mg manitol/mL. No caso do floroglucinol a inibição da AChE foi de $22 \pm 2 \%$ para uma concentração de 0.5 mg floroglucinol/mL, mais uma vez esta concentração é superior à de fenóis totais dos extratos, o que indica que os compostos presentes nos extratos têm uma maior bioatividade.

4.1.6 Comparação estatística dos Resultados, por Análise dos Componentes Principais (PCA)

Com os resultados obtidos recorreu-se uma ferramenta estatística *IBM SPSS Statistics Viewer*, onde se aplicou uma análise por componentes principais, PCA, para explicar a variância das quantificações nos diferentes extratos e poder selecionar o extrato que apresentou maior variação nas bioatividades em estudo. A análise PCA é um método de redução de dimensões permitindo transformar um conjunto de dados num menor numero de componentes principais que representem a informação contida nas variáveis que estão a ser analisadas.[118]

A análise PCA relacionou os dados obtidos sobre as variáveis: Conteúdo em fenóis totais (Fenois), conteúdo em proteínas (Proteínas), atividade antioxidante (DPPH) e inibição da acetilcolinesterase (AChE) nos diferentes extratos decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão

pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC), sendo estes dados apresentados na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1 – Dados analisados com o componente principal, diferentes conteúdos em fenóis, proteínas, atividades antioxidante e inibição da acetilcolinesterase para os extratos decoção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).

Extratos	Concentração de Fenóis totais ($\mu\text{g FLG/mL}$)	A.A. (%)	I. AChE (%)	Concentração de Proteínas (mg/mL)
AD	0.511	46.00	25.25	0.00099
ADG	0.312	25.19	12.48	0.00075
ACG	0.322	33.43	8.24	0.00053
ADP	0.636	26.14	7.43	0.00205
ACP	0.362	23.59	8.75	0.00100
ADC	0.535	37.90	19.72	0.00419
ACC	0.298	33.73	26.05	0.00068

Com a aplicação do PCA foi possível extrair dois componentes principais, componente 1 e componente 2, que representam as variáveis das quantificações efetuados para caracterizar e quantificar as atividades dos extratos. O componente 1 explica 49.149 % da variância das variáveis e o componente 2 explica 36.739 % da variância das variáveis. Ambos explicam 85.887 % da variância dos dados, como é visível na **Tabela 4.2**.

Tabela 4.2 – Variância total explicada para os 2 componentes principais extraídos por PCA dos dados da Tabela 4.1.

Componente	Valores próprios iniciais		
	Total	% de Variância	Cumulativa %
1	1.966	49.149	49.149
2	1.470	36.739	85.887

A **Tabela 4.3** representa a matriz dos componentes que corresponde à correlação das variáveis com os componentes principais estimados. Verificou-se que a componente 2 aparentemente representa a relação entre a composição dos extratos em fenóis totais e proteínas, enquanto a componente 1 representa a conjugação de todas as variáveis em estudo, no entanto com maior relevância para a atividade antioxidante (DPPH) e inibição da AChE para os extratos, como demonstrado na **Figura 4.9**.

Tabela 4.3 – Influência de cada um dos ensaios em estudo, nos dois componentes escolhidos.

Variáveis	Componente	
	1	2
Fenóis	0.633	0.666
DPPH	0.818	-0.461
AChE	0.678	-0.661
Proteínas	0.660	0.613

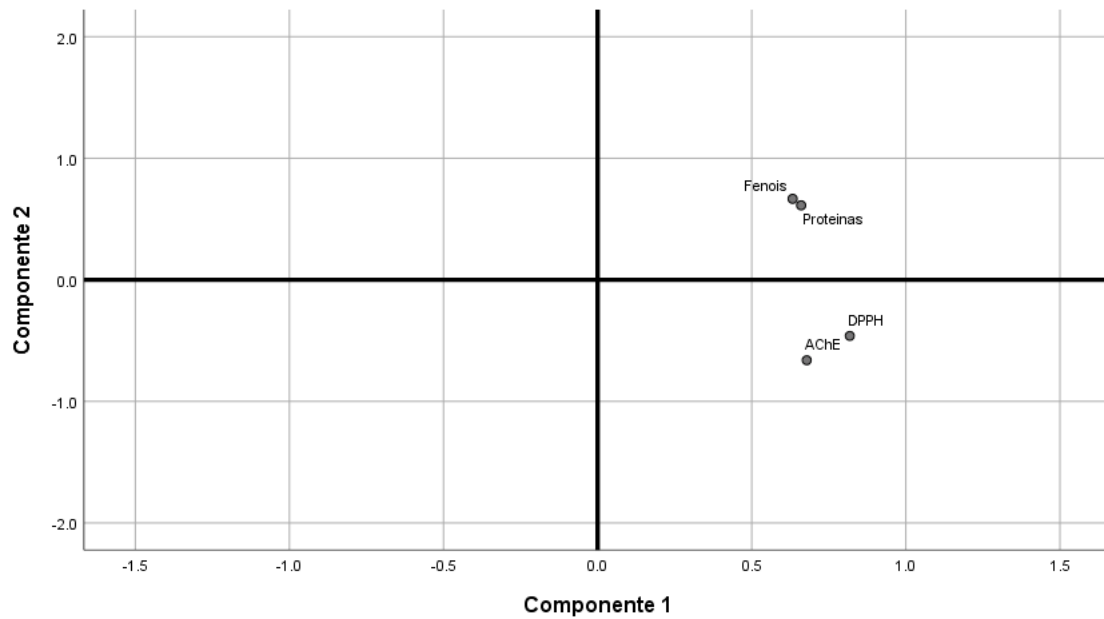


Figura 4.9 – Representação dos componentes e da importância de cada um dos resultados em estudo, Conteúdo em fenóis totais (Fenóis), Conteúdo em proteínas (Proteínas), atividade antioxidante (DPPH) e inibição da acetilcolinesterase (AChE).

Com base nestes resultados para cada uma das variáveis em estudo, pode-se definir qual é a posição em que cada um dos extratos analisados se representa relativamente às componentes principais na **Figura 4.10**.

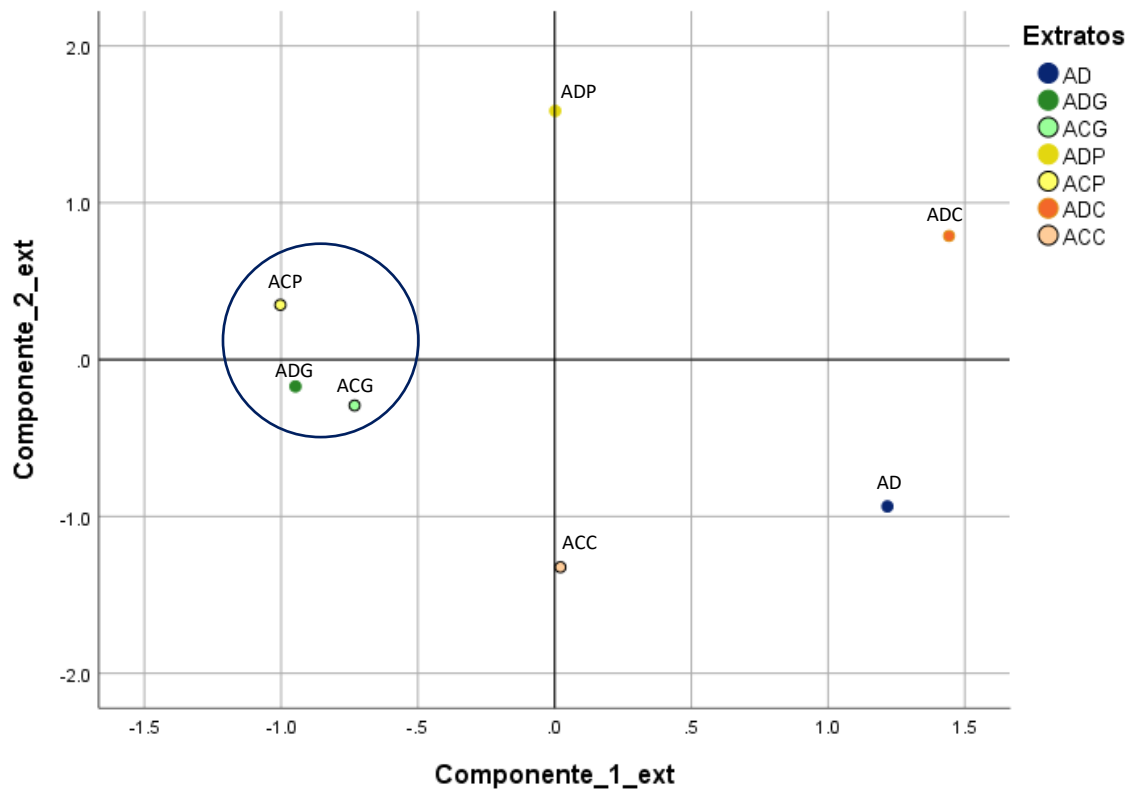


Figura 4.10 – Componentes e determinação da posição dos diferentes extratos, decocção (AD), digestão gástrica (ADG), controlo da digestão gástrica (ACG), digestão pancreática (ADP), controlo da digestão pancreática (ACP), digestão completa (ADC) e controlo da digestão completa (ACC).

Esta representação permitiu identificar que existe um grupo de três extratos, que na sua globalidade são muito parecidos em termos das variáveis em estudo, sendo eles o extrato da digestão gástrica (ADG) e os controlos da gástrica e pancreática (ACG e ACP), neste caso apresentam uma contribuição negativa da componente 1, revelando menores valores de atividade antioxidante e inibição da acetilcolinesterase, relativamente aos restantes extratos e uma contribuição praticamente nula da componente 2, portanto, pouco variando em composição de fenóis totais e proteínas relativamente aos restantes extratos. O que efetivamente corresponde aos resultados encontrados anteriormente, pois estes três extratos tiveram um conteúdo em fenóis totais e proteínas muito idênticos, no que diz respeito às atividades biológicas na atividade antioxidante também demonstraram grandes semelhanças, já no caso da inibição da AChE o extrato da digestão gástrica demonstrou uma maior inibição, no entanto não muito significativa.

O extrato da digestão pancreática (ADP) mostrou-se muito influenciado positivamente no componente 2, ou seja, apresentando maior conteúdo em fenóis totais e proteínas, no entanto demonstra não ter variação do componente 1, o que quer dizer que não apresenta variação relativamente aos restantes extratos em termos das bioatividades analisadas, o mesmo acontecendo com o extrato do controlo da digestão completa (ACC), mas no caso do componente 2, é influenciado negativamente, o que quer dizer que relativamente aos restantes extratos, apresenta menor conteúdo em fenóis totais e proteínas.

Relativamente ao extrato da digestão pancreática (ADP) efetivamente apresenta um valor de fenóis totais mais elevado em relação aos restantes extratos, no caso da concentração de proteínas é a segunda maior, para as atividades biológicas encontra-se na média dos restantes extratos. Para o extrato do controlo da digestão completa (ACC) o conteúdo em fenóis totais e proteínas é efetivamente mais baixo relativamente aos restantes extratos, já no caso das atividades biológicas, encontra-se na média dos restantes extratos para a atividade antioxidante, e para a inibição da AChE está na média dos extratos com maiores atividades.

O extrato da digestão completa (ADC), apresentou maior conteúdo em fenóis totais e proteínas, e bioatividades maiores relativamente aos restantes extratos, no entanto o suco completo apresentou atividade biológica, especialmente na inibição da AChE, o que interfere na bioatividade do extrato. O extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) apesar de apresentar uma contribuição negativa da componente 2, o que indica que apresenta menor conteúdo em fenóis e proteínas, apresenta relativamente aos restantes extratos uma maior variação de todas as variáveis em estudo e portanto maiores bioatividades de atividade antioxidante e inibição de acetilcolinesterase, apresentando-se numa posição relativa a estas variáveis muito próxima, o que justifica a sua escolha. Aparentemente apesar do menor conteúdo em compostos fenólicos extraídos pela decocção, estes apresentam-se como muito bioativos. O seu menor conteúdo em proteínas permite partir também de um extrato com menos interferentes, para o isolamento destes compostos bioativos presentes no extrato obtido após decocção.

Comparando então este resultado com os obtidos anteriormente relativamente ao extrato da digestão completa (ADC) é o que contém maior quantidade de proteínas e a segunda maior quantidade de fenóis totais, no caso das atividades está entre as melhores na atividade antioxidante e inibição da acetilcolinesterase relativamente aos outros extratos, no entanto existem atividades melhores que a deste extrato, até porque existem interferências do suco completo sobre as bioatividades. Já no caso do extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) que foi o escolhido efetivamente demonstrou um baixo conteúdo em proteínas e em termos dos fenóis totais não foi dos maiores valores obtidos, no entanto quanto às atividades biológicas, este foi o que apresentou uma maior atividade antioxidante, e uma das inibições da AChE mais

elevadas, confirmando-se assim o seu potencial e o porque da sua escolha para prosseguir os estudos.

4.1.7 Caracterização do extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD)

O extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) foi o escolhido para continuar as quantificações e seguir para o processo de isolamento dos compostos bioativos, assim sendo foi ainda determinado para este extrato a quantidade de glúcidos, manitol e a inibição da HMGR, os quais foram realizados segundo o que está descrito em 3.8, 3.9 e 3.12, respetivamente.

Para o extrato da decocção (AD), obteve-se então uma concentração de glúcidos de 1.0484 ± 0.0002 mg de glucose/mL, quanto à concentração de manitol foi de 8.47 ± 0.06 mg manitol/mL, e a inibição da HMGR foi de 65.3 ± 0.7 %, foi também determinada a inibição da HMGR para o inibidor do kit, a pravastatina, que obteve 78.2 %, indicando assim que o extrato obteve uma inibição desta enzima quase tão significativa quanto o próprio inibidor.

Ao secar o extrato da decocção (AD) obteve-se uma concentração 41.54 mg de extrato seco/mL de extrato, assim sendo pode normaliza-se os resultados anteriores das quantificações e atividades biológicas.

Na **Tabela 4.4**, encontra-se os resultados anteriores, para o extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD), tendo em conta a concentração deste extrato.

Tabela 4.4 – Conteúdo de fenóis totais, proteínas, glúcidos e manitol para o extrato decocção (AD), tendo em conta a concentração de extrato.

Ensaio	Concentração (mg/mL)	Concentração de extrato nos ensaios (mg extrato seco/mL)	Concentração pela quantidade de extrato seco (mg/mg extrato seco)
Conteúdo em fenóis totais	0.511 mg FLG/mL	1.662 mg extrato seco/mL	0.308 mg FLG/mg extrato seco
Conteúdo em proteínas	0.0010 mg proteínas/ mL	0.208 mg extrato seco/mL	0.0048 mg proteínas/mg extrato seco
Conteúdo em glúcidos	1.048 mg glúcidos/mL	8.308 mg extrato seco/mL	0.126 mg glúcidos/mg extrato seco
Conteúdo em manitol	8.466 mg manitol/mL	41.540 mg extrato seco/mL	0.204 mg manitol/mg extrato seco

Comparando os resultados da **Tabela 4.4** com a bibliografia, para o conteúdo em fenóis totais para um extrato aquoso foi de 0.176 mg FLG/ mg extrato, que está abaixo do obtido neste trabalho, no entanto uma extração que usam solventes orgânicos obteve um concentração de fenóis totais de 0.30 mg FLG/mg extrato seco, estando assim ao nível do resultado do extrato da decocção (AD).[125] Este resultado é muito interessante, pois apresenta uma alternativa às extrações que usam solventes orgânicos, diminuindo assim a contaminação dos extratos e os possíveis efeitos que estes solventes podem ter na saúde e meio ambiente.

A quantidade de proteínas nas algas é muito variável, pode variar entre 0.03 e 0.15 mg proteínas/mg extrato seco[119], [126], o que quer dizer que no caso do extrato da decocção (AD) este valor não foi alcançado, estando bastante abaixo. O que pode acabar por ser vantajoso, tendo-se menor quantidade de compostos não bioativos, indicando que são extraídos apenas os de maior interesse como os compostos fenólicos.

Para a quantidade de glúcidos na *F. vesiculosus* um estudo revela que esta pode chegar a 0.129 mg glucose/mg extrato[127], sendo este valor muito próximo do obtido para o extrato da decocção (AD).

A quantidade de manitol descrita para a alga em estudo recolhida na mesma época do ano é de 0.0883 mg manitol/mg extrato seco[128], que acaba por ser bastante abaixo do encontrado para o extrato da decocção (AD), no entanto sabe-se que a composição em manitol pode chegar a 25 % do peso seco das algas[32], assim sendo o valor obtido acaba por estar dentro deste resultado, as diferenças podem advir do método de extração utilizados ou mesmo das condições ambientais de crescimento da alga.

Em termos das atividades biológicas o extrato da decocção tem a atividade antioxidante de 46.01 % para uma concentração de 0.411 mg extrato/mL, assim sendo pode estimar-se a concentração para 50% de atividade antioxidante a qual foi de 0.447 mg extrato/mL. Para um extrato de *F. vesiculosus* feito em água a 70 °C a concentração para 50% de atividade antioxidante é de 0.024 mg extrato/mL, e em casos de extrações com solventes orgânicos e outras técnicas ainda se obtiveram valores mais baixos[43], [44], ou seja, valores muito inferior ao obtida para o extrato da decocção (AD), indicando que este tem uma atividade antioxidante consideravelmente mais baixa. O que pode dever-se ao método de extração, mas também a diferenças na composição da alga, cruzando o resultado anterior com este a elevada concentração em manitol pode ser a responsável por a diminuição da atividade antioxidante, pois como foi visto estes compostos não têm atividades biológicas.

A inibição da HMGR do extrato da decocção (AD) foi de 65.33 % para uma concentração de 2.077 mg extrato/mL, assim sendo pode estimar-se a concentração para 50% de inibição na HMGR que foi de 1.590 mg extrato/mL, o que indicando então um potencial efeito para com a prevenção da hipercolesterolemia. Por fim com menor eficiência na inibição da AChE que foi 25.25 % para uma concentração de 4.154 mg extrato/mL, permitindo assim estimar a concentração para 50% de inibição da AChE a qual foi de 8.226 mg extrato/mL. Para estas bioatividades não foram encontrados resultados que permitam uma comparação, uma vez que este tipo de estudos não têm sido o alvo das pesquisas sobre a *F. vesiculosus*, no entanto parecem ser resultados promissores, com potencial uso para o tratamento de hipercolesterolemia e demência.

4.2 Processos de Isolamento dos Compostos Bioativos

Primeiramente foram eliminadas as mucilagens dos extratos preparados, para avaliar se este processo é indicado para o enriquecimento em compostos bioativos, o que conseqüentemente se verificaria numa melhoria das atividades biológicas. Posteriormente usou-se a tecnologia de membranas, para a separação compostos bioativos.

4.2.1 Caracterização das frações da extração das mucilagens

As mucilagens são polissacarídeos complexos naturais, realizou-se a sua extração tendo em conta o procedimento descrito em 3.4, para cada um dos extratos (AD/ADG/ACG/ADP/ACP/ADC/ACC) obtendo-se então duas frações destes extratos uma fração designada de mucilagens e a outra de extrato sem mucilagens.

As frações sem mucilagens são: decocção sem mucilagens (sm_AD), digestão gástrica sem mucilagens (sm_ADG), controlo da digestão gástrica sem mucilagens (sm_ACG), digestão pancreática sem mucilagens (sm_ADP), controlo da digestão pancreática sem mucilagens (sm_ACP), digestão completa sem mucilagens (sm_ADC) e controlo da digestão completa sem mucilagens (sm_ACC). E as frações das mucilagens são: mucilagens da decocção (m_AD), mucilagens da digestão gástrica (m_ADG), mucilagens do controlo da digestão gástrica (m_ACG), mucilagens do controlo da digestão pancreática (m_ACP), mucilagens da digestão pancreática (m_ADP), mucilagens da digestão completa (m_ADC) e mucilagens do controlo da digestão completa (m_ACG).

Tendo em conta que a fração mucilagens do controlo da digestão gástrica (m_ACG) obteve-se um pequeno volume, apenas foi aplicada em HPLC-DAD, no entanto uma vez que esta fração é idêntica à fração mucilagens do controlo da digestão pancreática (m_ACP) pode assumir-se que os resultados serão idênticos.

Foram então realizados diferentes ensaios às frações, descritas anteriormente, após serem secas e ressuspendidas a uma concentração de 1 mg/mL, quantificados os fenóis totais, a atividade antioxidante, a inibição da acetilcolinesterase e analisou-se os cromatogramas dos extratos por HPLC-DAD.

Para a obtenção da concentração de fenóis usou-se o método descrito em 3.5, na **Figura 4.11** encontra-se a quantidade de fenóis obtida para cada uma das frações.

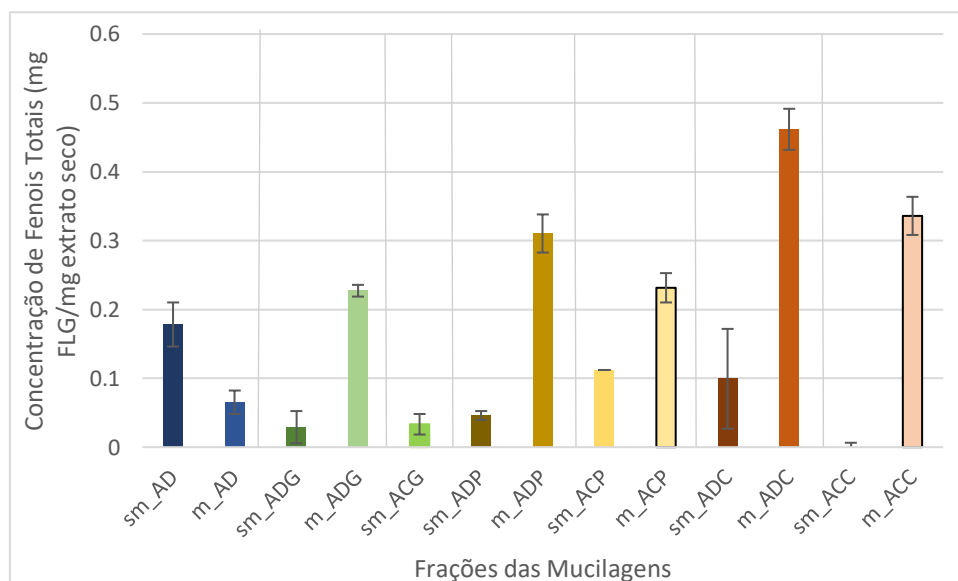


Figura 4.11 – Concentração de fenóis para as frações sem mucilagens extrato da alga decocção (sm_AD), sem mucilagens extrato da alga digestão gástrica (sm_ADG), sem mucilagens controlo da alga digestão gástrica (sm_ACG), sem mucilagens extrato da alga digestão pancreática (sm_ADP), sem mucilagens controlo da alga digestão pancreática (sm_ACP), sem mucilagens extrato da alga digestão completa (sm_ADC), sem mucilagens controlo da alga digestão completa (sm_ACC), mucilagens extrato da alga decocção (m_AD), mucilagens extrato da alga digestão gástrica (m_ADG), mucilagens extrato da alga digestão pancreática (m_ADP), mucilagens controlo da alga digestão pancreática (m_ACP), mucilagens extrato da alga digestão completa (m_ADC) e mucilagens controlo da alga digestão completa (m_ACC).

Ao observar os resultados na **Figura 4.11**, é visível que neste processo a fração das mucilagens é onde se encontra a maioria dos fenóis totais, ou seja, a remoção das mucilagens por este método arrastou a maioria dos compostos fenólicos presentes nos extratos.

Quanto à atividade antioxidante foi determinada, tendo em conta o procedimento descrito em 3.10, os resultados estão apresentados na **Figura 4.12**.

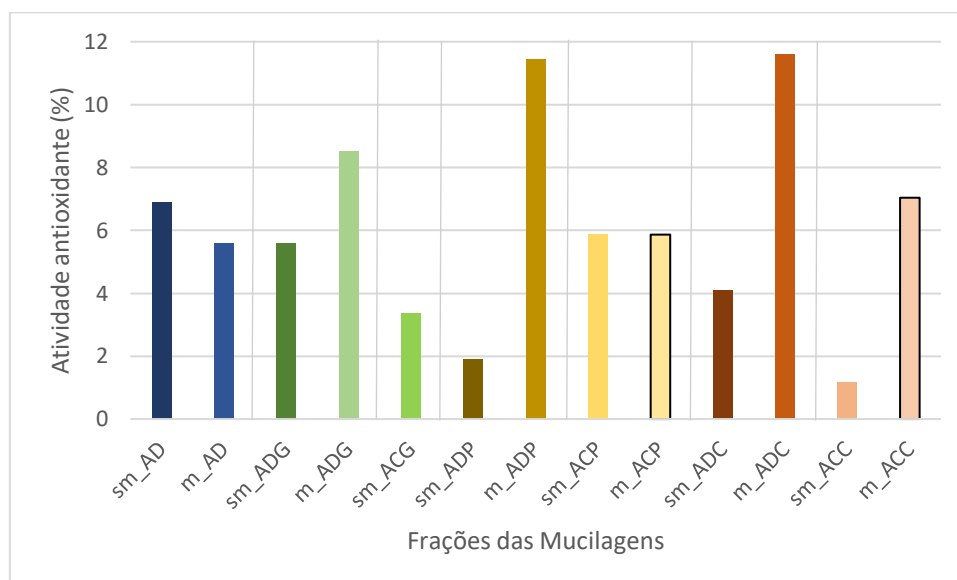


Figura 4.12 – Atividade antioxidante para as frações sem mucilagens extrato da alga decocção (sm_AD), sem mucilagens extrato da alga digestão gástrica (sm_ADG), sem mucilagens controlo da alga digestão gástrica (sm_ACG), sem mucilagens extrato da alga digestão pancreática (sm_ADP), sem mucilagens controlo da alga digestão pancreática (sm_ACP), sem mucilagens extrato da alga digestão completa (sm_ADC), sem mucilagens controlo da alga digestão completa (sm_ACC), mucilagens extrato da alga decocção (m_AD), mucilagens extrato da alga digestão gástrica (m_ADG), mucilagens extrato da alga digestão pancreática (m_ADP), mucilagens controlo da alga digestão pancreática (m_ACP), mucilagens extrato da alga digestão completa (m_ADC) e mucilagens controlo da alga digestão completa (m_ACC), a uma concentração de 1mg/mL.

Os resultados da **Figura 4.12** são um reflexo do resultado anterior (**Figura 4.11**), na maioria dos casos a atividade antioxidante é superior na fração das mucilagens, sendo as únicas exceções a este resultado, o extrato da decocção (AD) e controlo da digestão pancreática (ACP), onde a fração sem mucilagens apresenta uma maior ou igual atividade antioxidante, respetivamente (sm_AD e sm_ACP).

Evidenciando-se mesmo que os compostos com atividade biológica estão maioritariamente nas frações das mucilagens, sendo que este facto pode dever-se às próprias mucilagens, ou também aos fenóis que como se pode ver no estudo anterior foram arrastados para esta fração.

Para aferir a inibição da acetilcolinesterase de cada uma frações da extração das mucilagens, utilizou-se o procedimento descrito em 3.11, os resultados obtidos estão apresentados **Figura 4.13**.

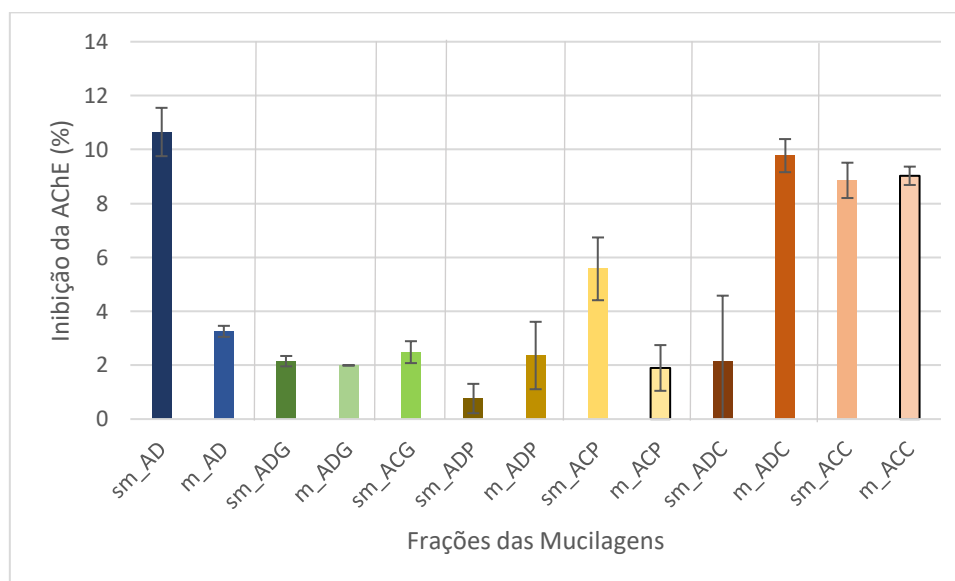


Figura 4.13 – Inibição da acetilcolinesterase para as frações sem mucilagens extrato da alga decocção (sm_AD), sem mucilagens extrato da alga digestão gástrica (sm_ADG), sem mucilagens controlo da alga digestão gástrica (sm_ACG), sem mucilagens extrato da alga digestão pancreática (sm_ADP), sem mucilagens controlo da alga digestão pancreática (sm_ACP), sem mucilagens extrato da alga digestão completa (sm_ADC), sem mucilagens controlo da alga digestão completa (sm_ACC), mucilagens extrato da alga decocção (m_AD), mucilagens extrato da alga digestão gástrica (m_ADG), mucilagens extrato da alga digestão pancreática (m_ADP), mucilagens controlo da alga digestão pancreática (m_ACP), mucilagens extrato da alga digestão completa (m_ADC) e mucilagens controlo da alga digestão completa (m_ACC).

A partir dos resultados apresentados na **Figura 4.13**, não é tão evidente os melhores resultados para as mucilagens, mas para as frações das mucilagens da digestão pancreática, digestão completa e controlo da digestão completa (m_ADP, m_ADC e m_ACC) isso acontece. Já no caso da fração sem mucilagens da decocção (sm_AD), foi a que obteve maior inibição da AChE, no entanto este valor acaba por ser consideravelmente mais baixo que os obtidos anteriormente.

O extrato da decocção (AD), obteve os resultados em que a fração sem mucilagens apresentou maior quantidade de fenóis, maior atividade antioxidante e maior inibição da AChE que as mucilagens, querendo dizer que os compostos fenólicos não foram arrastados para a fração das mucilagens, o que promoveu melhores resultados, talvez porque o método de extração a uma pressão de 2 bar liberta uma maior quantidade de compostos que possam estar associados às mucilagens.

Para realizar os cromatogramas em HPLC-DAD seguiu-se o procedimento descrito em 3.13, usando-se o método da **Tabela 3.1**. Os cromatogramas foram realizados para todas as frações obtidas pela extração das mucilagens, com uma concentração de 1 mg extrato/mL solução (**Anexo 14**).

Na **Figura 4.14** estão apresentados os cromatogramas obtidos para as frações obtidas após a extração das mucilagens ao extrato da decocção (AD) fração sem mucilagens (sm_AD) e a fração das mucilagens (m_AD), sendo escolhido este extrato porque foi o que prosseguiu para o outro método de purificação e é o que possui diferenças visíveis nos cromatogramas obtidos.

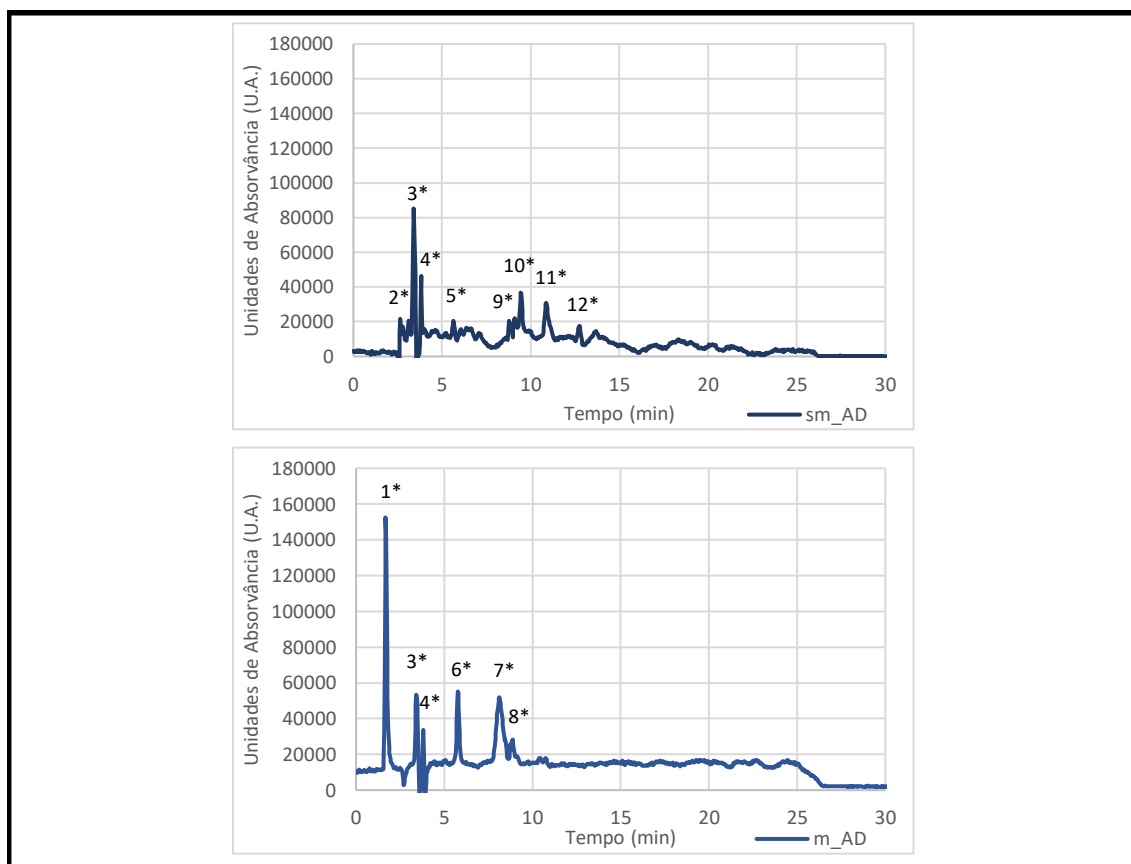


Figura 4.14 – Cromatograma obtido para as frações sem mucilagens (sm_AD) e mucilagens (m_AD).

Ao comparar os cromatogramas das frações das mucilagens e sem mucilagens do extrato da decocção (AD), é notória a diferença entre este em termos das intensidades, no caso da fração sem mucilagens (sm_AD) a intensidade é significativamente mais baixa. Outra diferença é o pico número 1*, da fração das mucilagens (m_AD) sendo o pico mais intenso deste cromatograma, podendo significar que o tempo de retenção 1.7 minutos pode corresponder às mucilagens. No caso do pico 2* apenas é visível para a fração sem mucilagens (sm_AD), o que acaba por indicar que houve mesmo uma separação entre alguns compostos.

No caso do pico 3* e 4* são iguais nos dois cromatogramas, no entanto a maior intensidade verifica-se para a fração sem mucilagens do extrato da decocção (sm_AD), a existência destes dois picos nos cromatogramas das duas frações pode ser um indicador que houve perda de compostos bioativos ou então uma não completa retirada das mucilagens, no entanto sabendo que houve perda de compostos fenólicos para as mucilagens é provável que se tratem desses compostos. Os restantes picos não correspondem entre as frações sem mucilagens (sm_AD) e mucilagens (m_AD), demonstrando mais uma vez que existiu uma diferenciação entre as duas frações como era suposto.

Foram traçados os espectros UV-Vis para os picos, na tentativa de conseguir identificar algum dos compostos, no entanto a concentração era muito baixa, o que não permitindo retirar quais quer conclusões.

Ainda assim este método de purificação, faz uso de um solvente orgânicos, o etanol. Para além disso, não é um processo eficiente para grandes volumes de extrato, e como os resultados

das bioatividades não foram muito elevados, decidiu-se prosseguir para outro método de purificação.

4.2.2 Filtração por membranas

Esta técnica de purificação foi realizada para o extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD), obtendo-se a partir deste várias frações diferentes, o esquema das frações obtidas está apresentado na **Figura 3.6**.

Para proceder à purificação foi necessário preparar duas membranas com porosidades diferentes e fazer a sua compactação, assim como a sua caracterização. A preparação e compactação das membranas foi feita tendo em conta o procedimento descrito em 3.16.1, foi então obtida a membrana com maior MWCO (C_{35}) e a com menor MWCO (C_{25}).

4.2.2.1 Caracterização das membranas preparadas

4.2.2.1.1 Determinação da permeabilidade hidráulica

Um dos pontos da caracterização das membranas é a determinação da sua permeabilidade hidráulica, que foi feita para cada uma delas usando o procedimento 3.16.2.1. Este método estuda a permeação da água pura através da membrana a diferentes pressões transmembranares.

Para a obtenção deste parâmetro é necessário calcular o fluxo de permeação normalizado a 25 °C (**Equação (3)**) e colocar este em função da pressão transmembranar, sendo que foi feito este procedimento para as duas membranas produzidas, na **Figura 4.15** está apresentado o resultado para a membrana com maior MWCO (C_{35}) e para a de menor MWCO (C_{25}).

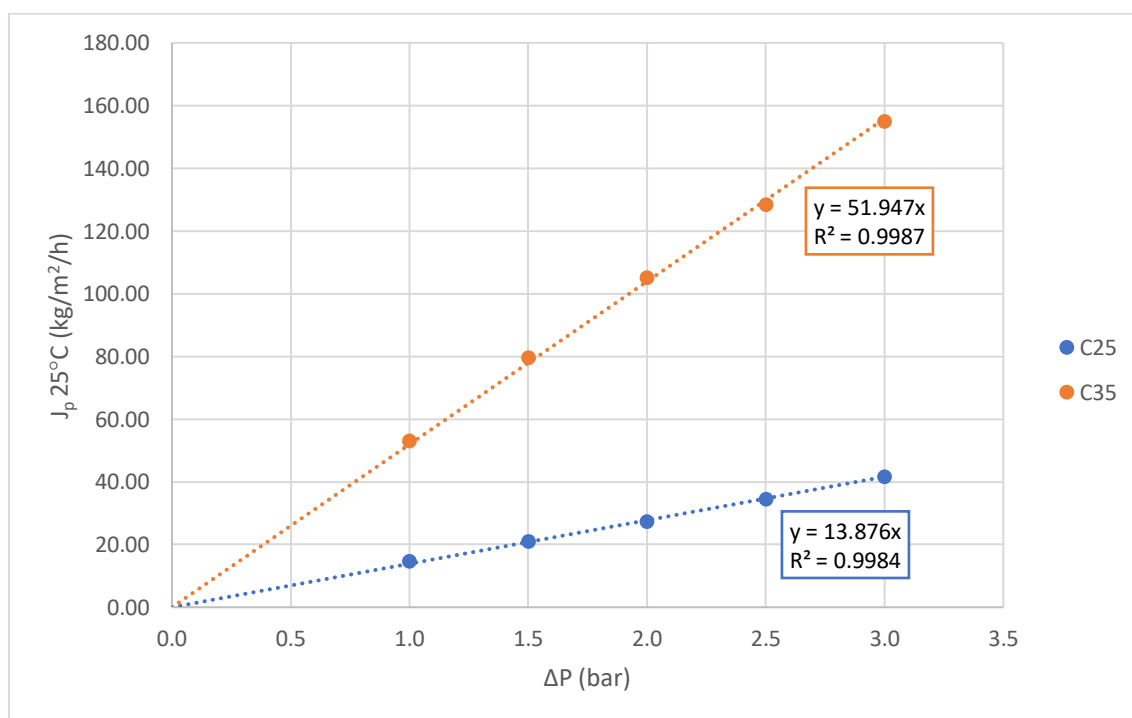


Figura 4.15 – Fluxo de permeação normalizado a 25°C em função da variação de pressão, para determinação da permeabilidade hidráulica, da membrana C_{35} com maior MWCO e da membrana C_{25} com menor MWCO.

O resultado obtido para a membrana com maior MWCO (C_{35}), o fluxo de permeação em função da pressão transmembranas demonstrou um bom coeficiente de correlação, sendo a permeabilidade hidráulica (L_p) dada pelo declive da reta que é de $51.9 \text{ kg/h/m}^2/\text{bar}$, é espetável que este resultado seja mais elevado que o da próxima membrana, porque neste caso a membrana tem um maior MWCO, logo a permeação da água será maior.

Comparando este resultado com o obtido em *Minhalma et al. 2000*[129] é ligeiramente diferente, as disparidades podem dever-se a diferenças na temperatura da sala e consequentemente na solução a permear, pequenas variações na pesagem, no uso equipamentos diferentes e condições de trabalho.

Para a membrana com menor MWCO (C_{25}), a reta do fluxo de permeação em função da pressão transmembranas, tem também um bom coeficiente de correlação, demonstrando a assertividade do método. A permeabilidade hidráulica (L_p) neste caso é de $13.9 \text{ kg/h/m}^2/\text{bar}$, e tal como era esperado é menor que no caso anterior, devido ao MWCO da membrana ser mais pequeno, o que leva à menor permeação de água.

4.2.2.1.2 Determinação do limite de exclusão molecular (MWCO)

Para a determinação deste parâmetro da caracterização foi seguido o procedimento descrito em 3.16.2.2, para a obtenção do coeficiente de rejeição aparente (f) é necessário determinar a concentração em cada um dos solutos na alimentação e no permeado, para tal foram traçadas retas de calibração para cada um dos solventes de referencia (**Anexo 4, 5, 6, 7, 8 e 9**).

Partindo então do coeficiente de rejeição aparente é possível calcular o $\log(f/(1-f))$ para cada um dos solutos de referência usados em função dos seus pesos moleculares, no entanto o limite de exclusão molecular é dado pela interseção desta reta com a reta $y=1$. Assim sendo os resultados obtidos para cada uma das membranas estão apresentados nas **Figura 4.16 e Figura 4.17**.

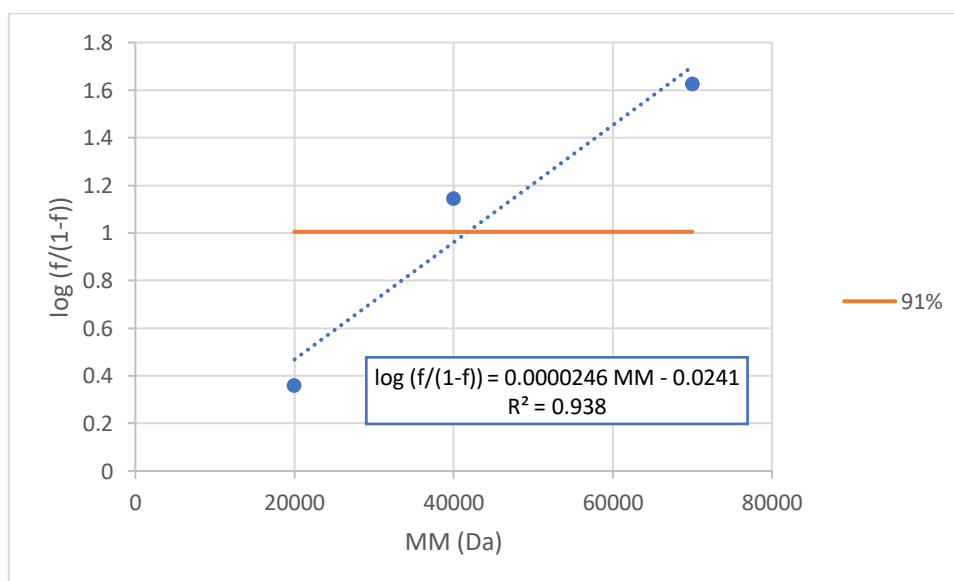


Figura 4.16 – Representação gráfica para a determinação do limite de exclusão molecular da membrana C_{35} com maior MWCO.

Na **Figura 4.16** está apresentada a interseção das retas anteriormente mencionadas, sendo este ponto onde se verifica o limite de exclusão molecular que é 51 445 Da.

Comparando novamente o resultado com o obtido em *Minhalma et al. 2000*[129], está bastante próximo do valor obtido podendo a pequena variação dever-se novamente a diferenças no equipamento e condições do ensaio.

Na **Figura 4.17** encontra-se a determinação da exclusão molecular da membrana com menor MWCO, estando então representada a reta $\log (f/(1-f))$ em função da massa molecular e a sua interseção com $y= 1$.

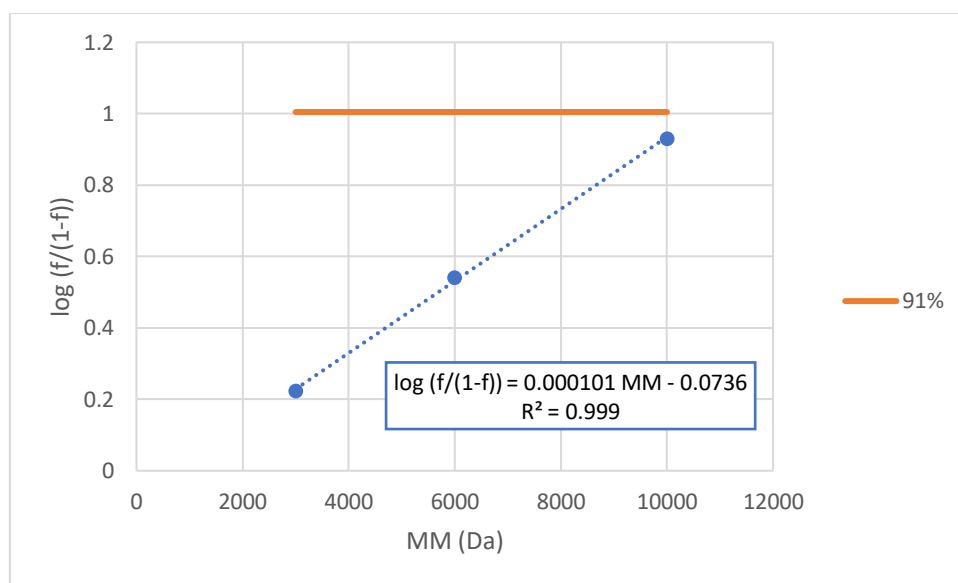


Figura 4.17 – Representação gráfica para a determinação do limite de exclusão molecular da membrana C₂₅ com menor MWCO.

Neste caso para determinar a interseção das duas retas será necessário fazer uma extrapolação indicando que se deveria ter sido usado um padrão com maior peso molecular, no entanto o limite de exclusão molecular da membrana com menor MWCO foi de 10 784 Da, sendo então espectável que o valor desta membrana fosse inferior ao da com maior MWCO, porque neste caso são rejeitados compostos com menor tamanho molecular que os da anterior membrana.

4.2.2.2 Fracionamento do extrato da Decocção (AD) pela filtração por membranas

Para proceder a purificação do extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD), seguiu-se o procedimento descrito em 3.16.3, foram medidos diferentes parâmetros do permeado, com intuito de calcular o caudal de permeado e de manter a temperatura do mesmo minimamente constante, outro parâmetro medido foi a condutividade que neste caso serviu para acompanhar o processo de diafiltração, a cada retirada de permeado este parâmetro tende a diminuir acabando por estabilizar sendo então o processo de diafiltração dado por concluído.

Na **Figura 4.18** tem-se a condutividade registada, no processo de permeação da membrana com maior MWCO (C₃₅), permitindo visualizar a sua evolução.

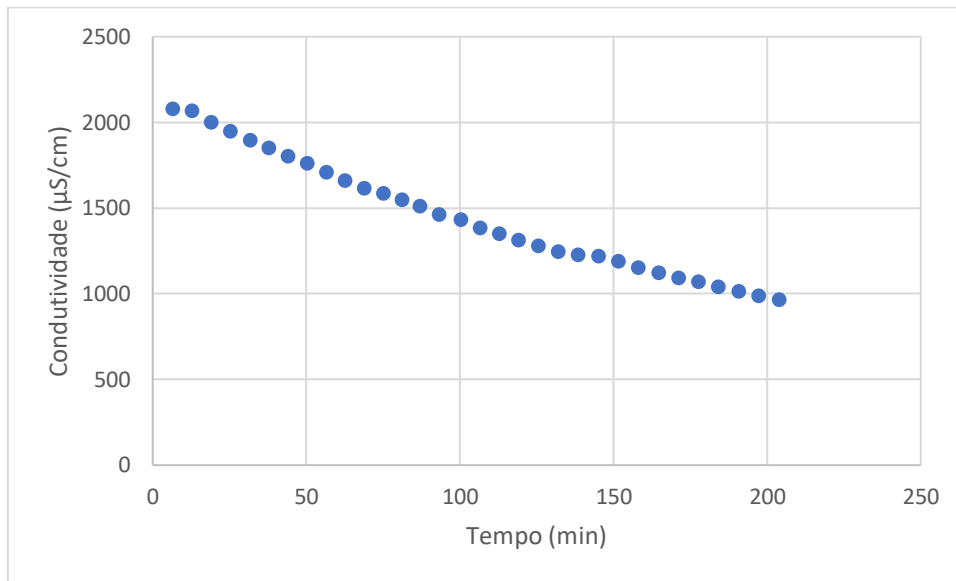


Figura 4.18 – Evolução do processo de diafiltração em termos da condutividade do permeado para a membrana C₃₅ com maior MWCO.

É visível o decréscimo da condutividade, no entanto a diferença nos últimos minutos de permeação começou a diminuir. Para garantir uma estabilização mais notória, dever-se-ia ter prolongado por mais alguns minutos a permeação.

Na **Figura 4.19** tem-se a evolução do processo de permeação da membrana com menor MWCO (C₂₅), sendo apresentada a condutividade em função do tempo do processo.

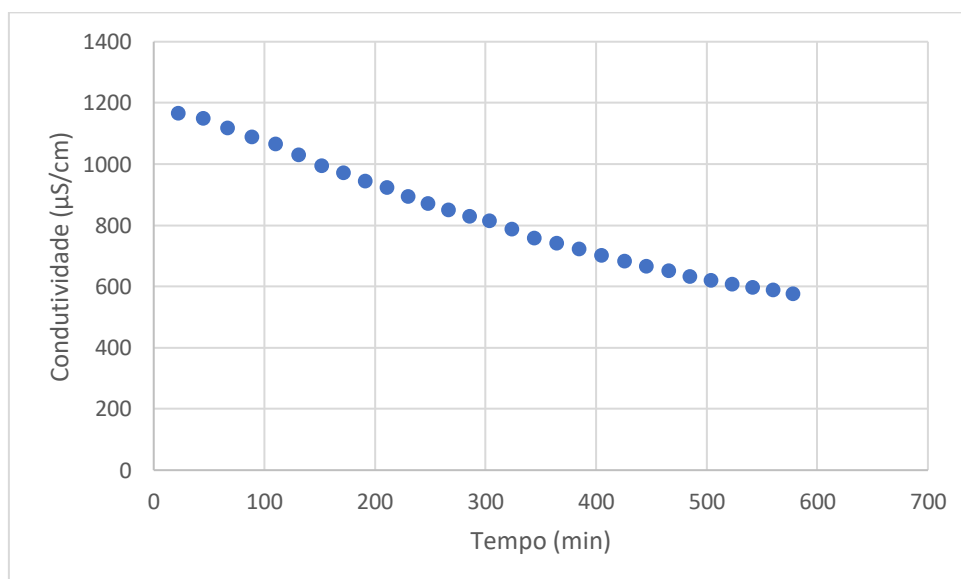


Figura 4.19 – Evolução do processo de diafiltração em termos da condutividade do permeado para a membrana C₂₅ com menor MWCO.

Este processo foi mais demorado que o anterior uma vez que a permeação é mais lenta devido ao menor MWCO que cria uma maior resistência à passagem do extrato, levando assim a um menor caudal de permeação. Neste caso dá para perceber uma estabilização mais efetiva nos minutos finais de permeação.

Através das medições do volume de permeado, tempo permeação e sabendo a área das membranas, foi possível calcular o fluxo de permeação ($L/m^2/h$) e colocar este em função do tempo e do volume, permitindo assim a análise do caudal de permeado ao longo do processo para cada uma das membranas.

Na **Figura 4.20** e **Figura 4.21** têm-se os resultado obtidos para a membrana de maior MWCO C_{35} .

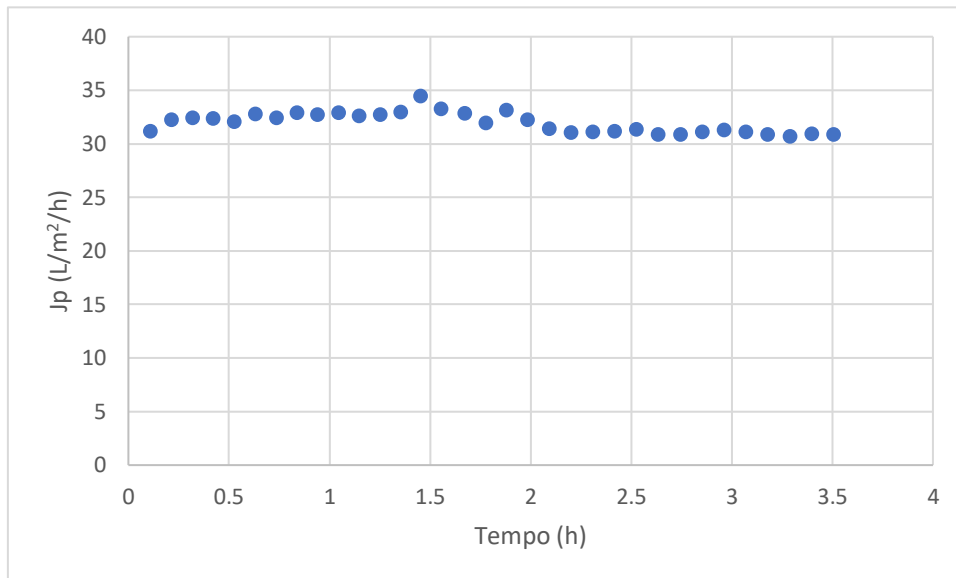


Figura 4.20 – Fluxo de permeação em função do tempo, para membrana de maior MWCO C_{35} .

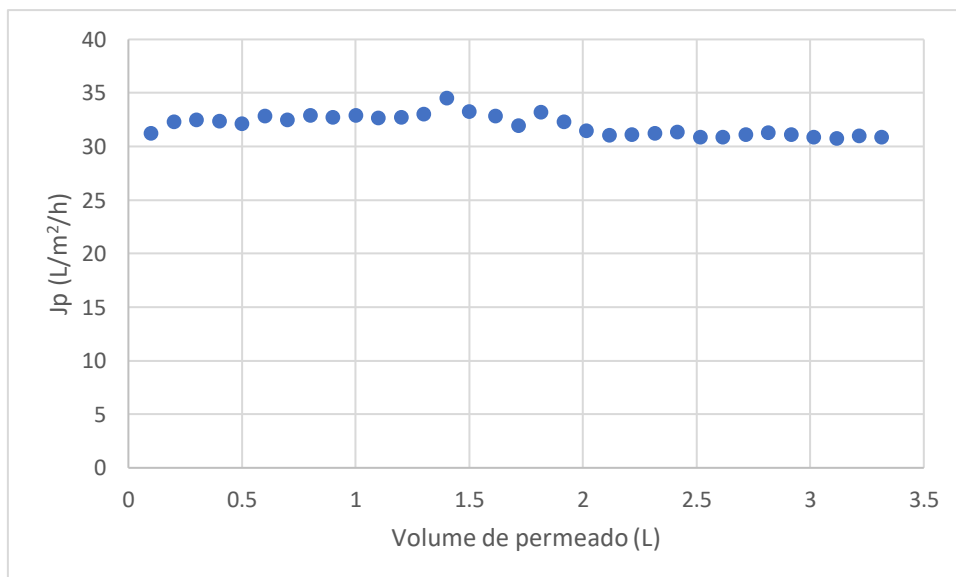


Figura 4.21 – Fluxo de permeação em função do volume, para membrana com maior MWCO C_{35} .

Ao analisar os resultados das duas figuras anteriores é visível que o caudal é mantido praticamente constante durante todo o processo de permeação, demonstrando assim uma das vantagens do processo de diafiltração, que é manutenção dos caudais praticamente constantes durante o processo e permitindo um elevado fluxo dos mesmos.

As pequenas variações devem-se a variações de temperatura do extrato, pois um aumento da temperatura leva a um fluxo de permeação mais elevado.

Na **Figura 4.22** e **Figura 4.23** têm-se os resultados obtidos para a membrana de maior MWCO C_{25} .

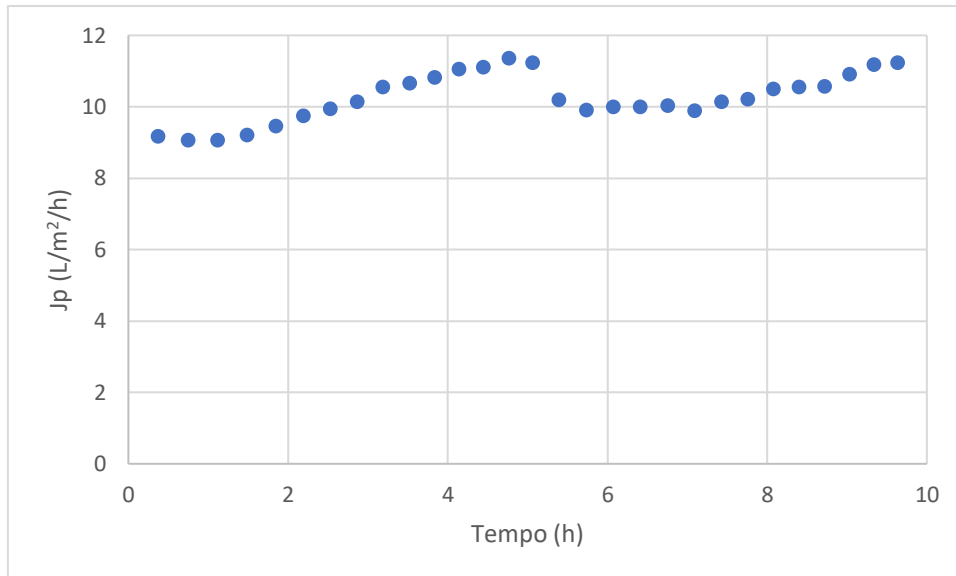


Figura 4.22 – Fluxo de permeação em função do tempo, para a membrana de menor MWCO C_{25} .

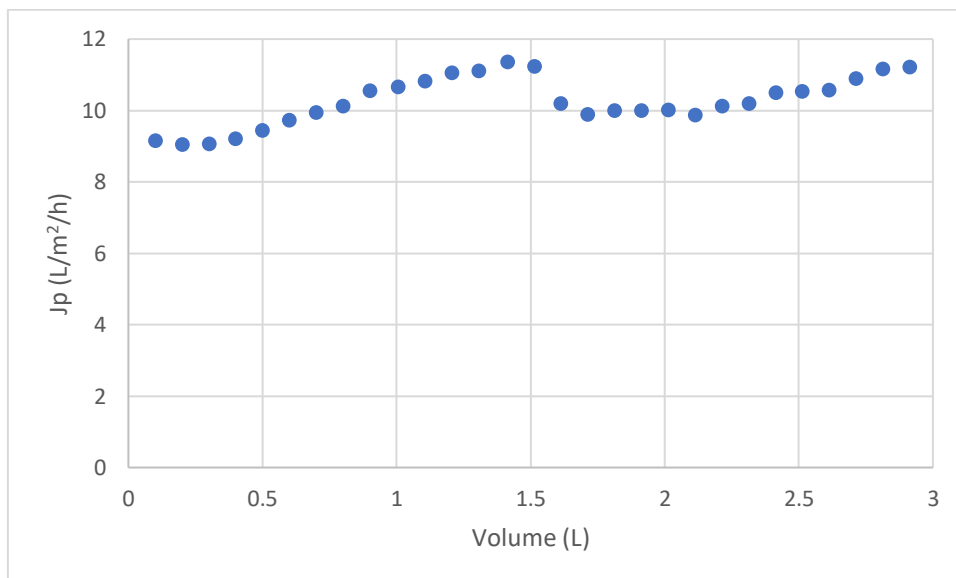


Figura 4.23 - Fluxo de permeação em função do volume, para a membrana de menor MWCO C_{25} .

Para o caso da membrana com menor tamanho de poro os resultados voltam a demonstrar a manutenção do caudal de permeação, voltando a ter-se variações devido às diferenças de temperatura do extrato.

A diafiltração é um método realmente vantajoso no que diz respeito à manutenção do caudal de permeação ao longo do processo e este ser relativamente elevado consoante o tipo de membrana. No caso da membrana de menor MWCO o fluxo de permeação é menor, o que é normal, visto que o extrato tem maior dificuldade em atravessá-la.

Para mostrar melhor as diferenças existentes entre as duas membranas foi calculado o coeficiente de rejeição aparente (f), para os fenóis totais e taninos, as suas concentrações foram determinados pelos procedimentos indicados em 3.5 e 3.6, para as alimentações e permeados e estão apresentadas na **Tabela 4.5**.

Tabela 4.5 – Concentração de fenóis totais e taninos, para a alimentação e permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_A} e C_{35_P}) e para a alimentação e permeado da membrana de menor MWCO (C_{25_A} e C_{25_P}).

Frações	Concentração em Fenóis totais ($\mu\text{g FLG}/\mu\text{L}$)	Concentração em Taninos ($\mu\text{g FLG}/\mu\text{L}$)
C_{35_A}	0.106 ± 0.004	0.099 ± 0.004
C_{35_P}	0.059 ± 0.004	0.055 ± 0.004
C_{25_A}	0.044 ± 0.002	0.038 ± 0.002
C_{25_P}	0.017 ± 0.001	0.011 ± 0.002

O cálculo da rejeição aparente (f) foi feito tendo em conta a **Equação (4)**, usando-se os resultados obtidos para as concentrações das alimentações e permeados de cada uma das membranas (**Tabela 4.5**), os resultados obtidos estão na **Tabela 4.6**.

Tabela 4.6 – Rejeição aparente (f) para os taninos e fenóis totais, tendo em conta as suas concentrações na alimentação e no permeado determinadas anteriormente para cada uma das membranas C_{35} com maior MWCO e C_{25} com menor MWCO.

	$f_{C_{35}}$ (%)			$f_{C_{25}}$ (%)		
Taninos	45.0	\pm	0.9	71.0	\pm	0.4
Fenóis totais	44	\pm	1	61.7	\pm	0.4

A rejeição aparente apresentada na **Tabela 4.5** para cada uma das membranas, demonstra que no caso dos fenóis e taninos são rejeitados maioritariamente na membrana de menor MWCO (C_{25}), ou seja, demonstra assim que maioritariamente estes compostos são de tamanho molecular médio, no entanto existem ainda alguns de maior peso molecular que são também rejeitados na membrana de maior MWCO (C_{35}).

4.3 Análise e caracterização das frações obtidas pela filtração por membranas

O extrato da decoção (AD) foi fracionado por tecnologia de membranas, em modo de diafiltração de acordo com o descrito em 3.16.3 e segundo o esquema da **Figura 3.6**. Neste esquema estão apresentadas as diferentes frações e tamanhos dos compostos que as constituem, a alimentação da primeira membrana a com maior MWCO (C_{35_A}) corresponde ao extrato da decoção (AD), dando assim origem às restantes frações onde a alimentação da segunda membrana de menor MWCO (C_{25_A}), corresponde à fração do permeado da primeira membrana por maior MWCO (C_{35_P}).

As diferentes frações da primeira membrana com maior MWCO (C_{35}) são a corrente do concentrado (C_{35_C}), fração grande (G), e a corrente do permeado (C_{35_P}), com os compostos médios e pequenos (M+P), as quais foram obtidas a partir da alimentação (C_{35_A}). Para a segunda

membrana de menor MWCO (C_{25}), as frações obtidas foram a corrente de concentrado (C_{25_c}), fração média (M) e a corrente do permeado (C_{25_p}), fração pequena (P).

Foram então caracterizadas as diferentes frações geradas pelas membranas, estas foram secas e ressuspendidas a uma concentração de 10 mg extrato/mL. E para cada uma das quantificações e determinação das bioatividades foram realizados três replicados.

4.3.1 Quantificações dos Fenóis Totais

Determinaram-se os fenóis totais das frações, o método para determinação dos fenóis foi o descrito anteriormente em 3.5, e os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 4.24**, sob a forma de concentração de fenóis totais em mg FGL/mg extrato seco.

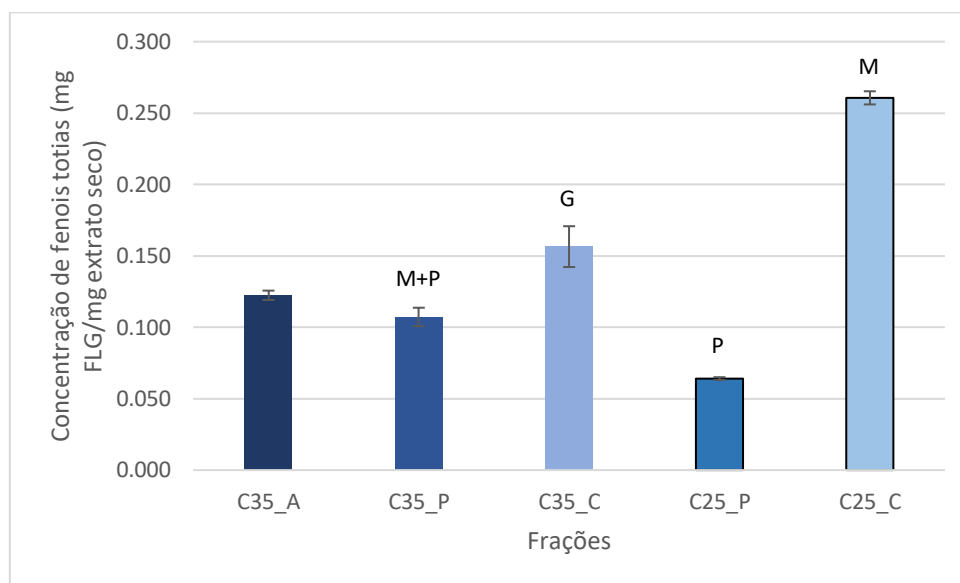


Figura 4.24 – Concentração de fenóis totais, determinada para a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_p}), concentrado da primeira membrana (C_{35_c}), permeado da segunda membrana (C_{25_p}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_c}).

Os polifenóis são uma família de compostos que apresentam uma larga gama de massas moleculares e analisando o processo de purificação verifica-se, para as duas membranas, que os concentrados (C_{35_c} e C_{25_c}) apresentam uma maior concentração, seguidos das alimentações e por fim os permeados com menor concentração.

A concentração de fenóis totais no primeiro concentrado (C_{35_c}) é mais elevada que na alimentação (C_{35_A}), foram então concentrados compostos fenólicos nesta fração tendo em conta o processo das membranas estes são compostos de maior massa molecular. Comparando a concentração da alimentação (C_{35_A}) com o permeado (C_{35_p}), a perda de compostos fenólicos não é significativa, o que pode significar que a quantidade de fenóis perdidos para o concentrado (C_{35_A}) não será assim tão elevada, pois como as frações foram ressuspendidas à mesma concentração uma menor quantidade de compostos leva a uma maior concentração dos mesmos.

Relativamente às frações geradas pela membrana de menor MWCO, verifica-se que no concentrado (C_{25_c}), ocorreu uma elevada concentração em fenóis totais, sendo estes os compostos fenólicos de tamanho “médio”. O permeado desta membrana (C_{25_p}) apresenta a

menor concentração em fenóis totais, mostrando que os compostos fenólicos são bastante retidos pela membrana de menores dimensões.

Relativamente à alimentação obtiveram-se as maiores concentrações de fenóis para os concentrados, na membrana de menor MWCO (C_{25_C}) com 0.261 ± 0.005 mg de FLG/mg de extrato seco, e na membrana com maior MWCO (C_{35_C}) com 0.16 ± 0.01 mg de FLG/mg de extrato seco.

4.3.2 Quantificações dos Taninos

Para a determinação dos taninos usaram-se as frações tal e qual, sem secagem prévia, e seguiu-se o procedimento descrito em 3.6, para tal usou-se a determinação de fenóis totais representada na **Figura 4.25**, fazendo-se a subtração dos valores de fenóis totais obtidos depois do tratamento com PVPP, estando esse resultado, a concentração em taninos (μg FLG/mL de extrato), representado na **Figura 4.26**.

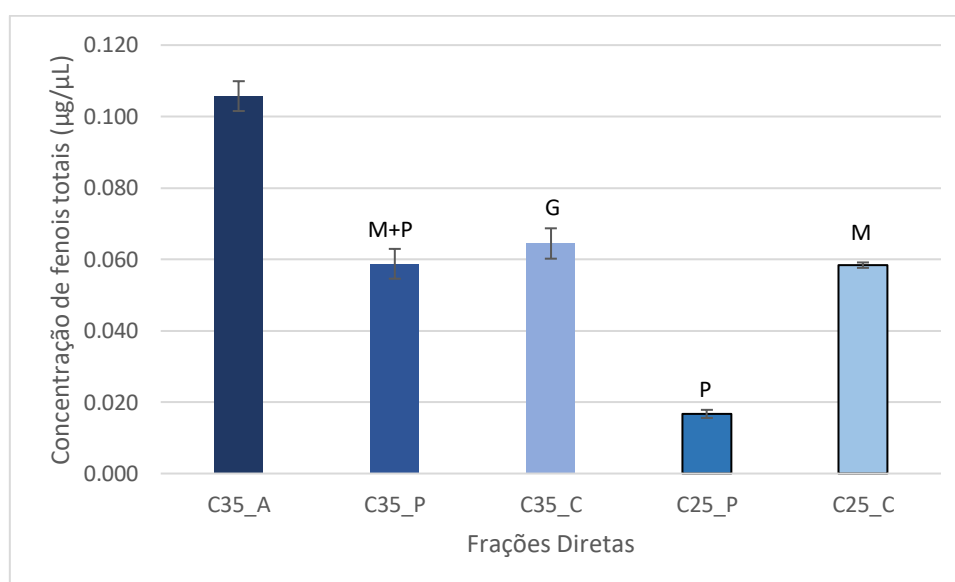


Figura 4.25 – Quantificação dos fenóis totais antes do tratamento com PVPP, para a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}), para as soluções obtidas pelas membranas.

A concentração de fenóis mais elevada dá-se para a alimentação da membrana com maior MWCO (C_{35_A}), pois as consecutivas adições de água fazem com que a concentração vá diminuindo, no entanto a dos concentrados é sempre superior à do permeado indicando que existe uma separação efetiva dos polifenóis pelo seu tamanho.

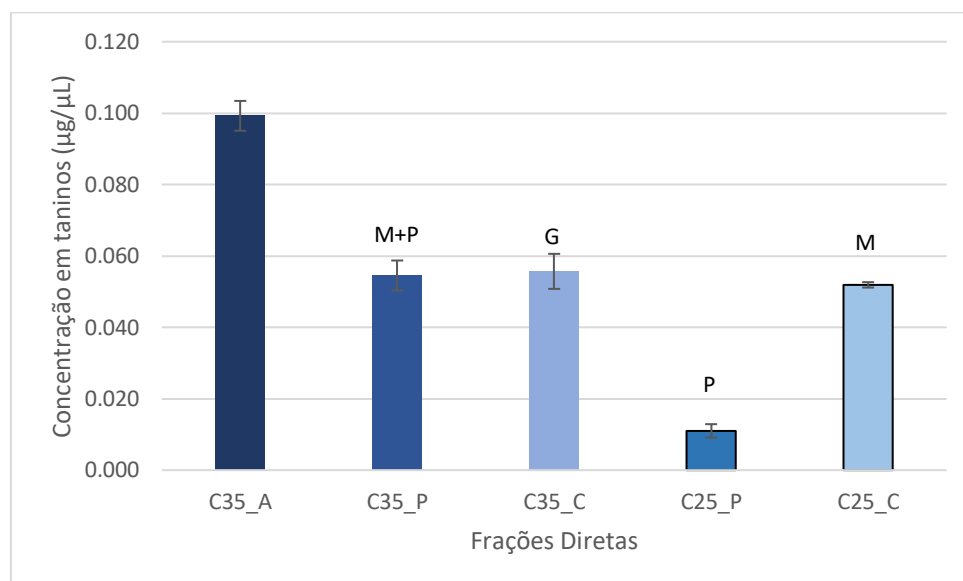


Figura 4.26 – Concentração de taninos, determinada para a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}), na concentração de partida obtida pelas membranas.

Ao comparar a **Figura 4.25** e **Figura 4.26**, percebe-se que a maioria dos fenóis das frações e do extrato de partida são taninos, sendo este resultado expectável, visto que na maioria das vezes os compostos fenólicos reportados como existentes nesta alga são os florotaninos.

A maior concentração de taninos diz respeito à alimentação da membrana com maior MWCO (C_{35_A}) (0.099 ± 0.004 µg FLG/mL de extrato), já a menor concentração de taninos dá-se na fração do permeado da segunda membrana (C_{25_P}) (0.011 ± 0.002 µg FLG/mL de extrato), tendo em conta o processo das membranas estes serão os taninos de menores dimensões, sendo a maioria dos taninos rejeitado pela membrana de menor MWCO (C₂₅).

4.3.3 Quantificações das Proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo método referido em 3.7, para cada uma das frações a 10 mg/mL, os resultados obtidos para a concentração de proteínas estão representados na **Figura 4.27**.

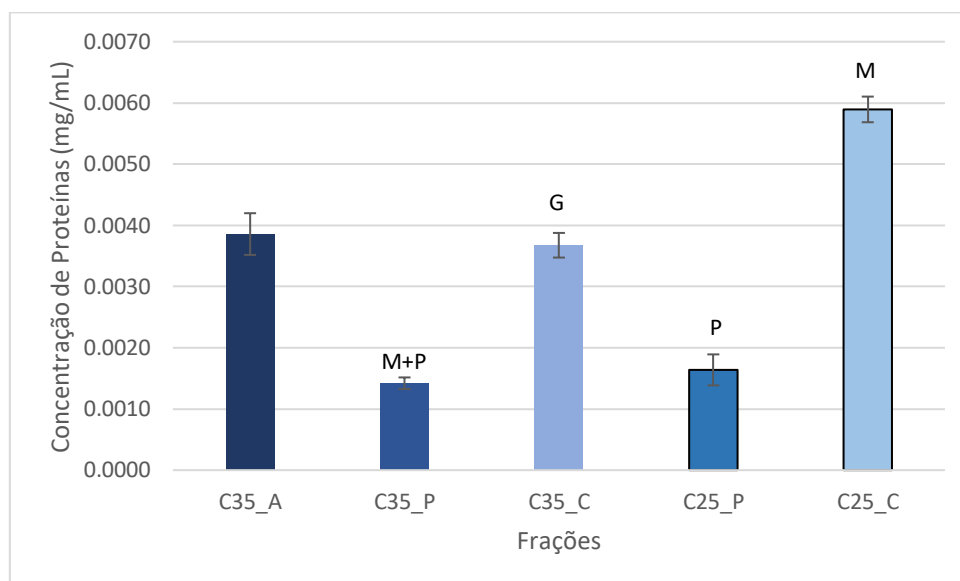


Figura 4.27 – Concentração de proteínas determinada para a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}).

Como se pode ver na **Figura 4.27**, a maior concentração de proteínas dá-se no concentrado da segunda membrana (C_{25_C}) sendo de 0.0059 ± 0.0002 mg proteína/mL extrato, que correspondem às proteínas de tamanho médio. No entanto, uma vez que a concentração de proteínas na alimentação e no concentrado da primeira membrana (C_{35_A} e C_{35_C}) são praticamente iguais, isto indica que a maioria das proteínas são retidas pela membrana C₃₅, indicando assim que as proteínas existentes no extrato são de tamanho grande, visto que são concentradas no C_{35_C}. No entanto, a maioria das proteínas que atravessa esta membrana é rejeitada pela membrana seguinte (C₂₅), e como existem menores quantidades de compostos na fração do concentrado (C_{25_C}), a concentração de proteínas torna-se mais elevada.

4.3.4 Quantificação dos Glúcidos

Para a quantificação dos glúcidos utilizou-se o método descrito em 3.8, os resultados já obtidos estão apresentados na **Figura 4.28**.

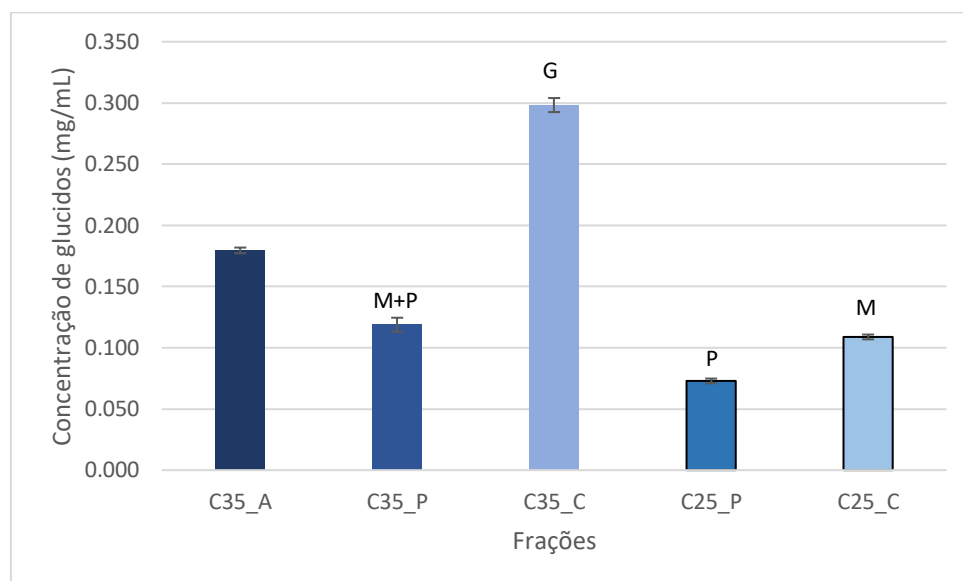


Figura 4.28 – Concentração de glúcidos para a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}).

Ao visualizar os resultados é evidente que a fração com maior composição em glúcidos é o concentrado da primeira membrana (C_{35_C}) com (0.298 ± 0.006 mg glúcidos/mL), tendo em conta o processo das membranas isto indica que os glúcidos presentes no extrato da *F. vesiculosus* são na sua maioria de maior peso molecular, sendo então rejeitados pela membrana de maior MWCO (C₃₅).

Com menor concentração de glúcidos tem-se o permeado da segunda membrana (C_{25_P}) com (0.073 ± 0.002 mg glúcidos/mL), mostrando assim a existência de poucos glúcidos de baixo peso molecular.

4.3.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada tendo por base o que está descrito em 3.10, os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 4.29**.

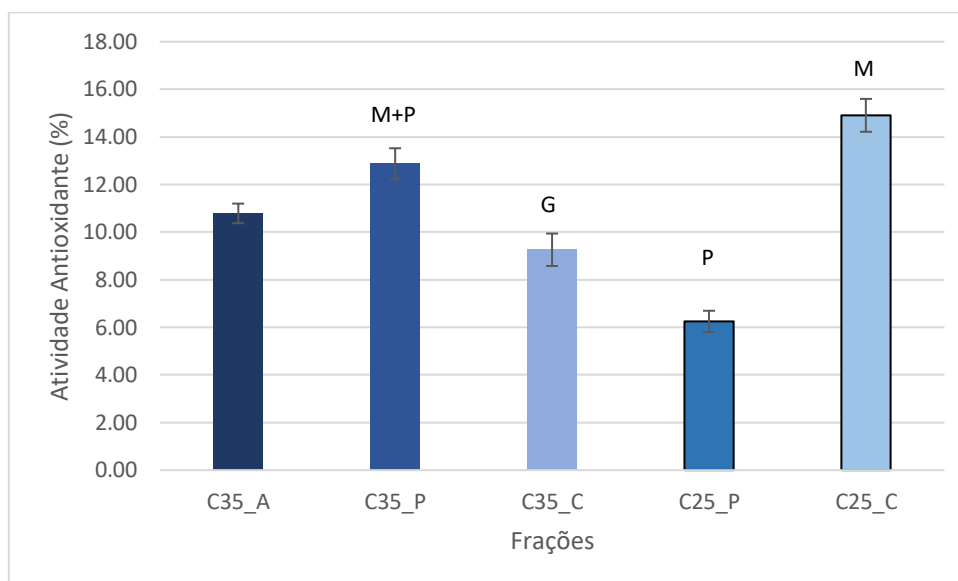


Figura 4.29 – Atividade antioxidante determinada para a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}).

Tendo em conta a **Figura 4.29** as frações com maior atividade antioxidante são o concentrado da membrana com menor MWCO (C_{25_C}) (14.9 ± 0.7 %), segundo processo das membranas estes são os compostos de tamanho “médio”, e o permeado da membrana com maior MWCO (C_{35_P}) (12.9 ± 0.7 %), sendo neste caso o conjunto dos compostos “médios e pequenos”.

Com menores atividades antioxidantes tem-se o permeado da membrana com menor MWCO (C_{25_P}) com 6.3 ± 0.5 %, que segundo o processo das membranas têm os compostos de baixo peso molecular. Outra fração com baixa atividade é o concentrado da membrana com maior MWCO (C_{35_C}) com 9.3 ± 0.7 %, que é constituído por os compostos de maior peso molecular, demonstrando assim que este tipo de compostos têm uma menor atividade biológica, sabendo que anteriormente (**Figura 4.28**) esta fração apresentou uma elevada concentração em glúcidos isto pode explicar estes resultados de fraca atividade biológica.

4.3.6 Inibição da AChE

A inibição da acetilcolinesterase foi feita tendo em conta o descrito em 3.11, os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 4.30**.

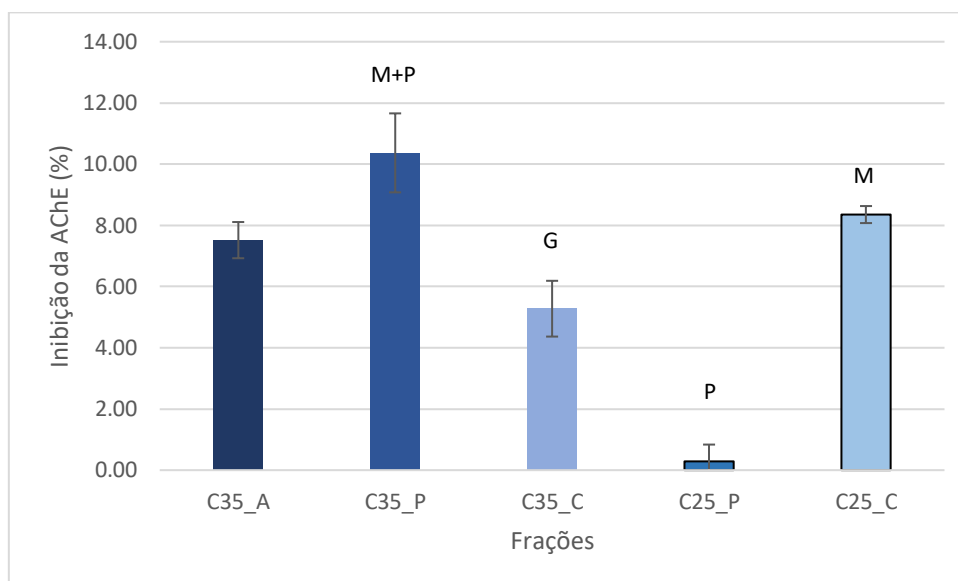


Figura 4.30 – Inibição da acetilcolinesterase para a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}).

Na **Figura 4.30** é visível que a maior inibição da AChE foi obtida para a fração do permeado da primeira membrana (C_{35_P}) com (10 ± 1 %), demonstrando que neste caso os compostos com massa molecular média e pequena em conjunto tem maior atividade na inibição da AChE. Outra das frações com maior inibição da AChE é o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}) com (8.4 ± 0.3 %) demonstrando que as partículas de peso molecular médio também possuem uma boa inibição da AChE, em comparação com as restantes frações. Comparando estes dois resultados com o do extrato de partida, representado pela alimentação da membrana de maior MWCO (C_{35_A}), houve um ganho de atividade.

Quanto a menor inibição da AChE foi verificada para a fração com menor concentração de fenóis totais, o permeado da segunda membrana (C_{25_P}) que foi de (0.3 ± 0.6 %), segundo o processo das membranas esta fração contém então os compostos de menor peso molecular, o que demonstra a sua inatividade. O concentrado da primeira membrana (C_{35_C}) obteve também um dos valores mais baixos de inibição de (5.3 ± 0.9 %) demonstrando assim que os compostos de maior tamanho molecular mais uma vez não possuem uma boa atividade biológica, podendo então dever-se à elevada constituição desta fração em glúcidos, o que demonstra a baixa atividade biológica destes compostos.

4.3.7 Caracterização das frações e comparação com padrões por HPLC-DAD

A obtenção dos cromatogramas teve por base o procedimento descrito em 3.13, sendo que neste caso se usou o método descrito na **Tabela 3.2**, sendo aqui apresentado as diferenças obtidas entre cada uma das frações no processo de permeação, começando então pelo processo de permeação da primeira membrana (C₃₅) na **Figura 4.31**.

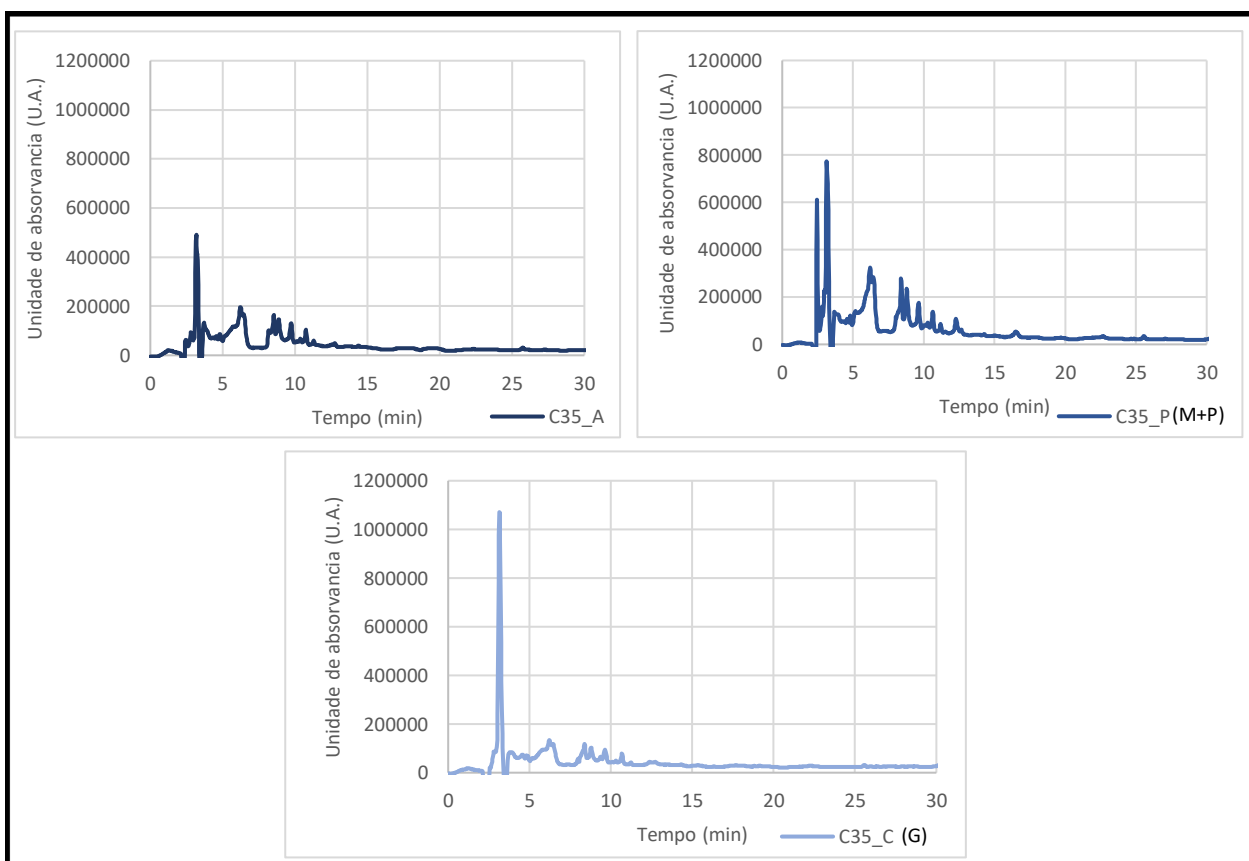


Figura 4.31 – Cromatograma das frações obtidas para a primeira membrana utilizada, com maior MWCO, alimentação, permeado e concentrado (C_{35_A} , C_{35_P} e C_{35_C}), a uma concentração 5 mg/mL.

Os cromatogramas da **Figura 4.31** permite comparar as diferentes frações obtidas pela membrana de maior MWCO, a maioria dos picos variam apenas na intensidade indicando então diferenças de concentração. Para todos os picos depois dos 5 minutos a maior intensidade dá-se para a fração do permeado (C_{35_P}) indicando que os compostos que constituem estes picos estão mais concentrados nesta fração, devendo tratar-se os compostos de pequeno e médio tamanho de partícula.

Na fase inicial antes dos 5 minutos de corrida a maior intensidade, dá-se para o concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), podendo indicar que estes serão os compostos com maior peso molecular segunda a tecnologia de membranas. No entanto são nestes instantes iniciais onde se dão as maiores diferenças, entre o permeado e o concentrado da primeira membrana (C_{35_P} e C_{35_C}), são a divisão do primeiro pico em dois no permeado (C_{35_P}) o que pode indicar a perda de alguns compostos, obtendo-se então uma maior resolução do primeiro pico.

Para a segunda membrana usou-se como alimentação o permeado da primeira membrana (C_{35_P}), a comparação dos cromatogramas do processo desta segunda membrana (C_{25}), estão representados na **Figura 4.32**.

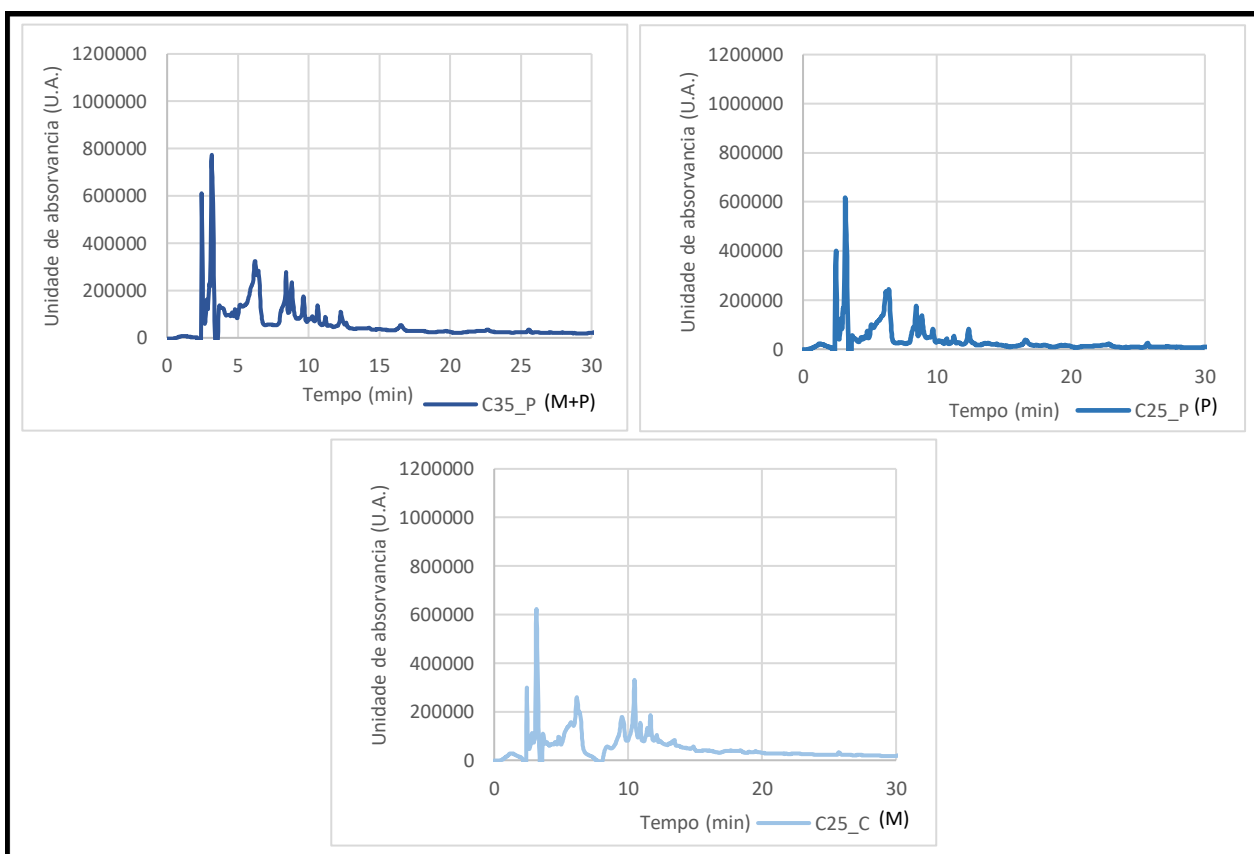


Figura 4.32 – Cromatograma das frações obtidas para a segunda membrana utilizada, com menor MWCO, alimentação, permeado e concentrado (C_{35_P}, C_{25_P} e C_{25_C}), a uma concentração de 5 mg/mL.

Ao analisar a **Figura 4.32** as maiores diferenças entre a alimentação (C_{35_P}) e as frações do permeado e concentrado da segunda membrana (C_{25_P} e C_{25_C}) são a diminuição da intensidade dos picos querendo dizer que a concentração dos compostos é menor nestas frações.

Atentando às diferenças entre o permeado e o concentrado da segunda membrana (C_{25_P} e C_{25_C}), as principais são na diferença de intensidade do primeiro pico para o concentrado (C_{25_C}) demonstrando que este foi um dos locais onde se perderam compostos de tamanho pequeno, e para além disto os picos por volta dos 10 minutos ganharam uma maior resolução, sendo visível uma melhor divisão dos mesmos, querendo dizer que nesta zona estes compostos foram concentrados e foram perdidos outros que interferiam no cromatograma.

Ao comparar então os cromatogramas com os padrões (**Anexo 15**) é visível que apenas dois se sobrepõem ao cromatograma, sendo eles o ácido quinico e o floroglucinol. Tendo em conta o já referido anteriormente em 4.1.3, o ácido quinico não pode estar presente no extrato em tão elevadas concentrações, já o floroglucinol é provável uma vez que é a unidade constituinte dos florotaninos.

Foram analisados os espectros UV-Vis das frações que obtiveram maiores bioatividade, permeado da primeira membrana (C_{35_P}) e concentrado da segunda membrana (C_{25_C}), para cada um dos picos na tentativa de identificar os compostos que constituem as frações.

Tendo em conta, que o padrão de floroglucinol é um dos possíveis componentes do extrato, compararam-se os espectros UV-Vis do mesmo com o das frações do permeado da primeira

membrana (C_{35_p}) e do concentrado da segunda membrana (C_{25_c}), estando então apresentados na **Figura 4.33**.

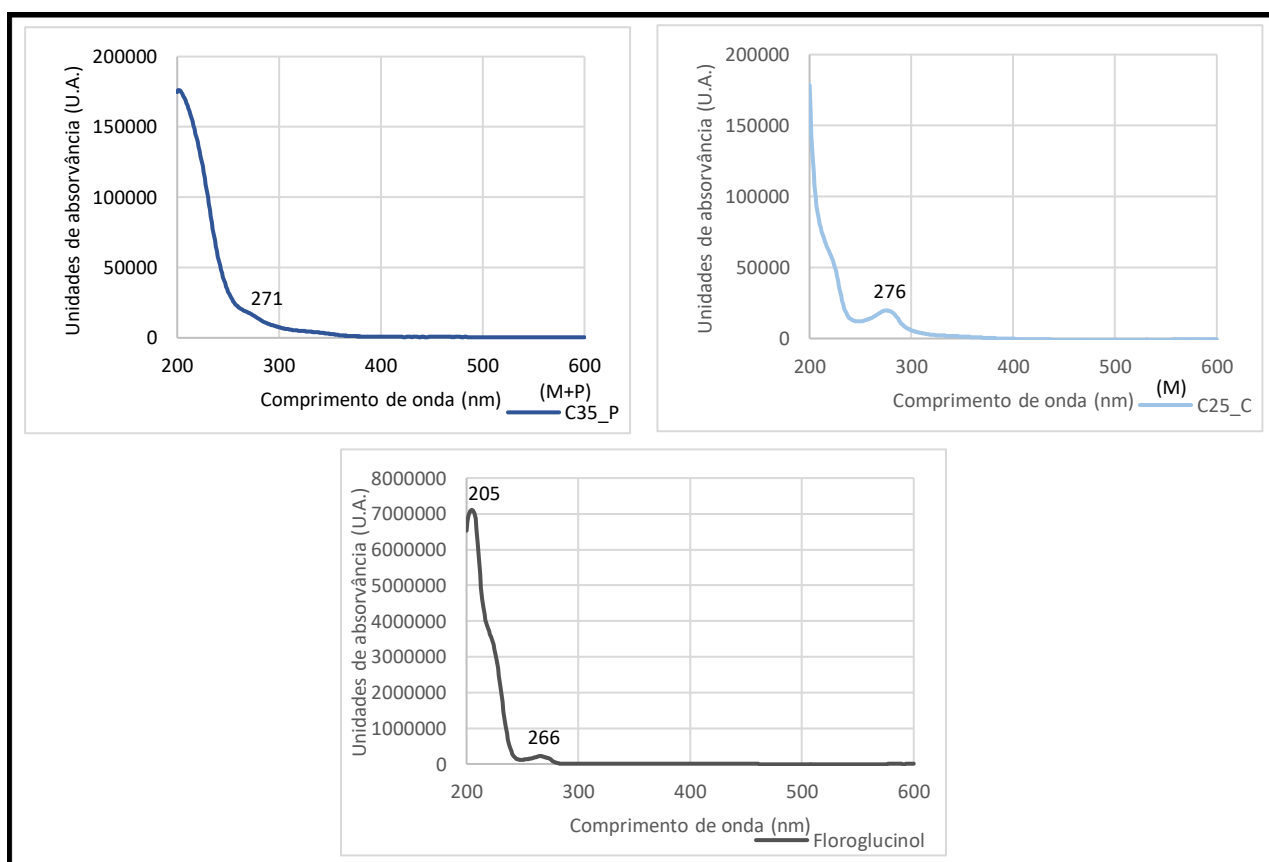


Figura 4.33 – Espectros UV-Vis para as frações do permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}), concentrado da membrana de menor MWCO (C_{25_c}) e padrão de floroglucinol, obtidos através dos respectivos cromatogramas, nos instantes 9.629, 9.522 e 9.469 minutos, respetivamente.

Tendo em conta, que os florotaninos tem um pico de absorvem entre os 270-280 nm[124], os compostos dos picos em torno dos 9.5 minutos das frações, podem não ser floroglucinol, porque neste caso não existe uma semelhança tão evidente, mas podem ser florotaninos, que ao sofrerem o processo de purificação aumentam o seu máximo de absorvância, devido a existência de menos interferentes. Sabendo que estes compostos são constituídos por subunidades de floroglucinol, pode ser por este motivo que apresentam um tempo de retenção idêntico ao padrão.

No caso do extrato e do padrão floroglucinol os espectros UV-Vis correspondiam, talvez porque podiam existir subunidades soltas, que foram perdidas na purificação. Quanto aos restantes picos, para a fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), foram encontrados espectros UV-Vis (**Anexo 16**), para os tempos de retenção 2.801, 3.681, 5.148, 8.802 e 12.270, que possuem um máximo de absorvância dentro do descrito para os florotaninos.

No caso da fração do concentrado da segunda membrana (C_{25_c}), os espectros UV-Vis dos restantes picos (**Anexo 17**), para os tempos retenção 2.801, 10.483, 12.136, 12.376, 13.283, 13.443, 14.857, 17.498 e 18.404, também apresentaram um máximo de absorvância na zona dos florotaninos. Neste caso e importante denotar que a maioria dos tempos de retenção que

apresentam essa característica são depois dos 10 minutos, e que ao observar a **Figura 4.32** notou-se um ganho de intensidade e uma melhor resolução no cromatograma, podendo mesmo indicar que se tratam dos compostos fenólicos de interesse, sendo normal tempos de retenção próximos, visto que são muito idênticos quimicamente falando.

4.3.8 Comparação estatística dos Resultados, por Análise dos Componentes Principais (PCA)

Com os resultados anteriormente apresentados, recorreu-se uma ferramenta estatística *IBM SPSS Statistics Viewer* onde se aplica a análise do componente principal, que é um método de redução de dimensões permitindo transformar um grande conjunto de dados em um conjunto mais pequeno continuando a ter a maioria da informação do conjunto de dados inicial e relacionando-os entre si.

A análise PCA relacionou os dados obtidos sobre as variáveis: Conteúdo em fenóis totais (Fenóis), conteúdo em proteínas (Proteínas), conteúdo em glúcidos (Glúcidos), atividade antioxidante (DPPH) e inibição da acetilcolinesterase (AChE) nas diferentes frações a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}), sendo estes dados apresentados na **Tabela 4.7**.

Tabela 4.7 – Dados analisados através da análise do componente principal, para os diferentes ensaios conteúdos em fenóis, proteínas, glúcidos, atividades antioxidante e inibição da acetilcolinesterase para as frações alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}).

Frações	Concentração de Fenóis totais (µg FLG/mg extrato seco)	A.A. (%)	I. AChE (%)	Concentração de Proteínas (mg/mL)	Concentração de glúcidos (mg glucose/mL)
C _{35_A}	0.122	10.79	7.52	0.00039	0.180
C _{35_P} (M+P)	0.107	12.87	10.37	0.00014	0.119
C _{35_C} (G)	0.156	9.26	5.28	0.00037	0.298
C _{25_P} (P)	0.064	6.25	0.30	0.00016	0.073
C _{25_C} (M)	0.261	14.91	8.35	0.00059	0.109

Com o PCA foi possível extrair dois componentes principais, componente 1 e componente 2, que representam as variáveis das quantificações efetuados para caracterizar e quantificar as atividades das frações. O componente 1 explica 59.481 % da variância das variáveis e o componente 2 explica 22.835 % da variância das variáveis. Ambos explicam 82.317 % da variância dos dados. como é visível na **Tabela 4.8**.

Tabela 4.8 – Variância total explicada dos 5 componentes, permitindo assim proceder à escolha dos componentes mais importante, com intuito de fazer a análise e comparação dos resultados.

Componente	Total	% de Variância	% Cumulativa
1	2.974	59.481	59.481
2	1.142	22.835	82.317

A **Tabela 4.9** representa a matriz dos componentes que corresponde à correlação das variáveis com os componentes principais estimados. Verificou-se que a componente 2 aparentemente representa a relação da composição em glúcidos, fenóis totais e em proteínas, no entanto a composição em glúcidos é mais pronunciada, enquanto a componente 1 representa a conjugação de todas as variáveis em estudo, mostrando-se menos influenciado pela composição em glúcidos, como demonstrado na **Figura 4.34**.

Tabela 4.9 – Influência de cada um dos ensaios sobre os componentes.

Ensaio	Componente	
	1	2
Fenóis	0.922	0.175
DPPH	0.923	-0.365
AChE	0.760	-0.363
Proteínas	0.817	0.389
Glúcidos	0.161	0.833

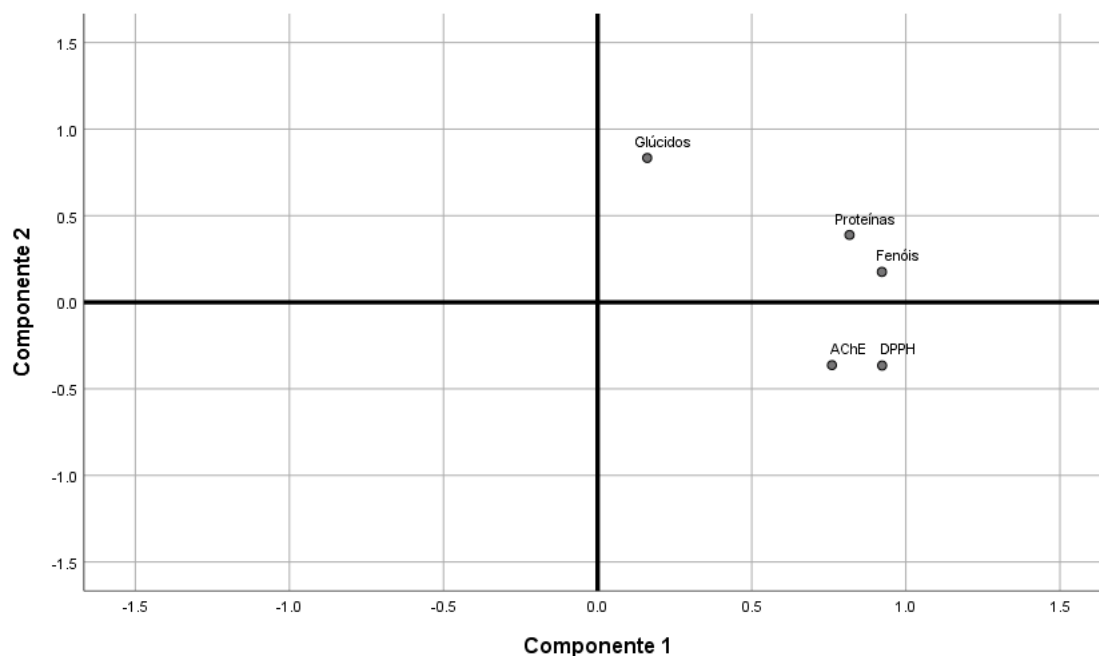


Figura 4.34 – Representação dos componentes e da importância de cada um dos resultados em estudo, fenóis totais (Fenóis), proteínas (Proteínas), hidratos de carbono (Glúcidos), atividade antioxidante (DPPH) e inibição da acetilcolinesterase (AChE).

A partir destes resultados para cada ensaio, pode-se obter então a zona que corresponde cada uma das frações, estando então essa representação feita na **Figura 4.35**.

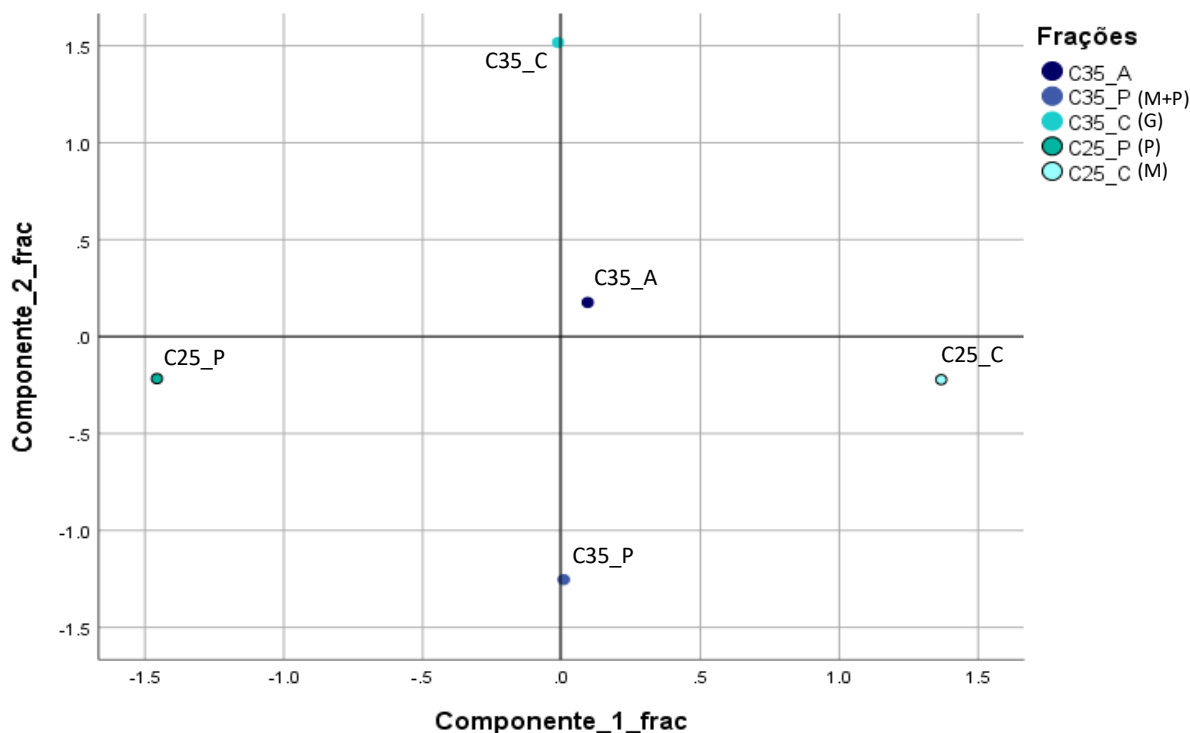


Figura 4.35 – Componentes e determinação da posição das diferentes frações, sendo elas a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), permeado da primeira membrana (C_{35_P}), concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e o concentrado da segunda membrana (C_{25_C}), tendo em conta os ensaios realizados.

A **Figura 4.35**, permite perceber que as frações são todas bastante diferentes umas das outras, o que é expectável uma vez que cada uma delas é composta por componentes de diferentes tamanhos moleculares, mostrando assim que efetivamente o processo de fracionamento foi bem sucedido.

No caso da alimentação da primeira membrana (C_{35_A}) a sua composição e atividades é intermédia em relação a todas as outras frações, sendo então a fração de partida é normal que isto aconteça, tem uma contribuição no componente 1 e 2 praticamente igual, significando que tem composição e atividades muito proporcionais.

Tendo em conta a posição da fração do concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), que segundo o processo das membranas é constituído pelos compostos de maior peso molecular, tem uma contribuição quase nula para o componente 1, o que indica que para a maioria dos ensaios está dentro da média, ao visualizar os resultados em termos das atividades biológicas estão dentro do valor médio das restantes frações, no entanto são mais baixas para esta fração, já para a concentração de proteínas e fenóis totais está mesmo na média, estando por vezes próximo das maiores concentrações nestes compostos. Este facto explica assim a posição relativa deste extrato em relação aos restantes, tendo como maior diferença a quantidade de glúcidos, representada pelo componente 2, que apresenta uma forte contribuição para esta fração.

No caso da fração do permeado da primeira membrana (C_{35_P}), que contém os composto de tamanho medio e pequeno, volta a ter-se uma contribuição quase nula do componente 1, sendo

que neste caso se verifica uma concentração de fenóis e proteínas, na média das frações mas ligeiramente mais baixa, e no caso das atividades biológicas está na média, no entanto é ligeiramente mais elevada. Estes resultados advêm da baixa diferença entra as atividades, no entanto tendo em conta os resultados anteriores para esta fração, apesar da pequena variação, as atividades biológicas são superiores em relação às restantes frações. A variação negativa do componente 2, advém da baixa concentração de glúcidos, pois a grande maioria deste composto é concentrada no concentrado da primeira membrana (C_{35_c}).

A fração do concentrado da segunda membrana (C_{25_c}), que corresponde aos compostos de tamanho médio no processo das membranas, tem a maior contribuição do componente 1 de todos as frações, indicando assim que para a maioria dos ensaios está a cima da média dos resultados obtidos, o que acaba por ser verdade pois a concentração de fenóis totais e proteínas nesta fração é maior em relação às restantes frações, e as atividades biológicas são das mais elevadas, em especial a atividade antioxidante. Já para o componente 2 a fração do concentrado da segunda membrana (C_{25_c}) tem uma contribuição negativa, devido à menor concentração de glúcidos, pois a maioria destes compostos é rejeitado na primeira membrana (C₃₅), o que parece permitir este ganho de atividade.

Para a fração do permeado da segunda membrana (C_{25_p}) que é constituído pelos compostos de baixo peso molecular, tem uma contribuição negativa em ambos os componentes, demonstrando baixas concentrações em fenóis totais, proteínas e glúcidos, e também baixas bioatividades, o que indica que os compostos de baixo peso molecular no extrato não têm uma boa bioatividade em relação aos restantes.

Tendo em conta estes resultados existiam duas possibilidades a escolha da fração do concentrado da segunda membrana (C_{25_c}) ou da fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), sendo que as duas apresentaram maiores bioatividade em relação às restantes frações. Segundo a análise do PCA a fração que demonstrou melhores resultados foi o concentrado da segunda membrana (C_{25_c}), no entanto como estas duas frações anteriormente apresentadas são bastante similares, alterando-se apenas a existência de compostos de menor peso molecular na fração de permeado (C_{35_p}), decidiu-se pela escolha desta para realização de outras análises na tentativa de identificação de mais compostos do extrato da alga *F. vesiculosus*.

4.3.9 Caracterização da fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p})

Foi feita então uma caracterização da fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), a selecionada para as análises subsequentes, reunindo-se todos os resultados desta fração.

Quantificou-se o manitol para fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), a qual foi realizada tendo em conta o procedimento descrito em 3.9. Obteve-se então uma concentração de manitol de 3.16 ± 0.06 g manitol/L solução.

O conteúdo de fenóis totais, proteínas, glúcidos e manitol, da fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), está descrito na **Tabela 4.10**, tendo em conta a quantidade de extrato seco.

Tabela 4.10 – Conteúdo de fenóis totais, proteínas, glúcidos e manitol para a fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), tendo em conta a quantidade de extrato seco.

Ensaio	Concentração (mg/mL)	Concentração de extrato nos ensaios (mg extrato seco/mL)	Concentração pela quantidade de extrato seco (mg/mg extrato seco)
Conteúdo em fenóis totais	0.122 mg FLG/mL	1.000 mg extrato seco/mL	0.122 mg FLG/mg extrato seco
Conteúdo em proteínas	0.0014 mg proteínas/ mL	0.05 mg extrato seco/mL	0.028 mg proteínas/mg extrato seco
Conteúdo em glúcidos	0.119 mg glúcidos/mL	2.000 mg extrato seco/mL	0.0595 mg glúcidos/mg extrato seco
Conteúdo em manitol	3.159 mg manitol/mL	10.00 mg extrato seco/mL	0.316 mg manitol /mg extrato seco

Comparando os resultados da **Tabela 4.10**, com os resultados obtidos para o extrato da decocção **Tabela 4.4**, existem perdas ao nível das concentrações de fenóis totais e glúcidos, quanto à concentração de proteínas e manitol sofrem um aumento. Assim sendo, os compostos fenólicos de maiores dimensões foram removidos, assim como a maioria dos glúcidos. Para o caso das proteínas não seriam de tamanho suficientemente grande para serem rejeitadas pela membrana de maior MWCO (C₃₅), devendo ter na sua maioria um tamanho médio, o manitol é uma molécula de pequenas dimensões que atravessa a membrana de maior MWCO (C₃₅), sendo então concentrados na fração do permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}), devido à remoção de outros compostos.

Quanto às atividades biológicas obteve-se uma atividade antioxidante de 12.87 % para uma concentração de extrato de 0.099 mg extrato seco/mL, e no caso da inibição da AChE foi de 10.37 % para uma concentração de extrato de 1.000 mg extrato seco/mL. Tendo em conta as baixas bioatividades não foi possível estimar a concentração responsável por 50 % de atividade biológica, para comparar estes valores com os do extrato de partida (AD) teve-se em conta as atividades da alimentação da membrana de maior MWCO (C_{35_A}), sendo que tanto para a atividade antioxidante e inibição da AChE, se obteve um ganho de bioatividade para o permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}).

4.4 Citotoxicidade

Para a determinação da citotoxicidade teve-se em conta o procedimento descrito em 3.15, para este ensaio usou-se o extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) e uma fração do purificado o permeado da primeira membrana (C_{35_p}), foram testadas diferentes concentrações, a fim de perceber se os compostos presentes exibem hepatotoxicidade em células Hep-G2, os resultados obtidos estão na **Figura 4.36**.

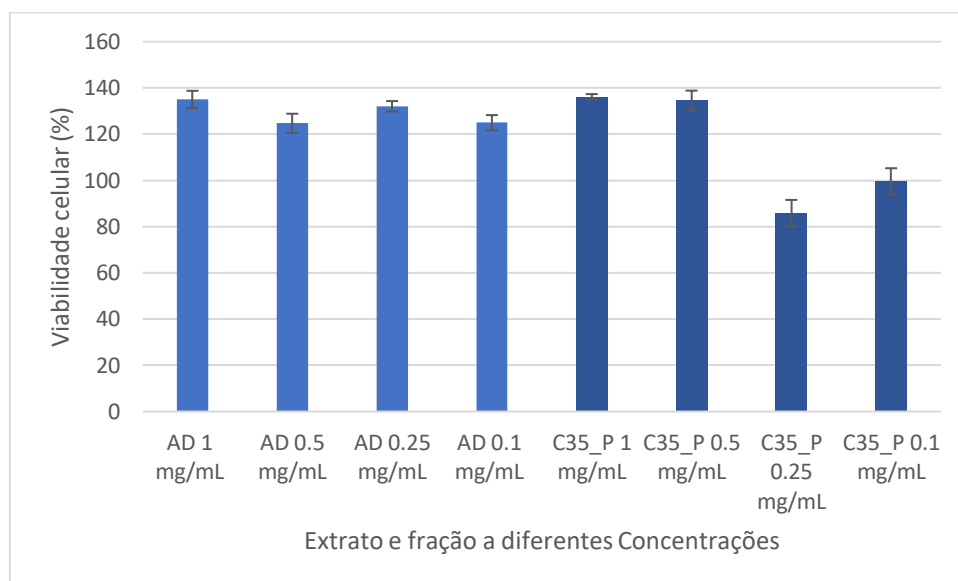


Figura 4.36 – Viabilidade celular das Hep-G2 colocadas em contacto com o extrato da decocção (AD) e com a fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}) a diferentes concentrações.

Na **Figura 4.36** pode ver-se que as células após 24h de contacto com os compostos presentes no extrato da decocção (AD) e na fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), apresentaram crescimento de células.

Para o extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD), os resultados para as diferentes concentrações apresentam-se a acima de 120% de viabilidade, o que indica que as células cresceram na presença do extrato relativamente ao ensaio controlo na ausência de compostos, podendo então dizer-se que a ingestão deste extrato de *F. vesiculosus* não é tóxica para o ser humano.

Quanto à fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), as duas maiores concentrações têm uma viabilidade celular a cima 120%, tal como o extrato anterior, no entanto as concentrações menores têm uma viabilidade ligeiramente abaixo de 100%, que pode indicar que apenas não houve crescimento, uma vez que a concentração da fração é mais baixa e esta tem menos compostos que o extrato da decocção (AD), em especial menor concentração de glúcidos, assim sendo não consegue estimular o crescimento das células, ou seja, os compostos desta fração também não apresentou toxicidade para as células.

4.5 Identificação de compostos da *Fucus vesiculosus* por LC-QTOF-MS

Para a identificação dos compostos por LC-QTOF-MS seguiu-se o procedimento descrito em 3.14, usaram-se então o extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD) e a fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), ambos a uma concentração de 0.5 mg de extrato seco/mL de solução, devido ao facto de se terem sido os melhores resultados em termos das atividades biológicas.

4.5.1 Análise dos cromatogramas

Numa primeira fase é importante comparar as diferenças entre o extrato de partida (AD) e o purificado escolhido (C_{35_p}), perceber se existem diferenças no cromatograma como o aparecimento e desaparecimento de picos, e a partir desse ponto perceber que tipo de compostos são esses.

Os cromatogramas do extrato da decocção (AD) e da fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), estão representados na **Figura 4.37** em modo negativo.

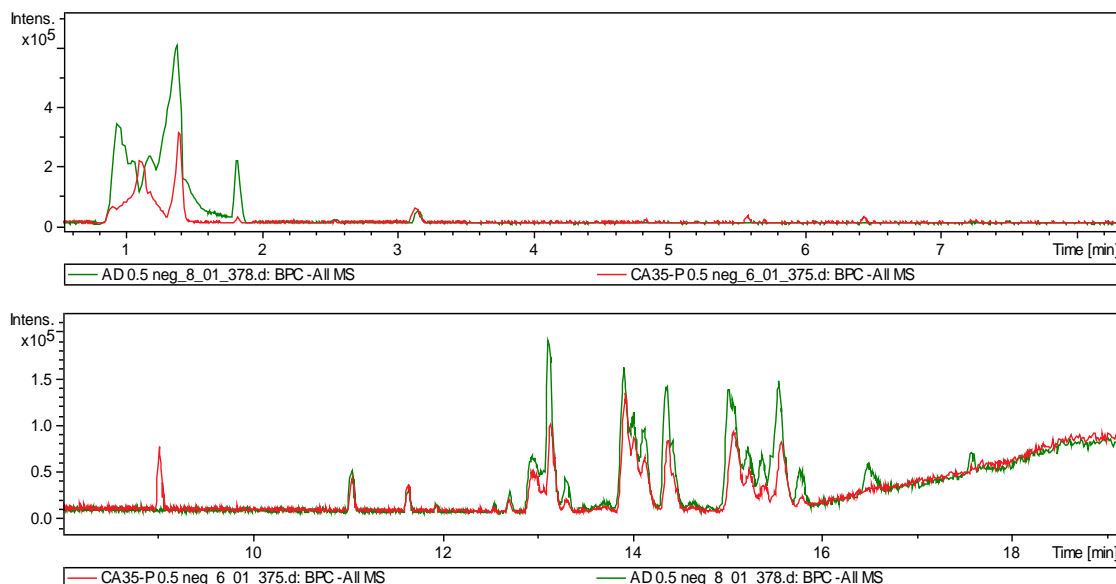


Figura 4.37 – Cromatograma da cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa em modo negativo, para o extrato da decocção (AD) e para a fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), tendo-se dividido o cromatograma em duas partes, a primeira para o tempo de 0.6 a 8.2 minutos e na segunda de 8.0 a 18.5 minutos.

Para o caso dos cromatogramas em modo positivo, o resultado obtido para o extrato da decocção (AD) e fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}) esta apresentado **Figura 4.38**.

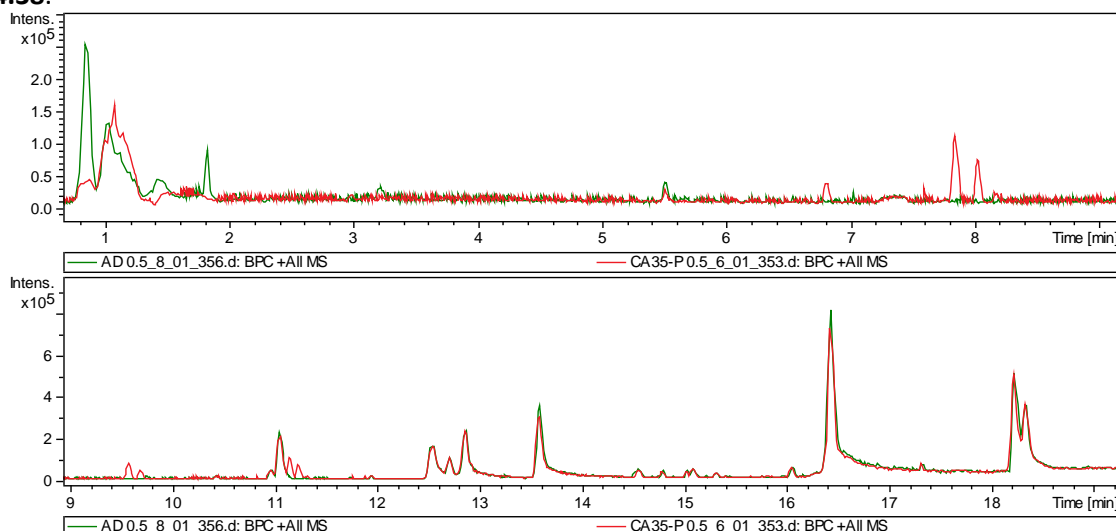


Figura 4.38 – Cromatograma da cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa em modo positivo, para o extrato da decocção (AD) e para a fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), tendo-se dividido o cromatograma em duas partes, a primeira para o tempo de 0.8 a 9.0 minutos e a segunda para o tempo de 9.0 a 19.2 minutos.

Depois de perceber quais as diferenças e principais picos do cromatograma, seguiu-se a comparação das massas de cada um dos picos, sendo registadas as massas (m/z) e respetivas intensidades, tendo como objetivo comparar a perdas de compostos, e possíveis perdas ou ganhos de intensidade entre o extrato de partida (AD) e o purificado (C_{35_p}).

Nas **Tabela 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14** têm-se a comparação das diferentes massas e respetivas intensidades em modo negativo de cada um dos extratos em estudo, foi ainda adicionado um indicador de cor para permitir uma mais fácil visualização das diferenças de intensidade.

Tabela 4.11 – Massas de 100.0000 a 199.9999 m/z, para os espectros de massa em modo negativo do extrato de partida (AD) e purificado (C_{35_p}), tendo em conta as respetivas intensidades.

	AD	C _{35_p}
Massa (m/z)	Intensidade	Intensidade
115.9209	5920	0
126.9051	2124	6291
128.0354	28570	0
129.0194	1015	0
130.9986	1172	0
133.0146	1224	0
144.9236	1787	0
146.046	1408	0
146.9385	0	1128
155.0021	2813	7470
157.0119	1259	0
163.0615	0	3118
164.9472	6024	1176
165.0406	1667	0
169.9890	0	4614
170.8333	0	1146
173.009	11352	0
181.0716	29037	93211
184.0460	0	1563
185.0455	3083	2977
186.9291	1032	0
191.0197	175263	0
194.9275	67965	37094

Analisando estes resultados é visível que no purificado (C_{35_p}) houve a perda de vários compostos, ou uma diminuição da sua intensidade, mas aumento da intensidade de alguns já existentes e o aparecimento de novos que na realidade já se encontravam no extrato, mas que possivelmente devido à sua baixa concentração não eram detetados. E ao purificar ocorre uma perda de compostos e a concentração de outros o que provoca estes resultados que também são visíveis para as seguintes massas.

As massas com aumento de intensidade significativo no purificado (C_{35_p}) foram: 126.9053; 155.0022; 163.0615; 169.9890 e 181.0719 m/z.

Na **Tabela 4.12** tem-se a comparação das massas na casa dos 200.000 m/z, para o extrato de partida e para o purificado.

Tabela 4.12 – Massas de 200.0000 a 299.9999 m/z, para os espectros de massa em modo negativo do extrato de partida (AD) e purificado (C_{35_p}), tendo em conta as respetivas intensidades.

Massa (m/z)	AD	C _{35_p}
	Intensidade	Intensidade
213.0068	0	1052
216.9094	7606	5584
217.0484	34576	63736
219.0454	12812	24108
223.0822	6150	23461
223.1338	5451	4362
227.0772	4974	19335
228.994	2249	2493
230.9882	1678	8511
232.8829	4179	0
236.1054	1504	1685
238.8907	4566	0
239.0669	1882	1867
239.0775	0	1791
243.0179	0	2537
243.0622	1629	0
250.037	0	1178
254.863	2638	0
256.0939	2637	0
257.0489	0	23436
259.0218	0	1190
260.8731	1909	0
262.9022	1454	0
265.1476	136919	73371
269.0869	2608	9327
271.104	0	1268
274.9725	1079	0
277.0925	35220	41772
276.8474	1777	0
279.031	0	1421
279.0394	18298	6037
280.0169	1012	0
288.987	10985	0
293.1756	25807	27175
295.0617	0	1385
297.1524	57434	41139
299.0748	3625	3887

Neste caso aconteceu o mesmo que anteriormente já foi dito devido a purificação e o ganho de intensidade no purificado (C_{35_p}) foi mais significativo para as massas: 217.0485; 219.0456; 223.0825; 227.0773; 230.9897; 257.0489; 269.0879 e 277.093 m/z.

Para as massas dentro de 300 m/z foi feita a mesma comparação entre a o extrato de partida (AD) e o purificado (C_{35_p}), estando esta apresentada na **Tabela 4.13**.

Tabela 4.13 – Massas de 300.0000 a 399.9999 m/z, para os espectros de massa em modo negativo do extrato de partida (AD) e purificado (C_{35_P}), tendo em conta as respetivas intensidades.

	AD	C _{35_P}
Massa (m/z)	Intensidade	Intensidade
300.8631	1368	0
302.0002	0	1231
304.0651	0	46060
309.1738	1694	1540
310.9687	3272	0
311.1684	109401	88460
312.9461	1604	0
314.875	2876	2277
317.0547	20631	7532
325.1841	92705	69489
328.2133	1385	0
330.8435	4054	4338
333.135	5222	2975
336.8585	1266	1286
339.1998	4239	3687
340.9862	0	1171
346.0557	3502	0
352.8305	2786	1312
353.2001	65290	35374
358.8387	1979	0
361.0451	1628	1704
361.1661	3901	2544
362.0509	1077	0
364.128	1458	10200
365.14	2305	1592
369.1279	0	1511
370.1367	1803	0
372.053	0	2089
374.8111	3047	0
375.0598	1797	2106
377.161	2888	2138
377.2578	3369	2132
379.156	3004	2263
384.1524	5336	0
387.2861	38732	27863
389.0756	0	1233
390.7838	1650	0
393.1714	3140	2483
395.1047	1753	0
396.7923	1721	0
397.0409	1449	1451
397.2262	18717	5898

Para estas massas é notório maiores perdas que ganhos em intensidade e compostos, o que acaba por ser normal visto que a membrana tem capacidade de permear apenas moléculas mais pequenas, sendo expectável que as maiores massas moleculares se percam ou diminuam a sua intensidade. No entanto, ainda houve alguns compostos que apareceram no purificado (C_{35_P})

ou aumentaram a sua intensidade, sendo as suas massas: 302.0002; 304.0651; 330.8444; 340.9862; 364.1287; 369.1279; 372.0530; 375.0613 e 389.0756 m/z.

Para as restantes massas encontradas nos cromatogramas do extrato de partida (AD) e purificado (C35_P), a comparação das intensidades está apresentada na **Tabela 4.14**.

Tabela 4.14 - Massas de 400.0000 a 699.9999 m/z, para os espectros de massa em modo negativo do extrato de partida (AD) e purificado (C_{35_P}), tendo em conta as respetivas intensidades.

	AD	C _{35_P}
Massa (m/z)	Intensidade	Intensidade
405.0286	9869	0
405.2895	1418	1379
407.1867	1766	0
412.7647	1093	1692
415.0228	1486	0
415.3174	19744	15948
420.9967	2018	0
421.1876	2080	1377
424.9020	1390	0
428.8145	1042	0
434.0229	0	1064
436.9419	2000	0
439.0767	1141	0
439.2482	2596	1650
441.0922	4734	0
441.1260	1131	1057
441.2522	20498	6538
450.7961	0	1203
455.2737	1486	1001
467.2793	1304	0
472.7786	1255	0
482.1191	1036	0
483.0996	2800	2174
484.9680	0	1134
485.2820	2071	0
488.7534	1008	0
494.7611	1666	0
510.7332	1593	0
516.7407	1163	0
532.7123	1248	0
538.0816	1994	0
544.9648	3589	0
551.1823	2481	0
576.1782	2329	0
594.9613	1745	1706
611.1436	1167	0
613.0210	1374	0
665.1793	0	1289
694.9558	2074	2375
697.2024	2444	0

Para as massas moleculares ainda maiores volta a verificar-se mais perdas no purificado (C_{35_P}) do que ganhos, sendo expectável devido ao processo de purificação. Mas mesmo assim

ainda houve ganhos de intensidade por parte de algumas massas e aparecimento de novas, sendo elas: 412.1344; 434.0229; 450.7961; 484.9680; 665.1793 e 694.9560 m/z.

Tendo em conta os resultados das **Tabela 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13**, é visível que a maior perda de compostos aconteceu para os compostos entre 100-199 m/z e 400-699 m/z, indicando então uma efetiva perda dos compostos de maior peso molecular, mas também alguns de baixo peso molecular, que provavelmente foram complexados com os compostos de maiores massas moleculares.

Para o caso do cromatograma em modo positivo os seus resultados estão apresentados no **Anexo 18, Anexo 19, Anexo 20 e Anexo 21**, volta a estar visível as diferentes intensidades e o indicador de cor, neste caso existem muitas massas e algumas com dupla carga, o que complica a identificação dos compostos.

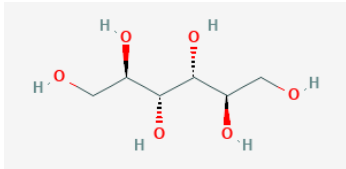
4.5.2 Identificação de compostos

A identificação dos compostos teve em conta as diferenças encontradas anteriormente no purificado (C_{35_p}), visto que este exibiu superior atividade biológica, assim sendo pretende-se tentar identificar os compostos que apareceram neste cromatograma ou que aumentaram a sua intensidade, para entender quais contribuem para este ganho de atividade.

Devido ao facto do estudo das algas ser recente, existe pouca informação sobre a maioria dos compostos químicos existentes na *F. vesiculosus*, havendo um foco maior na identificação dos polifenóis, no entanto muitos têm estruturas desconhecidas e como são constituídos por unidades de floroglucinol estas são muito variáveis, por este motivo a identificação dos mesmos vai ser feita tendo por base a existência de fragmentos próximos de 121, 123, 125, 139, 140, 244, 245, 247, 261, 263, 265 e 267 m/z [130], o que prova que são realmente derivados de floroglucinol, ou seja polifenóis, não sendo possível determinar a estrutura ao certo devido ao seu elevado grau de variância.

Assim sendo foi feita a identificação dos compostos que é apresentada na **Tabela 4.15**, sendo usadas como referências o já descrito anteriormente, as sugestões do programa *DataAnalysis* e bases de dados de espectros de massa.

Tabela 4.15 – Identificação dos compostos com intensidade diferente do purificado (C_{35_p}) em modo negativo.

Massa [M-H] ⁻ m/z	Fragmentos MS ² [m/z, (intensidade %)]	Compostos propostos	Referência
217.0487	59.0132 (7.6); 101.0249 (8.15); 182.0484 (42.7).	Derivado de D-Manitol	M/Z CLOUD Database[131] Padrão
399.1280	181.0720 (25.5); 217.0484 (100).	Derivado de D-Manitol	M/Z CLOUD Database[131]
181.0719	55.0202 (7.0); 59.0147 (44.2) ; 71.0142 (31.0) ; 73.0299 (6.6); 79.9575 (100); 80.9650 (9.3); 101.0232 (7.2) ; 136.9926 (4.9)	D-Manitol (2R,3R,4R,5R)-hexane- 1,2,3,4,5,6-hexol 	<i>DataAnalysis</i> Padrão M/Z CLOUD Database[131]
227.0775	44.9995 (30.1); 55.0197 (6.6); 59.0146 (100) ; 71.0141 (74.8) ; 73.0298 (13.6) ; 83.0139 (10.5) ; 85.0291 (16.5) ; 89.0245 (59.4) ; 97.0296 (5.3) ; 101.0248 (83.2) ; 113.0248 (6.5) ; 119.0354 (12.6) ; 131.0362 (5.9) ; 163.0611 (17.2) ; 181.0719 (54.2)	D-Manitol ligado a Ácido Fórmico	M/Z CLOUD Database[131] Padrão
302.0000	59.0141 (8.6); 101.0265 (4.4)	Derivado de D-Manitol	M/Z CLOUD Database[131]
364,1291	59.015 (0.8); 71.0147 (0.8); 89.0259 (0.6); 101.0243 (0.8); 181.0721 (7.0); 182.0495 (100)	Derivado de D-Manitol	M/Z CLOUD Database[131] Padrão
665.1777	89.0249 (2.7); 101.0233 (6.2); 181.0716 (23.1);301.0209 (100)	Derivado do Manitol	M/Z CLOUD Database[131] Padrão
219,0457	59.0145 (64.2); 71.0142 (37.5); 101.0241 (79.1); 181.0718 (62.8); 182.0488 (100); 182.0778 (15.0)	Derivado do D-Manitol	M/Z CLOUD Database[131]
230.9898	123.0091 (17.8); 139.0033 (13,7); 140.0121 (24.4)	Derivado do Floroglucinol	Fragmentos derivados de Floroglucinol[130]
375.0608	122.9427 (1.4); 138.9320 (1.4)	Derivado do Floroglucinol	Fragmentos derivados de Floroglucinol[130]
277.0930	123.0437 (0.7); 141.0571 (10.9)	Derivado do Floroglucinol	Fragmentos derivados de Floroglucinol[130]
372.0535	123.0559 (0.8); 139.1135 (3.9)	Derivado do Floroglucinol	Fragmentos derivados de Floroglucinol[130]
434.0226	122.9397 (8.9); 140.3702 (1.3); 304.0661 (100)	Derivado do Floroglucinol	Fragmentos derivados de Floroglucinol[130]
694.9539	120.9366 (4.9); 121.9472 (5.4), 245.8397 (3.8); 266.9738 (5.8)	Derivado do Floroglucinol	Fragmentos derivados de Floroglucinol[130]

É visível a existência de D-Manitol e de muitos dos seus derivados, que são moléculas de manitol que polimerizaram ou que se ligam a outras moléculas, no entanto sabe-se que o manitol não tem efeito nas atividade biológica, pelos resultados apresentados anteriormente

onde apresentou bioatividades nulas, o que indica que o ganho de atividade não se deve a estes compostos.

Por outro lado, existe também vários compostos derivados do floroglucinol, ou seja, florotaninos, estes têm sido associados às atividades biológicas em estudo, conseguindo ver-se anteriormente que o floroglucinol apresentou bioatividades, podendo-se então dizer que o aumento da concentração destes compostos pode estar associado ao aumento da atividade biológica do purificado (C_{35_p}) em relação ao extrato inicial (AD).

Existiram alguns compostos que não foi possível identificar, porque não fragmentavam, ou porque não havia sugestão de possíveis compostos, outros apresentaram sugestão, no entanto usou-se outra base de dados o MetLin Database para tentar ver a concordância entre os resultados do DataAnalysis e não havia concordância ou apresentava erros demasiado elevados.

5 Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho analisaram-se extratos da alga *Fucus vesiculosus*, com o objetivo de aproveitar um recurso marinho tão abundante, que é reconhecido como tendo compostos bioativos na sua constituição, onde era pretendido avaliar a ação biológica da alga para com doenças cardiovasculares, em especial a hipercolesterolemia.

A extração com água mostrou-se mais eficiente na extração de compostos bioativos da alga *F. vesiculosus*, em especial o extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD), que apesar de não ser o extrato com maior quantidade de fenóis, foi o que obteve melhores bioatividades. Este método de extração é simples, o que facilita uma implementação a nível industrial, faz uso de água, o que o torna numa tecnologia limpa, e demonstrou um poder de extração de fenóis idêntico aos métodos que fazem uso de solventes orgânicos.

O extrato da decocção a uma pressão de 2 bar (AD), obteve uma concentração responsável por 50% de atividade antioxidante foi de 0.447 mg extrato/mL solução, já a concentração inibitória 50% da atividade da AChE foi de 8.226 mg extrato/mL solução e da HMGR 1.590 mg extrato/mL solução, o que indica que o extrato demonstrou atividade antioxidante e potencial aplicação em doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, não demonstrando citotoxicidade. O estudo da aplicação dos extratos de *F. vesiculosus*, neste tipo de doenças é muito reduzido não existindo estudos que possibilitem uma comparação, o que indica que se trata de uma nova área de estudo das bioatividades da alga.

Para o enriquecimento do extrato da decocção (AD) em compostos bioativos, usou-se a tecnologia de membranas, uma tecnologia limpa, onde se desenvolveu um esquema de diafiltração, onde foram usadas duas membranas uma de maior MWCO C₃₅ (51.4 kDa) e outra de menor MWCO C₂₅ (10.8 kDa), e obtiveram-se diferentes frações com compostos de diferentes tamanhos moleculares, tendo em conta a rejeição aparente a maioria dos taninos e fenóis foi rejeitado pela membrana de menor MWCO (C₂₅), o que indica que são na sua maioria compostos de tamanho “médio”. Já tendo em conta as quantificações feitas para as diferentes frações é notório que a maioria dos hidratos de carbono é rejeitado pela membrana de maior MWCO (C₃₅), querendo dizer que estes compostos têm maior massa molecular, segundo o processo de fracionamento das membranas.

Foram então estudadas cada uma das frações e conclui-se que o permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}), que contém compostos médios e pequenos, e o concentrado da membrana de menor MWCO (C_{25_c}), que é constituído pelos compostos médios, mostraram melhores atividades, pois apresentam um ganho de atividade antioxidante e de inibição da AChE, em relação ao extrato de partida, representado no esquema de permeação pela alimentação da membrana de maior MWCO (C_{35_A}). No entanto optou-se por aprofundar o estudo da fração do permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}), e esta apresentou uma diminuição significativa da concentração de glúcidos, o que a enriqueceu em compostos bioativos, elevando assim o potencial biológico do extrato, sendo importante referir que os compostos desta fração não demonstraram citotoxicidade.

O fracionamento do extrato da decocção (AD), demonstra que efetivamente a quantidade em fenóis parece estar relacionada com as boas atividades biológicas da *F. vesiculosus*, no entanto também foi possível perceber que nem todos os compostos fenólicos possuem a mesma bioatividade. Através da identificação dos compostos que foram concentrados na fração do

permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}), da alga *F. vesiculosus*, conseguiu-se perceber que o aumento da bioatividade foi causado pelos derivados de floroglucinol, uma vez que o manitol não é bioativo, para as atividades em estudo.

Futuramente, é importante aprofundar os estudos sobre as algas, uma vez que são um recurso tão abundante e com potenciais biológicos promissores, podendo ser consumidas na alimentação, ou usar os seus compostos bioativos como alimentos funcionais para benefício da saúde.

Podendo aprofundar-se o estudo da alga *F. vesiculosus*, preparando diferentes extratos aquosos, usando diferentes temperaturas e tempos de extração, uma vez que o controlo da digestão completa (ACC), feito apenas com água, obteve resultados de bioatividades elevados, o que pode indicar que temperaturas mais baixas podem funcionar, na obtenção de compostos bioativos. Seria importante estudar a inibição da HMGR para o permeado da membrana de maior MWCO (C_{35_p}), assim como aprofundar o estudo da fração do concentrado da membrana de menor MWCO (C_{25_c}), que acabou por se revelar também numa das mais promissoras em termos da recuperação dos compostos bioativos.

Referências Bibliográficas

- [1] E. Vieira *et al.*, "Seaweeds from the Portuguese coast as a source of proteinaceous material: Total and free amino acid composition profile," *Food Chem.*, vol. 269, pp. 264–275, 2018.
- [2] L. Wang, Y. Park, Y. Jeon, and B. Ryu, "Bioactivities of the edible brown seaweed, *Undaria pinnatifida*: A review," *Aquaculture*, vol. 495, pp. 873–880, 2018.
- [3] Y. Roeck-Holtzauer, I. Quere, and C. Claire, "Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga," *J. Appl. Phycol.*, vol. 3, pp. 259–264, 1991.
- [4] G. El-Said and A. El-Sikaily, "Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 185, pp. 6089–6099, 2013.
- [5] R. Patarra, L. Paiva, A. Neto, E. Lima, and J. Baptista, "Nutritional value of selected macroalgae," *J. Appl. Phycol.*, vol. 23, pp. 205–208, 2011.
- [6] R. Agregán, P. Muneke, D. Franco, R. Dominguez, J. Carballo, and J. Lorenzo, "Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD – ESI-MS / MS," *Food Res. Int. J.*, vol. 99, pp. 979–985, 2017.
- [7] V. Gressler *et al.*, "Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species," *Food Chem.*, vol. 120, pp. 585–590, 2010.
- [8] G. Patterson, "The Distribution of Sterols in Algae," *Lipids*, vol. 6, pp. 120–127, 1971.
- [9] K. Güven, A. Percot, and E. Sezik, "Alkaloids in Marine Algae," *Mar. Drugs*, vol. 8, pp. 269–284, 2010.
- [10] C. Sava and R. Sîrbu, "Analytical study of the determination of flavonoids in Black Sea algae," *Ovidius Univ. Ann. Chem.*, vol. 21, pp. 29–34, 2010.
- [11] R. Matsukawa *et al.*, "A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds," *J. Appl. Phycol.*, vol. 9, pp. 29–35, 1997.
- [12] H. Noda, H. Amano, K. Arashima, and K. Nisizawa, "Antitumor activity of marine algae," *Hydrobiologia*, vol. 204, pp. 577–584, 1990.
- [13] S.-H. Eom, Y.-M. Kim, and S.-K. Kim, "Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 9, pp. 3251–3255, 2012.
- [14] H. A. Jung, S. E. Jin, B. R. Ahn, C. M. Lee, and J. S. Choi, "Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 59, pp. 199–206, 2013.
- [15] M. Kang *et al.*, "Dieckol isolated from brown seaweed *Ecklonia cava* attenuates type II diabetes in db/db mouse model," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 53, pp. 294–298, 2013.
- [16] J. Houser, M. Venable, Y. Sakamachi, M. Hamburger, J. Herrin, and S. Tuberty, "Wastewater Remediation Using Algae Grown on a Substrate for Biomass and Biofuel Production," *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif.)*, vol. 5, pp. 895–904, 2014.
- [17] M. Centella, A. Arévalo-Gallegos, R. Parra-saldivar, and H. Iqbal, "Marine-derived bioactive compounds for value-added applications in bio-and non-bio sectors," *J. Clean. Prod.*, vol. 168, pp. 1559–1565, 2017.
- [18] J. Cock, A. Peters, and S. Coelho, "Quick guide - Brown algae," *Current Biology*, vol. 21, no. 15. Elsevier, pp. 573–575, 2011.

- [19] Y.-X. Li, I. Wijesekara, Y. Li, and S.-K. Kim, "Phlorotannins as bioactive agents from brown algae," *Process Biochem.*, vol. 46, pp. 2219–2224, 2011.
- [20] J. Venkatesan, K. Keekan, S. Anil, I. Bhatnagar, and S.-K. Kim, "Phlorotannins," *Encycl. Food Chem.*, pp. 515–527, 2019.
- [21] C. Hoek, D. Mann, and H. Jahns, *Algae: An Introduction to Phycology*, 1^a. Cambridge Press, 1995.
- [22] M. Catarino, A. Silva, and S. Cardoso, "Phytochemical Constituents and Biological Activities of *Fucus* spp.," *Mar. Drugs*, vol. 16, 2018.
- [23] E. Tarakhovskaya, V. Lemesheva, T. Bilova, and C. Birkemeyer, "Early Embryogenesis of Brown Alga *Fucus vesiculosus* L. is Characterized by Significant Changes in Carbon and Energy Metabolism," *Molecules*, 2017.
- [24] "AlgaeBase." [Online]. Available: https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=87. [Accessed: 17-Dec-2019].
- [25] J. Lorenzo *et al.*, "Proximate Composition and Nutritional Value of Three Macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*," *Mar. Drugs*, vol. 15, pp. 1–11, 2017.
- [26] A. Jones and J. Harwood, "Lipid Composition of the brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*," vol. 31, pp. 3397–3403, 1992.
- [27] P. Rupérez, "Mineral content of edible marine seaweeds," *Food Chem.*, vol. 79, pp. 23–26, 2002.
- [28] R. Rodriguez-Jasso, S. Mussatto, L. Pastrana, C. Aguilar, and J. Teixeira, "Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes," *Chem. Pap.*, 2013.
- [29] S. Kraan, *Pigments and minor compounds in algae*. Woodhead Publishing Limited, 2014.
- [30] D. Hermund *et al.*, "Structure dependent antioxidant capacity of phlorotannins from Icelandic *Fucus vesiculosus* by UHPLC-DAD-ECD-QTOFMS," *Food Chem.*, vol. 240, pp. 904–909, 2018.
- [31] A. Bakrudeen, A. Ahmed, M. Adel, P. Karimi, and M. Peidayesh, "Marine Carbohydrates: Fundamentals and Applications, Part B," 1st ed., vol. 73, Elsevier Inc., 2014, pp. 197–220.
- [32] R. Reed, I. Davison, J. Chudek, and R. Foster, "The osmotic role of mannitol in the Phaeophyta: an appraisal," *Phycologia*, vol. 24, pp. 35–47, 1985.
- [33] G. Leppard, "The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems," *Sci. Total Environ.*, vol. 165, pp. 103–131, 1995.
- [34] P. Taylor, S. Ahmady-Asbchin, Y. Andres, C. Gerente, and P. Cloirec, "Natural seaweed waste as sorbent for heavy metal removal from solution," *Environ. Technol.*, vol. 30, pp. 755–762, 2009.
- [35] K. Balina, F. Romagnoli, and D. Blumberga, "Chemical composition and potential use of *Fucus vesiculosus* from Gulf of Rija," *Energy Procedia*, vol. 95, pp. 43–49, 2016.
- [36] M. Shanmugam and K. Mody, "Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents," *Curr. Sci.*, vol. 79, pp. 1672–1683, 2000.

- [37] Y. S. Khotimchenko, "Antitumor Properties of Nonstarch Polysaccharides : Fucoïdans and Chitosans," *Russ. J. Mar. Biol.*, vol. 36, pp. 321–330, 2010.
- [38] A. Béress, O. Wassermann, T. Bruhn, and L. Béress, "A New Procedure for the Isolation of Anti-HIV Compounds (Polysaccharides and Polyphenols) from the Marine Alga *Fucus vesiculosus*," *J. Natural Prod.*, vol. 56, pp. 478–488, 1993.
- [39] M.-H. Kim and H.-G. Joo, "Immunostimulatory effects of fucoïdan on bone marrow-derived dendritic cells," *Immunol. Lett.*, vol. 115, pp. 138–143, 2008.
- [40] W. Wijesinghe and Y.-J. Jeon, "Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoïdans isolated from brown seaweeds: A review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, pp. 13–20, 2012.
- [41] J. Peng, J.-P. Yuan, C.-F. Wu, and J.-H. Wang, "Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health," *Mar. Drugs*, vol. 9, pp. 1806–1828, 2011.
- [42] M. Zaragozá *et al.*, "Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus vesiculosus* Extracts," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, pp. 7773–7780, 2008.
- [43] T. Wang *et al.*, "Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus vesiculosus*," *Agric. Food Chem.*, vol. 60, pp. 5874–5883, 2012.
- [44] D. A. Kirke, T. J. Smyth, D. K. Rai, O. Kenny, and D. B. Stengel, "The chemical and antioxidant stability of isolated low molecular weight phlorotannins," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1104–1112, 2016.
- [45] G. Lopes *et al.*, "Profiling phlorotannins from *Fucus* spp . of the Northern Portuguese coastline: Chemical approach by HPLC-DAD-ESI/MSn and UPLC-ESI-QTOF/MS," *Algal Res.*, vol. 29, pp. 113–120, 2018.
- [46] R. Mehrotra and A. Aggarwal, *Plant Pathology*, 2^a. India: McGraw-Hill, 2003.
- [47] Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Editio. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2009.
- [48] M. Paradis, P. Couture, and B. Lamarche, "A randomised crossover placebo-controlled trial investigating the effect of brown seaweed (*Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*) on postchallenge plasma glucose and insulin levels in men and women," *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, vol. 36, pp. 913–919, 2011.
- [49] B. Bahar, J. V. O. Doherty, T. J. Smyth, A. M. Ahmed, and T. Sweeney, "A cold water extract of *Fucus vesiculosus* inhibits lipopolysaccharide (LPS) induced pro-inflammatory responses in the porcine colon ex-vivo model," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 37B, pp. 229–236, 2016.
- [50] M. Zenthoefer *et al.*, "Isolation of polyphenols with anticancer activity from the Baltic Sea brown seaweed *Fucus vesiculosus* using bioassay-guided fractionation," *J. Appl. Physiol.*, vol. 29, pp. 2021–2037, 2017.
- [51] G. Lopes, E. Pinto, P. Andrade, and P. Valentão, "Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts : Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor," *PLoS One*, vol. 8, 2013.
- [52] G. Lopes *et al.*, "Can Phlorotannins Purified Extracts Constitute a Novel Pharmacological Alternative for Microbial Infections with Associated Inflammatory Conditions ?," *PLoS One*, vol. 7, 2012.

- [53] L. Paiva, E. Lima, A. I. Neto, and J. Baptista, "Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Fucus spiralis* macroalgae and influence of the extracts storage temperature—A short report," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 131, pp. 503–507, 2016.
- [54] V. Franco, L. Araujo-Bazán, I. Rodríguez-Martín, and S. González, "In vivo UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, pp. 1109–1117, 2012.
- [55] A. Pisoschi and A. Pop, "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 97, pp. 55–74, 2015.
- [56] J. Betteridge, "What Is Oxidative Stress?," *Metabolism*, vol. 49, pp. 3–8, 2000.
- [57] A. Phaniendra, D. Jestadi, and L. Periyasamy, "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases," *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 30, pp. 11–26, 2015.
- [58] L. Pham-Huy, H. He, and C. Pham-Huy, "Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health," *Int. J. Biomed. Sci.*, vol. 4, pp. 89–96, 2008.
- [59] X. Pan, Y. Zhu, N. Lin, J. Zhang, Q. Ye, and H. Huang, "Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's d," *Mol. Neurodegener.*, vol. 6, pp. 1–17, 2011.
- [60] E. Sevcsik, A. Trexler, J. Dunn, and E. Rhoades, "Allostery in a Disordered Protein: Oxidative Modifications to τ -Synuclein Act Distally To Regulate Membrane Binding," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, pp. 7152–7158, 2011.
- [61] J. Witherick, A. Wilkins, N. Scolding, and K. Kemp, "Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and a Cell Therapy Approach to Treatment," *Autoimmune Dis.*, vol. 2011, pp. 1–11, 2010.
- [62] D. Beebe, M. Holekamp, and Y.-B. Shui, "Oxidative Damage and the Prevention of Age-Related Cataracts," *Ophthalmic Res.*, vol. 44, pp. 155–165, 2010.
- [63] P. Vasanthi, G. Nalini, and G. Rajasekhar, "Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis," *Int. J. Rheum. Dis.*, vol. 12, pp. 29–33, 2009.
- [64] M. Bachem *et al.*, "Depending on Their Concentration Oxidized Low Density Lipoproteins Stimulate Extracellular Matrix Synthesis or Induce Apoptosis in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 37, pp. 319–326, 1999.
- [65] N. S. Dhalla, R. M. Temsah, and T. Netticadan, "Role of oxidative stress in cardiovascular diseases," *J. Hypertens.*, vol. 18, pp. 655–673, 2000.
- [66] L. Oberley, "Free radicals and diabetes," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 5, pp. 113–124, 1988.
- [67] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, J. Christopher, and J. Telser, "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 266, pp. 37–56, 2004.
- [68] F. M. F. Roleira *et al.*, "Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties," *Food Chem.*, vol. 183, pp. 235–258, 2015.
- [69] A. Abushita, E. Hebshi, H. Daood, and P. Biacs, "Determination of antioxidant vitamins in tomatoes," *Food Chem.*, vol. 60, pp. 207–212, 1997.
- [70] R. Sharma, "Practice and Mechanisms of Benefits," in *Polyphenols in Human Health and*

- Disease*, Elsevier Inc., 2014, pp. 757–778.
- [71] R. Kandimalla and P. H. Reddy, “Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer’s Disease,” *J. Alzheimer’s Dis.*, vol. 57, pp. 1049–1069, 2017.
- [72] M. Holden and C. Kelly, “Use of cholinesterase inhibitors in dementia,” vol. 8, pp. 89–96, 2002.
- [73] V. Talesa, “Acetylcholinesterase in Alzheimer’s disease,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 122, pp. 1961–1969, 2001.
- [74] NCBI, “Crystal Structure Of Human Acetylcholinesterase.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?dps=0&uid=4PQE>. [Accessed: 21-Dec-2019].
- [75] L. Roseiro, A. Rauter, and M. L. Serralheiro, “Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease,” *Nutr. Aging*, vol. 1, pp. 99–111, 2012.
- [76] C. Dea, S. Brookes, and D. Wattchow, “The efficacy of treatment of patients with severe constipation or recurrent pseudo-obstruction with pyridostigmine,” *Color. Dis.*, vol. 12, pp. 540–548, 2010.
- [77] A. Bharucha *et al.*, “A randomised controlled study of the effect of cholinesterase inhibition on colon function in patients with diabetes mellitus and constipation,” *Neurogastroenterology*, vol. 62, pp. 708–715, 2013.
- [78] M. Jung and M. Park, “Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*,” *Molecules*, vol. 12, pp. 2130–2139, 2007.
- [79] E. Akkol, I. Orhan, and E. Yesilada, “Anticholinesterase and antioxidant effects of the ethanol extract, ethanol fractions and isolated flavonoids from *Cistus laurifolius* L. leaves,” *Food Chem.*, vol. 131, pp. 626–631, 2012.
- [80] Y. Zhou, W. Li, L. Xu, and L. Chen, “In *Salvia miltiorrhiza*, phenolic acids possess protective properties against amyloid beta-induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 31, pp. 443–452, 2011.
- [81] A. Ademosun, G. Oboh, F. Bello, and P. Ayeni, “Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities,” *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.*, vol. 21, pp. 11–17, 2015.
- [82] R. Kannan, M. Aderogba, A. Ndhlala, W. Stirk, and J. Van Staden, “Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss,” *Food Res. Int.*, vol. 54, pp. 1250–1254, 2013.
- [83] S.-H. Lin, K.-J. Huang, C. Weng, and D. Shiuau, “Exploration of natural product ingredients as inhibitors of human HMG-CoA reductase through structure-based virtual screening,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 9, pp. 3313–3324, 2015.
- [84] D. Arnold and P. Kwiterovich Jr, “Absorption, Function, and Metabolism,” in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2^a, Academic Press, Ed. 2003, pp. 1226–1237.
- [85] R. Costa *et al.*, “Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, pp. 1389–1398, 2012.

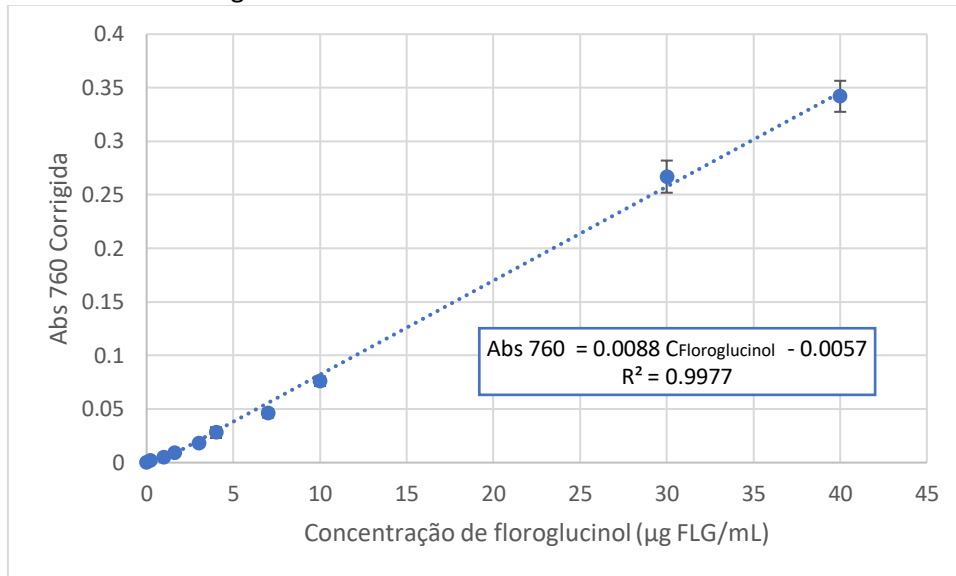
- [86] M. Heek, D. Compton, and H. Davis, "The cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases diet-induced hypercholesterolemia in monkeys," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 415, pp. 79–84, 2001.
- [87] T. Horwich and W. Maclellan, "Atorvastatin and statins in the treatment of heart failure," *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 8, pp. 3061–3068, 2007.
- [88] D. Singh, S. Banerjee, and T. Porter, "Green and black tea extracts inhibit HMG-CoA reductase and activate AMP kinase to decrease cholesterol synthesis in hepatoma cells," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 20, pp. 816–822, 2009.
- [89] T. L. Zern *et al.*, "Grape Polyphenols Exert a Cardioprotective Effect in Pre- and Postmenopausal Women by Lowering Plasma Lipids and Reducing Oxidative Stress," *Hum. Nutr. Metab.*, vol. 135, pp. 1911–1917, 2005.
- [90] G. Noratto, H. Martino, S. Simbo, D. Byrne, and S. Mertens-Talcott, "Consumption of polyphenol-rich peach and plum juice prevents risk factors for obesity-related metabolic disorders and cardiovascular disease in Zucker rats," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 26, pp. 633–641, 2015.
- [91] M. Porter, *Handbook of Industrial Membrane Technology*. New Jersey, U.S.A.: Noyes Publications, 1990.
- [92] R. W. Baker, *Membrane Technology and Applications*, 2^a. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 2004.
- [93] C. Rijn, *Membrane Science and Technology*, vol. 10. Elsevier B.V., 2004.
- [94] B. Kunst and S. Sourirajan, "An Approach to the Development of Cellulose Acetate Ultrafiltration Membranes," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 18, pp. 3423–3434, 1974.
- [95] S. Judd and B. Jefferson, *Membranes for Industrial Wastewater Recovery and Re-use*, 1^a. Inglaterra: Elsevier Ltd, 2003.
- [96] Z. Cui and H. Muralidhara, *Membrane Technology: A Practical Guide to Membrane Technology and Applications in Food and Bioprocessing*, 1^a. Elsevier Ltd, 2010.
- [97] L. Gomes, "Estudo do efeito Anti Tumoral e Antioxidante de diferentes fracções recuperadas do efluente da cortiça através do Processo de Membranas," Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2016.
- [98] L. Gomes, C. Borges, M. L. M. Serralheiro, M. Minhalma, and R. Pacheco, "Cork processing wastewaters components fractioned by ultrafiltration membranes – studies of antioxidant and antitumoral activity," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 93, pp. 861–870, 2018.
- [99] L. Schwartz, "Diafiltration: A Fast, Efficient Method for Desalting, or Buffer Exchange of Biological Samples," 2003.
- [100] P. Falé *et al.*, "Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion," *J. Med. Plants Res.*, vol. 7, pp. 1370–1378, 2013.
- [101] L. Trinh, Y.-S. Choi, and H.-J. Bae, "Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 125, pp. 261–268, 2018.
- [102] M. Ghanem *et al.*, "Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species

- Kosteletzkya virginica: Localization and composition in relation to salt stress," *J. Plant Physiol.*, vol. 167, pp. 382–392, 2010.
- [103] C. A. Silva, C. Silva, E. Bechara, and M. Trevisan, "Fontes vegetais naturais de antioxidantes," *Quim. Nova*, vol. 32, pp. 689–702, 2009.
- [104] G. A. Agbor, J. A. Vinson, and P. E. Donnelly, "Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay Description of Folin Ciocalteu Reagent," *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.*, vol. 3, pp. 147–156, 2014.
- [105] L. Ford, K. Theodoridou, G. Sheldrake, and P. Walsh, "A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds," *Phytochem. Anal.*, pp. 1–13, 2019.
- [106] M. Oktay, Í. Gulçin, and O. Kufreviöglu, "Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts," *Food Sci. Technol.*, vol. 36, pp. 263–271, 2003.
- [107] S. Parys, A. Rosenbaum, S. Kehraus, G. Reher, K.-W. Glombitza, and G. König, "Evaluation of Quantitative Methods for the Determination of Polyphenols in Algal Extracts," *J. Nat. Prod.*, vol. 70, pp. 1865–1870, 2007.
- [108] H. P. S. Makkar, M. Blummel, N. K. Borowy, and K. Becker, "Gravimetric Determination of Tannins and their Correlations with Chemical and Protein Precipitation Methods," *J. Nat. Prod.*, vol. 61, pp. 161–165, 1993.
- [109] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [110] Bio-Rad, "Quick Start Bradford Protein Assay - Instruction Manual." [Online]. Available: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>. [Accessed: 20-Sep-2019].
- [111] V. Turula, T. Gore, S. Singh, and R. G. Arumugham, "Automation of the Anthrone Assay for Carbohydrate Concentration Determinations," *Anal. Chem.*, vol. 82, pp. 1786–1792, 2010.
- [112] Y.-Q. Xu *et al.*, "The major factors influencing the formation of sediments in reconstituted green tea infusion," *Food Chem.*, vol. 172, pp. 831–835, 2015.
- [113] M. Frasco, D. Fournier, F. Carvalho, and L. Guilhermino, "Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity," *Biomarkers*, vol. 10, pp. 360–375, 2005.
- [114] J. C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Canete, and R. Horobin, "MTT assay for cell viability : Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets," *Acta Histochem.*, vol. 114, pp. 785–796, 2012.
- [115] E. Grela, J. Kozłowska, and A. Grabowiecka, "Current methodology of MTT assay in bacteria—A review," *Acta Histochem.*, vol. 120, pp. 303–311, 2018.
- [116] T. Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," *J. Immunological Methods*, vol. 65, pp. 55–63, 1983.
- [117] S. Wold, K. Esbensen, and P. Geladi, "Principal Component Analysis," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 2, pp. 37–52, 1987.

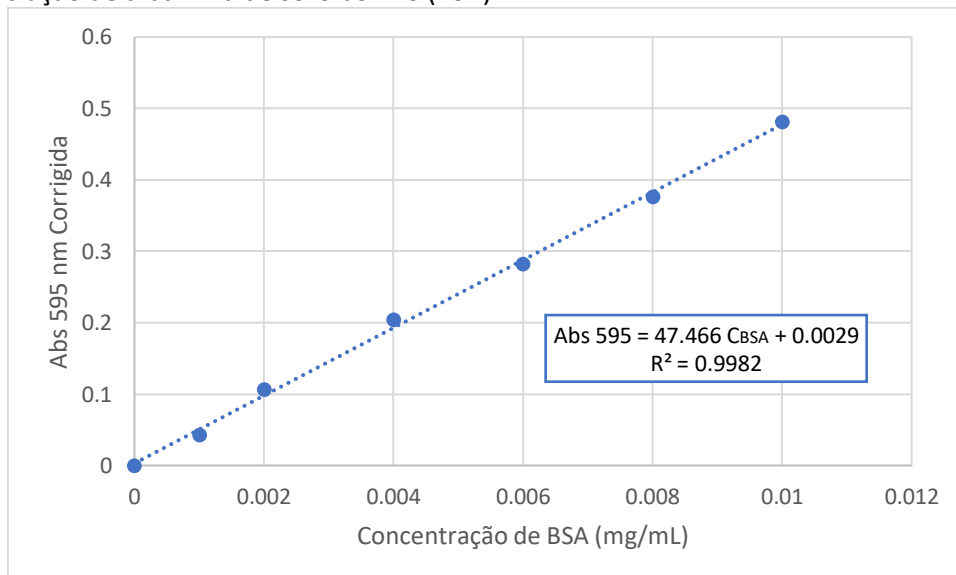
- [118] I. Jolliffe, "Principal Component Analysis," in *International Encyclopedia of Statistical Science*, Springer, 2014, pp. 1094–1096.
- [119] R. Pangestuti and S.-K. Kim, "Seaweed proteins, peptides, and amino acids," in *Seaweed Sustainability*, Elsevier Inc., 2015, pp. 125–140.
- [120] S. Kadam, C. Alvarez, B. Tiwari, and C. O'Donnell, "Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*," *Food Res. Int.*, vol. 99, pp. 1021–1027, 2017.
- [121] P. MacArtain, C. Gill, M. Brooks, R. Campbell, and I. Rowland, "Nutritional Value of Edible Seaweeds," *Nutr. Rev.*, vol. 65, pp. 535–543, 2007.
- [122] M. Fujinaga, M. Chernaia, N. Tarasova, S. Mosimann, and M. James, "Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin," *Protein Sci.*, vol. 4, pp. 960–972, 1995.
- [123] J. Lohr, F. Hummel, K. Pirilis, G. Steinkamp, A. Korner, and F. Henniges, "Properties of different pancreatin preparations used in pancreatic exocrine insufficiency," *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 21, pp. 1024–1031, 2009.
- [124] R. Koivikko, J. Loponen, K. Pihlaja, and V. Jormalainen, "High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Phlorotannins from the Brown Alga *Fucus Vesiculosus*," *Phytochem. Anal.*, vol. 18, pp. 326–332, 2007.
- [125] T. Wang, R. Jónsdóttir, and G. Ólafsdóttir, "Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds," *Food Chem.*, vol. 116, pp. 240–248, 2009.
- [126] R. Applegate and P. Gray, "Nutritional Value of Seaweed to Ruminants," *Rangifer*, vol. 15, pp. 15–18, 1995.
- [127] R. Moreira, F. Chenlo, J. Sineiro, S. Arufe, and S. Sexto, "Drying temperature effect on powder physical properties and aqueous extract characteristics of *Fucus vesiculosus*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 28, pp. 2485–2494, 2015.
- [128] E. Rickert, M. Lenz, F. Barboza, S. Gorb, and M. Wahl, "Seasonally fluctuating chemical microfouling control in *Fucus vesiculosus* and *Fucus serratus* from the Baltic Sea," *Mar. Biol.*, vol. 163, pp. 1–13, 2016.
- [129] M. Minhalma, C. Dias, and M. Pinho, "Membrane fouling in ultrafiltration of cork processing wastewaters," *Adv. Environ. Res.*, vol. 3, pp. 539–549, 2000.
- [130] Y. Li, X. Fu, D. Duan, X. Liu, J. Xu, and X. Gao, "Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell," *Mar. Drugs*, vol. 15, pp. 1–15, 2017.
- [131] "M/Z CLOUD Database." [Online]. Available: [https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference\\$1527/T2375%23Standard/Recalibrated/271202](https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference$1527/T2375%23Standard/Recalibrated/271202). [Accessed: 14-Nov-2019].

Anexos

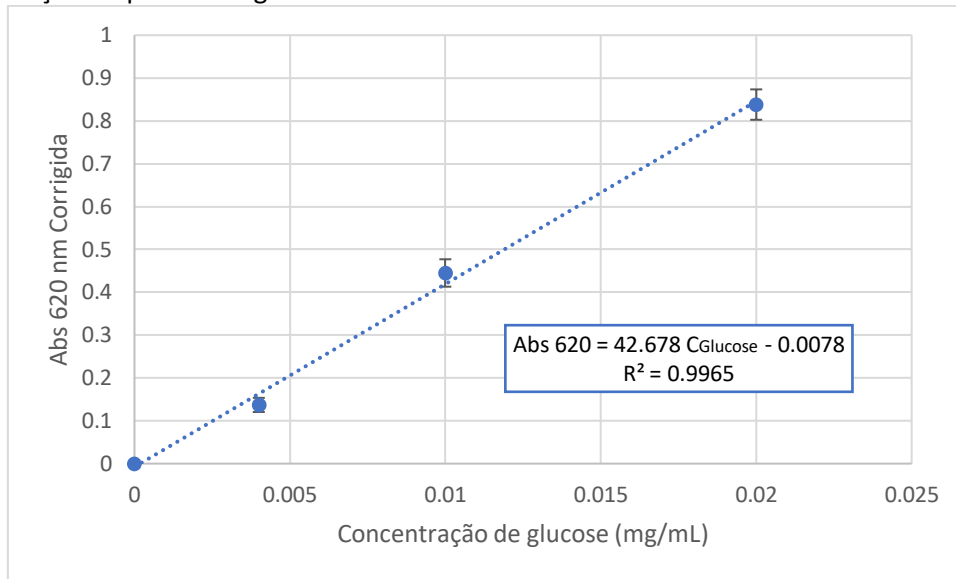
Anexo 1: Retra de calibração usada para a determinação dos fenóis totais nos extratos e frações, onde Abs 760 diz respeito a absorvância a 760 nm corrigida e $C_{\text{Floroglucinol}}$ é a concentração do padrão fenólico o floroglucinol.



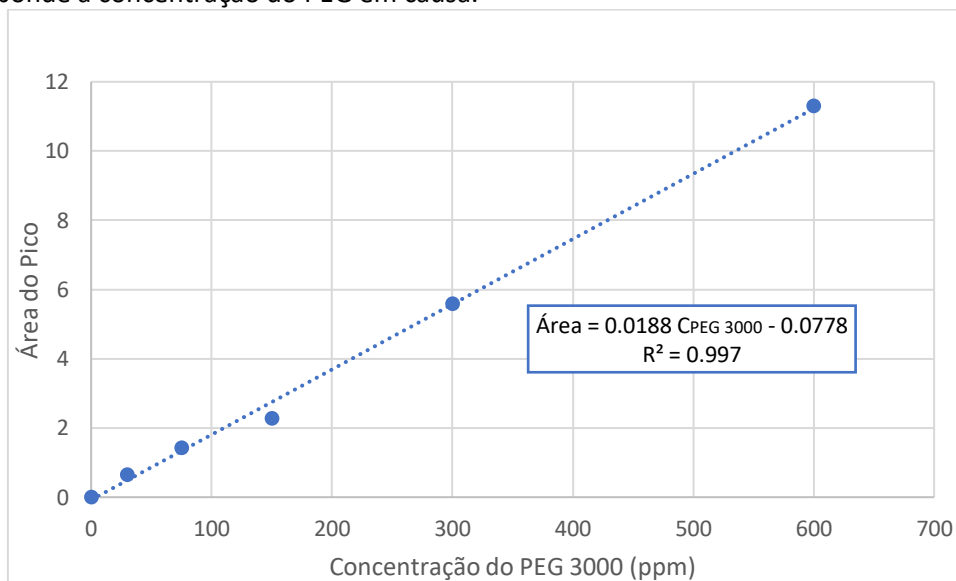
Anexo 2: Retra de calibração usada para a determinação da quantidade de proteína nos extratos e frações, onde Abs 595 diz respeito a absorvância a 595 nm corrigida e C_{BSA} é a concentração de albumina de soro bovino (BSA).



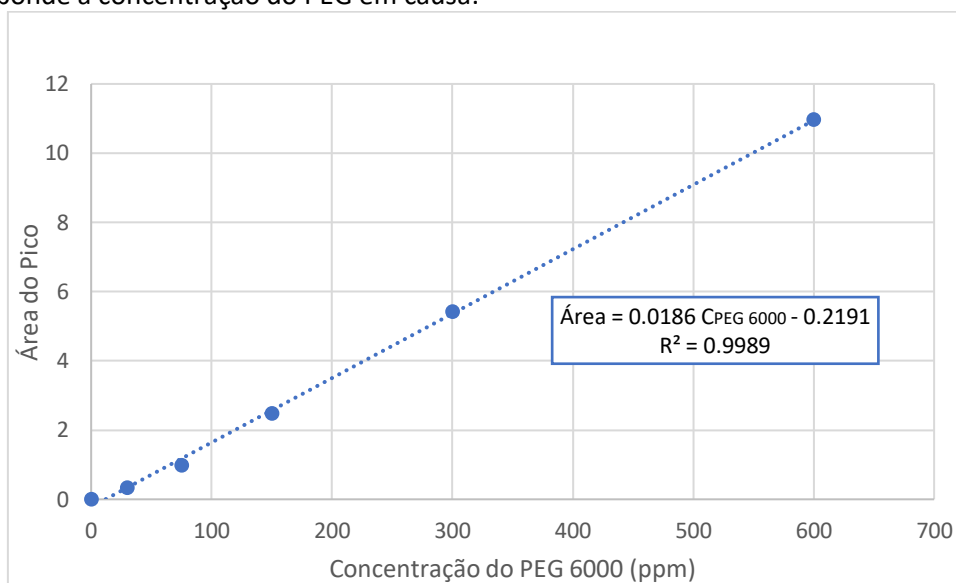
Anexo 3: Retra de calibração usada para a determinação da quantidade de glúcidos nos extratos e frações, onde Abs 620 diz respeito a absorvância a 620 nm corrigida e C_{Glucose} é a concentração do padrão de glucose.



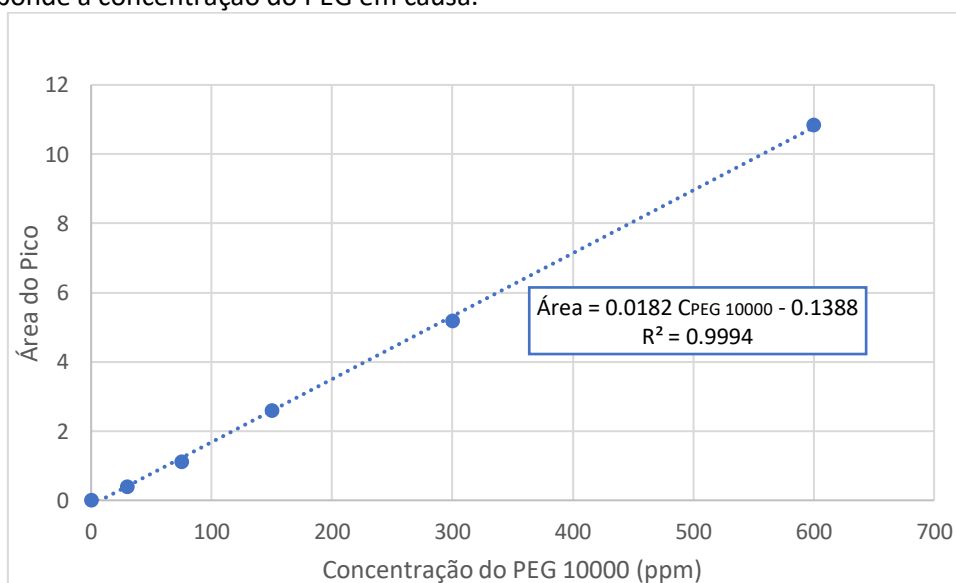
Anexo 4: Retra de calibração para a determinação da concentração de polietilenoglicol (PEG) de massa 3000 Da, no ensaio que visa a determinação do MWCO. Onde a Área corresponde à área do pico obtido pela passagem das diferentes concentrações no HPLC-IR e $C_{\text{PEG 3000}}$ corresponde a concentração do PEG em causa.



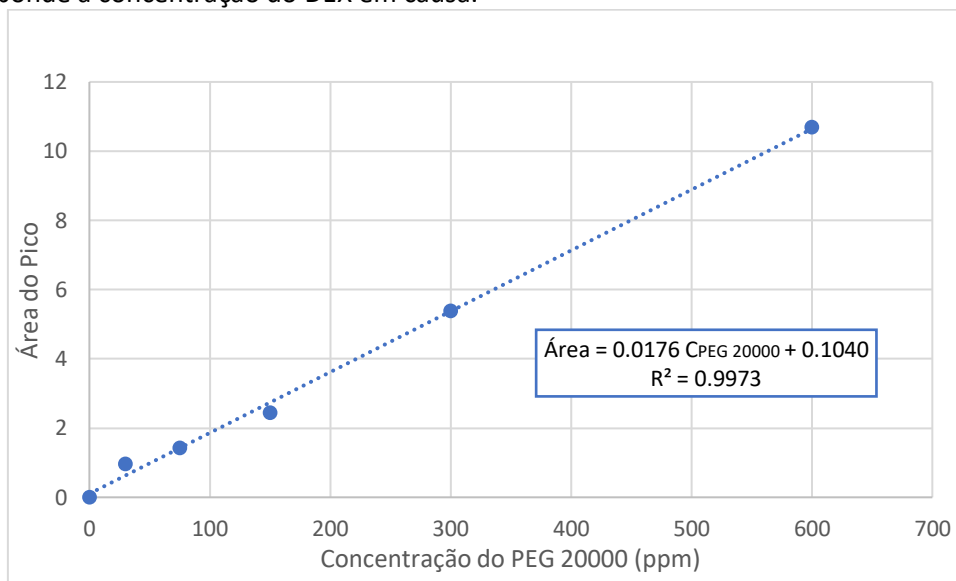
Anexo 5: Retas de calibração para a determinação da concentração de polietilenoglicol (PEG) de massa 6 000 Da, no ensaio que visa a determinação do MWCO. Onde a Área corresponde à área do pico obtido pela passagem das diferentes concentrações no HPLC-IR e $C_{\text{PEG } 6000}$ corresponde a concentração do PEG em causa.



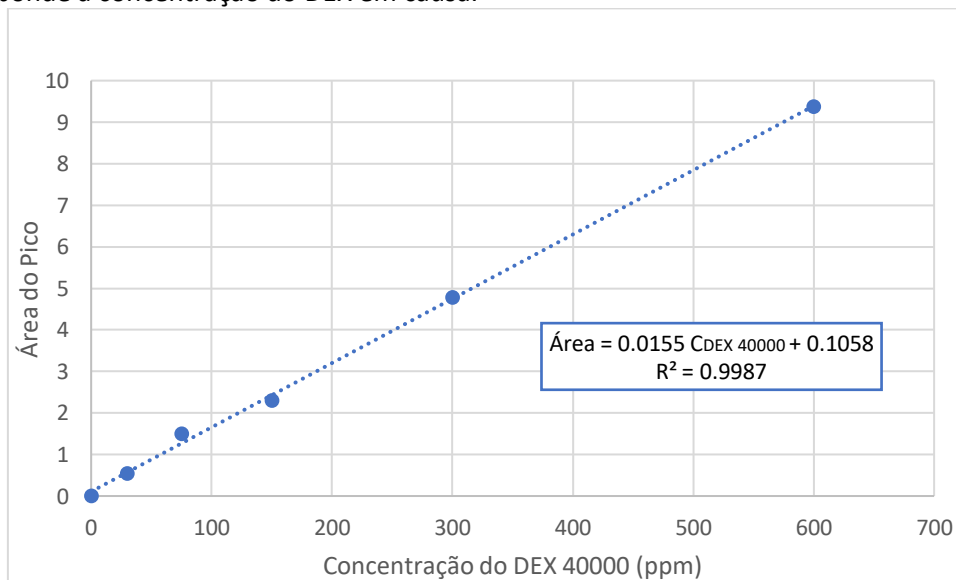
Anexo 6: Retas de calibração para a determinação da concentração de polietilenoglicol (PEG) de massa 10 000 Da, no ensaio que visa a determinação do MWCO. Onde a Área corresponde à área do pico obtido pela passagem das diferentes concentrações no HPLC-IR e $C_{\text{PEG } 10000}$ corresponde a concentração do PEG em causa.



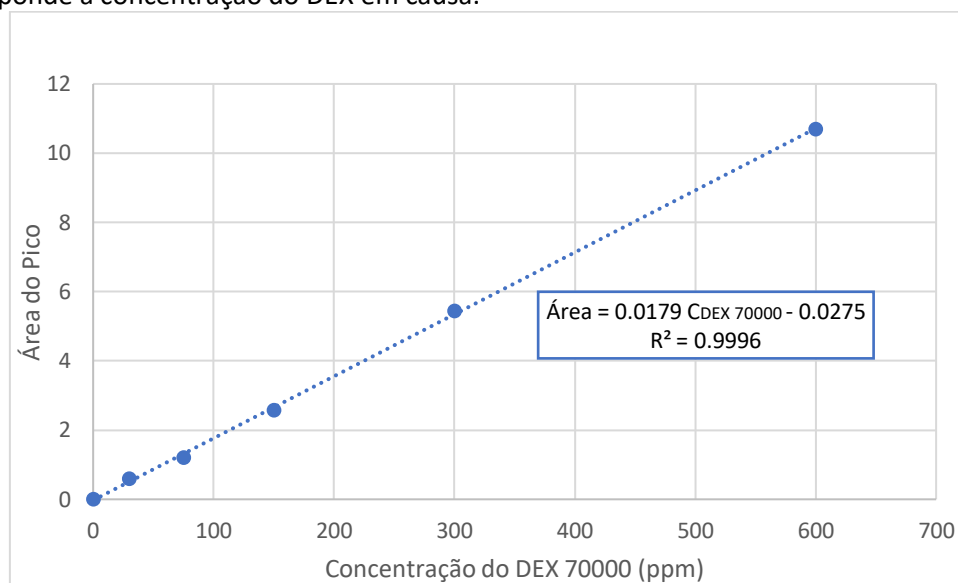
Anexo 7: Reta de calibração para a determinação da concentração de dextrano (DEX) de massa 20 000 Da, no ensaio que visa a determinação do MWCO. Onde a Área corresponde à área do pico obtido pela passagem das diferentes concentrações no HPLC-IR e $C_{DEX\ 20000}$ corresponde a concentração do DEX em causa.



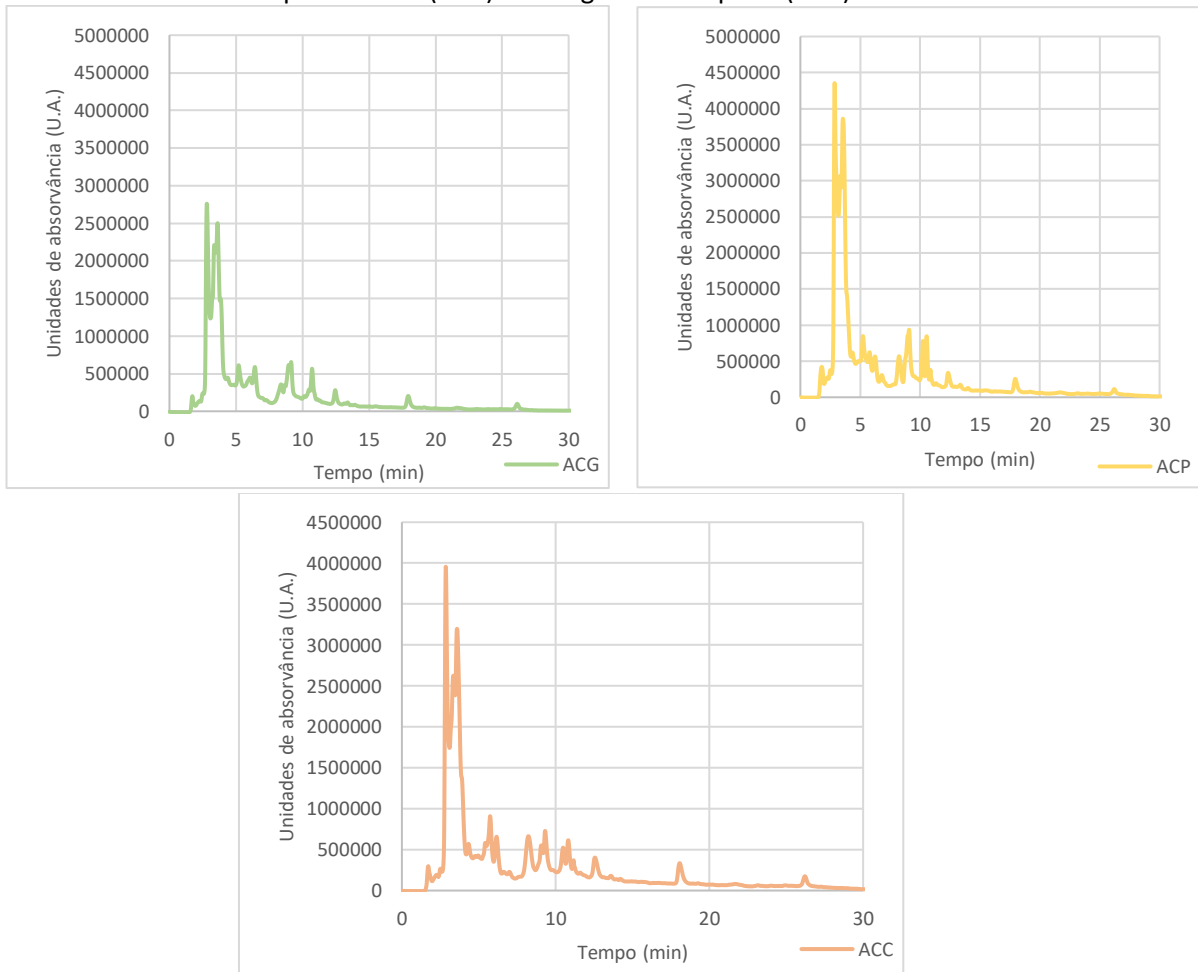
Anexo 8: Reta de calibração para a determinação da concentração de dextrano (DEX) de massa 40 000 Da, no ensaio que visa a determinação do MWCO. Onde a Área corresponde à área do pico obtido pela passagem das diferentes concentrações no HPLC-IR e $C_{DEX\ 40000}$ corresponde a concentração do DEX em causa.



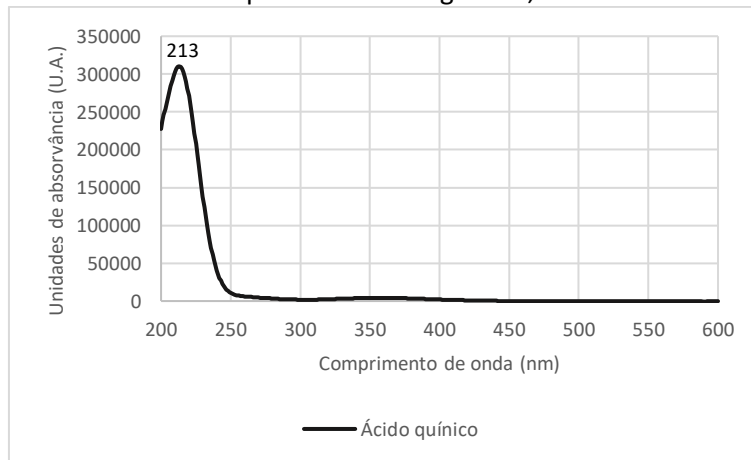
Anexo 9: Reta de calibração para a determinação da concentração de dextrano (DEX) de massa 70 000 Da, no ensaio que visa a determinação do MWCO. Onde a Área corresponde à área do pico obtido pela passagem das diferentes concentrações no HPLC-IR e $C_{\text{DEX } 70000}$ corresponde a concentração do DEX em causa.

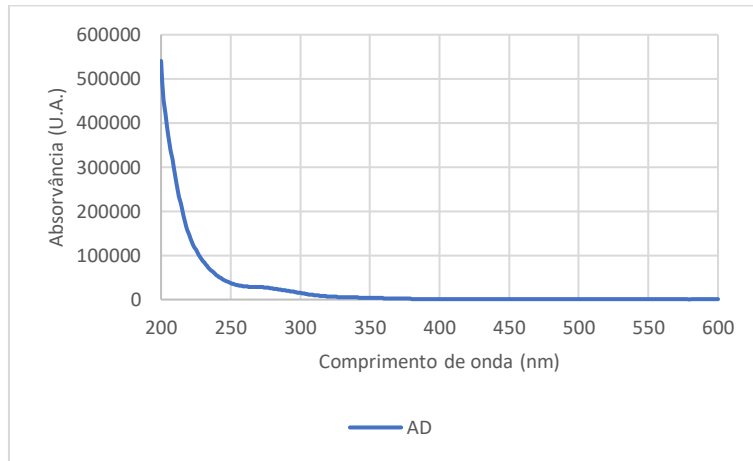


Anexo 10: Cromatogramas obtidos no HPLC-DAD com a coluna C8 e usando o método da **Tabela 3.1**, para os extratos dos contrologos da digestão gástrica (ACG), da digestão pancreática (ACP) e da digestão completa (ACC).

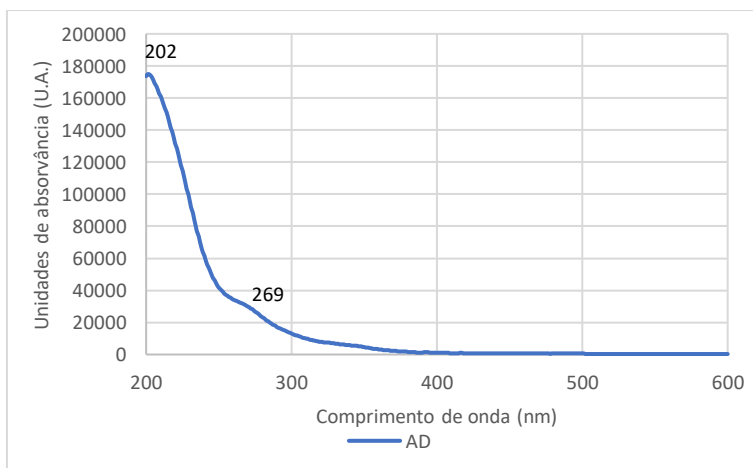
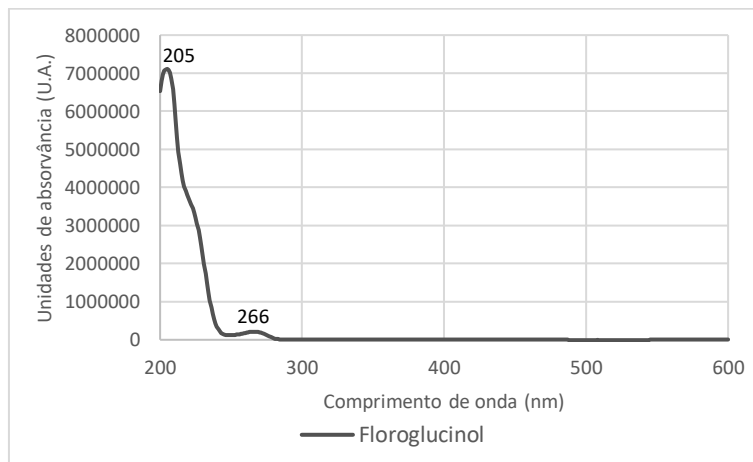


Anexo 11: Espectros UV-Vis do padrão de ácido quínico e do extrato da decoção (AD) do pico 3, obtidos através dos respetivos cromatogramas, ao instante 3.2 minutos.

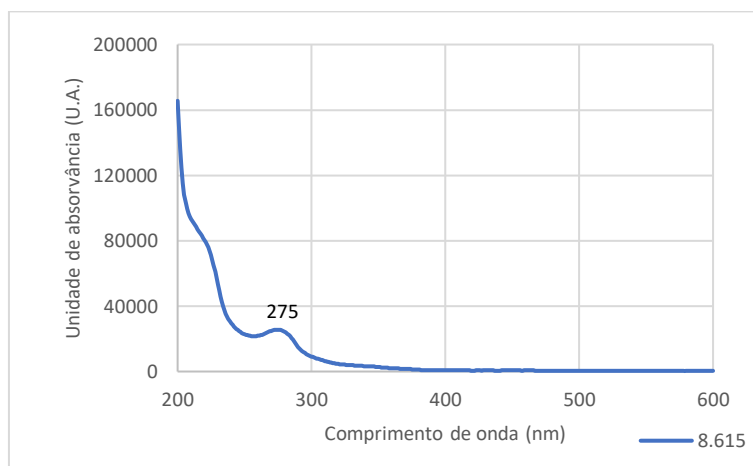
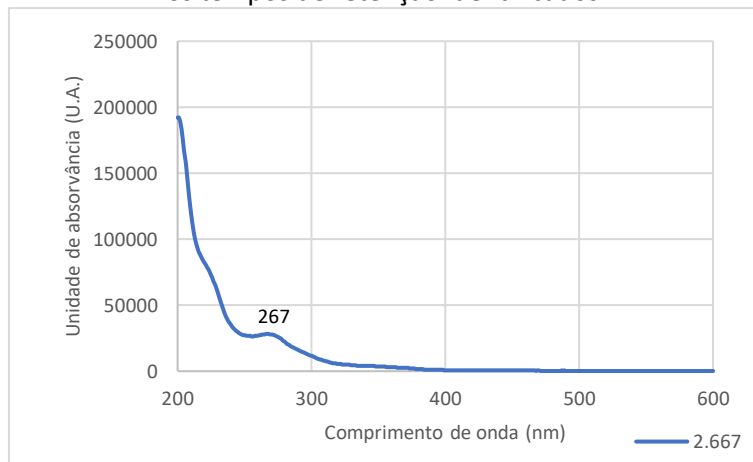




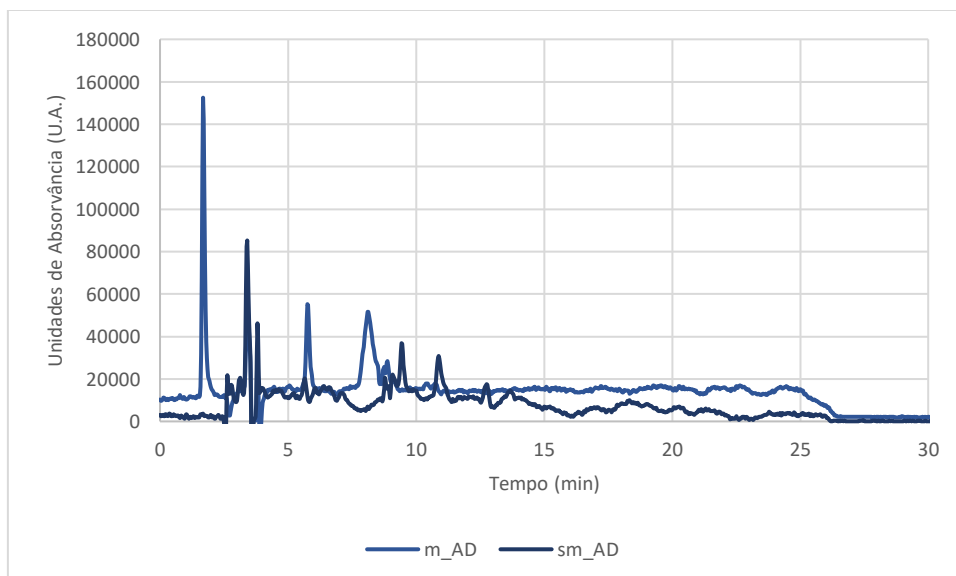
Anexo 12: Espectros UV-Vis do padrão de floroglucinol e do extrato da decocção (AD) do pico 10, obtidos através dos respetivos cromatogramas, ao instante 9.5 minutos.

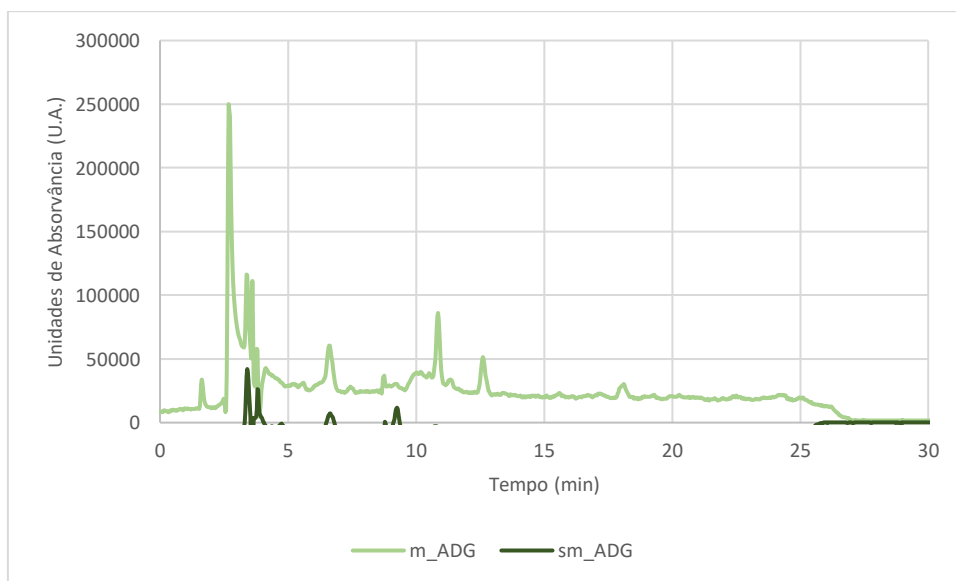
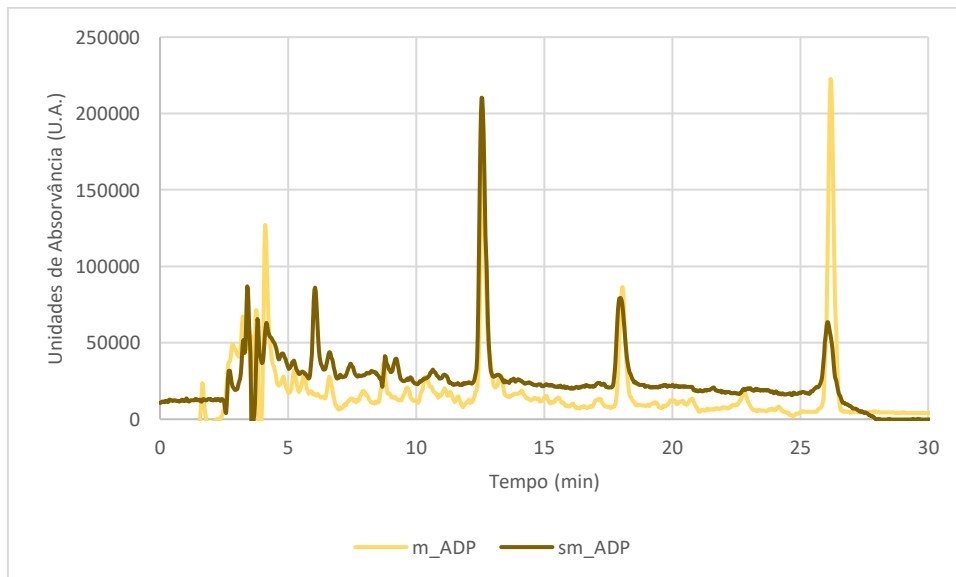
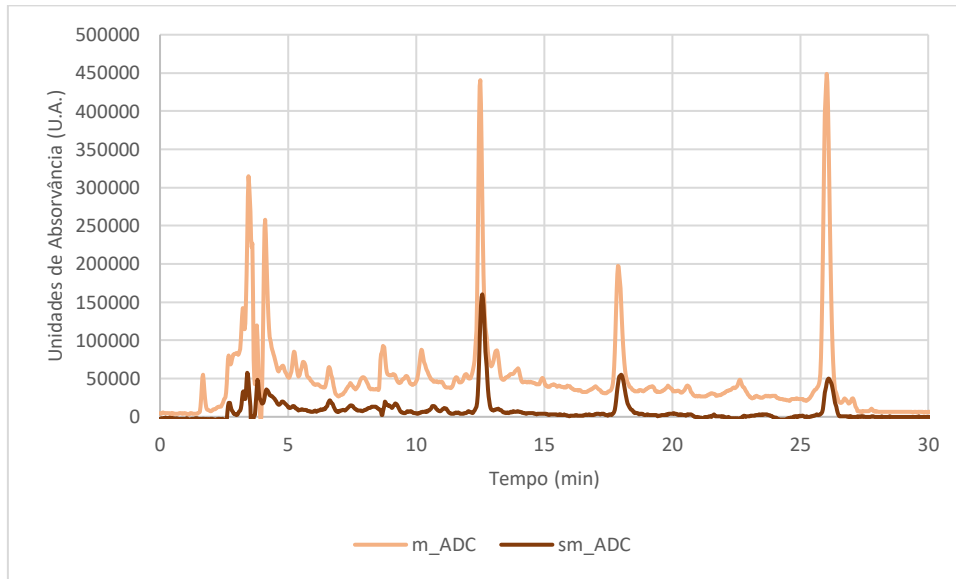


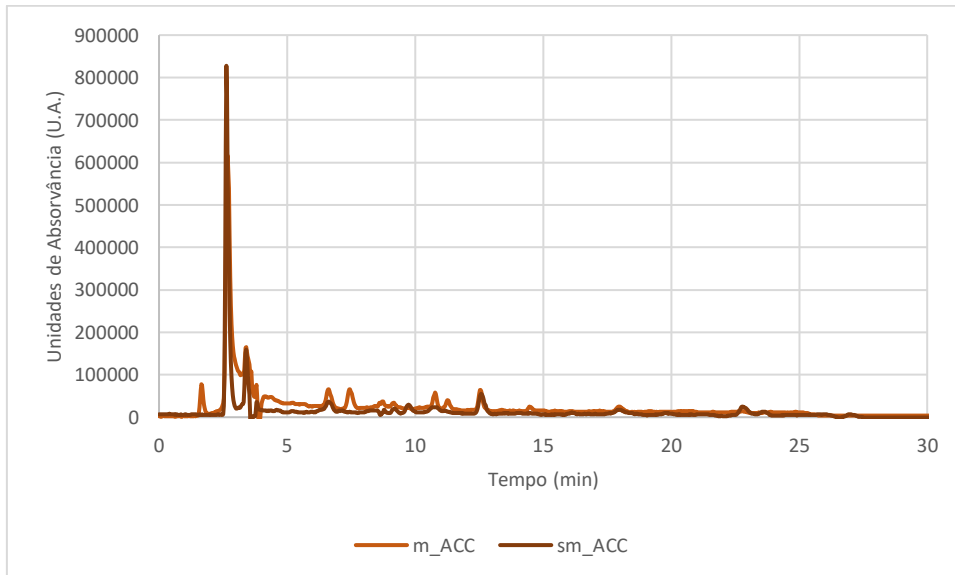
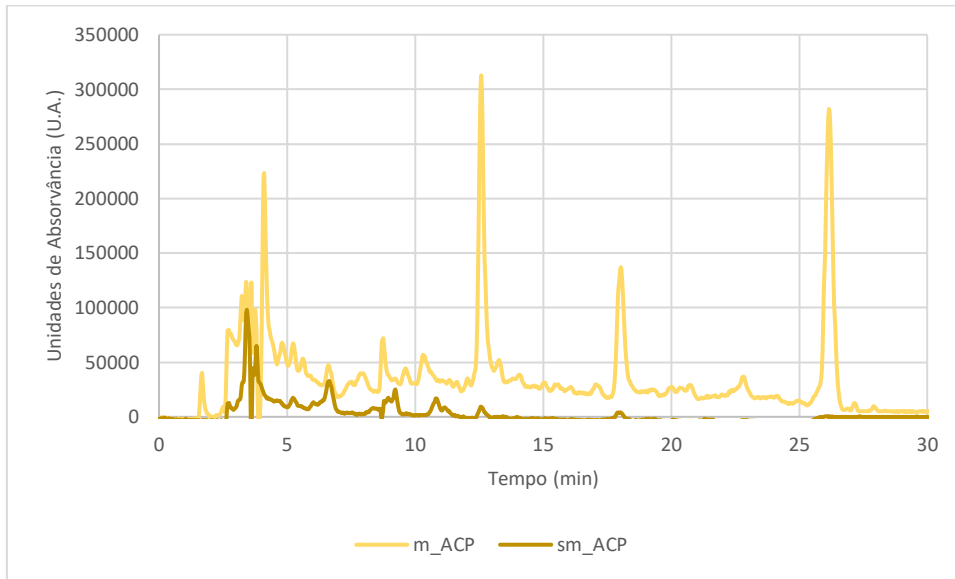
Anexo 13: Espectros UV-Vis do extrato da decocção, para os picos 2 e 9, respetivamente, com os tempos de retenção identificados.



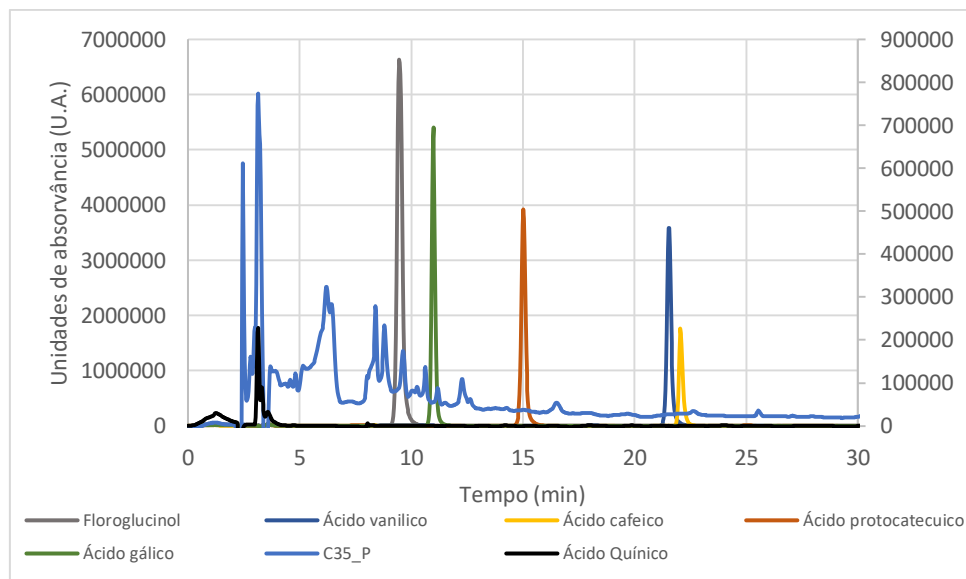
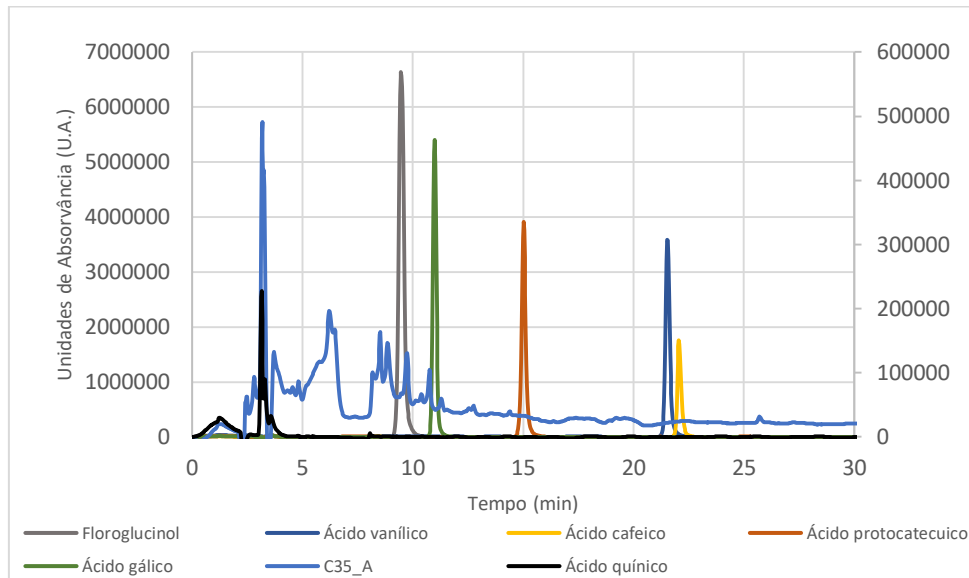
Anexo 14: Cromatogramas obtidos no HPLC-DAD com a coluna C8 e usando o método da Tabela 3.1, para as frações das mucilagens (m) e sem mucilagens (sm) de cada um dos extratos desda decocção (AD), às digestões (ADG/ADP/ADC) e aos seus controlos (ACP/ACC).

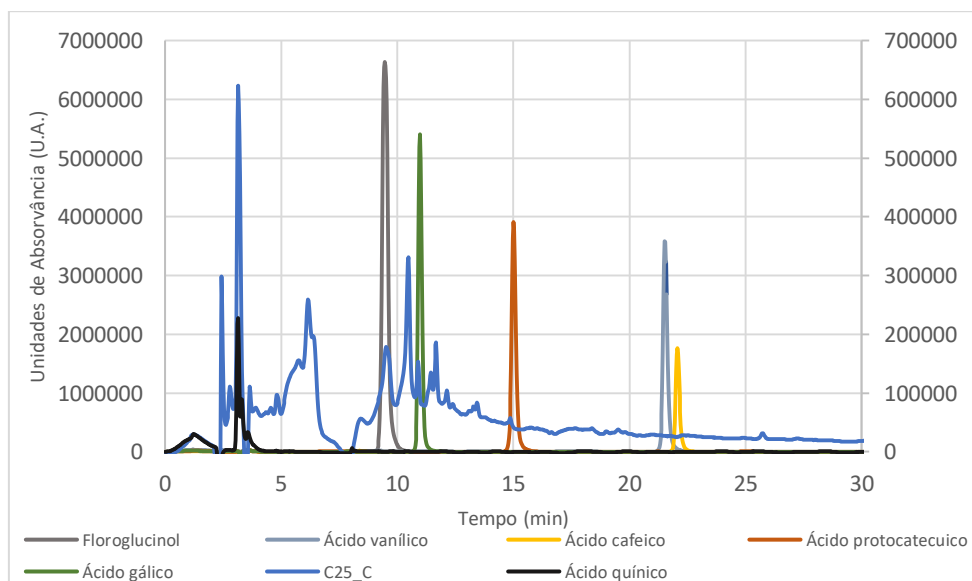
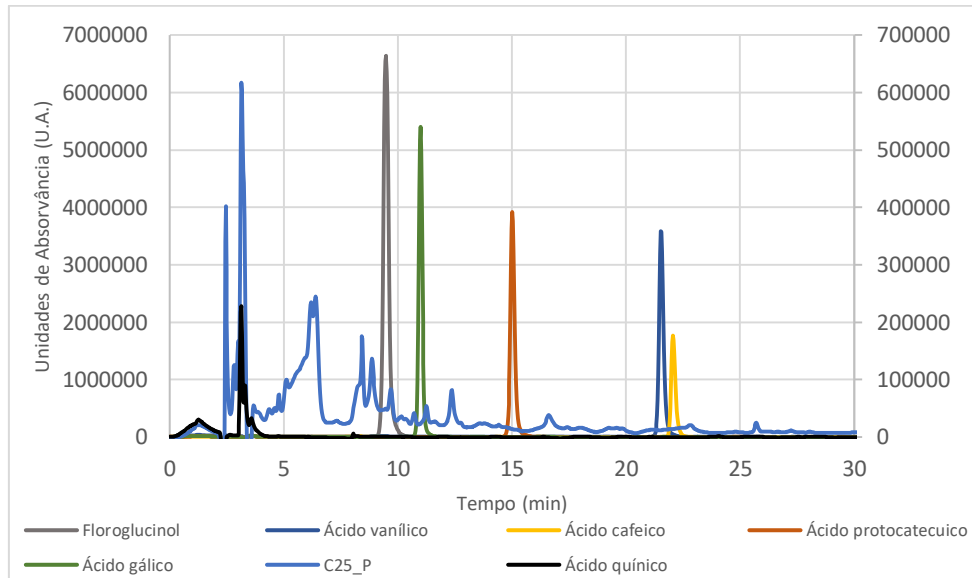
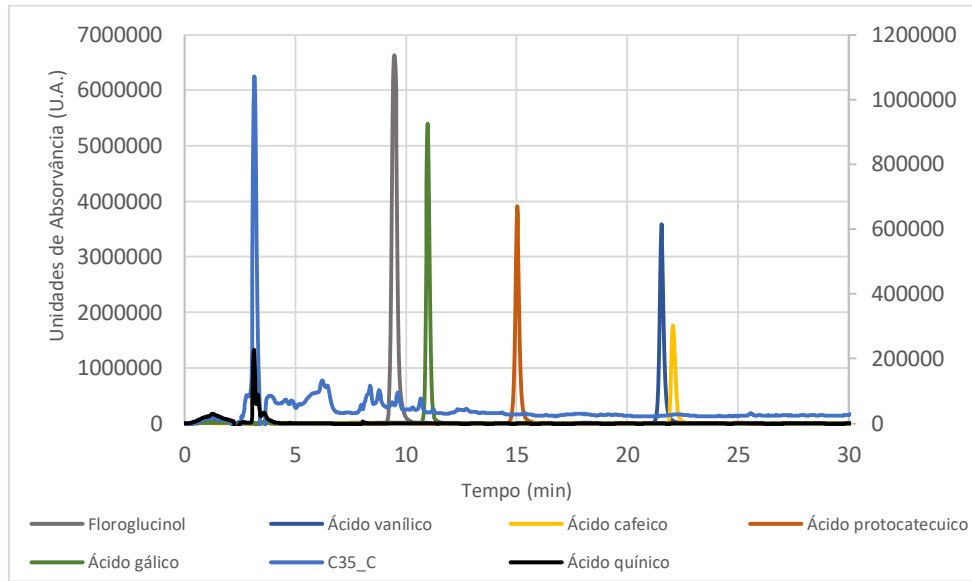




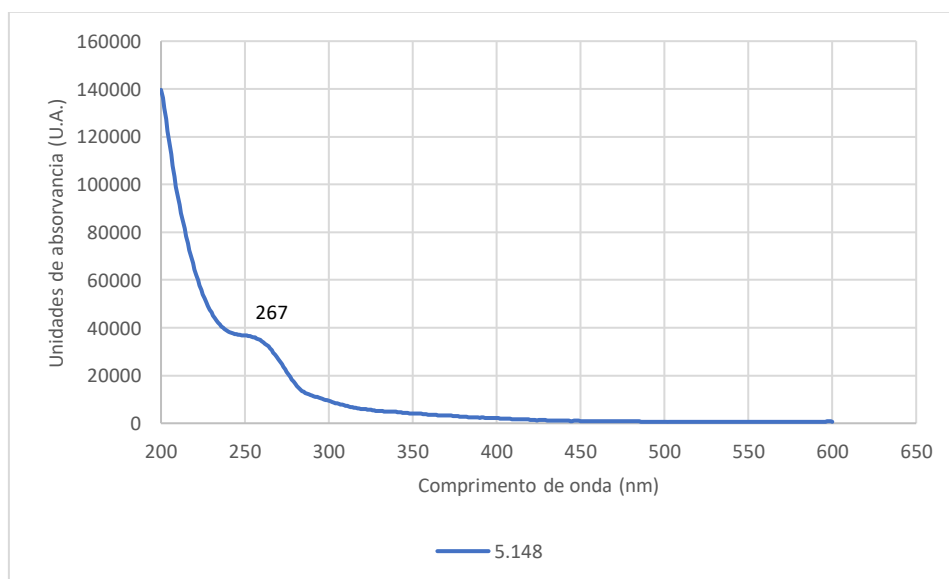
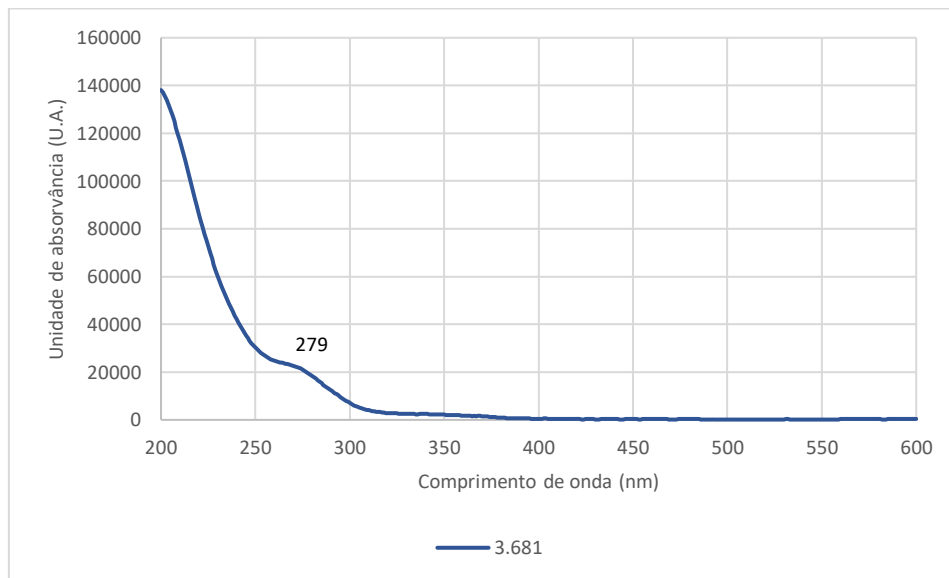
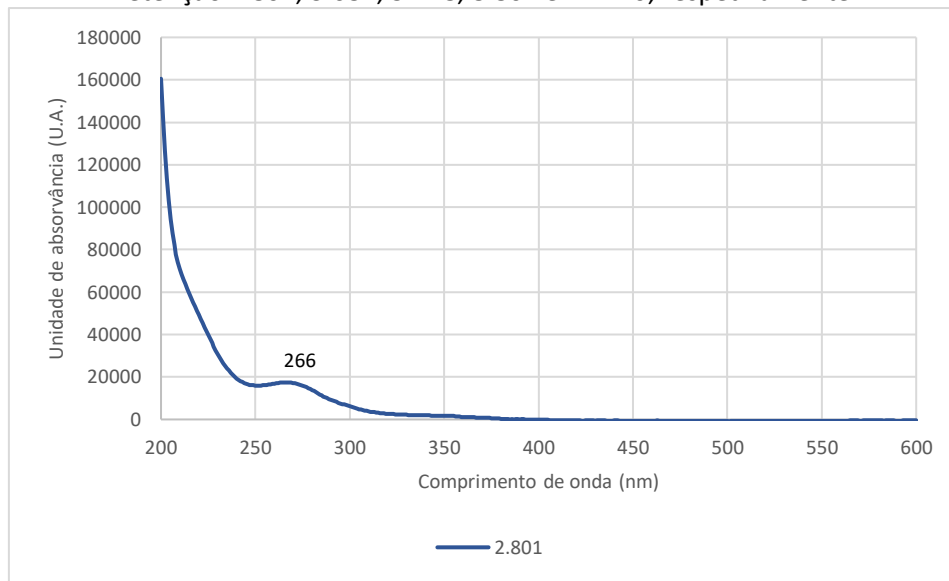


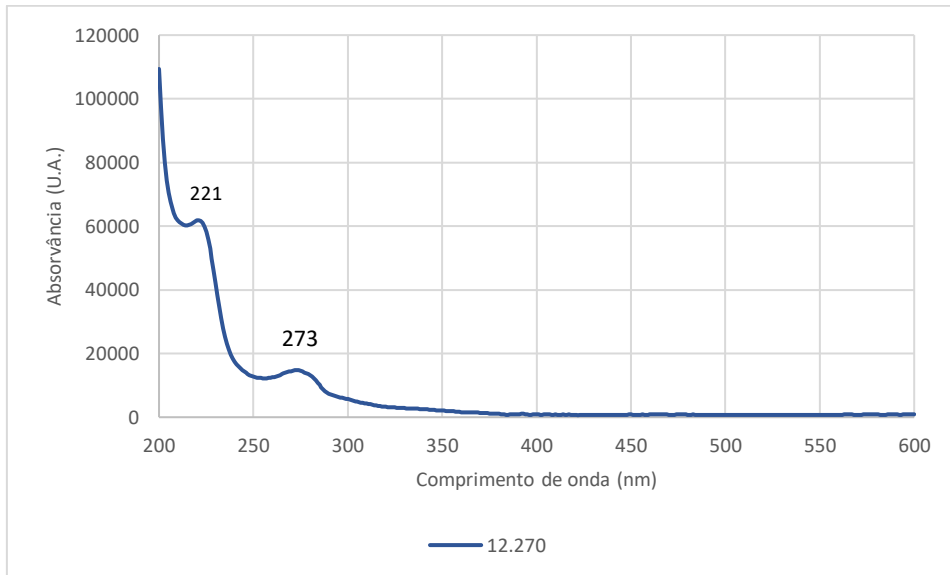
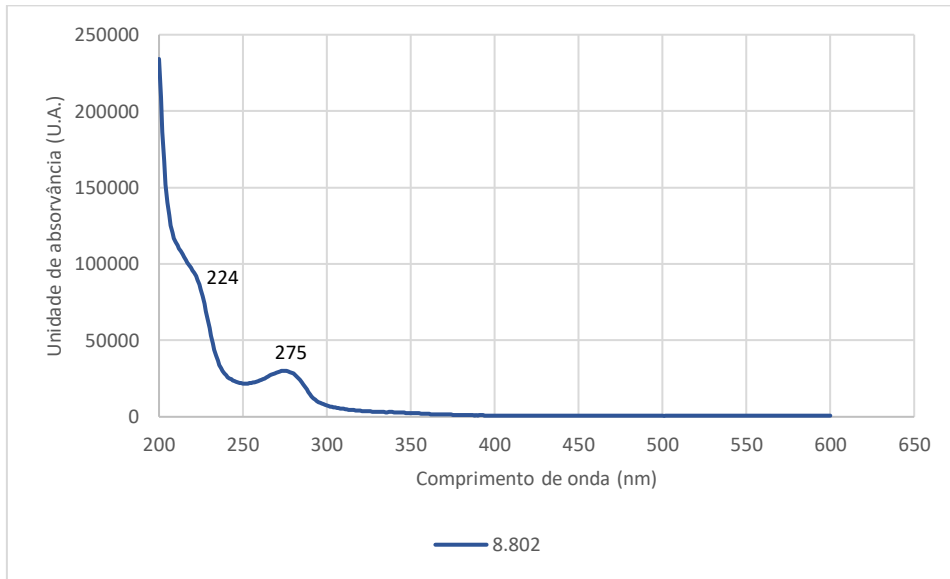
Anexo 15: Cromatogramas obtidos no HPLC-DAD com a coluna C18 e usando o método da **Tabela 3.2**, para a alimentação da primeira membrana (C_{35_A}), o permeado da primeira membrana (C_{35_P}), o concentrado da primeira membrana (C_{35_C}), permeado da segunda membrana (C_{25_P}) e concentrado da segunda membrana (C_{25_C}), conjugados com os cromatogramas de cada um dos padrões em estudo.



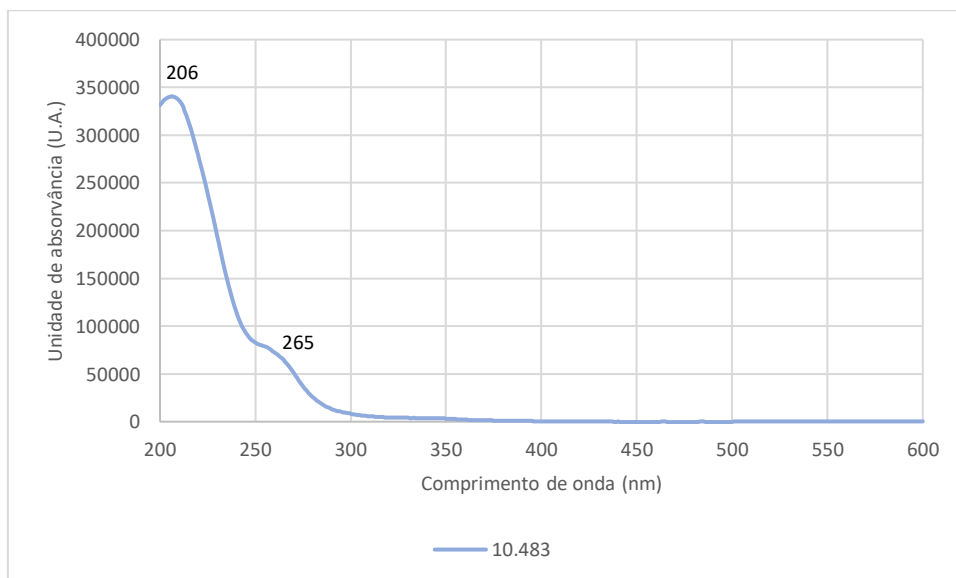
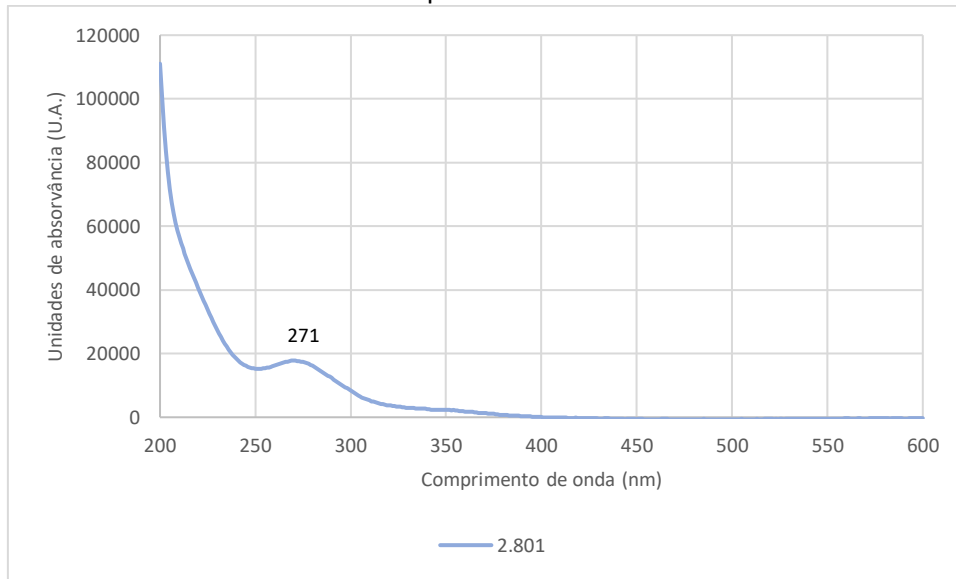


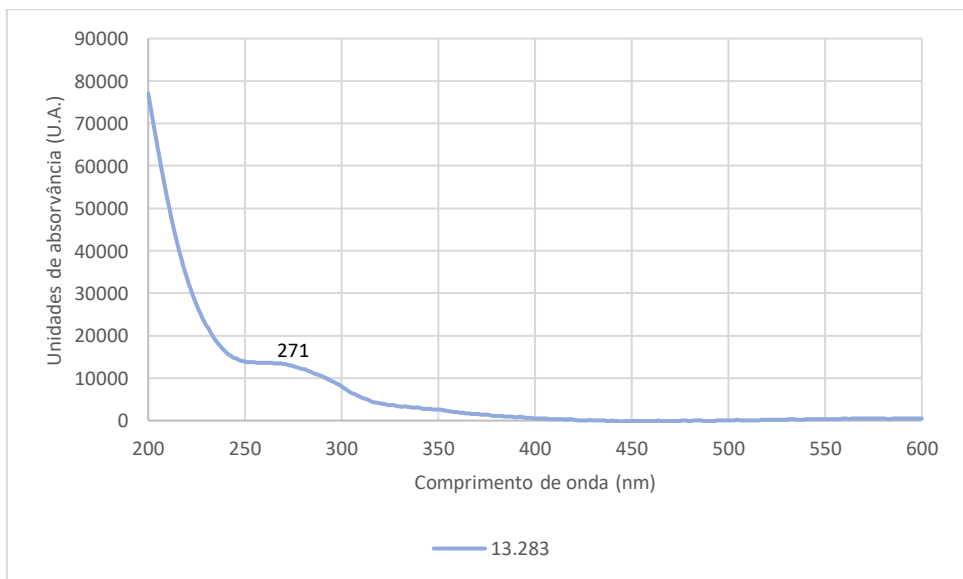
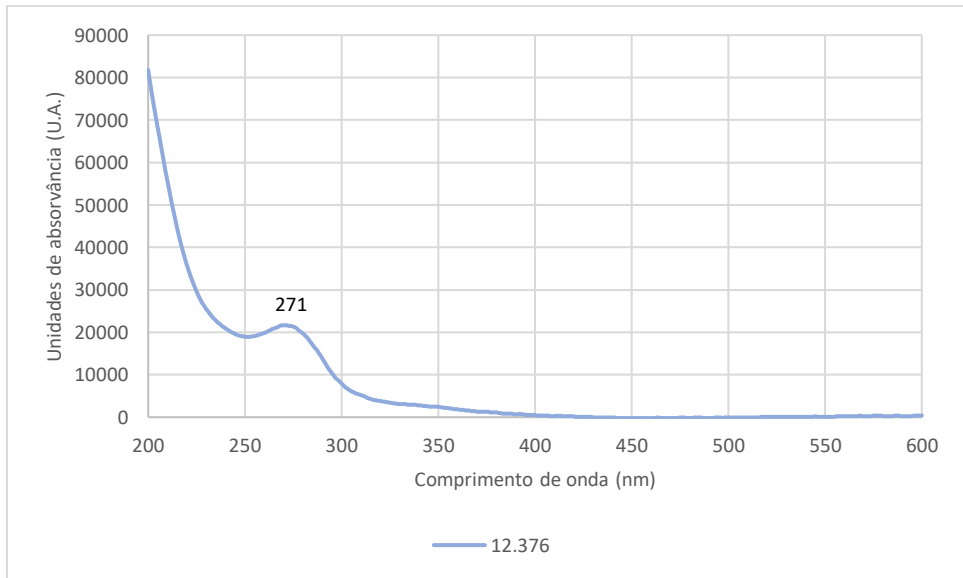
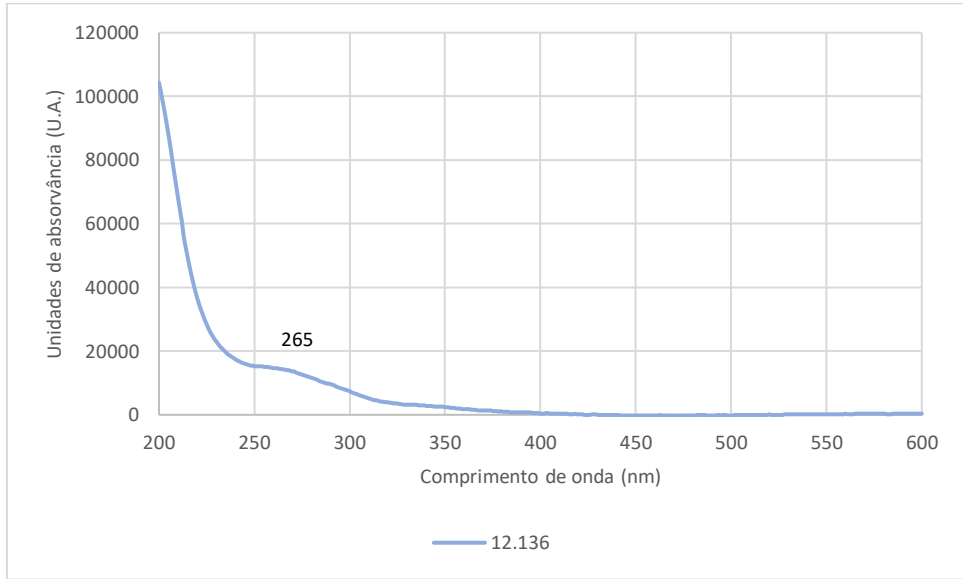
Anexo 16: Espectros UV-Vis da fração do permeado da primeira membrana (C_{35_p}), tempos de retenção 2.801, 3.681, 5.148, 8.802 e 12.270, respetivamente.

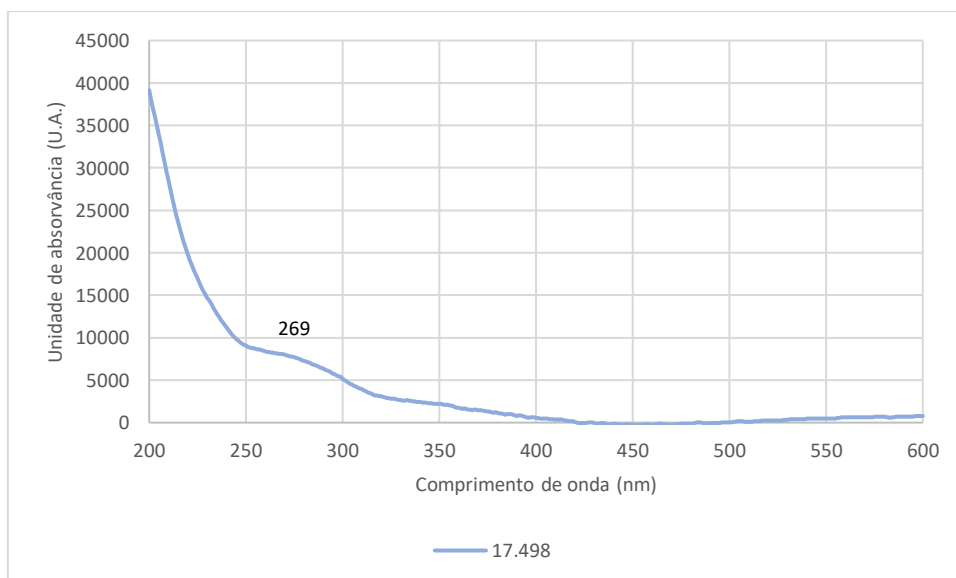
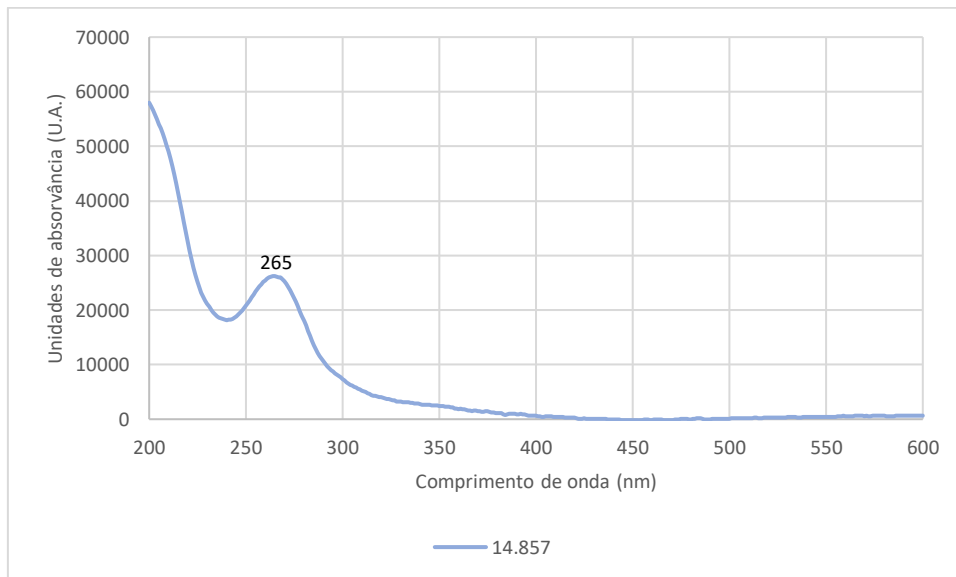
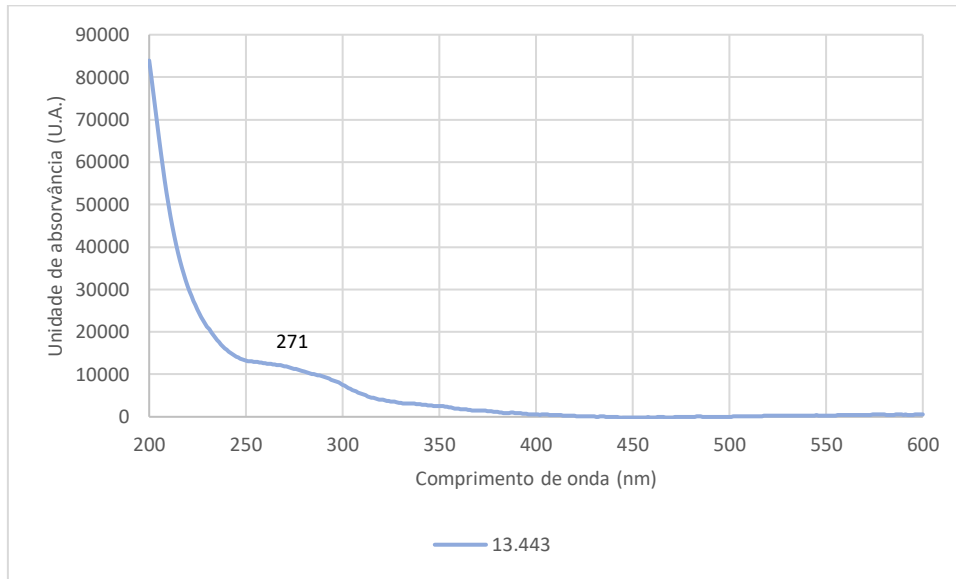


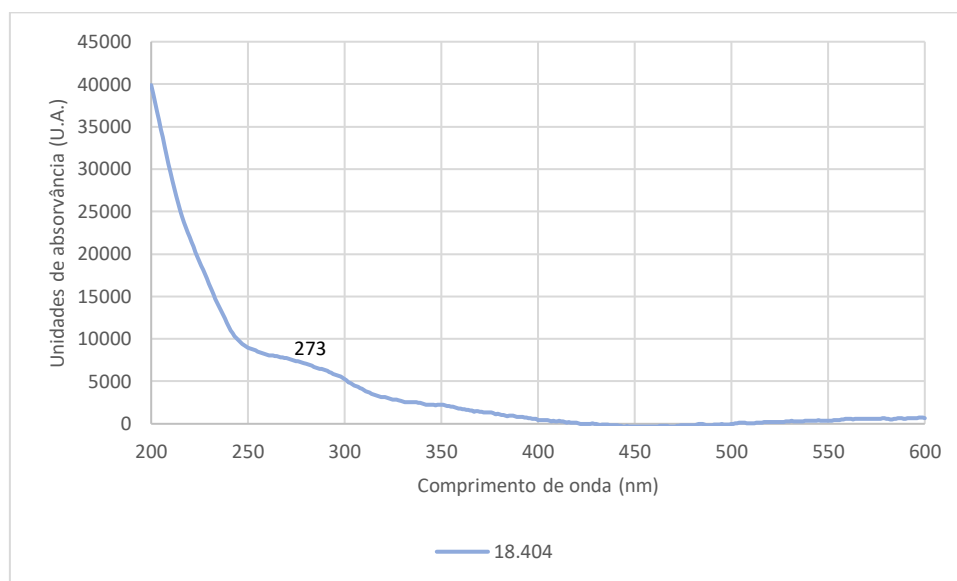


Anexo 17: Espectros UV-Vis da fração do permeado da primeira membrana (C_{25_c}), tempos de retenção 2.801, 10.483, 12.136, 12.376, 13.283, 13.443, 14.857, 17.498 e 18.404, respetivamente.









Anexo 18: Massas de 100.0000 a 199.9999 m/z, para os espectros de massa em modo positivo do extrato de partida (AD) e purificado (C_{35_p}).

AD		C _{35_p}	
Massa (m/z)	Intensidade	Intensidade	Massa (m/z)
114.9874	4064	1923	114.9876
116.9859	3922	1031	116.9861
118.0353	2637	1343	118.0352
120.0255	3527	9372	120.0257
120.0809	13390	0	
120.9796	1144	0	
123.0553	16052	0	
	0	1009	124.025
130.0499	82528	0	
132.5500	3834	9584	132.5502
133.9603	1905	1774	133.9602
134.0449	3381	0	
135.0476	1653	0	
136.062	13259	0	
136.1128	1064	1065	136.1123
136.5075	3153	0	
	0	2605	138.0362
139.0028	13173	0	
	0	1464	139.1119
140.0021	4562	1307	140.0021
140.5389	5652	17673	140.5389
144.9806	1090	0	
145.0173	3943	2906	145.0176
145.5127	5831	0	
146.0300	7407	6552	146.0299
146.1175	13832	0	
146.9808	4871	5035	146.9807
147.0289	9436	0	
148.5803	6264	6175	148.5806
149.0234	7103	7982	149.0233
149.9530	1087	1420	149.9528
150.1126	3877	2410	150.1125
151.0353	14087	7528	151.0353
151.0972	1253	1237	151.0965

Recuperação de compostos bioativos da alga *Fucus vesiculosus* por ultrafiltração/diafiltração e avaliação da ação biológica em doenças cardiovasculares

152.0320	3153	0	
152.0555	2088	1988	152.0559
154.5180	5478	0	
156.0145	1733	0	
157.0136	7207	0	
157.5856	12053	11799	157.5857
158.0091	1703	0	
159.0309	5916	0	
159.9688	1264	0	
	0	1102	160.0456
161.0105	1321	0	
161.1049	2079	2040	161.1048
162.0076	1795	1160	162.0075
163.0275	2113	1978	163.0280
165.0757	10597	12601	165.0759
166.0260	1079	0	
166.5911	13700	15719	166.5911
167.0128	6214	1631	167.0130
168.0334	5223	4472	168.0334
169.0460	1842	1702	169.0459
169.0935	6304	5942	169.0938
170.0151	3200	0	
	0	1036	171.1491
	0	1065	172.0946
171.1016	4833	6625	171.1019
172.1511	1608	1940	172.1517
173.0788	3502	3602	173.0788
	0	1816	174.1855
175.0238	15638	0	
175.5965	2219	2302	175.5963
177.1121	3189	2708	177.1124
178.0991	12285	13171	178.0989
181.0381	1249	1020	181.0387
182.0881	1054	1012	182.0883
182.9025	1204	0	
183.0863	27754	34121	183.0863
183.6011	2866	4061	183.6015
184.0057	2708	1994	184.0059
185.1169	4707	4404	185.1171
186.0077	1353	0	
186.0437	5059	4311	186.0440
186.1673	1041	1356	186.1669
188.0765	1080	1559	188.0772
189.0759	14993	0	
	0	1279	190.1075
192.6067	4421	6454	192.6069
193.0345	15020	0	
193.0818	1288	1588	193.0826
194.0709	13605	22978	194.0711
	0	30769	198.1281
198.9401	5071	0	
199.1693	65479	67687	199.1695

Anexo 19: Massas de 200.0000 a 299.9999 m/z, para os espectros de massa em modo positivo do extrato de partida (AD) e purificado (C_{35_P}).

AD		C _{35_P}	
Massa (m/z)	Intensidade	Intensidade	Massa (m/z)
	0	1502	200.0709
200.1302	1775	1984	200.1303
200.9732	1360	0	
200.1725	2007	1536	200.173
202.0598	24785	51828	202.0598
204.0540	1878	2086	204.0549
204.1147	3371	4600	204.1148
205.0682	76000	100615	205.0683
207.0863	5445	0	
207.1537	1331	1426	207.1537
209.0595	2336	2338	209.0598
	0	1116	209.1355
210.0608	4922	0	
211.5539	1049	3157	211.554
212.0078	15889	0	
	0	2205	213.0447
213.1195	3710	5553	213.1197
	0	2773	213.1460
214.0896	1262	1819	214.0895
214.9175	5791	0	
215.0165	53460	0	
215.1261	12514	12851	215.1256
216.9509	4193	0	
217.0681	2016	2456	217.0680
217.1048	2114	1425	217.1050
217.1800	21801	21710	217.1802
	0	82914	218.2116
218.9836	1915	1016	218.9838
219.1955	4019	4554	219.1957
220.1672	1113	1166	220.1677
221.0422	21426	19629	221.0416
223.0629	1682	2425	223.0633
223.9893	5824	1763	223.9891
224.0569	1248	1563	224.0569
225.0978	5509	0	
225.1485	8032	9392	225.1486
227.0326	1187	1220	227.0328
228.0393	6202	0	
228.1649	4772	4973	228.1651
	0	3292	229.1411
230.9887	5776	0	
232.9283	3344		
233.0702	2863	4167	233.0699
234.9613	4658	0	
	0	1079	236.0717
236.1493	62778	0	
237.1526	7300	0	
239.1618	133703	112736	239.1622
239.9668	4932	0	
240.1082	1774	2248	240.1086
240.1653	20152	20126	240.1656
240.2321	11576	12257	240.2322
	0	1356	241.1549
241.1549	7658	0	
241.9997	9278	3848	242.0000
243.0865	9334	0	

Recuperação de compostos bioativos da alga *Fucus vesiculosus* por ultrafiltração/diafiltração e avaliação da ação biológica em doenças cardiovasculares

243.9977	2748	1201	243.9976
245.0773	2055	0	
245.1587	38988	43788	245.1590
245.1748	10884	14729	245.1753
	0	63140	246.2429
247.0793	15047	0	
247.1305	5113	6175	247.1305
248.9917	1632	0	
249.1462	1039	0	
250.9390	2990	0	
251.0612	2806	6827	251.0614
251.0804	2052	3029	251.0810
251.186	2702	2337	251.1857
255.1356	10056	8198	255.1358
255.9434	1965	0	
256.2999	239394	211773	256.3003
257.1701	2797	2253	257.1702
257.9775	6362	0	
258.1089	6218	0	
259.1908	13270	12634	259.1908
261.0097	1231	0	
261.0973	6027	0	
262.1689	3584	3657	262.1696
	0	56679	262.2378
262.998	3798	0	
265.016	2224	0	
265.2530	1960	1845	265.2532
265.6719	1453	1370	265.6718
267.0389	4899	14821	267.0390
267.1565	30713	42179	267.1571
268.1039	4221	0	
268.2632	4277	4152	268.2641
269.2093	3234	1882	269.2098
271.1746	3554	4555	271.1748
271.1885	1287	1441	271.1880
272.0076	1003	0	
273.1374	1103	0	
273.1680	9509	9660	273.1676
273.9549	1958	0	
274.0962	2016	3309	274.0965
	0	92958	274.2744
275.0974	1617	0	
277.0959	1212	1247	277.0961
276.5291	2352	0	
278.5726	8648	0	
279.1589	13005	15593	279.1591
280.0910	1236	0	
280.1880	1563	1110	280.1877
280.2640	1817	1816	280.2638
281.0083	2589	0	
281.1725	30833	30878	281.1728
282.2798	141396	135115	282.2796
283.0863	3006	0	
283.1307	4203	6170	283.1313
284.3313	25286	21990	284.3316
285.1106	5852	16785	285.1108
285.2901	4592	13437	285.2902
287.2219	122736	112891	287.2222
287.9800	3041	0	
288.2534	11819	11173	288.2538

290.1353	1874	0	
	0	40603	290.2689
293.5912	7291	59524	293.0996
295.1900	3782	3139	295.1913
297.1465	4356	4221	297.1468
297.2408	1930	2089	297.2407
298.0955	5040	0	
298.2067	53119	53845	298.2070
	0	1982	299.0997
299.3060	1132	0	

Anexo 20: Massas de 300.0000 a 399.9999 m/z, para os espectros de massa em modo positivo do extrato de partida (AD) e purificado (C_{35_P}).

AD		C _{35_P}	
Massa (m/z)	Intensidade	Intensidade	Massa (m/z)
300.2901	2637	2501	300.2906
301.0894	7086	0	
	0	2541	301.0849
301.1323	5035	6175	301.1330
301.1408	28259	32489	301.1410
	0	2247	301.2857
	0	1892	302.3052
303.1556	2477	0	
303.1652	1826	2102	303.1656
304.2484	70480	67036	304.2488
305.138	1167	1067	305.0822
306.1956	78526	87153	306.1958
307.0839	27924	0	
308.0215	9730	0	
309.2038	229711	215543	309.2040
309.9399	1035	0	
310.0527	1372	0	
310.2356	2835	2865	310.2358
	0	3762	312.0730
312.3630	3365	3194	312.3630
313.3215	4930	3465	313.3217
314.0913	2893	0	
315.2007	33459	37591	315.2007
315.2279	6281	6551	315.2285
317.0563	2857	0	
317.1151	8153	9472	317.1149
319.0048	1025	0	
319.1432	8085	9224	319.1436
321.0118	1158	0	
322.0774	8398	0	
325.0168	1289	0	
325.1778	56101	54334	325.1781
325.1989	3059	3694	325.1989
326.3785	5130	4492	326.3781
326.9952	1581	0	
329.3169	1338	1624	329.3171
	0	1889	330.0617
331.1170	2390	0	
331.2227	32495	19006	331.2233
332.3319	1170	1079	332.3319
	0	1041	335.1387
335.7140	1110	1415	335.7145
335.9998	1055	0	
336.2510	7350	7939	336.2519

Recuperação de compostos bioativos da alga *Fucus vesiculosus* por ultrafiltração/diafiltração e avaliação da ação biológica em doenças cardiovasculares

336.3122	1206	1119	336.3117
338.3428	1769	1239	338.3424
340.0845	1533	0	
340.3948	3906	3798	340.3943
340.9912	1663	0	
343.2956	126523	137517	343.2958
344.2399	44237	48010	344.2403
345.1399	3600	0	
	0	1168	346.3329
346.9594	1615	0	
348.0711	14999	0	
350.2309	1071	1053	350.231
352.3396	2457	4195	352.3400
354.0993	1167	0	
355.2830	2534	2603	355.2825
359.1519	1898	1517	359.1519
	0	1092	361.0597
361.1895	2280	2104	361.1903
364.0659	2918	0	
365.1369	1423	1395	365.1364
365.1655	1032	2316	365.1658
365.2773	1833	1978	365.2776
367.1212	4586	2252	367.1207
368.4258	308448	283551	368.4256
369.0866	2168	0	
370.2962	1199	1221	370.2958
	0	1199	371.1005
371.1741	2396	3987	371.1749
371.228	1684	0	
371.3269	82009	86305	371.3273
372.152	5369	0	
374.1256	2811	0	
375.2512	3524	3830	375.2508
375.9788	1207	0	
377.1915	1345	1063	377.1917
379.7765	2185	2641	379.7765
380.3379	1478	1795	380.3373
	0	1119	381.1218
	0	1241	382.2407
384.1389	1057	3596	384.1391
385.2934	2740	2522	385.2933
386.1678	17356	0	
387.1467	14765	25115	387.1462
388.2546	1804	1108	388.2548
389.1113	4677	6175	389.1118
389.1849	2736	4777	389.1854
391.2849	3789	3698	391.2851
393.2096	4609	2901	393.2106
394.3536	2571	2657	394.3534
397.0894	1266	0	
397.2438	5400	5511	397.2441
399.0717	8182	0	
399.358	27767	12614	399.3588

Anexo 21: Massas de 400.0000 a 810.0000 m/z, para os espectros de massa em modo positivo do extrato de partida (AD) e purificado (C_{35_P}).

AD		C _{35_P}	
Massa (m/z)	Intensidade	Intensidade	Massa (m/z)
401.0910	1769	0	
402.3581	38547	36912	402.3580
	0	3060	403.1128
404.5894	3456	0	
406.2026	14049	16132	406.2029
407.0407	10310		
411.0935	6874	9270	411.0939
411.1732	1480	0	
414.2094	2305	0	
414.3216	2069	2352	414.3215
415.2118	1936	2361	415.2120
	0	1252	419.0846
419.2776	4918	5533	419.2771
420.0673	1435	0	
423.0082	8213	0	
423.1112	1325	2195	423.1117
424.3639	1903	2149	424.3638
	0	1177	425.1082
427.0677	3783	4866	427.0679
427.2467	1188	1169	427.2461
428.3737	7862	7613	428.3743
429.3193	2389	2704	429.3188
430.3895	52414	48983	430.3896
434.1893	1736	0	
437.1925	2457	3297	437.1938
438.3799	3088	2943	438.3798
438.9807	2590	0	
439.0891	5117	17353	439.0893
439.1059	4684	0	
441.0869	1609	5662	441.0866
443.3354	3461	3586	443.3351
444.1079	1223	1381	444.1087
449.1179	3862	19051	449.1182
	0	2830	450.1214
452.0965	1057	1701	452.0974
452.3958	3145	2882	452.3953
453.1674	2494	3023	453.168
455.0711	1563	0	
	0	1525	455.1097
455.3342	71652	59183	455.3350
457.3510	3402	3188	457.3508
458.3488	1256	1339	458.3477
463.3031	2203	2402	463.3033
465.0999	2155	0	
465.2099	1650	1065	465.2101
468.3910	2661	2447	468.3900
471.0456	1210	0	
	0	1065	471.0893
473.3452	1526	1565	473.3445
482.4068	3458	3479	482.4064
483.3292	1311	1496	483.3298
485.1040	3377	1821	485.1074
487.2723	1094	1047	487.2726
487.3617	2067	1979	487.3609
491.2989	1975	2452	491.2996
496.4215	4474	4233	496.4217

Recuperação de compostos bioativos da alga *Fucus vesiculosus* por ultrafiltração/diafiltração e avaliação da ação biológica em doenças cardiovasculares

500.2111	1191	0	
501.0809	6831	3392	501.0838
501.3278	4768	5252	501.3287
504.3197	1084	0	
507.1923	8253	0	
507.2758	6941	7615	507.2769
	0	1067	507.3304
509.2743	2153	2617	509.2746
511.0287	1178	0	
511.3242	3922	5750	511.3246
512.4165	2287	2547	512.4163
517.305	17082	19782	517.3055
520.2837	1564	1811	520.284
520.9753	3364	0	
522.5987	1690	1896	522.598
525.2421	1802	0	
526.4324	2976	3112	526.4323
529.1752	3089	0	
531.3875	1003	0	
534.2933	1591	2293	534.2944
	0	1078	535.1474
539.3560	3036	2881	539.3567
540.4482	3812	3828	540.4482
542.2687	1027	0	
	0	2131	543.1371
545.4032	1083	1095	545.4042
546.1243	1054	0	
552.0498	1354	0	
556.4433	1585	1891	556.4435
559.3232	1190	1130	559.3248
563.5523	2798	2715	563.5522
569.2678	1676	1956	569.2663
570.4590	2094	2235	570.4588
	0	1484	572.1594
576.4116	1279	0	
579.1612	1088	0	
579.2925	4821	5469	579.2933
581.1508	2845	0	
584.4751	2171	2382	584.4751
	0	3151	586.1696
587.3545	1045	0	
595.1391	1213	0	
595.4193	1848	1923	595.4186
599.0601	1088	0	
600.4700	1322	1285	600.4688
613.1614	2101	0	
614.4848	1319	1499	614.4850
615.0356	5150	0	
620.4375	1405	1716	620.4373
	0	2593	621.1683
628.5008	1531	1662	628.5002
647.0998	2354	0	
653.3655	1171	1700	653.3671
669.2462	3469	0	
672.5273	1010	1014	672.5275
684.2047	6347	5728	684.2044
723.4485	1945	2009	723.4499
807.0655	1038	0	