



Avaliação da Composição e Bioatividade de Algas Comestíveis Comercializadas em Portugal

ANA RITA DUARTE MARÇALO
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, na Área de Especialização de Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Magda Nobre Soares de Carvalho Cardoso Nobre Semedo
Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho

Vogais:

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco
Doutor Nelson Alberto Frade da Silva
Doutora Magda Nobre Soares de Carvalho Cardoso Nobre Semedo

Novembro de 2024

Avaliação da Composição e Bioatividade de Algas Comestíveis Comercializadas em Portugal

ANA RITA DUARTE MARÇALO
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, na Área de Especialização Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Magda Nobre Soares de Carvalho Cardoso Nobre Semedo, ISEL\IPL
Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo, FCT\UNL

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho, ISEL\IPL

Vogais:

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco, ISEL\IPL
Doutor Nelson Alberto Frade da Silva, ISEL\IPL
Doutora Magda Nobre Soares de Carvalho Cardoso Nobre Semedo, ISEL\IPL

Novembro de 2024

Agradecimentos

O financiamento deste trabalho deve-se à Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P. (FCT), Portugal, através das unidades de investigação UIDP / 04035 / 2020 (GeoBioTec), UIDB / 00616 / 2020 e UIDP / 00616 / 2020.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para este trabalho. Em especial, àquelas com quem tive a oportunidade de colaborar e de aprender. Foi uma experiência de grande valor para minha vida.

Aos meus orientadores, Prof.^a Magda Semedo e Prof. Fernando Reboredo, sem o apoio e orientação dos quais, este trabalho não teria sido possível.

À Prof.^a Sónia Martins, que, mesmo não tendo sido oficialmente orientadora, esteve sempre presente, oferecendo uma base sólida de apoio, juntamente com a Prof.^a Magda. A essa dupla maravilhosa, devo muito, tanto como pessoa quanto como profissional.

Agradeço também aos professores Rita Pacheco, Nelson Silva e Diogo Nogueira, pela paciência e compreensão ao permitirem que eu desenvolvesse meu trabalho de mestrado durante as aulas, e a minha ausência como monitora do laboratório de bioquímica para que eu pudesse realizar o meu trabalho em outros institutos.

Às professoras Alexandra Costa, Patrícia Barata e Ana Sofia Figueiredo, estou grata pelo apoio nos ensaios fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Fernando Cardoso do IHMT, agradeço pela paciência em me ensinar os ensaios citotóxicos. E ao Prof. Mauro Guerra e a Ana Marques da NOVA FCT, pelo apoio na utilização do equipamento EDXRF.

Às colegas Maria Inês Chouzende e Mariana Conduto, agradeço pela colaboração nesta jornada que compartilhamos.

Agradeço à Zita e Adelaide, que foram essenciais para o bom funcionamento dos laboratórios, e à Maria Augusta, pelo apoio motivacional na fase final do trabalho.

Por fim, agradeço à minha família pelo suporte emocional e motivacional ao longo de todo o meu percurso acadêmico, em especial ao meu noivo, David Velez.

Declaração de integridade

Declaro que esta(e) dissertação é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

O autor

Ana Nogueira

Lisboa, 11 de Novembro de 2024

Resumo

As macroalgas são importantes recursos marinhos utilizadas na produção de alimentos e fármacos devido aos seus nutrientes e compostos com propriedades benéficas para a saúde, incluindo atividades anti-oxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, anticoagulante e antitumoral.

Contudo, esses organismos possuem capacidade de biorremediação por processos de bioabsorção e bioacumulação, retendo nas suas células compostos tóxicos presentes no meio de cultura, que representam um risco para a saúde do consumidor, invalidando os benefícios previamente identificados.

Neste estudo foram selecionadas cinco algas comestíveis adquiridas em locais de venda ao público de bens alimentares em Portugal: *Undaria pinnatifida* (wakame da China e do Japão), *Laminaria* spp. (kombu da Coreia do Sul e do Japão), e *Porphyra* spp. (nori da China).

A composição elementar foi avaliada por fluorescência de raios X de energia dispersiva obtendo-se teores de K, S, Cl, Ca, Fe, Zn, Br, As, Sr, Cu, P, Si, I e Ni. Os compostos bioativos foram extraídos por três métodos: autoclave (água, 121 °C, 30 minutos), multi-etapas (água fria, água em ebulição, condições alcalinas e ácidas) e micro-ondas (água, KOH, 120 °C, 30 minutos).

Foram quantificados lípidos, carboidratos, proteínas, compostos fenólicos, flavonoides e pigmentos através de espectroscopia UV-Vis.

A atividade anti-oxidante, antibacteriana e o efeito citotóxico dos extratos foram avaliados através de ensaios *in vitro* e a identificação e caracterização parcial dos compostos presentes foram efetuadas por FTIR.

Este trabalho revelou a presença de macro e micronutrientes essenciais, bem como de elementos tóxicos (Sr, Br e As), comprometendo a qualidade e segurança destes alimentos. Contudo, os extratos exibiram atividades antioxidante, antibacteriana e baixa citotoxicidade, demonstrando potencial como alimentos funcionais e aplicação nas indústrias alimentar e biofarmacêutica, desde que desenvolvidas em condições controladas. Assim, para as macroalgas serem resposta às necessidades de soluções sustentáveis e inovadoras para a saúde humana, estas exigem estudos aprofundados da sua composição e propriedades.

Palavras-chave: atividade biológica, citotoxicidade, composição elementar, fluorescência de raios-X, macroalgas.

Abstract

Macroalgae have been valued for a long time for their role in the production of food and pharmaceutical products, due to their rich nutrient content and the presence of compounds known to offer various health benefits, including antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, anticoagulant and antitumor properties.

However, these organisms are capable of bioremediation through bioabsorption and bioaccumulation processes, retaining toxic compounds present in the culture medium within their cells, which may represent a risk to consumer health, thereby invalidating the previously identified benefits.

In this study, five edible seaweeds were selected, sold in the Portuguese market: *Undaria pinnatifida* (wakame from China and Japan), *Laminaria* spp. (kombu from South Korea and Japan), and *Porphyra* spp. (nori from China). The elemental composition was assessed using energy-dispersive X-ray fluorescence, revealing levels of K, S, Cl, Ca, Fe, Zn, Br, As, Sr, Cu, P, Si, I, and Ni.

Bioactive compounds were extracted using three methods: autoclave (water, 121 °C, 30 minutes), multi-step extraction (cold water, boiling water, alkaline and acidic conditions), and microwave-assisted extraction (water, KOH, 120 °C, 30 minutes).

Lipids, carbohydrates, proteins, phenolic compounds and flavonoids were quantified by UV-Vis spectroscopy. *In vitro* assays were performed to evaluate the antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of seaweed extracts and partial characterization of the compounds present were carried out by FTIR.

This study revealed the presence of essential macro- and micronutrients, as well as toxic elements (Sr, Br, and As), which could compromise the quality and safety of these foods. However, the extracts exhibited antioxidant and antibacterial activities and low cytotoxicity, showing potential as functional foods and application in the food and biopharmaceutical industries, as long as they are produced under controlled conditions. Thus, the need for sustainable and innovative solutions for human health requires in-depth studies of the composition and properties of these seaweeds.

Keywords: biological activity, cytotoxicity, elemental composition, macroalgae and X-ray fluorescence.

Divulgação Científica

Do trabalho desenvolvido resultaram as seguintes comunicações em conferências nacionais e internacionais:

1. Ana R. Marçalo, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Alexandra I. Costa, Fernando H. Reboredo, “Avaliação da Composição e Bioactividade de Cinco Algas Comestíveis Comercializadas em Portugal”, 9º Fórum de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 16 a 19 maio de 2023, Lisboa, Comunicação em painel e *flash communication*,
2. Ana R. Marçalo, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Alexandra I. Costa, Fernando M. H. Cardoso, Fernando H. Reboredo, *Composition, nutritive value, and bioactivity of five edible algae sold in the Portuguese market*, *Internacional Meeting Molecules4Life*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 20 a 22 setembro 2023, Vila Real, Comunicação em painel,
3. Ana R. Marçalo, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Alexandra I. Costa, Fernando M. H. Cardoso, Fernando H. Reboredo, *Nutritional Profile and in vitro Biological Activities of Edible Algae from Various Origins Available in the Portuguese Market*, XXVII Encontro Luso-Galego de Química, Centro de Congressos e Exposições da Fundação Dr. António Cupertino de Miranda, 22 a 24 novembro, Porto, Comunicação em painel,
4. Ana R. Marçalo, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Alexandra I. Costa, Fernando M. H. Cardoso, Fernando H. Reboredo, “Macroalgas Marinhas Comestíveis como Potencial Fonte de Alimentos Funcionais”, 10º Fórum de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 7 a 10 maio de 2024, Lisboa, Comunicação em painel e *flash communication*,
5. Ana R. Marçalo, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Alexandra I. Costa, Fernando M. H. Cardoso, Fernando H. Reboredo, “Macroalgas Marinhas Comestíveis Comercializadas em Portugal: Avaliação da sua Composição e Propriedades Bioativas”, 7º Simpósio Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, 29 de maio de 2024, Oeiras, Comunicação em oral.
6. Ana R. Marçalo, Magda C. Semedo, Sónia Martins, Patrícia D. Barata, Alexandra I. Costa, Fernando M. H. Cardoso, Fernando H. Reboredo, “Composição e Bioatividade de Al-

gas Nori, Wakame e Kombu Comercializadas em Portugal”, XXVIII Encontro Galego-Portugués de Química, a realizar de 13 a 15 de novembro de 2024, Vigo, Espanha, Comunicação em painel.

Índice

Resumo	iii
Abstract	v
Divulgação Científica	vii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xviii
Abreviaturas	xxiii
Preâmbulo	1
1 Introdução	5
1.1 Biotecnologia Azul	5
1.2 Produção de Macroalgas no Mundo e em Portugal	7
1.3 Macroalgas	9
1.4 Interesse Comercial das Macroalgas	11
1.5 Composição elementar das Macroalgas	14
1.6 Biocompostos de Macroalgas	16
1.6.1 Lípidos	17
1.6.2 Carboidratos	18
1.6.3 Proteínas	23

1.6.4	Pigmentos	25
1.6.5	Compostos Fenólicos	27
1.7	Métodos de Extração e Quantificação de Biocompostos	31
1.7.1	Extração de Biocompostos	32
1.7.2	Métodos de Quantificação de Biocompostos	34
1.8	Atividade Biológica	42
1.8.1	Atividade Anti-oxidante	42
1.8.2	Atividade Antibacteriana	45
1.8.3	Atividade Citotóxica	48
1.9	Técnicas de Caracterização Estrutural de Biocompostos	50
2	Materiais e Métodos	53
2.1	Reagentes e Material Biológico	53
2.2	Amostras	54
2.3	Métodos	55
2.3.1	Pré-tratamento das amostras	55
2.3.2	Análise Elementar por Espectrometria de Fluorescência de Raio X por Energia Dispersiva (EDXRF)	55
2.3.3	Extração de compostos bioativos	56
2.3.4	Doseamentos de Biocompostos	59
2.3.5	Determinação da Atividade Anti-oxidante	63
2.3.6	Atividade Antimicrobiana	64
2.3.7	Citotoxicidade	65
2.3.8	Caracterização Parcial das Estruturas dos Biocompostos por FTIR	66
3	Resultados e Discussão	67
3.1	Análise Elementar	67
3.1.1	Impacto na Alimentação	75

3.2	Extração de Compostos Bioativos	75
3.3	Quantificação de Biocompostos	79
3.3.1	Lípidos	79
3.3.2	Carboidratos	80
3.3.3	Proteínas	86
3.3.4	Pigmentos	87
3.3.5	Compostos Fenólicos Totais	95
3.4	Atividades Biológicas	98
3.4.1	Atividade Anti-oxidante	98
3.4.2	Atividade Antibacteriana	100
3.4.3	Citotoxicidade	103
3.5	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	109
4	Conclusões e Perspetivas Futuras	115
5	Referências	119
6	Anexos	147
A.1	Curvas de calibração dos doseamentos colorimétricos.	147
A.2	Doseamentos por métodos colorimétricos dos biocompostos	153
A.3	Atividade Antibacteriana	161
A.4	Recursos adicionais de FTIR	166
A.5	Código Python da tabela de FTIR de polissacáridos	167
A.6	Espectros de FTIR	169

Índice de Figuras

1.1	Aplicações da biomassa de alga (adaptado de European Commission, 2022).	6
1.2	Produção Mundial de algas em milhões de toneladas nos períodos de 1950 a 2019 (adaptado de CBI 2022; FAO 2021; European Parliament 2023).	7
1.3	Alga vermelha do género <i>Porphyra</i> spp. - nori (AlgaeBase, M.D. Guiry).	10
1.4	Alga da espécie <i>Undaria pinnatifida</i> - wakame (AlgaeBase, Hideki Haga).	10
1.5	Alga do género <i>Laminaria</i> spp. - kombu (AlgaeBase, Michael Guiry)	11
1.6	Esquema representativo dos principais biocompostos presentes em macroalgas (adaptado de Xie <i>et al.</i> , 2023).	16
1.7	Principais atividades biológicas identificadas em macroalgas (adaptado de Farghali <i>et al.</i> , 2022).	17
1.8	Estrutura química das clorofilas: A – clorofila <i>a</i> ; e B – clorofila <i>b</i> (adaptado de Osório <i>et al.</i> , 2020).	25
1.9	Estrutura química da fucoxantina (adaptado de Lourenço-Lopes <i>et al.</i> , 2022).	26
1.10	Estrutura química de ficobiliproteínas (adaptado de Tounsi <i>et al.</i> , 2023).	27
1.11	Exemplos de compostos fenólicos (adaptado de Santos <i>et al.</i> , 2019).	28
1.12	Estruturas de flavonoides (adaptado de Ferdous <i>et al.</i> , 2021 e Shraim <i>et al.</i> , 2021)	30
1.13	Reação simplificada de DNS com açúcares redutores (adaptado de Deshavath <i>et al.</i> , 2020).	36
1.14	Reações do método do fenol-ácido sulfúrico com glucose (adaptado de Wiley 2005).	36
1.15	Estrutura química do corante Congo <i>red</i> (adaptado de Merck, 2024).	37
1.16	Estrutura do corante Azul de Coomassie G-250 (adaptado de Merck, 2024).	38

1.17	Reações do método de Folin-Ciocalteu (adaptado de Sánchez-Rangel <i>et al.</i> , 2013)	41
1.18	Formação do complexo ácido estável do método do cloreto de alumínio (adaptado de Sharaim <i>et al.</i> , 2021).	42
1.19	Mecanismos patológicos derivados do <i>stress</i> oxidativo (adaptado de Wei <i>et al.</i> , 2023).	43
1.20	Esquema da reação do método do radical catiónico ABTS (adaptado de Schaich <i>et al.</i> , 2015).	45
1.21	Esquema reacional do método da capacidade quelante dos iões Fe ²⁺ (adaptado de Canabady-rochelle <i>et al.</i> , 2015).	45
1.22	Redução da resazurina a resorufina na presença oxidorredutases produzidas por células viáveis (adaptado de Csepregi <i>et al.</i> , 2018).	48
1.23	Redução do MTT a formazan na presença de oxidorredutases produzidas por células viáveis (adaptado de Berridge <i>et al.</i> , 1993).	50
2.1	Esquema do método de extração por multi-etapas aplicado às amostras das algas em estudo.	58
3.1	Suspensão de extração sólido-líquido após extração assistida por autoclave.	76
3.2	Extratos obtidos para amostras em estudo, através dos três métodos de extração aplicados (MSE, AAE e MAE).	77
3.3	Quantificação de lípidos nos extratos de AAE e nas frações de MSE obtidos a partir das algas em estudo pelo método do SPV (ND – Não detetado, <i>n</i> = 3).	79
3.4	Quantificação de açúcares redutores nos extratos de AAE e de MSE das algas em estudo, através do método do DNS (<i>n</i> = 3).	81
3.5	Quantificação de carboidratos totais nos extratos de AAE e MSE das algas em estudo através do método do fenol-ácido sulfúrico (<i>n</i> = 3).	82
3.6	Quantificação de polissacáridos sulfatados nos extratos de AA e, MSE das algas em estudo através do método do azul de toluidina (<i>n</i> = 3).	83
3.7	Quantificação de polissacáridos ácidos nos extratos de AAE e MSE das algas em estudo, através do método carbazol-ácido sulfúrico (<i>n</i> = 3).	85
3.8	Quantificação de proteína total nos extratos de AAE, MAE e MSE das algas em estudo, pelo método de Bradford (<i>n</i> = 3).	86

3.9	Extratos obtidos por maceração com acetona das macroalgas estudadas, utilizados na quantificação dos pigmentos.	88
3.10	Quantificação de clorofilas nos extratos obtidos para a alga nori (ND - Não Detetado).	88
3.11	Quantificação de clorofilas nos extratos obtidos para as algas wakame (UPC e UPJ).	89
3.12	Quantificação de clorofilas nos extratos obtidos para as algas kombu (LLJ e KK) (ND - Não Detetado.	89
3.13	Quantificação de carotenoides extratos obtidos para a alga nori (ND - Não Detetado).	90
3.14	Quantificação de carotenoides extratos obtidos para as algas wakame (ND - Não Detetado).	91
3.15	Quantificação de carotenoides extratos obtidos para as algas kombu (ND - Não Detetado).	91
3.16	Quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos AAE e MSE das algas em estudo, pelo método de Foli Ciocalteu (ND – Não detetado, $n = 3$).	96
3.17	Quantificação de flavonoides totais nos extratos AAE e MSE de todas as algas estudadas, pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (ND – Não detetado, $n = 3$).	97
3.18	Atividade antioxidante dos extratos AAE e MSE (5 mg/mL) das algas em estudo, expressa em % de inibição de ABTS ^{•+} , utilizando ácido ascórbico, trolox, ácido gálico, ácido poligalacturónico e BHT como controlos positivos (ND – Não detetado, $n = 3$).	98
3.19	Atividade antioxidante determinada pelo método do ABTS ^{•+} dos extratos AAE e MSE das algas estudadas, expressa em mg TE por g de amostra (ND – Não detetado, $n = 3$).	99
3.20	Capacidade quelante de iões Fe ²⁺ dos extratos das algas estudadas, utilizando EDTA (2 mg/ mL) como controlo positivo, expressa em percentagem ($n = 3$).	100
3.21	Microplacas de 96 poços onde foi realizado o método da microdiluição em meio líquido com resazurina, para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos NC(AAE) e UPC(FHCl) contra <i>Escherichia coli</i> e do extrato UPC(FHCL) contra <i>Staphylococcus aureus</i>	103
3.22	Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra NC, contra as linhas celulares: A - Vero, B - 3T3, C - S180, D - HeLa, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).	104

3.23	Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra UPC, contra as linhas celulares: A - Vero, B - 3T3, C - S180, D - HeLa, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).	105
3.24	Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra UPJ, contra as linhas celulares: A - Vero, B - 3T3, C - S180, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).	106
3.25	Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra LLJ, contra as linhas celulares: A - Vero, B - 3T3, C - S180, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).	107
3.26	Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra KK, contra as linhas celulares: A - Vero, B - 3T3, C - S180, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).	108
3.27	Espectros de FTIR dos extratos AAE das algas estudadas, em pastilha de KBr.	109
3.28	Espectros de FTIR das frações FW1 de MSE das algas estudadas, em pastilha de KBr.	110
3.29	Espectros de FTIR das frações FW2 de MSE das algas estudadas, em pastilha de KBr.	111
3.30	Espectros de FTIR das frações FKOH de MSE das algas estudadas, em pastilha de KBr.	112
3.31	Espectros de FTIR das frações FHCl de MSE das algas estudadas, em pastilha de KBr.	113
3.32	Espectros de FTIR das frações FNaOH de MSE das algas estudadas, em pastilha de KBr.	114
A.1	Curva de calibração do óleo de canola para o método do SPV para a quantificação de lípidos ($n = 3$).	147
A.2	Curva de calibração da glucose para o método DNS para a quantificação de açúcares redutores ($n = 3$).	148
A.3	Curva de calibração de ácido poligalacturónico para o método fenol ácido sulfúrico para a quantificação de carboidratos totais ($n = 3$).	148
A.4	Curva de calibração de sulfato de dextrano para o método com azul de toluidina para a quantificação de polissacáridos sulfatados ($n = 3$).	149
A.5	Curva de calibração de ácido D-galacturónico para o método Carbazol ácido sulfúrico para a quantificação de polissacáridos ácidos ($n = 3$).	149

A.6	Curva de calibração de β -1,3-D-glucano de cevada para o método do corante Congo red para a quantificação de β -1,3-D-glucano ($n = 3$).	150
A.7	Curva de calibração da BSA para o método de Bradford para a quantificação de proteína total ($n = 3$).	150
A.8	Curva de calibração de ácido gálico para o método de Folin Ciocalteu para a quantificação de compostos fenólicos totais ($n = 3$).	151
A.9	Curva de calibração de catequina para o método do cloreto de alumínio para a quantificação de compostos flavonoides totais ($n = 3$).	151
A.10	Curva de calibração de trolox para o método de descoloração do radical catiónico ABTS ($n = 3$).	152
A.11	Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra NC estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: A - <i>E. coli</i> , B - <i>S. aureus</i> ($n = 3$).	161
A.12	Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra UPC estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: A - <i>E. coli</i> , B - <i>S. aureus</i> ($n = 3$).	162
A.13	Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra UPJ estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: A - <i>E. coli</i> , B - <i>S. aureus</i> ($n = 3$).	163
A.14	Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra LLJ estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: A - <i>E. coli</i> , B - <i>S. aureus</i> ($n = 3$).	164
A.15	Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra KK estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: A - <i>E. coli</i> , B - <i>S. aureus</i> ($n = 3$).	165
A.16	Espectro FTIR da amostra NC(AAE).	169
A.17	Espectro FTIR da amostra UPC(AAE).	169
A.18	Espectro FTIR da amostra UPJC(AAE).	170
A.19	Espectro FTIR da amostra LL(AAE).	170
A.20	Espectro FTIR da amostra KK(AAE).	171
A.21	Espectro FTIR da amostra NC(FW1).	171
A.22	Espectro FTIR da amostra UPC(FW1).	172

A.23 Espectro FTIR da amostra UPJ(FW1).	172
A.24 Espectro FTIR da amostra LLJ(FW1).	173
A.25 Espectro FTIR da amostra KK(FW1).	173
A.26 Espectro FTIR da amostra NC(FW2).	174
A.27 Espectro FTIR da amostra UPC(FW2).	174
A.28 Espectro FTIR da amostra UPJ(FW2).	175
A.29 Espectro FTIR da amostra LLJ(FW2).	175
A.30 Espectro FTIR da amostra KK(FW2).	176
A.31 Espectro FTIR da amostra NC(FKOH).	176
A.32 Espectro FTIR da amostra UPC(FKOH).	177
A.33 Espectro FTIR da amostra UPJ(FKOH).	177
A.34 Espectro FTIR da amostra LLJ(FKOH).	178
A.35 Espectro FTIR da amostra KK(FKOH).	178
A.36 Espectro FTIR da amostra NC(FHCl).	179
A.37 Espectro FTIR da amostra UPC(FHCl).	179
A.38 Espectro FTIR da amostra UPJ(FHCl).	180
A.39 Espectro FTIR da amostra LLJ(FHCl).	180
A.40 Espectro FTIR da amostra KK(FHCl).	181
A.41 Espectro FTIR da amostra NC(FNaOH).	181
A.42 Espectro FTIR da amostra UPC(FNaOH).	182
A.43 Espectro FTIR da amostra UPJ(FNaOH).	182
A.44 Espectro FTIR da amostra LLJ(FNaOH).	183
A.45 Espectro FTIR da amostra KK(FNaOH).	183

Índice de Tabelas

1.1	Limite máximo de metais tóxicos, em mg por kg de algas secas comestíveis para consumo humano, definidos em França (Edible Seaweed-French & European Regulation, 2014).	15
1.2	Valores máximos para elementos em mg/kg em alimentos (<i>Codex Alimentarius</i> Commission, 1995).	15
1.3	Resumo dos polissacáridos mais comuns encontrado e respetivas estruturas gerais encontrados em macroalgas (adaptado de Foroughi <i>et al.</i> , 2024).	19
2.1	Identificação dos acrónimos atribuídos às amostras das macroalgas estudadas.	54
2.2	Valores nutricionais das macroalgas estudadas por 100 g de amostra indicados na embalagem comercial (ND - Não Determinado).	55
2.3	Limites de deteção para amostras vegetais determinados pelos padrões: folhas de orquídea (NBS 1571) e folhas de álamo (GBW 07604) com valores de recuperação entre 93 % e 113 % (Reboredo <i>et al.</i> , 2021).	56
3.1	Resultados da análise elementar por EDXRF de bancada da matriz inicial, frase sólida de AAE e MSE de todas as algas estudadas em mg/kg (ND – Não detetado ou inferior ao limite de deteção).	70
3.2	Conteúdo elementar de algas kombu de provenientes de diferentes áreas geográficas em mg/kg (ND – Não detetado).	71
3.3	Conteúdo elementar de algas wakame de provenientes de diferentes áreas geográficas em mg/kg (ND – Não detetado).	71
3.4	Conteúdo elementar de algas nori de provenientes de diferentes áreas geográficas em mg/kg (ND – Não detetado).	72
3.5	Percentagem de perda de minerais para a fração líquida de extração das algas estudadas em percentagem mássica (ND – Não detetado ou inferior ao limite de deteção).	74

3.6 Dose diária recomendada para adultos em mg/dia (Decreto-Lei da República Portuguesa N° 54/2010).	75
3.7 Concentração em mg/mL e respetivos rendimentos dos extratos obtidos por AAE.	77
3.8 Concentração em mg/mL dos extratos obtidos por MSE.	78
3.9 Quantificação de lípidos nos extratos NC por MAE pelo método do SPV.	80
3.10 Quantificação de açúcares redutores nos extratos NC por MAE através do método do DNS.	81
3.11 Quantificação de carboidratos totais nos extratos NC por MAE através do método do fenol-ácido sulfúrico.	82
3.12 Quantificação de polissacáridos sulfatados nos extratos NC por MAE através do método do azul de toluidina.	84
3.13 Quantificação de polissacáridos ácidos nos extratos NC por MAE, através do método carbazol-ácido sulfúrico.	85
3.14 Quantificação de β -1,3-D-glucanos nas macroalgas em estudo, através do método do corante Congo <i>red</i>	86
3.15 Quantificação de proteínas totais nos extratos NC por MAE, pelo método de Bradford.	87
3.16 Quantificação de ficobiliproteínas dos extratos AAE, MSE e MAE da alga nori estudada (ND - Não Detetado).	93
3.17 Quantificação de ficobiliproteínas dos extratos AAE, MSE e MAE das algas wakame estudada (ND - Não Detetado.	94
3.18 Quantificação de ficobiliproteínas dos extratos AAE, MSE e MAE das algas kombu estudada.	95
3.19 Quantificação de compostos fenólicos totais dos extratos MAE das algas nori estudada, pelo método de Foli Ciocalteu.	96
3.20 Quantificação de flavonoides totais dos extratos MAE das algas nori estudada, pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio.	97
3.21 Atividade antioxidante determinada pelo método do ABTS ^{•+} dos extratos MAE da alga nori, expressa em mg TE por g de amostra.	99
3.22 Valores MIC dos extratos obtidos por AAE e MSE das algas nori, wakame (UPC e UPJ) e kombu (LLJ e KK) e aplicados no estudo da atividade antibacteriana contra <i>E. coli</i> determinados pelo método de microdiluição em meio líquido. . . .	101

3.23	Valores MIC dos extratos obtidos por AAE e MSE das algas nori, wakame (UPC e UPJ) e kombu (LLJ e KK) e aplicados no estudo da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> , determinados pelo método de microdiluição em meio líquido.	101
A.1	Doseamentos por métodos colorimétricos dos extratos AAE de todas as algas estudadas (ND – Não detetado).	154
A.2	Doseamentos de lípidos, proteínas, compostos fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante para os extratos MSE de todas as algas estudadas (ND – Não detetado).	155
A.3	Doseamentos de carboidratos os extratos MSE de todas as algas estudadas (ND – Não detetado).	156
A.4	Doseamentos por métodos colorimétricos dos extratos MAE da alga nori.	157
A.5	Quantificação de clorofilas dos extratos acetona, AAE, MSE e MAE da alga nori estudada (ND - Não Determinado).	157
A.6	Quantificação de clorofilas dos extratos acetona, AAE e MSE da alga wakame estudada (ND - Não Determinado).	158
A.7	Quantificação de clorofilas dos extratos acetona, AAE e MSE da alga kombu estudada (ND - Não Determinado).	158
A.8	Quantificação de carotenoides totais e fucoxantina dos extratos acetona, AAE, MSE e MAE da alga nori estudada (ND - Não Determinado).	159
A.9	Quantificação de carotenoides totais e fucoxantina dos extratos acetona, AA e, MSE da alga wakame estudada (ND - Não Determinado).	159
A.10	Quantificação de carotenoides totais e fucoxantina dos extratos acetona, AA e, MSE da alga wakame estudada (ND - Não Determinado).	160
A.11	Quadro de atribuições de bandas de FTIR para a caracterização de polissacáridos (Hong <i>et al.</i> , 2021; Delattre <i>et al.</i> , 2016 e Esther <i>et al.</i> , 2020).	166

Abreviaturas

- AAE** *Autoclave Assisted Extraction* – Extração Assistida por Autoclave
- ABTS** 2,2'-Azino-bis-(ácido 3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
- ABS** Absorvância
- BHT** Butil-hidroxi-tolueno
- CAE** Catechin equivalents – Equivalentes de catequina
- DDR** Dose Diária Recomendada
- DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Meio Dulbecco Modificado por Eagle
- DMSO** *Dimethyl sulfoxide* – Dimetilsulfóxido
- DNS** 3,5-dinitrosalicylic acid – ácido 3,5-dinitrosalicílico
- EDTA** *Ethylenediamine tetraacetic acid* – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EDXRF** *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry* – Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva
- ELISA** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- et al.** *Et alia* (origem do latim, referência a outros)
- FBS** *Fetal bovine serum* – Soro bovino fetal
- FDA** *Food and Drug Administration* – Autoridade Reguladora do Medicamento dos Estados Unidos
- FHCI** Fração de extração MSE com solução aquosa de ácido clorídrico 0.6 M
- FNaOH** Fração de extração MSE com solução aquosa de hidróxido de sódio 1M
- FTIR** *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
- FKOH** Fração de extração MSE com solução aquosa de hidróxido de potássio 1M
- FSAAE** Fração sólida de AAE

FSMAE Fração sólida de MAE

FSMSE Fração sólida de MSE

FW1 Fração de extração MSE com água à temperatura ambiente

FW2 Fração de extração MSE com água em ebulição

GAE *Gallic acid equivalents* – Equivalentes de ácido gálico

GC *Gas chromatography* - Cromatografia Gasosa

GC-MS *Gas Chromatography with Mass Spectrometry* - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

HAT *Hydrogen Atom Transfer* – Transferência de átomos de Hidrogénio

HPLC *High-Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

iAs *Inorganic Arsenic* – Arsénio Inorgânico

IM-MS *Ion Mobility Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massa com Mobilidade Iónica

KK Kombu Korea – Kombu Coreia

LC *Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida

LLJ *Laminaria* spp. Japão

LC-MS *Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry* - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

LC-PDA *Liquid Chromatography with Photodiode Array*

LC-UV-Vis *Liquid Chromatography with UV-Vis* - Cromatografia Líquida com detecção UV-Vis

MAE *Microwave Assisted Extraction* - Extração Assistida por Micro-Ondas

MIC *Minimal Inhibitory Concentration* - Concentração mínima inibitória

MSE *Multi-Step Extraction* – Método de extração de multietapas

MSI *Mass Spectrometry Imaging* – Espectrometria de Massa por Imagem

MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MHB Mueller Hinton *Broth* – Meio Mueller Hinton

MHA Mueller Hinton Agar – Agar Mueller Hinton

NC Nori China – *Porphyra umbilicalis*

ND Não Detetado

NMR *Nuclear Magnetic Resonance* - Ressonância Magnética Nuclear

- oAS** *Organic Arsenic* - Arsénio Orgânico
- PBS** *Phosphate-Buffered Saline* – Tampão fosfatos salino
- QE** *Quercetin Equivalents* – Equivalentes de Quercetina
- RE** *Rutin Equivalents* – Equivalentes de Rutina
- REIMS** *Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massa por Ionização Rápida por Evaporação Induzida por Laser
- RNS** *Reactive Nitrogen Species* – Espécies reativas de Nitrogénio
- ROS** *Reactive Oxygen Species* – Espécies reativas de oxigénio
- SDS-PAGE** *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis* – eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
- SET** *Single electron transfer* – Transferência de eletrão
- SPV** *Sulfo-Phospho-Vanillin* – Sulfo-Fosfo-Vanilina
- TE** *Trolox Equivalent* – Equivalentes de Trolox
- TLC** *Thin Layer Chromatography* - Cromatografia em Camada Fina
- UE** União Europeia
- UFC** Unidades formadoras de colónias
- UPC** *Undaria pinnatifida* China
- UPJ** *Undaria pinnatifida* Japão
- UV** Espectroscopia de Ultravioleta
- UV-Vis** Espectroscopia de Ultravioleta-visível
- XRF** *X-Ray Fluorescence Spectrometry* – Espectrometria de Fluorescência de Raios X

Preâmbulo

As macroalgas são um abundante recurso marinho que apresentam grande potencial como fonte de matérias-primas para diversas indústrias. Devido à sua composição bioquímica, exibem várias propriedades com efeitos preventivos e benéficos para a saúde, nomeadamente atividades anti-oxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, anticoagulante e antitumoral, podendo assim ser consideradas “superalimentos” (Osório *et al.*, 2020).

Dadas as suas propriedades, aliadas à crescente consciencialização do público para a saúde e bem-estar em conjunto com o desenvolvimento de novas aplicações por parte da indústria, as macroalgas são alvo de crescente procura e investigação (Adarshan *et al.*, 2024).

No seu ambiente natural, a presença de macroalgas no oceano é um bom indicador da saúde ecológica, estando correlacionada com um baixo nível de poluição (Leandro *et al.*, 2020).

Devido ao facto de as macroalgas terem a capacidade de biorremediação através de processos de bioabsorção e bioacumulação, retendo nas suas células compostos tóxicos presentes no meio onde se desenvolvem, como por exemplo, os metais pesados ou compostos orgânicos presentes no meio, quando utilizadas para consumo humano podem representar um risco potencial para a saúde, tendo sido detetadas quantidades consideráveis de metais pesados em diversas espécies comestíveis (Circuncisão *et al.*, 2018).

Assim torna-se imperativo perceber se existe uma lacuna no controlo na produção e comercialização de macroalgas.

Existem esforços da UE em incentivar os produtores deste sector de forma a promover a economia e desenvolver soluções sustentáveis para problemas atuais; desde a produção de energia e biomateriais até a descoberta de novos fármacos, contudo é praticamente inexistente legislação que limite a concentração de metais pesados em macroalgas; as medidas atualmente já implementadas são, de grosso modo, inconsequentes (European Commission, 2022).

Como consumidora deste tipo de produto e como aluna de mestrado interessada em explorar as macroalgas pelas suas propriedades e tendo já participado em outro projeto com foco em macroalgas, acredito no seu potencial já muito comprovado. Reforço, no entanto, a importância da investigação e elaboração de legislação mais responsável sobre esta problemática. Espero com este trabalho ter uma contribuição positiva para a adoção das macroalgas como alimento, explorando métodos capazes de aferir as suas propriedades benéficas, bem como capazes de

identificar potenciais riscos do seu consumo; métodos estes que poderão ser utilizados para o controlo do que chega às nossas prateleiras, promovendo a segurança do seu consumo.

Este trabalho final de mestrado teve como objetivo estudar macroalgas comercializadas em Portugal ao nível da sua composição bioquímica e propriedades bioativas com vista a compreender o seu valor como superalimento, para isso os teores de lípidos, proteínas, carboidratos, pigmentos, flavonoides e compostos fenólicos, foram quantificados através de métodos colorimétricos, a composição elementar através de espectrometria. Para avaliar o seu potencial biológico averiguaram-se as atividades anti-oxidante, antibacteriana e citotóxica.

Este trabalho iniciou-se em setembro de 2022, através da pesquisa de suplementos alimentares à base de macroalgas e cogumelos, disponíveis no mercado português, em locais de venda ao público de bens alimentares.

Devido ao processo de bioremediação o local de produção e/ou recolha influencia o conteúdo de elementos minerais, pelo que a exposição a ambientes poluídos pode resultar num elevado nível de bioacumulação. Esta consideração é especialmente importante devido à crescente preocupação com contaminação dos alimentos por metais tóxicos tais como arsénio e chumbo. Torna-se assim relevante comparar amostras de origens diferentes da mesma espécie, comparando o conteúdo mineral observado e permitindo assim concluir se existe diferenciação entre as mesmas. Como tal, o local de origem considerou-se fulcral e excluíram-se amostras que não detalhavam esta informação.

Observou-se que na maioria, os suplementos não detalhavam a origem de cultivo da sua matéria-prima, isto resultou em que as amostras de suplementos fossem substituídas pela matéria-prima principal, ou seja o alimento na sua forma integral e de preferência desidratada.

O trabalho experimental foi iniciado em dezembro de 2022 com uma vasta coleção de macroalgas com origem de cultivo explícita. Após uma análise preliminar da composição elementar por espectrometria de fluorescência de raio X (XRF), realizada com um equipamento portátil no Departamento de Ciências da Terra da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, tendo-se verificado nas macroalgas quantidades mais significativas de arsénio, cobalto e estrôncio. Atendendo também à necessidade de limitar o número de amostras a uma quantidade razoável para fins práticos, optou-se por cingir o restante estudo às amostras de macroalgas.

Do conjunto de amostras de macroalgas disponíveis, selecionaram-se as algas castanhas wakame e kombu, por se dispor de amostras com origens diferentes, e a alga nori de forma a incluir também uma alga vermelha.

No início de 2023 foram realizados os doseamentos dos biocompostos com valor nutricional e atividade biológica, tais como: proteínas, carboidratos e lípidos, compostos fenólicos e flavonoides. Os ensaios de atividade anti-oxidante e antibacteriana e do efeito citotóxico foram realizados após a caracterização das amostras.

Os ensaios antibacterianos foram conduzidos no laboratório do Centro de Estudos de Enge-

nharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa e os ensaios de citotoxicidade foram realizados em parceria com o com o grupo *TB, HIV and opportunistic diseases and pathogens* do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, sendo concluídos em junho de 2024. Em paralelo, os ensaios de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizados no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa para complementar os do-seamentos de polissacáridos uma vez que, por meio desta técnica, foi possível caracterizar parcialmente as estruturas dos biocompostos, identificando as cinco regiões características dos polissacáridos e as bandas relativas ao carbono anomérico, complementando assim o do-seamento dos glucanos, que foi uma determinação seletiva para a conformação β .

Houve ainda a necessidade de realizar novas determinações de análise elementar por espectrometria de fluorescência de raio X (EDXRF), utilizando um equipamento de bancada mais sensível. Estes ensaios foram realizadas entre janeiro e junho de 2024 no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Biotecnologia Azul

A biotecnologia azul é a biotecnologia que estuda os recursos aquáticos e marinhos, de forma a descobrir soluções inovadoras para criar produtos e aplicações industriais, nomeadamente biocompostos com alto valor acrescentado (Tramper, 2003).

Atualmente a União Europeia (UE) está a tomar medidas para fortalecimento do setor de exploração de algas, uma vez que estas são fonte de matéria-prima e energia sustentável (European Commission, 2022). Fatores como o crescimento da população mundial, a escassez dos recursos e as pressões ambientais reforçam a necessidade de inovação dos sistemas alimentares e económicos. A resposta poderá ser encontrada nos oceanos, onde os recursos são vastos e até agora pouco explorados, dado que cerca de 70 % do planeta é coberto por mares onde apenas 2 % é utilizado para alimentação humana (Gurria *et al.*, 2022).

Uma vez identificado o potencial dos produtos do mar a estratégia do "Prado ao Prato" destaca o papel das algas como uma importante fonte de proteínas que contribui para um sistema alimentar sustentável (European Commission, 2019). Desta forma as estratégias para uma aquicultura sustentável e competitiva na UE para o período de 2021 a 2030 reiteram a necessidade de promover o cultivo de algas de forma a cumprir vários objetivos do Pacto Ecológico Europeu, bem como concretizar objetivos da UE para a descarbonização, poluição zero, circularidade, preservação e restauro da biodiversidade, proteção dos ecossistemas e desenvolvimento de serviços ambientais.

Para além disso as algas podem ser utilizadas para substituir produtos de origem fóssil e servir de matéria-prima para bioestimulantes na agricultura e produção de produtos químicos. A Figura 1.1 esquematiza as várias oportunidades de exploração da biomassa de algas.

A coligação Seaweed for Europe estima que a procura europeia de algas marinhas poderá atingir 8 milhões de toneladas e atingir um valor de 9 mil milhões de € em 2030 em todos os setores, principalmente para o setor alimentar, quer seja para consumo humano ou animal. Este

aumento da procura, caso seja correspondido em termos de produção, poderá criar cerca de 85 000 postos de trabalho, remover anualmente milhares de toneladas de fósforo e azoto dos mares europeus, atenuar até 5,4 milhões de toneladas de emissões de CO₂ por ano e aliviar a pressão sobre os solos (European Commission, 2022). O volume de negócio a nível mundial de produtos à base de algas está a aumentar devido à consciencialização dos seus benefícios aliada à procura de um estilo de vida e alimentação mais saudável por parte do público em geral.

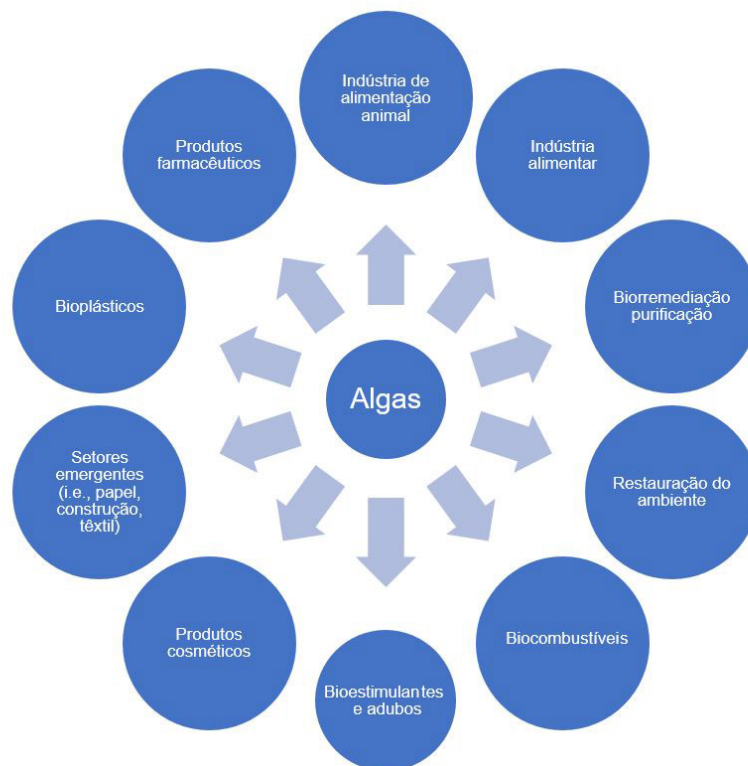


Figura 1.1 Aplicações da biomassa de alga (adaptado de European Commission, 2022).

Para que em 2030 a UE atinja os objetivos a que se propõe esta deve superar os obstáculos identificados pela Roadmap for the Blue Bioeconomy publicado pelo Fórum da Bioeconomia Azul em 2019, que identificou obstáculos em quatro domínios principais (European Commission, 2022):

1. Política, ambiente e regulamentação,
2. Finanças e desenvolvimento das empresas,
3. Consumidores e cadeias de valor,
4. Ciência, tecnologia e inovação.

Relativamente à ciência, tecnologia e inovação destaca-se a necessidade de desenvolver equipamentos e tecnologias que permitem aumentar a produção à escala industrial obtendo biomassa de qualidade. Encontra-se a necessidade de desenvolver sistemas de cultivo, sondas

de monitorização com sistema de controlo entre outros que permita reduzir a perda de biomassa e custo de mão de obra. Será importante inovar processos de *downstream* como é o caso das biorrefinarias de grande escala (European Commission, 2022).

1.2 Produção de Macroalgas no Mundo e em Portugal

Desde a década de 1990, a produção mundial de algas tem aumentado exponencialmente. Entre 2015 e 2019, os valores de produção mundial têm crescido gradualmente, conforme a Figura 1.2 (CBI 2022; FAO 2021; European Parliament 2023).

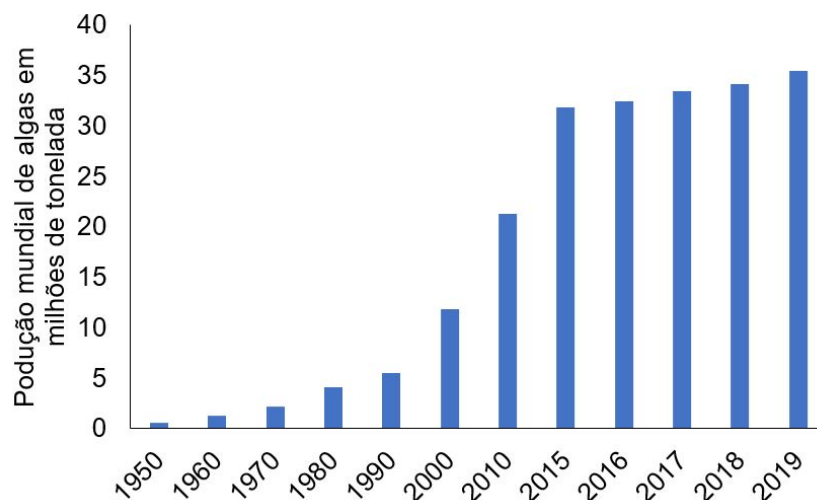


Figura 1.2 Produção Mundial de algas em milhões de toneladas nos períodos de 1950 a 2019 (adaptado de CBI 2022; FAO 2021; European Parliament 2023).

A partir do século XXI, a produção mundial de algas tem vindo a aumentar, atingindo 13,9 milhões de toneladas em 2004, com um valor de 6,8 mil milhões de US\$ (FAO 2007). Segundo o Instituto Português do Mar e da Atmosfera, a produção mundial de macroalgas em 2016 foi avaliada em 10,6 mil milhões de \$. Foi estimado para 2023 que o valor do mercado europeu ao nível de produtos à base de algas atinge-se 1240 milhões de € e um valor total mundial de 4810 milhões de € (Mendes *et al.*, 2022). As algas marinhas mais produzidas mundialmente são (FAO, 2007):

1. Kombu (*Laminaria* spp.), com 4,5 milhões de toneladas,
2. Wakame (*Undaria pinnatifida*), com 2,5 milhões de toneladas,
3. Nori (*Porphyra* spp.), com 1,3 milhões de toneladas.

O mercado europeu verificou um aumento de 147 % entre 2011 a 2015, devido ao crescente interesse pelo consumo de refeições mais saudáveis e nutritivas, levando assim à procura de alimentos e bebidas contendo algas marinhas, como kombu, nori e wakame. Durante esse período, a Europa conseguiu desenvolver e lançar novos produtos no mercado com sucesso,

superando outras regiões, como a América, mas sem ultrapassar a Ásia, que continua como grande produtora e consumidora de algas (Mintel, 2016).

As algas nori e wakame são mais produzidas para consumo humano, especialmente no extremo Oriente. As algas kombu são produzidas tanto para alimentação quanto para a produção de alginato (Mouritsen, 2013; Pereira, 2016; Leite, 2017). No entanto, nos últimos anos, têm sido aprovadas para consumo cada vez mais espécies pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, com o objetivo de estimular o interesse dos produtores deste setor (Mendes *et al.*, 2022; El-Ramady *et al.*, 2022).

Os países líderes de produção na Europa (França, Irlanda, Noruega e Espanha) apresentam um volume de negócio anual combinado de 147 milhões de €, destes, 68% correspondem a venda de macroalgas, 17% de microalgas e 11% de *Spirulina* (European Parliament, 2023, Mendes *et al.*, 2022; El-Ramady *et al.*, 2022).

O interesse industrial nas macroalgas reflete-se na existência de cerca de 420 empresas de produção de algas marinhas na Europa, das quais 36% são focadas na produção de macroalgas (Mendes *et al.*, 2022).

A Associação Portuguesa de Produtores de Algas é uma associação de direito privado, sem fins lucrativos, com personalidade jurídica, que tem como objetivo a promoção, a defesa e a dinamização dos interesses dos produtores de microalgas e macroalgas. Atualmente, já existem diversas empresas portuguesas a produzir algas, designadamente: (Associação Portuguesa de Produtores de Algas, 2024).

NECTON



A NECTON (Companhia Portuguesa de Culturas Marinhas S.A.) é uma empresa portuguesa localizada em Olhão, especializada na produção de microalgas e sal marinho tradicional. Surgiu em 1997 como um projeto na Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, com o objetivo inicial de produção de macroalgas. Ao longo da sua evolução, a empresa conquistou vários prêmios e reconhecimentos que lhe permitiram expandir as instalações e melhorar projetos. A NECTON possui certificações ISO 9001 e 22000 para qualidade alimentar, certificação de Sustentabilidade (Ecovadis) e certificação de produção biológica. Recentemente, em 2023, adquiriu a Allmicroalgae, uma empresa especializada em microalgas (Necton, 2024).

Alga+



A Alga+ é uma empresa situada em Ílhavo, especializada no cultivo sustentável de macroalgas. Criada em 2011 lançou no mercado, em 2013, produtos de sal com algas. No ano seguinte, passou a comercializar algas desidratadas e produtos com fins cosméticos utilizando algas marinhas da Ria de Aveiro. Continuou a lançar novos alimentos no mercado com algas, obtendo a certificação BIO (Kiwa Sativa) em 2015. Encontra-se em constante expansão e desenvolvimento de novos sistemas de cultivo (Alga+, 2024).

A Iberagar é uma empresa especializada em macroalgas para o setor dos hidrocolóides. Após a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), o Japão enfrentava uma situação delicada e procurava alternativas no fornecimento de produtos, incluindo o agar. Naquela época, a produção de hidrocolóides era emergente na Europa, países como Portugal, Espanha e França começam a desenvolver-se neste setor. Em Portugal, a primeira fábrica de agar, fundada em 1964 pela Iberagar em Alverca do Ribatejo, surgiu para colmatar essa necessidade do mercado. Atualmente é especializada na colheita e transformação da alga dos géneros *Gelidium* e *Gracilaria* para produzir agar (Iberagar, 2024).

1.3 Macroalgas

As algas são o maior grupo primitivo fotoautotrófico eucariotas e realizam mais de 50% da fotossíntese do planeta. Englobam um conjunto complexo e heterogéneo de organismos caracterizados pela sua natureza fotossintética e estruturas reprodutivas simples, e dividem-se em macroalgas e microalgas (Menaar *et al.*, 2021).

As macroalgas são organismos multicelulares de crescimento rápido e podem atingir comprimentos de até 70 metros. São abundantes nos oceanos e encontram-se em zonas costeiras, podendo fixar-se a rochas ou a outras superfícies sólidas ou manterem-se na sua forma livre (Cesário *et al.*, 2018).

São classificadas com base nas suas características químicas e morfológicas, em particular pela presença de pigmentos específicos que se reflete na sua cor, e estão distribuídas pelos filos: *Chlorophyta* (algas verdes), *Rhodophyta* (algas vermelhas) e *Phaeophyceae* (algas castanhas). As algas verdes produzem xantofilas e clorofilas *a* e *b* como pigmentos, que lhes confere a tonalidade verde. As algas vermelhas possuem pigmentos responsáveis pela cor avermelhada, como a ficoeritrina, além de produzirem clorofilas *a* e *b* e carotenoides. E as algas castanhas, onde foram identificados pigmentos como a fucoxantina, clorofilas *a* e *c*, e carotenoides (Ki, 2013).

A presença de macroalgas nos oceanos pode servir como bioindicador de qualidade da água e algumas têm a capacidade de biorremediação através da adsorção e bioacumulação de contaminantes presentes no meio aquático onde se desenvolvem (Leandro *et al.*, 2020).

Devido à sua resiliência, estas conseguiram adaptar-se a meios hostis com mudanças de temperatura, salinidade, exposição a radiação ultravioleta (UV) e poluição. Essa adaptabilidade faz com que as macroalgas sintetizem metabolitos secundários tais como pigmentos, polissacáridos, vitaminas, compostos fenólicos, esteróis entre outros biocompostos, como forma de respostas as adversidades do meio ambiente. Para além disso a competição por luz, nutrientes, espaço e dióxido de carbono, induz a síntese e acumulação de diversos compostos dentro de suas células para resistir e competir contra microrganismos. Como tal produzem biocompostos com atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral como mecanismos de defesa

(Leandro *et al.*, 2020).

A *Porphyra* spp., Figura 1.3, é das algas vermelhas mais comercializadas na forma seca, designadas vulgarmente por “nori”. A sua cor vermelha indica a presença da proteína ficoeritrina, para além de conter diversos biocompostos, incluindo vitamina B₁₂. Muitas espécies de *Porphyra* podem ser encontradas em zonas costeiras, mas também conseguem realizar fotossíntese a maiores profundidades. São bastante cultivadas no Japão, Coreia e China, e também em países do litoral Atlântico Norte, como o Reino Unido, Irlanda, Canadá e Estados Unidos, onde estas espécies são também colhidas. Estas algas possuem vários nomes comuns, sendo o mais usual o termo “nori”, como já referido, sendo comercializadas sob esse nome (Bito *et al.*, 2017).



Figura 1.3 Alga vermelha do género *Porphyra* spp. - nori (AlgaeBase, M.D. Guiry).

A segunda alga mais comercializada é a alga castanha *Undaria pinnatifida*, Figura 1.4, designada habitualmente por “wakame”. Esta alga é nativa do Pacífico Noroeste e tem sido amplamente cultivada para alimentação humana e animal, aquicultura e como matéria-prima para a extração de vários compostos aplicados na indústria farmacêutica e cosmética (Shan *et al.*, 2021). Nos últimos 30 anos, foi considerada uma das espécies de algas marinhas mais invasoras (Epstein *et al.*, 2017), devido à sua fácil adaptação ao ambiente. É também cultivada em menor escala, na Europa, principalmente em França e em Espanha (Shan *et al.*, 2021).



Figura 1.4 Alga da espécie *Undaria pinnatifida* - wakame (AlgaeBase, Hideki Haga).

O termo “kombu” abrange várias espécies do género *Laminaria*, Figura 1.5. Estas espécies podem ser encontradas ao longo da costa atlântica e no Estreito de Messina (mar Mediterrâneo, Itália). É muito utilizada como matéria-prima para a extração de alginato, além de conter

elevadas quantidades de lípidos (Ventura *et al.*, 2024).

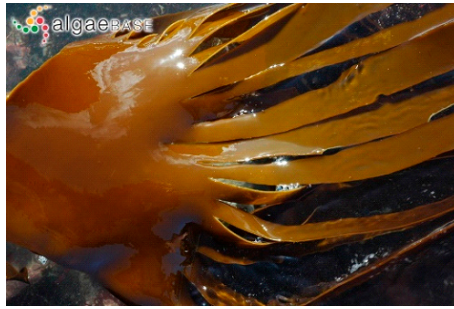


Figura 1.5 Alga do género *Laminaria* spp. - kombu (AlgaBase, Michael Guiry)

1.4 Interesse Comercial das Macroalgas

Pelo descrito anteriormente, compreende-se o interesse industrial e económico das macroalgas nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética, bem como no setor dos materiais, biocombustíveis e agrícola (Adarshan *et al.*, 2024).

Na indústria alimentar, as macroalgas podem ser utilizadas para melhorar produtos alimentares, devido aos nutrientes que oferecem, desde proteínas a carboidratos e lipídios, além de conterem teores interessantes de macro e micronutrientes (Adarshan *et al.*, 2024). Também são utilizadas devido às propriedades físicas de alguns compostos que produzem.

Por exemplo, na indústria de panificação, os hidrocolóides são ingredientes fundamentais para a produção do pão, tornando a massa mais maleável devido às suas propriedades gelificantes, e melhoram as qualidades do próprio pão, prolongando a validade do produto. Um desses hidrocolóides é o alginato, um polissacárido localizado nas paredes celulares das algas, que tem grande aplicação em farinhas. Assim como o alginato, as carrageninas e o agar são usados para gelificação, espessamento e estabilização de produtos alimentares à base de água e laticínios (Healy *et al.*, 2023).

Em alimentos enlatados, as algas podem ser incorporadas sobre a forma de conservantes naturais, pois têm propriedades que evitam a oxidação dos alimentos e a formação de espécies reativas, prolongando assim o seu prazo de validade, especialmente de peixes em conserva (Healy *et al.*, 2023).

Além das propriedades estruturais que as algas marinhas podem conferir à produção de alimentos, o uso dos seus pigmentos é promissor, uma vez que são considerados corantes naturais, com a vantagem adicional de exibirem diversas propriedades como: anti-oxidantes, antidiabética, anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral, antialérgica e neuroprotetiva, têm despertado interesse como potenciais fármacos (Osório *et al.*, 2020; Arias *et al.*, 2023). Como substitutos de corantes, também se destacam na indústria têxtil como alternativas sustentáveis a corantes de síntese industrial (Azeem *et al.*, 2019; Alabiyik *et al.*, 2018).

A presença de proteínas em macroalgas é de grande interesse para a indústria alimentar, não apenas pela capacidade de estabilizar géis e emulsões, mas também como ingrediente funcional (Foegeding *et al.*, 2011). Bioatividades farmacológicas tais como imunomoduladoras, antibacteriana, anti-trombótica e anti-hipertensiva, também foram atribuídas às proteínas, o que as torna igualmente atrativas para a indústria farmacêutica (Murray *et al.*, 2007). Quanto a produtos alimentares considerados menos saudáveis, como snacks, estes podem ser tornados mais nutritivos com a adição de algas marinhas, promovendo assim o seu consumo na vida quotidiana (Healy *et al.*, 2023).

Assim, as macroalgas também oferecem compostos bioativos com potencial farmacêutico, com inúmeros estudos a serem continuamente desenvolvidos para encontrar novos fármacos. Na literatura, encontram-se identificados mais de 700 biocompostos com várias propriedades terapêuticas, como atividades antitumorais, anti-inflamatórias, anti-oxidantes, anticoagulantes, antivirais, antidiabéticas e antialérgicas (Adarshan *et al.*, 2024).

Os carboidratos de macroalgas auxiliam na formulação de comprimidos como excipiente, em sistemas de entrega dos princípios ativos no sistema alvo, *drug delivery*, e também para disfarçar o mau sabor (Szekalska *et al.*, 2016). Outras propriedades, como anti-inflamatória no tratamento de processos imunológicos, propriedades antitumorais e imunomoduladoras também auxiliam em terapias oncológicas e em engenharia de tecidos (Adarshan *et al.*, 2024).

Os compostos fenólicos de macroalgas atuam na prevenção de doenças ou no auxílio da cura. Por exemplo, no caso de tumores, são capazes de inibir células tumorais e estimular processos de apoptose em células tumorais de cancro da mama (Gupta *et al.*, 2011; Nwosu *et al.*, 2011). Também têm um impacto positivo em doenças cardiovasculares e de hipercolesterolemia (Iso, 2011). Foram avaliados os efeitos anti-alérgicos em estudos *in vitro*, onde verificou-se a inibição da histamina (Vo *et al.*, 2012), bem como a inibição da viabilidade bacteriana das espécies *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Xu *et al.*, 2003).

As macroalgas marinhas são, de um modo geral, ricas em polissacáridos sulfatados, que têm propriedades de interesse para indústria farmacêutica e cosmética pelas suas diversas atividades biológicas, como, por exemplo, atividade anticoagulante semelhantes à heparina (Bernardi *et al.*, 1962) e atividade antiviral, exibida principalmente contra vírus envelopados por lípidos (Witvrouw *et al.*, 1997). Recentemente, foi demonstrada em modelos animais, a redução de níveis de triglicéridos e colesterol (Chellappan *et al.*, 2023).

Quanto à atividade anti-inflamatória, os polissacáridos sulfatados estimulam a resposta imunomoduladora, afetam o processo de metástase de tumores e influenciam a imunidade inata, reduzindo o estado pró-inflamatório em reações alérgicas e processos de doenças autoimunes. Os polissacáridos sulfatados também exibem atividade antitumoral pelo aumento da citotoxicidade de linfócitos, macrófagos e células *natural killer*, atividade observada principalmente nos fucoidanos e carragenanas (Jiao *et al.*, 2011).

Na indústria cosmética, as macroalgas são fontes de componentes de interesse, como alginato, fucoidanos, agar, carrageninas, proteínas, péptidos, compostos fenólicos, ácidos gordos

polinsaturados, minerais e vitaminas. Estes biocompostos são valorizados devido às suas diversas propriedades, como gelificante, estabilizante, emulsionante, espessante e coloração dos produtos, além de agregarem bioatividades desejáveis, como proteção contra radiação ultravioleta, anti-oxidante e antimicrobiano, permitindo à indústria cosmética formular produtos que melhoram a hidratação e a suavidade da pele, estando presentes em algumas formulações de produtos antienvhecimento, antirrugas e clareamento da pele (López-Horta *et al.*, 2021).

Há várias propriedades associadas aos lípidos das macroalgas de interesse para a indústria cosmética, como a proteção da barreira cutânea e a regulação da resposta inflamatória promovida por ácidos gordos polinsaturados. O fucosterol, um esteroide típico das macroalgas, demonstra propriedades protetoras contra a radiação ultravioleta. O grupo fosfato presente nos fosfolípidos e em ácidos gordos demonstrou auxiliar na absorção de carotenoides, e estudos apontam que os fosfolípidos podem auxiliar na redução de massa gorda corporal, em estudo *in vivo* em ratos. Os óleos essenciais têm atividade antimicrobiana e anticapa, sendo bons para a formulação de champôs (López-Horta *et al.*, 2021).

Os carboidratos de macroalgas, pelas propriedades emulsionantes, anti-oxidantes e de fotoproteção, tornam-se bons princípios ativos para formulação de produtos antienvhecimento, clareadores e protetores solares (Lourenço-Lopes *et al.*, 2020).

Cada vez mais materiais não biodegradáveis e de origem sintética revelam-se problemáticos para o ambientais, aumentando assim a procura por alternativas sustentáveis. Um exemplo, são os filmes comestíveis, que, para cumprirem o seu propósito, devem proteger os produtos embalados da exposição ao oxigênio e ao dióxido de carbono, mantendo o produto intacto e garantir a integridade estrutural. Os filmes produzidos a partir de hidrocolóides extraídos de algas marinhas são exemplo de uma alternativa sustentável a produtos tipicamente produzidos com recursos fósil (Healy *et al.*, 2023). Os carboidratos de macroalgas também são utilizados para a produção de biopolímeros (Elkaliny *et al.*, 2024), e no setor energético, para a produção de biocombustíveis (Kawai *et al.*, 2016).

Uma vez que se desenvolvem em meio aquático, as macroalgas não necessitam da rigidez conferida pelas lenhinas, como ocorre nas plantas terrestres. Este facto torna as macroalgas uma boa fonte de carbono para as biorrefinarias, uma vez que a ausência da lenhina facilita a aplicação de processos biotecnológicos para a obtenção de biocombustíveis, bioquímicos e biomateriais (Cesário *et al.*, 2018).

A produção de biocombustíveis derivados de macroalgas é realizada por meio de métodos bioquímicos e termoquímicos. Os processos mais utilizados incluem transesterificação, liquefação, fermentação, digestão anaeróbica e pirólise. Estes métodos são empregados na produção de biodiesel, bioetanol, biohidrogênio e biometano, havendo já processos patenteados (Godvin *et al.*, 2021; Pugazhendi *et al.*, 2023).

Os bioestimulantes são compostos naturais que promovem o crescimento das plantas e aumentam a sua resistência ao meio ambiente. Os extratos de macroalgas são ricos em compostos que possibilitam a bioestimulação das plantas, contendo hormonas de crescimento vegetal,

que promovem o transporte de nutrientes e a divisão celular. Para além de fornecerem nutrientes para o crescimento normal da planta, a grande vantagem dos bioestimulantes em relação aos fertilizantes químicos, é a regulação do crescimento e a frutificação, pois interferem em vias metabólicas de forma mais específica. Atualmente, já existem produtos no mercado com esta proposta, como o Reabilit Algas, desenvolvido pela empresa brasileira Nutimax (Arias *et al.*, 2023).

1.5 Composição elementar das Macroalgas

As algas marinhas têm uma grande capacidade para acumular elementos minerais, podendo atingir, em comparação com plantas terrestres um conteúdo elementar de 10 a 100 vezes superior. Assim, apresentam teores consideráveis de elementos essenciais para o ser Humano, como sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), potássio (K), iodo (I), ferro (Fe) e zinco (Zn) (Circuncisão *et al.*, 2018; Bocanegra *et al.*, 2009).

Contudo, as algas marinhas também têm a capacidade de bioacumular metais tóxicos como arsénio (As), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb), com concentrações que podem variar de 200 a 500 vezes mais elevadas do que nas plantas terrestres, representando um risco potencial para a saúde. No entanto, deve considerar-se que o efeito negativo dos metais tóxicos depende da espécie química presente e da respetiva concentração. Por exemplo, o arsênio inorgânico (iAs) é muito mais tóxico do que sua forma orgânica (oAs), sendo esta última mais frequente em algas marinhas (WHO, 2017).

Em geral, as formas oAs exercem baixa ou nenhuma toxicidade, ao passo que as formas inorgânicas são as mais perigosas. A acumulação destas formas inorgânicas estão associadas ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo nefrotoxicidade, diabetes, hepatotoxicidade, disfunção cardiovascular e cancro, principalmente da pele, pulmões e bexiga (Circuncisão *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2006; Bunderson *et al.*, 2004; Meliker *et al.*, 2010 e Oyagbemi *et al.* 2017).

Assim, o consumo de uma alga contendo oAs não significa necessariamente que causará envenenamento (Circuncisão *et al.*, 2018). Em macroalgas, o arsênio orgânico está associado principalmente aos carboidratos, como, por exemplo, em derivados dos ácidos monometilarsênico e dimetilarsênico, além de arsenobetaína. Quanto às formas inorgânicas, as principais são arsenato (As^{5+}) e arsenito (As^{3+}) (Circuncisão *et al.*, 2018).

No entanto, a falta de legislação sobre o limite máximo destes metais em algas de forma sancionatória, mesmo em continentes onde as algas são consumidas e produzidas em maior quantidade, podem colocar em causa a saúde pública. Na União Europeia, alguns países já tomaram medidas a este respeito, como França e Espanha (Circuncisão *et al.*, 2018). Mesmo assim, tratam-se apenas de recomendações sem qualquer vínculo jurídico (Stévant *et al.*, 2018). Os níveis máximos para metais tóxicos estabelecidos em França para algas marinhas comestíveis estão indicados na Tabela 1.1 (Circuncisão *et al.*, 2018).

Tabela 1.1 Limite máximo de metais tóxicos, em mg por kg de algas secas comestíveis para consumo humano, definidos em França (Edible Seaweed-French & European Regulation, 2014).

Metal		Concentração (mg/kg de alga seca)
Arsénio Inorgânico	iAs	< 3
Cádmio	Cd	< 0,5
Chumbo	Pb	< 3
Estanho	Sn	< 5
Mercúrio	Hg	< 0,1

A norma 2002/32/EC da Comissão Europeia refere para rações animais à base de algas marinhas valores de As inferiores a 2 mg/kg (2002/32/EC). Fora da UE, países como a Austrália e a Nova Zelândia estabeleceram limites para iAS de 1 mg/kg para algas secas (Australia New Zealand Food Standards Authority, 2013).

Os Regulamentos da Comissão Europeia EC n.º 629/2008 estabelecem níveis máximos de Cd < 3 mg/kg alga seca em suplementos alimentares (EC 629/2008).

Nos Estados Unidos da América também não existe uma norma específica, mas organizações como a Food and Drug Administration (FDA) e a Environmental Protection Agency (EPA) monitorizam o As em alimentos (WHO, 2018).

O *Codex Alimentarius* estabelece valores máximos para elementos tóxicos em vários tipos de alimentos, mas não inclui algas. A Tabela 1.2 a seguir reúne os valores mais elevados estabelecidos para cada elemento (*Codex Alimentarius* Commission, 1995) nos alimentos em geral.

Tabela 1.2 Valores máximos para elementos em mg/kg em alimentos (*Codex Alimentarius* Commission, 1995).

Metal		Concentração (mg/kg)
Arsénio	As	< 0,5
Cádmio	Cd	< 2
Chumbo	Pb	< 0,3
Estanho	Sn	< 250
Mercúrio	Hg	< 0,1

Existem muitos métodos para a análise elementar de macroalgas marinhas, como espectrometria de emissão ótica e espectrofotometria de absorção atômica. No entanto, requerem um tratamento prévio da amostra para remover toda a matriz orgânica por meio de digestão prolongada na presença de grandes quantidades de oxidantes e ácidos (Hédouin *et al.*, 2008; Amado-Filho *et al.*, 2008; Kamala-Kannan *et al.*, 2008).

Outra metodologia que pode ser aplicada é a espectrometria de fluorescência de raios X, que permite a análise direta da matriz da amostra, sem a produção de resíduos tóxicos ou a utilização de solventes prejudiciais à saúde do operador e ao meio ambiente. Além de ser uma técnica não destrutiva e de rápida execução, também apresenta algumas limitações, como o facto de que os resultados podem ser afetados pela estrutura física da matriz, devido a fenómenos de absorção ou intensificação do sinal de emissão por outros elementos presentes nessa

mesma matriz (Nagata *et al.*, 2001 e Brito *et al.*, 2017).

Para distinção de arsénio inorgânico, pode-se recorrer à técnica combinada de cromatografia de troca iónica com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (Llorente-Mirandes, *et al.*, 2017).

1.6 Biocompostos de Macroalgas

As macroalgas exibem um perfil nutricional de valor, caracterizado pela presença de micro e macronutrientes com bioatividades de interesse, sendo por isso classificadas como alimentos funcionais. Para entender melhor esse valor é relevante especificar alguns desses nutrientes (Xie *et al.*, 2023). Contudo, é importante salientar que a composição das macroalgas é influenciada pelo ambiente onde se desenvolvem, nomeadamente exposição à luz, salinidade, nutrientes, temperatura, poluição e turbulência da água, uma vez que as condições de crescimento influenciam ao nível metabólico, logo o teor dos compostos bioativos é muito variável. Desta forma, uma mesma espécie de macroalga colhida em locais diferentes pode emostrar características distintas (Gordalina *et al.*, 2021; Pliego-Cortés *et al.*, 2020). Os metabolitos mais afetados por estas variações são principalmente as proteínas, os lípidos e os β -glucanos (Leandro *et al.*, 2020; Zayed *et al.*, 2019).

Como já referido, muitos dos biocompostos presentes nas macroalgas possuem valor nutricional e atividade biológica. Assim, na Figura 1.6 estão identificados estes biocompostos (Xie *et al.*, 2023) e a Figura 1.7 apresenta as principais atividades biológicas identificadas em macroalgas.

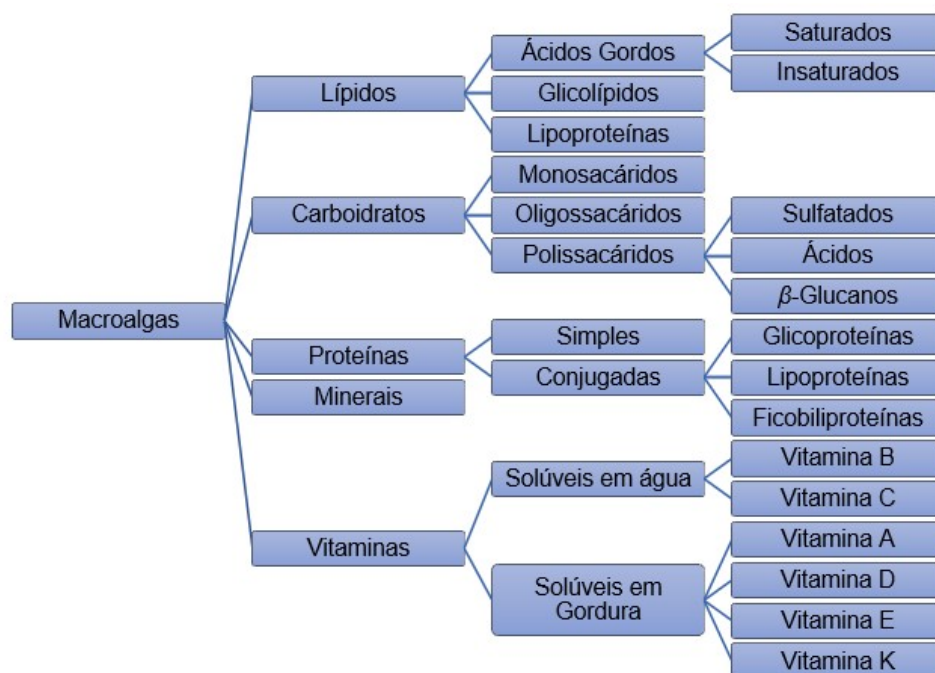


Figura 1.6 Esquema representativo dos principais biocompostos presentes em macroalgas (adaptado de Xie *et al.*, 2023).

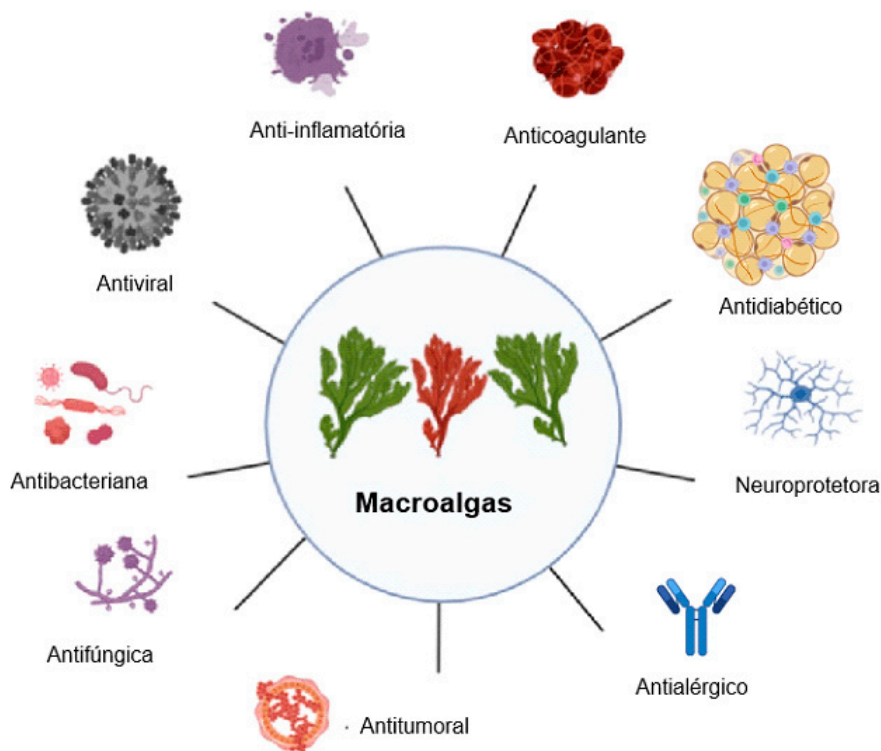


Figura 1.7 Principais atividades biológicas identificadas em macroalgas (adaptado de Farghali *et al.*, 2022).

1.6.1 Lípidos

As macroalgas contêm um teor lipídico percentual em base seca de 0,1 a 11,5 % (m/m) para algas castanhas, de 0,4 a 12 % (m/m) para algas vermelhas e 0,2 a 15 % (m/m) para algas verdes (Xie *et al.*, 2023). A maior parte do conteúdo lipídico é constituído por ácidos gordos poliinsaturados, além disso contêm esteróis, glicolípidos, fosfolípidos (Xie *et al.*, 2023; Morais *et al.*, 2021). Os lípidos provenientes de macroalgas exibem potencial terapêutico como neuroprotetores, anti-inflamatório, anti-alérgico, antitumoral, antibacteriano, anti-oxidante e ainda na prevenção de doenças cardiovasculares (Xie *et al.*, 2023; Brown *et al.*, 2014; Morais *et al.*, 2021).

O método mais convencional para a extração de lípidos em macroalgas, é à base de solventes orgânicos como o clorofórmio, no entanto, devido aos danos que este pode causar ao meio ambiente, tem sido substituído por outros solventes menos nocivos como diclorometano e propano-2-ol (Arias *et al.*, 2023).

É necessário considerar a polaridade dos solventes, que devem ser polares o suficiente para remover os lípidos da matriz celular, mas a polaridade não pode impedir a solubilização dos lípidos não polares, de modo a otimizar o rendimento da extração. Também é necessário levar em conta a matriz, adequando os solventes e a proporção da mistura de solventes ao tipo de amostra (Kumari *et al.*, 2011).

Existem vários métodos de extração, destacando a importância das novas tecnologias de extração, como a extração assistida por micro-ondas, que está a ser mais explorada em macroalgas,

uma vez que se trata de um método eficaz na extração de biocompostos e que se rege segundo princípios da Química Verde (Arias *et al.*, 2023).

A quantificação de lípidos pode ser feita por métodos gravimétricos, espectrométricos ou metodologias combinadas, como a cromatografia gasosa com espectrometria de massa (Kumari *et al.*, 2011).

1.6.2 Carboidratos

Os carboidratos são um dos componentes mais abundantes nas macroalgas, uma vez que, a percentagem mássica destes compostos, em base seca, para macroalgas verdes varia entre 25 a 50 %, entre 30 a 60 % para algas vermelhas e entre 30 a 50 % para algas castanhas (Gordalina *et al.*, 2021).

No presente estudo foram quantificados açúcares redutores, polissacáridos totais, ácidos, sulfatados e β -1,3-D-glucanos. Assim, brevemente apresenta-se o interesse e especificidade de cada um destes compostos nos tópicos seguintes.

1.6.2.1 Açúcares Redutores

Os açúcares que contêm grupo carbonilo livre, provenientes do aldeído das aldoses, como por exemplo, a glucose, a maltose e a lactose, têm poder redutor, uma vez que oxidam o grupo carbonilo, a carboxila na presença de soluções alcalinas e iões ferro e cobre (Jain *et al.*, 2021). Por serem carboidratos fermentáveis, os açúcares redutores têm importância em processos fermentativos, como por exemplo, para a produção de bioetanol (Tan *et al.*, 2013). Para dosear estes biocompostos habitualmente recorre-se ao método do ácido pícrico ou ao método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Lindsay, 1973).

1.6.2.2 Polissacáridos

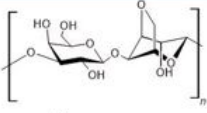
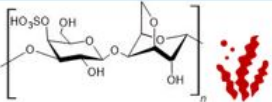
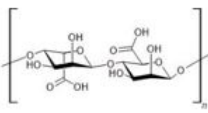
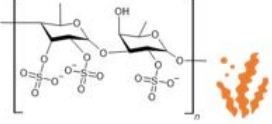
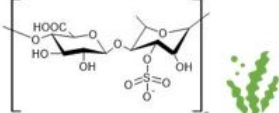
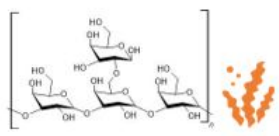
Os polissacáridos de macroalgas são classificados de acordo com a sua função biológica, sendo os polissacáridos estruturais, constituintes da parede celular, e os polissacáridos de armazenamento de energia (Cesário *et al.*, 2018).

O polissacárido estrutural mais abundante em plantas, a celulose, é também abundante em macroalgas, no entanto, existem outros polissacáridos estruturais típicos das macroalgas e característicos da família a que pertencem, por exemplo, o ulvano que é encontrado em macroalgas verdes, a carragenina que pode corresponder, em percentagem mássica, até 75 % (m/m) ou o agar até 52 % (m/m) em base seca para macroalgas vermelhas, enquanto o alginato é encontrado em macroalgas castanhas. Como polissacáridos de armazenamento de energia encontra-se o amido em macroalgas verdes e em vermelhas amido floridano, enquanto

as macroalgas castanhas podem conter até 35 % em base seca de β -1,3-glucanos (Gordalina *et al.*, 2021).

A Tabela 1.3 apresenta um resumo dos polissacáridos já identificados nas macroalgas e as suas estruturas gerais.

Tabela 1.3 Resumo dos polissacáridos mais comuns encontrado e respectivas estruturas gerais encontrados em macroalgas (adaptado de Foroughi *et al.*, 2024).

Polissacáridos Neutros	
 <p>Agarose</p>	
Polissacáridos Polianiónicos	
Sulfatados	Ácidos
 <p>Carragenina</p>	 <p>Alginato</p>
 <p>Fucoidanos</p>	
Sulfatados e Ácidos	
 <p>Ulvano</p>	
Glucanos	
 <p>Laminarina</p>	

Devido à grande variedade de polissacáridos, existem inúmeras técnicas desenvolvidas para quantificar estes compostos numa determinada amostra, como por exemplo, técnicas de cromatografia, eletroforese capilar, espectroscopia infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, no entanto, estas metodologias são dispendiosas e morosas, assim, métodos colorimétricos baseados numa reação ou interação de um corante permitem analisar carboidratos a partir do espectro eletromagnético num comprimento de onda fixo (Albalasmeh *et al.*, 2013). O método colorimétrico mais utilizado para carboidratos é o método fenol-ácido sulfúrico, por ser versátil, de elevada sensibilidade e rápido (Albalasmeh *et al.*, 2013).

1.6.2.2.1 Polissacáridos Sulfatados

Os polissacáridos sulfatados exibem atividade anti-oxidante através da capacidade quelante de metais, capacidade redutora de ferro e inibição de radicais livres. Esta atividade é tanto maior quanto maiores forem os níveis de grupos sulfato presentes nas suas estruturas, estando correlacionada com elevados níveis de fucose (Jiao *et al.*, 2011).

As algas verdes são caracterizadas por produzirem ulvano, que pode ser classificado como polissacárido sulfatado pela presença dos grupos sulfato, mas também pode ser integrado no grupo dos polissacáridos ácidos pela presença do carboxilo pelos monómeros ácido glucorónico e idurónico (Jiao *et al.*, 2011). Uma das atividades biológicas características do ulvano é a atividade lipêmica observada *in vivo* em modelos animais reduzindo os níveis de triglicéridos e colesterol (Chellappan *et al.*, 2023).

As algas castanhas são caracterizadas principalmente pela presença de fucoidanos, constituídos por cadeias de fucose ramificadas a cada 2 a 3 resíduos de fucose. A estrutura dos fucoidanos é muito variável, podendo identificar-se fucoidanos diferentes numa mesma espécie. Mesmo possuindo uma estrutura tão heterogênea, estes foram classificados em dois grupos diferentes. Os fucoidanos com origem em macroalgas dos géneros *Laminarias*, *Analiplus*, *Cladosiphon* e *Chorda*, caracterizados por conterem resíduos α -L-fucopiranoose ligação 1 \rightarrow 3. Os fucoidanos isolados de macroalgas das espécies dos géneros *Ascophyllum* e *Fucus*, caracterizados por cadeias centrais de resíduos de α -L-fucopiranoose com ligações 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4 (Jiao *et al.*, 2011).

Os fucoidanos têm potencial para aplicações farmacêuticas, uma vez que exibem bioatividade anticoagulante e antitrombótica semelhante à heparina (Bernardi *et al.*, 1962), bem como atividade antiviral, observada em estudos *in vitro* com células animais, revelando a inibição do vírus da dengue tipo 2 (Hidari *et al.*, 2008). Assim como o ulvano, os fucoidanos exibem atividade antilipídica, observada em estudos *in vivo* em modelos de ratos hiperlipémico. Neste estudo, detetou-se um aumento da atividade enzimática de lípases como a lipoproteína lípase, lípase hepática e lecitina colesterol aciltransferase, no soro dos ratinhos (Maruyama *et al.*, 2005).

As algas vermelhas caracterizam-se pela presença de carrageninas polissacáridos de D-galactanas sulfatadas de elevado peso molecular, com dissacáridos de ligações 3 \rightarrow 4 de β -D-galactopiranoose e α -galactopiranoose ou 3,6-anidro- α -galactopiranoose. Já foram identificadas 15 carrageninas diferentes que variam conforme o padrão de sulfatação dos dissacáridos e a repetição destes (Jiao *et al.*, 2011).

Assim como os fucoidanos, os polissacáridos das algas vermelhas também exibem propriedade anticoagulante equiparáveis a heparina, inibindo a trombina e o fator X (Jiao *et al.*, 2011). A utilização de polissacáridos sulfatados de algas é promissora, tendo a vantagem do produto final ter uma probabilidade baixa de conter vírus, que por vezes podem estar presente em produtos finais de heparina comercial produzida a partir de soro bovino e/ou suíno (Hidari *et al.*, 2008). As carrageninas também exibem atividade antiviral, observada em estudos *in vitro* em células animais onde inibiram a multiplicação do vírus da dengue (Talarico *et al.*, 2007).

O isolamento desses compostos geralmente envolve extração com água quente seguida de purificação adicional (Hahn *et al.*, 2016). Para analisar a estrutura de polissacáridos sulfatados, recorre-se a dessulfatação e metilação, determinando os ésteres de sulfato ligados ao longo da cadeia e da estrutura. A metilação permite determinar as ligações entre monossacáridos. Após a hidrólise dos polissacáridos sulfatos, obtêm-se monossacáridos parcialmente metilados que após acetilação são separados e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Outra forma mais expedita para a análise desta biomolécula é através de espectrometria de ressonância magnética nuclear que permite determinar os monossacáridos constituintes, as configurações anoméricas e posição das ramificações e sulfatações (Jiao *et al.*, 2011). Os polissacáridos sulfatados podem ainda ser determinados e caracterizados pelo método de Dische (Dische, 1949, Hahn *et al.*, 2016).

Estes polissacáridos provenientes de algas podem ser modificados facilmente por dessulfatação, supersulfatação, acetilação benzoilação, permitindo produzir por semissíntese, compostos com características mais eficazes para uma dada aplicação (Jiao *et al.*, 2011).

No entanto, a maioria destes métodos são demorados, complexos e corrosivos. Por esse motivo, adotam-se metodologia espectroscópicas nomeadamente métodos colorimétricos, que avaliam a formação de complexos formados por interações entre um corante específico e a biomolécula alvo (Hahn *et al.*, 2016).

1.6.2.2.2 Polissacáridos Ácidos

Os polissacáridos ácidos podem ser considerados como carboidratos raros, mas que no caso das macroalgas, podem ser encontrados em quantidades consideráveis. Nas algas castanhas identifica-se grandes quantidades de alginato que é constituído por dois monómeros que estabelecem ligação glicosídica 1 → 4 entre ácido β -1-D-manuronílico e ácido α -1,4-L-gulurónico

Este polissacárido confere propriedades físicas, como resistência mecânica, e capacidade que-lante, sendo por isso aplicado nas indústrias farmacêutica, tecnologia médica, cosmética, alimentar, agrícola, têxtil e do papel (Brownlee *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2012; Jönsson *et al.*, 2020).

Através deste composto é ainda possível formar géis com solubilidades diferentes em água; por exemplo, os alginatos de cálcio formam géis insolúveis em água, utilizados no encapsulamento de outros compostos ou enzimas, enquanto na presença de sódio e magnésio, o gel torna-se solúvel em água (Devillé *et al.*, 2004). No entanto, o alginato facilmente degrada-se nos seus monómeros em condições ácidas e alcalinas, e fatores como a temperatura, a presença de radicais livres e polifenóis também pode afetar a estabilidade do alginato (Brownlee *et al.*, 2009).

Existem vários métodos para quantificar polissacáridos ácidos, como os métodos colorimétricos com ácido urónico, através de metanólise e pela reação com ácido sulfúrico e carbazol (Li *et al.*, 2007).

1.6.2.2.3 Glucanos

Os glucanos são polissacáridos produzidos principalmente por macroalgas castanhas, sendo por essa razão, comum encontrar a designação laminarina para glucanos de macroalgas. Estes têm como funções o armazenamento e a reserva de energia, sendo acumulados em vacúolos no interior das células, podendo chegar a 35 % (m/m) do peso seco da macroalga (Garcia-Vaquero, *et al.*, 2019).

A sua estrutura caracteriza-se por uma cadeia principal composta por D-glucose ligadas a β -1,3 com ramificações entre as posições 6 e 2. Embora as moléculas possam conter uma grande variedade de monossacáridos, o mais comum o é manitol (Graiff *et al.*, 2016). A laminarina, exibe uma conformação β -1-3 e β -1-6 (Singh *et al.*, 2020).

A estrutura terciária em tripla hélice de alguns β -1,3-D-glucanos está relacionada com as diversas bioatividades (Semedo *et al.*, 2015; Garcia-Vaquero, *et al.*, 2019), tais como: anti-inflamatórias, anticoagulantes, anti-oxidantes, antivirais, antitumorais, anti-obesidade e antimicrobianas (Garcia-Vaquero, *et al.*, 2019). Os β -1,3-glucanos fazem parte de alguns suplementos alimentares utilizados em paralelo com terapias anticâncer devido às suas propriedades imunoestimulantes, anti-inflamatórias, podendo também atuar ao nível do microbioma (Singh *et al.*, 2020).

Estes compostos são facilmente extraídos com água a elevada temperatura ou com soluções alcalinas ou ácidas, através de métodos como a extração assistida por autoclave, sendo comum recorrer a vários ciclos de extração consecutivos (Rajauria *et al.*, 2010). Outras metodologias inovadoras, como a extração assistida por ultrassons, têm demonstrado rendimentos promissores de extração (Garcia-Vaquero *et al.*, 2018).

Para a quantificação do teor total de β -1,3-glucanos recorre-se usualmente a métodos de hidrólise enzimática ou ácida, consequentemente, métodos hidrolíticos ignoram a conformação terciária. Além disso, a hidrólise ácida é muito inespecífica, enquanto a enzimática é específica, porém dispendiosa e morosa (Nitschke *et al.*, 2011).

Contudo existem outros métodos que não ignoram a conformação dos glucanos, como por exemplo, métodos ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que determinam β -glucanos de alto peso molecular. Contudo o método tem uma aplicabilidade limitada (Mizuno *et al.*, 2001). Também existem métodos colorimétricos para quantificar conformações específicas, como por exemplo, o método fluorométrico com azul de anilina, que interage com β -glucanos de hélice única, que geralmente ocorre em meio alcalino (Ogawa *et al.*, 1972). O método do corante Congo *red* é específico para a quantificação de β -1,3-glucanos com tripla hélice, uma vez que o corante interage com β -glucanos este tipo de estrutura (Nitschke *et al.*, 2011; Semedo *et al.*, 2015).

Através de métodos espectroscópicos, como a espectroscopia de infravermelho ou a de ressonância magnética nuclear, torna-se possível detetar e quantificar a conformação α e β do carbono anomérico (Kato *et al.*, 2023; Hong *et al.*, 2021). Evidentemente, para quantificar todas

as conformações é necessário recorrer a várias metodologias específicas para cada uma, pois não existe um método direto.

1.6.3 Proteínas

Conhecidas por serem biomoléculas de grandes dimensões, são formadas por cadeias longas de resíduos aminocídicos ligados por ligações peptídicas. A nível nutricional, desempenham funções importantes no nosso organismo tais como a construção e reparação de tecidos e intermediar reações metabólicas. Algumas espécies de macroalgas marinhas revelaram ser excelentes fontes de proteínas quando comparadas com outras fontes, nomeadamente a soja (Healy *et al.*, 2022). No entanto, os teores de proteína podem variar conforme a estação do ano, uma vez que, como descrito anteriormente, as condições de crescimento afetam o metabolismo das macroalgas e, para algumas espécies, os níveis mais elevados de proteína são alcançados durante o inverno e a primavera (Fleurence, 2004). De uma forma geral, apresentam as seguintes percentagens mássicas em base seca: algas verdes 0,4 a 32,1 % (m/m), algas castanhas 3,1 a 42,1 % (m/m) e algas vermelhas 3,5 a 47 % (m/m). Ao nível do paladar, as macroalgas estão associadas ao sabor umami devido à elevada abundância de ácido aspártico, ácido glutâmico e alanina, tendo sido identificados todos os aminoácidos essenciais ao ser humano, na sua composição (Xie *et al.*, 2023).

No que diz respeito a enzimas, as macroalgas são uma fonte interessante de fosfatase alcalina, oxidases, enzimas fibrinolíticas e rubisco (Gordalina *et al.*, 2021).

As ficobiliproteínas são pigmentos de natureza proteica e são as principais proteínas das algas vermelhas, representando até 50 % do seu conteúdo total de proteínas. Trata-se de uma família de proteínas fluorescentes ligadas covalentemente a grupos tetrapirrólicos, conhecidos como ficobilinas, como grupo prostético, e são utilizadas como marcadores de outras moléculas, e estão identificadas como tendo atividade anti-oxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, hipocolesterolémica, hepatoprotetora, antiviral e antitumoral (Cian *et al.*, 2015; Sekar *et al.*, 2008). Dada a sua relevância será um complexo abordado na Secção 2.5.4., sobre Pigmentos.

As proteínas em macroalgas também surgem de forma conjugada com outros compostos, nomeadamente complexos proteína-carboidratos, as glicoproteínas. Estruturalmente, são proteínas que possuem ligações covalentes a uma ou mais cadeias de oligossacáridos (glicanos ou polissacáridos pequenos). Estas são facilmente extraídas com água fria ou quente, uma vez que se localizam na parede celular (Cian *et al.*, 2015; Pliego-Cortés *et al.*, 2020).

Assim, extratos aquosos com elevado teor de proteínas e carboidratos podem indicar a presença de glicoproteínas, principalmente as lectinas, que interagem de forma específica com outros glicanos solúveis, estabelecendo uma ligação com a membrana e estão associadas a atividade hemaglutinante contra eritrócitos (Gordalina *et al.*, 2021; Hahn *et al.*, 2011). Apesar de já estarem caracterizadas, a sua bioatividade requer mais estudos (Pliego-Cortés *et al.*, 2020).

Para extrair proteínas, é necessário considerar as quatro classes de proteínas e as suas solubilidades específicas. As albuminas são solúveis em água, as globulinas em soluções salinas, as glutelinas em ácidos ou bases diluídas e as prolaminas em álcool até 70 % (V/V) (Mæhre 2015). Para otimizar a extração das quatro classes, habitualmente realizam-se extrações sequenciais, recorrendo a metodologias convencionais que envolvem soluções aquosas, ácidas e alcalinas. No entanto, para preservar as suas estruturas, é necessário utilizar condições suaves de pH ou recorrer a soluções de recolha para neutralizar e recuperar a conformação (Kadam *et al.*, 2013). Para extrair proteínas intracelulares, é necessário recorrer a métodos físicos como temperatura, ou métodos enzimáticos, de forma a promover a lise celular. Como alternativa às metodologias convencionais, novas metodologias, como a extração assistida por micro-ondas ou extração assistida por ultrassons, entre outras, têm sido aplicados na extração de proteínas de macroalgas (Gordalina *et al.*, 2021).

Existem vários métodos para caracterizar e quantificar proteínas, nomeadamente ensaios eletroforéticos, cromatográficos, espectrométricos, e imunoquímicos. Os métodos eletroforéticos, como a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), são utilizados para identificar o peso molecular das subunidades das proteínas, permitindo também identificar a espécie de macroalga através do perfil proteico (Gordalina *et al.*, 2021).

Ensaio cromatográficos são amplamente aplicados em extratos de macroalgas marinhas, como cromatografia de exclusão molecular e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Gordalina *et al.*, 2021).

Segundo Gordalina *et al.* (2021), os ensaios espectrometria de massa (MS) e espectrométricos de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) são as técnicas mais utilizadas no estudo de proteínas provenientes de macroalgas. Com a vantagem acrescida de identificar a estrutura secundária das proteínas através do FTIR, através das bandas do grupo amida, sendo a amida I caracterizada pela extensão CO, e a amida II caracterizada pela de extensão NH e CN. Através da banda da amida I é possível identificar a estrutura secundária hélice α , folhas β , voltas e indefinida (Haris *et al.*, 1999).

As técnicas espectrométricas, como a cristalografia de raio X e a ressonância magnética nuclear (NMR), também possibilitam a caracterização da estrutura secundária das proteínas, permitindo obter a estrutura tridimensional completa. No entanto, apresentam várias desvantagens, como por exemplo, a cristalografia dependente da alta qualidade dos cristais obtidos, que é de difícil formação, podendo ocorrer a cristalização de uma conformação que não corresponde à realidade da proteína no seu meio nativo. Adicionalmente, oferece uma imagem estática da conformação, que vai contra a natureza dinâmica da proteína. O NMR por sua vez, oferece uma flexibilidade no estudo de proteínas em solução. Contudo, se a amostra for muito complexa, o espectro resultante será igualmente complexo e difícil de interpretar. Além disso, a técnica está limitada a proteína com peso molecular até 30 kDa (Haris *et al.*, 1999).

Os ensaios espectrofotométricos são amplamente utilizados para a deteção e quantificação de proteína por serem métodos mais rápidos e menos dispendiosos, embora por vezes menos sensíveis comparativamente aos das outras técnicas referidas anteriormente. A leitura

da absorvância é um ensaio simples que tem por base a detecção dos resíduos aminocídicos aromáticos (e.g., triptozano, tirosina e fenilalanina), por essa razão a leitura é realizada no comprimento de onda 280 nm. No entanto, a concentração de proteína pode variar devido à contaminação por compostos fenólicos (Merck, 2024).

Os ensaios reacionais colorimétricos são igualmente rápidos e simples, além de resolverem resolver o problema das contaminações, uma vez que utilizam um reagente ou um corante com afinidade específica para com os resíduos aminocídicos, formando assim um cromóforo. Os protocolos mais usuais são os ensaios de ácido bicinonínico, Lowry e Bradford (Merck, 2024).

1.6.4 Pigmentos

Como descrito anteriormente na Secção 2.4., as algas verdes (*Chlorophyta*), as algas castanhas (*Phaeophyta*) e as algas vermelhas (*Rhodophyta*) contém pigmentos naturais característicos das macroalgas, sendo a estrutura molecular dos pigmentos semelhantes, diferindo apenas nos seus grupos funcionais (Arias *et al.*, 2023). Dentro deste grupo destacam-se as clorofilas, os carotenoides e as ficobiliproteínas, abordando-se de seguida cada um deles, elucidando a sua estrutura, propriedades e consequentes bioatividades.

As clorofilas (Figura 1.8) são pigmentos esverdeados apolares, responsáveis pela conversão de luz em energia, estão presentes na maioria das plantas e algas autotróficas. Estruturalmente são compostas por anéis de porfina ligados a um átomo de magnésio. Existem quatro conformações diferentes em algas marinhas: clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *c* e clorofila *d*, sendo a clorofila *a* mais importante, uma vez que é responsável pela produção de energia (Osório *et al.*, 2020).

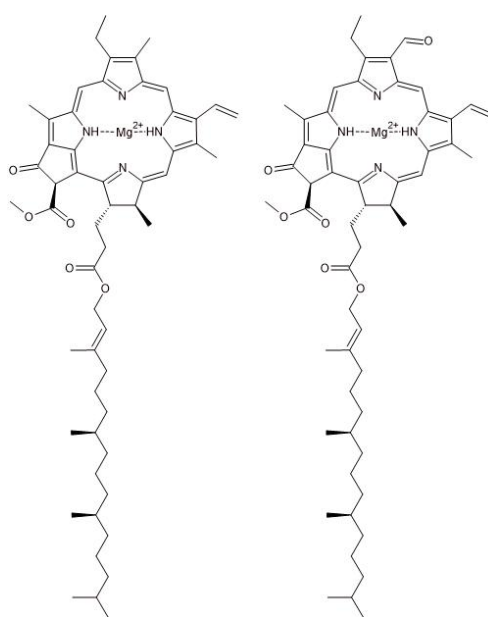


Figura 1.8 Estrutura química das clorofilas: A – clorofila *a*; e B – clorofila *b* (adaptado de Osório *et al.*, 2020).

Os carotenoides são pigmentos apolares e podem exibir cores diferentes, dependendo da sua estrutura. São terpenóides de cadeias de polieno altamente conjugadas responsáveis pelas diversas cores que a molécula pode exibir, incluindo tons de roxo, vermelho, laranja ou amarelo (Osório *et al.*, 2020). Existem dois tipos de carotenoides: os hidrocarbonetos insaturados, (e.g. β -caroteno e o licopeno), e as xantofilas (e.g. luteína, fucoxantina). As xantofilas distinguem-se dos carotenos pela presença de grupos funcionais contendo átomos de oxigénio (Poojary *et al.*, 2016).

A fucoxantina (Figura 1.9) é o carotenoide mais abundante em algas castanhas, conferindo-lhes essa cor (Matsuno *et al.*, 2001; Lourenço-Lopes *et al.*, 2022). Estruturalmente possui uma ligação alélica incomum com o grupo epóxido e grupo carbonilo conjugado na cadeia polieno (D’Orazio *et al.*, 2012).

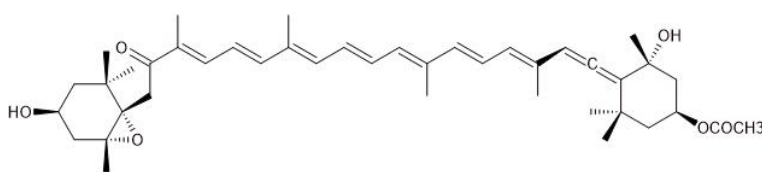


Figura 1.9 Estrutura química da fucoxantina (adaptado de Lourenço-Lopes *et al.*, 2022).

Como metabolito, é responsável pela absorção da luz e transformá-la em energia (Lourenço-Lopes *et al.*, 2022). As bioatividades que apresenta devem-se essencialmente às ligações alélicas e ao grupo acetil (Liu *et al.*, 2011). Assim este pigmento exibe atividade anti-oxidante, sendo capaz de inibir espécies reativas de oxigénio, como os radicais hidroxilo e anião superóxido (Heo *et al.*, 2008). A atividade antitumoral observada em diversos estudos sugere que a fucoxantina interage com moléculas reguladoras do ciclo celular e mecanismos de apoptose de células tumorais (D’Orazio *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2010; Kotake-Nara *et al.*, 2005).

A fucoxantina exibe também efeito termogénico em mamíferos, uma vez que afeta enzimas presentes nas mitocôndrias do tecido adiposo, induzindo uma maior libertação de energia sobre forma de calor nesses tecidos, auxiliando assim em doenças como a obesidade (D’Orazio *et al.*, 2012). Também foi observado que este carotenoide afeta a expressão de genes que intervêm na captação de glicose e do metabolismo lipídico, entre outros fatores relacionados com a obesidade e a resistência à insulina, o que faz com que este pigmento exiba também atividade antidiabética (Maeda *et al.*, 2006; D’Orazio *et al.*, 2012).

A atividade neuroprotetora foi observada em estudos *in vivo* e *in vitro* em modelos de lesão cerebral onde a fucoxantina foi capaz de promover os mecanismos de neuroprotecção molecular (Zhang *et al.*, 20017). Relativamente à atividade fotoprotetora foi avaliada em estudos *in vivo*, onde os investigadores relacionaram a atividade anti-oxidante e antitumoral com a fotoenvelhecimento induzido por radiação ultravioleta (Yasuda *et al.*, 1998).

As ficobiliproteínas (Figura 1.10) são pigmentos polares fluorescentes proteicos que podem exibir diferentes cores. Estruturalmente são um complexo de proteína ligado covalentemente à ficobilina, uma estrutura linear de tetrapirróis (Osório *et al.*, 2020). Esta família de proteínas

está associada a estruturas de superfície da membrana citoplasmática de ficobilissomas, enquanto os carotenoides e clorofilas estão localizados na membrana bifosfolipídica (Gordalina *et al.*, 2021). Existem quatro categorias principais de ficobiliproteínas divididas segundo a cor que exibem: ficoeritrina (roxo), ficocianina (azul), aloficocianina (verde azulado) e ficoeritrocianina (roxo) (Osório *et al.*, 2020). Entre os complexos também se destacam as ficobiliproteínas devido à sua fluorescência, sendo utilizadas como marcadores de outras moléculas, além de serem anti-oxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetoras, hipocolesterolêmicas, hepatoprotetoras, antivirais, antitumorais (Sekar *et al.*, 2008).

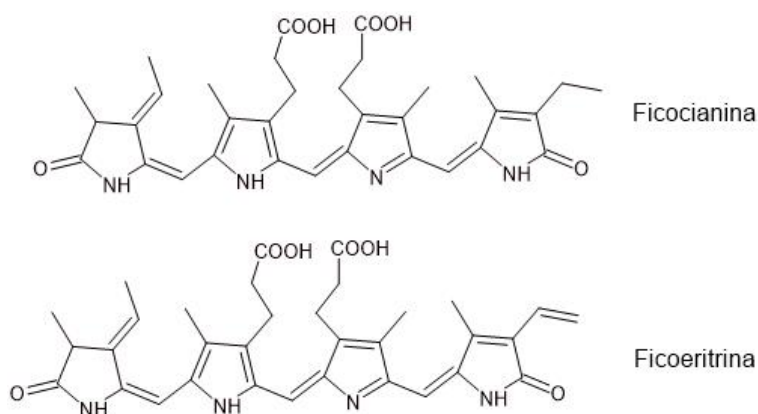


Figura 1.10 Estrutura química de ficobiliproteínas (adaptado de Tounsi *et al.*, 2023).

Existem diversos métodos convencionais para a extração de pigmentos, como a extração contínua em Soxhlet e maceração com solventes orgânicos, que apresentam várias desvantagens por serem morosas e por utilizarem, de um modo geral, solventes tóxicos. Os métodos inovadores como extração assistida por micro-ondas, extração com dióxido de carbono supercrítico e extração assistida por ultrassons superam as desvantagens dos métodos convencionais e proporcionam melhores rendimentos. Geralmente, são utilizadas técnicas cromatografias, espectroscopia de infravermelho e ultravioleta-visível para quantificar os pigmentos (Cikoš *et al.*, 2022).

1.6.5 Compostos Fenólicos

As macroalgas comestíveis são ricas em compostos fenólicos ou polifenóis, onde cerca de um terço é composto por ácido fenólico e os dois terços restantes por flavonoides (Ferdous *et al.*, 2021). As macroalgas produzem estes compostos para sua própria defesa contra infecções e agressões causadas pelo ambiente externo (Santos *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos são compostos de elevado valor devido às suas propriedades com inúmeros benefícios para a saúde. Para além da capacidade anti-oxidante, estes exibem atividades antidiabéticas, anti-Alzheimer, anti-inflamatórias, anti-alérgicas, anti-obesidade, antibacterianas, entre outras (Montero *et al.*, 2018).

No caso particular dos compostos fenólicos presentes das macroalgas, estes são os metaboli-

tos secundários mais explorados para a indústria, são compostos por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo, geralmente associados a derivados do ácido hidroxibenzoico. As macroalgas vermelhas, verdes e castanhas, usualmente contêm compostos fenólicos derivados de flavan-3-ol (Santos *et al.*, 2019).

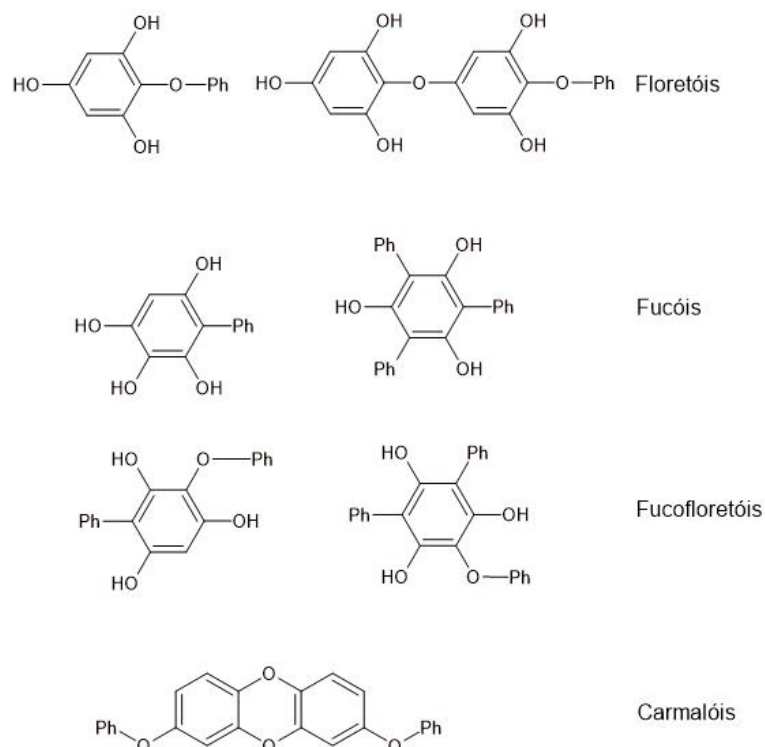


Figura 1.11 Exemplos de compostos fenólicos (adaptado de Santos *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos mais estudados das macroalgas, principalmente das castanhas, são os florotaninos, que são polifenóis derivados da oligomerização de unidades de floroglucinol por meio de ligações carbono-carbono ou éter diaril. Este composto pode variar em tamanho, sendo o mais pequeno de 126 Da. Os florotaninos podem ser classificados em quatro grupos, dependendo do tipo de ligação entre as unidades aromática (Figura 1.11): os floretóis, que têm uma ligação éter; os fucóis, com ligação fenil; os fucofloretóis, com ligação éter e fenil e os carmalóis, com ligação benzodioxina (Singh *et al.*, 2013).

Os compostos fenólicos exibem atividades benéficas à pele, sendo utilizados na indústria cosmética, constituindo formulações com efeito regenerador, protetor contra radiação ultravioleta, antirrugas, anti-alérgico, anti-inflamatório, anti-oxidante, antimicrobiano, antifúngico, inibidor da tirosinase, antimelanogénico, clareador da pele e anti-acne (Kalasariya *et al.*, 2022).

O doseamento e a caracterização destes compostos em macroalgas podem ser difíceis devido à elevada complexidade da matriz da amostra, que contém quantidades significativas de polisacáridos, proteínas e lípidos. Além disso, em algas já bastante estudadas, conclui-se que os compostos fenólicos podem variar conforme a idade do organismo, tamanho e o tipo de tecido de onde são extraídos, assim como os fatores que intervêm no meio onde se desenvolvem, como a salinidade, nutrientes e estação do ano (Santos *et al.*, 2019).

A extração de compostos fenólicos usualmente é feita através de metodologias convencionais de extração sólido-líquido com solventes menos polares, seguida de processos de separação para obter um extrato purificado. Outros métodos avançados têm sido implementados devido à sua eficiência, fácil otimização de condições de extração e maior sustentabilidade, como a extração assistida por micro-ondas, enzimática e com fluídos supercríticos (Santos *et al.*, 2019).

Usualmente, em extratos brutos de macroalgas, é possível detectar a presença destes compostos pela absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 330 nm, devido à natureza destes compostos. No entanto, esta análise é apenas qualitativa, uma vez que os resultados são sensíveis ao pH e à presença de outros compostos da matriz da amostra. A quantificação é geralmente realizada por métodos espectrofotométricos, pela reação de com 2,4-dimetoxibenzaldeído ou pela reação de Folin-Ciocalteu, pela simplicidade e baixo custo do ensaio (Santos *et al.*, 2019).

Para caracterizar estes compostos, também é comum recorrer NMR e à espectroscopia de infravermelho. Sendo que em extratos brutos, pela sua complexidade, é difícil analisar compostos fenólicos mesmo através de técnicas de alta resolução (Santos *et al.*, 2019). Nos últimos anos, as abordagens cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, LC-MS e LC-MS/MS de alta resolução, associadas a estatísticas multivariadas, têm sido amplamente utilizadas para identificar este tipo de compostos (Santos *et al.*, 2019; López-Fernández *et al.*, 2020).

1.6.5.1 Flavonoides

Os flavonoides fazem parte do grupo dos polifenóis. São estruturalmente complexos, derivados de 2-fenil-benzo-pirona e possuem uma estrutura base comum caracterizada por uma cadeia fenilpropanoide de 15 carbonos, organizada em dois anéis aromáticos ligados a um anel pireno contendo oxigênio (Ferdous *et al.*, 2021).

Existem cinco classes de flavonoides, que se distinguem pelas modificações no anel pireno: flavanóis (*e.g.* catequina, epicatequina, epigallocatequina), flavonóis (*e.g.* morina, quercetina, kaempferol, miricetina), flavanonas (*e.g.* naringenina e hesperetina), isoflavonas (*e.g.* genisteína e daidzeína), flavonas (*e.g.* luteolina) e antocianinas (Figura 1.12) (Brodowska 2017).

A catequina, flavan-3-ol, é dividida em oito classes diferentes (Bae *et al.*, 2020). Pode ser encontrada em macroalgas vermelhas, como a *Porphyra tenera* e exibe citotoxicidade contra glioma humano e impede a angiogénese de melanoma humano (Machu *et al.*, 2015; Sheng 2020; Di Leo *et al.*, 2017).

A epicatequina é uma das subclasses de catequina, que também pode ser encontrada em macroalgas vermelhas, como a alga *Porphyra tenera* (Machu *et al.*, 2015). Exibe atividade antitumoral em cancro da mama, promovendo a apoptose das células tumorais (Pereyra-Vergara *et al.*, 2020). A epicatequina pode ser utilizada como coadjuvante em quimioterapia, uma vez

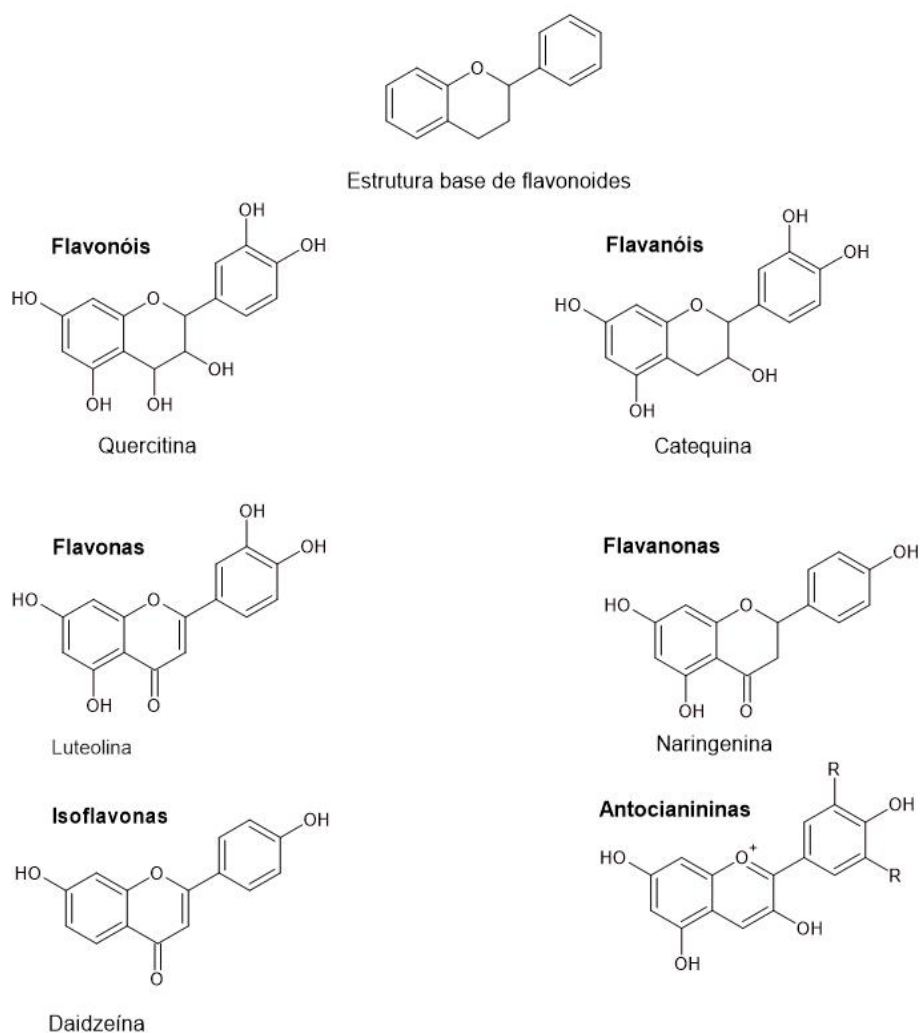


Figura 1.12 Estruturas de flavonoides (adaptado de Ferdous *et al.*, 2021 e Shraim *et al.*, 2021)

que atua em danos causados por este tipo de tratamento (Shariati *et al.*, 2019).

A epigalocatequina-galato também faz parte do grupo das catequinas, sendo encontrada em macroalgas como a *Undaria pinnatifida* e também em macroalgas vermelhas, como a *P. tenera*. Este flavanol foi reconhecido como uma das catequinas com atividade antitumoral mais potente, exibindo essa atividade em vinte e quatro tipos de câncros (Almatroodi *et al.*, 2020). Atua interferindo nos sistemas de angiogênese e metástase (Huang *et al.*, 2020).

A morina é um flavonoide específico de algumas espécies de algas, podendo ser encontrada na *Porphyra yezoensis*, *Undaria pinnatifida* e *Laminaria religiosa* (Yoshie-Stark *et al.*, 2003). Esta exibe atividade antitumoral contra leucemia pela estimulação da apoptose das células tumorais (Nie *et al.*, 2019). Em células tumorais da mama exibiu atividade antiproliferativa (Wang *et al.*, 2021).

As isoflavonas, como a daidzeína ou a genisteína, podem ser encontradas em macroalgas vermelhas, do gênero *Porphyra* spp. e em macroalgas como a *Undaria pinnatifida* (Santos *et al.*, 2019).

De um modo geral, os flavonoides exibem atividade anti-oxidante e antitumoral, interferindo nos sistemas de apoptose, angiogénese e metástase, além de possuírem propriedades antimicrobianas e de proteção UV. Em algas comestíveis, os compostos flavonoides ingeridos podem desempenhar funções biológicas no organismo humano, como a melhora do transporte da glucose, a diminuição do colesterol, atua beneficemente na disfunção cardiovascular, doenças oculares e em alterações neurológicas relacionadas com a perda de memória (Ferdous *et al.*, 2021).

Uma vez que promovem benefícios a vários níveis e exibem diversas bioatividades, os compostos flavonoides tornam-se princípios ativos de interesse. No entanto, as algas e as plantas produzem quantidades reduzidas (Ferdous *et al.*, 2021).

Em macroalgas, a produção de flavonoides à semelhança de outros biocompostos, dependente muito das condições de crescimento (Ferdous *et al.*, 2021). A salinidade é um dos fatores que afeta significativamente a sua produção e sua acumulação, ou seja, quando as concentrações salinas são mais elevadas, a acumulação de compostos aumenta (Singh *et al.*, 2014). O *stress* provocado pela presença de metais no meio de crescimento é também um fator que também induz a uma maior acumulação destes compostos (López *et al.*, 2015).

A purificação e identificação destes compostos são trabalhosas, dispendiosas e acrescido do facto de se tratarem de compostos sensíveis e de fácil degradação (Ferdous *et al.*, 2021). Contudo, tecnologias de otimização em sistemas de purificação e engenharia metabólica têm vindo a melhorar a capacidade de extrair grandes quantidades de compostos fenólicos neste tipo de amostras (Amawi *et al.*, 2017). As algas tornaram-se uma fonte promissora para a extração de flavonoides, uma vez que o seu cultivo em áreas controladas e de grande dimensão proporciona um crescimento controlado, diminuído fatores de contaminação, o uso de fertilizantes e de exploração de terras. Para além disso, a sua integração em sistemas de aquacultura ou o seu cultivo com águas residuais provenientes desta industria, torna os sistemas de cultivo sustentáveis e integrados numa perspetiva de economia circular (Ferdous *et al.*, 2021; Dębowski *et al.*, 2020).

A quantificação de flavonoides pode ser realizada por técnicas cromatográficas, eletroforéticas, e espetrométricas (*e.g.* UV-Vis, fluorimetria e espectrometria de massa). Estas metodologias requerem a utilização de equipamentos avançados e técnicos qualificados. Por essa razão, métodos colorimétricos de fácil utilização são frequentemente selecionados (Magalhães *et al.*, 2012). Existem dois métodos colorimétrico para deteção e quantificação de flavonoides, o método com cloreto de alumínio e o método com borohidreto de sódio e cloranil (Magalhães *et al.*, 2012).

1.7 Métodos de Extração e Quantificação de Biocompostos

Atualmente, existe interesse das comunidades científica e industrial pela investigação e exploração na extração e caracterização de compostos bioativos de fontes naturais, devido à sua

capacidade de proporcionarem vários benefícios em diversas áreas. Nesta secção descrevem-se os principais métodos de extração aplicados na recuperação de biocompostos a partir de macroalgas, assim como métodos que permitem a sua deteção e quantificação.

1.7.1 Extração de Biocompostos

Ao longo da Secção 1.6 sobre Biocompostos das Macroalgas já foram explicitadas algumas condições e métodos de extração mais favoráveis para a obtenção de determinados compostos a partir de macroalgas. A utilização de altas temperaturas e solventes (incluindo água), para obter produtos de elevado valor com mais aplicações potenciais continua a ser uma prática industrial, frequentemente com impacto adverso no ambiente e na funcionalidade dos produtos. No entanto, mais recentemente, têm sido sugeridos métodos e abordagens alternativos, procurando não só melhorar o desempenho do processo, mas também serem menos prejudiciais à saúde humana e ao ambiente (Matos *et al.* 2021; Babich *et al.* 2022).

As extrações sólido-líquido convencionais são amplamente utilizadas pela indústria com o objetivo de alcançar altos rendimentos de extração através de equipamentos relativamente simples e acessíveis. No entanto, podem ser considerados morosos e requerem um elevado gasto de energia e solventes. Os métodos mais explorados em macroalgas têm sido infusão, percolação, destilação a vapor, maceração e extração contínua em Soxhlet (Matos *et al.* 2021; Babich *et al.*, 2022; Garcia-Vaquero, *et al.* 2020). A escolha do solvente é um passo importante para a solubilização do composto alvo, permitindo seletividade, elevada eficiência com o aumento da transferência de massa, danos nos tecidos, difusão do solvente, em combinação com diferentes tecnologias de extração ou agitação (Matos *et al.* 2021).

Tendo em consideração estes pontos fracos comuns das extrações convencionais, têm sido abordados outros métodos, numa perspetiva económica, que se regem segundo princípios da Química Verde, ou seja, que podem reduzir a energia, os solventes e o tempo de extração, e habitualmente são designados por métodos “verdes” ou “alternativos”. O desenvolvimento de métodos de extração sustentáveis é fundamental para aumentar o valor acrescentado da indústria de algas em expansão global (Babich *et al.* 2022).

Assim, têm sido exploradas técnicas alternativas sustentáveis na extração de compostos de macroalgas, tais como a extração com fluidos supercríticos, a extração assistida por ultrassom e a extração assistida por micro-ondas (MAE). Estes novos métodos oferecem vantagens em relação aos convencionais, como a obtenção de altos rendimentos, a utilização de solventes mais sustentáveis e a otimização de parâmetros para a extração seletiva de compostos bioativos (Cikoš *et al.*, 2018).

Neste trabalho, foram utilizadas duas metodologias convencionais, —extração em multi-etapas (MSE) e extração assistida por autoclave (AAE) e um método alternativo, extração assistida por micro-ondas (MAE).

A MSE é uma técnica realizada em várias fases, que utiliza solventes e condições operacio-

nais diferentes em cada etapa. A fração líquida é recolhida por um processo de separação, enquanto a fração sólida prossegue para a próxima etapa. Cada etapa permite extrair compostos específicos conforme o solvente utilizado (Wuryatmo *et al.*, 2021).

Este método pode começar por misturar a amostra com um solvente de menor nível de polaridade, ou seja, um solvente não polar, passando para um solvente semipolar na seguinte etapa e, finalmente, para um solvente polar. No entanto, pode haver diferentes configurações na utilização dos solventes, conforme o resultado desejado (Wuryatmo *et al.*, 2021)

Habitualmente realizam-se cinco etapas: a primeira com água à temperatura ambiente, com o objetivo de extrair compostos da superfície da parede celular; a segunda com água em ebulição para provocar a lise celular e recolher compostos solúveis em água presentes do interior das células; as três etapas seguintes, com soluções alcalinas e ácidas de forma alternada para extrair compostos solúveis em hidróxido de potássio (o primeiro solvente alcalino), ácido clorídrico (para solubilizar compostos ácidos) e, por fim, uma solução alcalina, o hidróxido de sódio, para remover os restantes compostos. Entre cada etapa, é fundamental proceder à neutralização das frações para renaturar as estruturas (Gordalina *et al.*, 2021).

A MSE apresenta baixo custo de operação e requer equipamentos simples. No entanto, os tempos de extração são longos, há um gasto grande de energia, podendo ocorrer desnaturação térmica de alguns compostos e degradação de algumas moléculas de interesse (Barba *et al.* 2015).

A extração assistida por autoclave é considerada um método convencional e é um tipo de extração termomecânica, que consiste na utilização de água como solvente a temperaturas (50 – 200 °C) e pressão elevadas (Duarte *et al.*, 2014), fragilizando a parede celular que permite o acesso facilitado do solvente de extração. Esta extração permite um elevado rendimento e, por envolver apenas o uso de água, é mais segura para o ambiente. No entanto, o tempo de extração deve ser controlado, pois pode ocorrer degradação dos compostos (Zakaria *et al.*, 2016; Khanra *et al.*, 2018; Cikoš *et al.*, 2018).

Por sua vez, a extração assistida por micro-ondas é a tecnologia não química mais utilizada atualmente à escala laboratorial. Baseia-se na utilização de ondas eletromagnéticas, cujas ondas são não-ionizantes e na faixa de frequência entre 300 MHz e 300 GHz. A absorção das ondas pode originar dois processos diferentes, a rotação dipolar e a condução iónica, dependendo da temperatura e provocando alterações estruturais na matriz (Matos *et al.* 2021; Seoane *et al.*, 2017). O aquecimento por micro-ondas provoca a absorção de energia pelas moléculas polares, resultando na rutura das células e facilitando a transferência de massa e a difusão de compostos para fora da matriz sólida (Cikoš *et al.*, 2018). A MAE pode ser realizada em vasos abertos ou fechados. Os vasos abertos operam à pressão atmosférica, enquanto os vasos fechados operam a uma pressão maior que a atmosférica (Pérez *et al.*, 2014). Os fatores importantes a considerar incluem a frequência, a potência, a razão amostra:solvente, o solvente (concentração e as suas propriedades), as características da matriz, bem como o tempo, a pressão, a temperatura e o número de ciclos de extração (Matos *et al.*, 2021).

A grande vantagem da utilização deste método é a extração de compostos através de um processo económico e sustentável, uma vez que o processo permite reduzir a quantidade de solvente e o tempo de extração (Balasubramanian *et al.*, 2011). Atualmente, já estão descritos alguns protocolos de MAE otimizados para a extração seletiva de polifenóis e polissacáridos de macroalgas (Cikoš *et al.*, 2018). A MAE pode ser ampliada para o nível industrial, embora com restrições devido à penetração limitada das ondas nas matrizes e os custos do equipamento e as competências do operador são elevados, pelo que são necessários mais estudos neste âmbito (Matos *et al.*, 2021).

1.7.2 Métodos de Quantificação de Biocompostos

A deteção e quantificação rápidas e fiáveis do conteúdo de compostos bioativos em espécies de algas e seus derivados são de extrema importância. Após a extração destas moléculas, é essencial quantificar os produtos obtidos. Para detetar compostos bioativos podem ser utilizados diversos métodos, designadamente, espectroscópicos, cromatográficos e de fluorescência. A escolha do método depende do tipo de informação que se pretende obter, da quantificação absoluta ou relativa e do componente a quantificar (Fu *et al.* 2019). A análise bioquímica de macroalgas é, na prática, mais difícil do que a de materiais vegetais. As técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida (LC), cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar e outras técnicas inovadoras têm sido utilizadas para analisar várias classes de compostos obtidos a partir destes organismos, a maioria das quais acoplada a um detetor de matriz de fotodiodo (LC-PDA) ou ultravioleta-visível (LC-UV-Vis) e/ou a um espectrómetro de massa (LC-MS ou GC-MS) e/ou NMR. No entanto, a seleção de amostras é frequentemente efetuada por cromatografia em camada fina (TLC). Em geral, quando a preparação da amostra e a cromatografia são suficientemente seletivas, é aconselhável recorrer a técnicas de deteção espectroscópica mais baratas (Misra *et al.* 2015; Xu *et al.* 2017; Alassali *et al.* 2016). Os métodos de quantificação baseados em fluorescência demonstrada pela formação de alguns complexos biocomposto-corante, podem causar um desvio batocrómico ou hipsocrómico no comprimento de onda que resulta numa variação da intensidade de fluorescência. Destas técnicas de fluorescência, podem ser analisados os espectros de emissão e espectros de excitação. No entanto, este tipo de método de quantificação pode apresentar desvantagens inerentes à sua complexidade, designadamente o tempo e a estabilidade da solução a analisar (Semedo *et al.* 2015; Schmitt *et al.* 2009). A espectroscopia UV-Visível permite adquirir informações sobre a estrutura de vários compostos. Quando esses compostos absorvem luz UV ou visível, ocorrem transições eletrónicas para estados de maior energia ou excitados da molécula. O estudo qualitativo e quantitativo dos compostos pode ser realizado por análise da forma, da altura e da área da banda espectral de absorção. Os métodos colorimétricos têm por base a alteração da absorvância (ou transmitância) de um reagente colorido que é adicionado a uma amostra, podendo esta alteração ser provocada por uma reação com o analito ou através de interações entre o reagente utilizado e o analito. Estes métodos são seletivos, e consistem na comparação da absorvância da mistura reacional obtida para solução padrão e para amostra, usando uma curva de calibração de forma a determinar a concentração do analito em questão presente

na amostra (Lee *et al.* 2013; Semedo *et al.* 2015). Estes métodos quando comparados com os anteriormente mencionados são simples, rápidos, sensíveis, específicos e de baixo custo, continuando, a serem bastante aplicados nos dias de hoje, nomeadamente em microescala. Nas seções seguintes, serão descritos os métodos espectrofotométricos que foram utilizados durante o presente trabalho.

1.7.2.1 Método do Reagente Sulfo-Fosfo-Vanilina (SPV)

O método SPV, por ser expedito, reproduzível e aplicável em pequena escala, permite utilizar microplaca para realizar várias reações em simultâneo com uma pequena quantidade de amostra, tendo sido, por estas razões, selecionado para dosear o teor lipídico dos extratos obtidos a partir das macroalgas em estudo. Este método foi desenvolvido por Chabrol e Charonnat (1937), tendo sido modificado e otimizado diversas vezes (Anschau *et al.*, 2017).) e permite detetar apenas ácidos gordos insaturados, conforme as reações propostas por Knight e seus colaboradores (Knight *et al.* 1972). Anschau e seus colaboradores, mais recentemente que modificaram e adaptaram-no e acrescentam que, para extratos de cor esverdeada, o padrão a utilizar deverá ser azeite ou óleo de origem vegetal (Anschau *et al.*, 2017).

A reação deste método ocorre em três etapas. A primeira etapa ocorre a reação entre o ácido fosfórico com a vanilina para formar ésteres de fosfato com maior reatividade do grupo carbonilo (reagente SPV). Na segunda, com temperatura elevada, lipídios insaturados presentes na amostra (que contêm ligações duplas e grupos hidroxilo livres), reagem com o ácido sulfúrico concentrado, formando *carbonium ion* vanílico incolor (Anschau *et al.*, 2017). Na última etapa, o *carbonium ion* reage com o grupo carbonilo da fosfovanilina na presença de ácido fosfórico, formando um cromóforo rosa, estável por várias horas, com um perfil de absorvância entre 400 a 600 nm (Anschau *et al.* 2017; Park *et al.* 2016).

1.7.2.2 Doseamentos Colorimétricos de Carboidratos

No presente estudo foram avaliados os seguintes tipos de carboidratos: açúcares redutores, polissacáridos totais, ácidos, sulfatados e β -1,3-D-glucanos

Recorreu-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS por ser um dos métodos mais convenientes para dosear açúcares redutores em amostras alimentares. Esta reação (Figura 1.13) ocorre entre DNS com os açúcares redutores, que possuem um grupo carbonilo das aldoses. Este reduz o grupo NO₂ do carbono 3 do ácido a um grupo amina, e o carbonilo da aldose passa a carboxilo. Assim, forma-se o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que exibe uma cor amarela forte que absorve a um comprimento de onda de 540 nm (Lindsay 1973; Deshavath *et al.*, 2020).

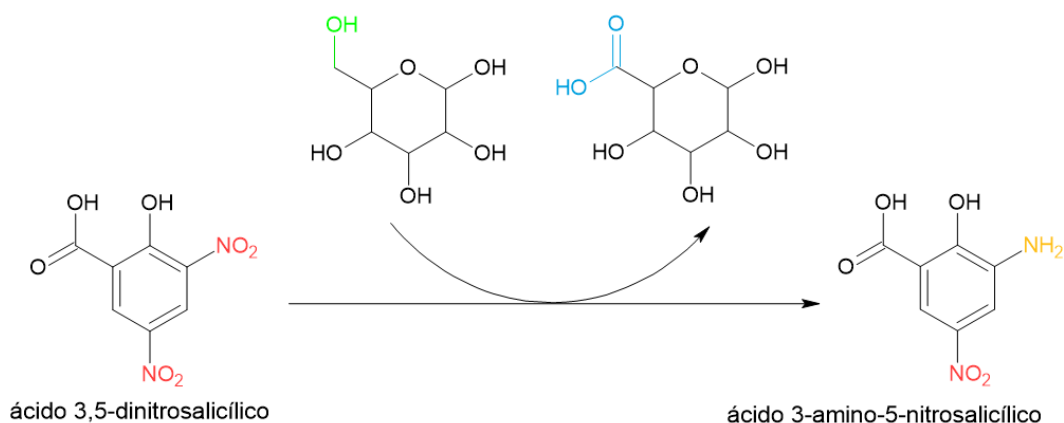


Figura 1.13 Reação simplificada de DNS com açúcares redutores (adaptado de Deshavath *et al.*, 2020).

O método do fenol-ácido sulfúrico desde o seu desenvolvimento por Dubois *et al.*, tem sido até hoje, o método colorimétrico mais utilizado e mais fiável para a quantificação de carboidratos totais. Devido à sua sensibilidade tem sofrido adaptações de modo a alargar o seu espetro de deteção a polissacáridos (neutros e aniónicos), glicoproteínas e glicolípidos e, foi adaptado a microplaca de modo a rentabilizar o processo relativamente à quantidade de reagente e amostra utilizada, e ao tempo necessário para a reação (Albalasmeh *et al.*, 2013; Masuko *et al.*, 2005).

Como ilustrado na Figura 1.14 primeiramente, os carboidratos são desidratados, ou seja, hidrolisados em monossacáridos pela ação do ácido sulfúrico concentrado, transformando-os em derivados de furfural. Numa segunda etapa, o fenol forma complexos com os derivados de furfural que exibem cor acastanhada, sendo detetados a um comprimento de onda de 490 nm (Albalasmeh *et al.*, 2013; Panagiotopoulos *et al.*, 2005).

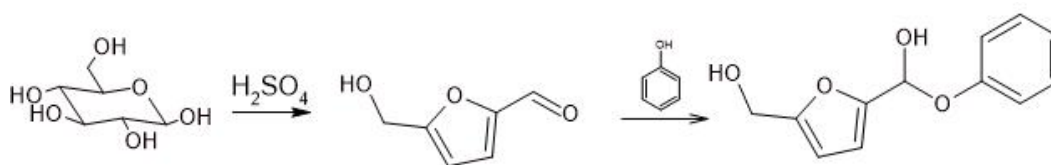


Figura 1.14 Reações do método do fenol-ácido sulfúrico com glucose (adaptado de Wiley 2005).

Contudo, o método apresenta desvantagens, sendo a principal a utilização de fenol, que é prejudicial à saúde do utilizador e do ambiente. Outra desvantagem, relacionada que está relacionada com as amostras em estudo neste trabalho, é o facto que da presença de pigmentos afetar os resultados obtidos através deste método (Chen *et al.*, 2023).

Recorrendo ao método do azul de toluidina [(7-amino-8-metil-fenotiazina-3-ilideno)-dimetil amónio], é possível determinar o conteúdo de polissacáridos sulfatados em extratos brutos de algas, com menor interferência de polissacáridos neutros e ácidos como o alginato. Este método foi desenvolvido por Hahn *et al.* (2016), e utiliza o corante catiónico azul de toluidina que interage com a carga negativa dos grupos éster sulfato destes polissacáridos, provocando um decrés-

cimo na absorvância da mistura reacional a 632 nm, estabelecendo uma relação linear com a concentração destes compostos. O método não é corrosivo, é simples e rápido, e apresenta poucas limitações, tais como a necessidade de condições reacionais de pH neutro e a presença de pelo menos um dissacárido sulfatado na amostra para que ocorra reação e consequente mudança de cor (Hahn *et al.*, 2016). Este método tem sido alvo de adaptações e otimizações, no entanto, a escolha do padrão continua a ser um desafio (Abdella *et al.*, 2024).

O método do carbazol-ácido sulfúrico foi descrito por Dische (1947), tendo sofrido diversas adaptações, e é um dos métodos mais sensíveis e reprodutíveis para dosear polissacáridos ácidos com menos interferência de polissacáridos neutros, através da reação com ácido sulfúrico e carbazol (Filisetti-Cozzi *et al.*, 1991; Gabriel, 2023). Este método desenvolve uma cor vermelha cuja absorção máxima ocorre a 525 nm pela adição de ácido sulfúrico, que promove a hidrólise, originando moléculas de furano que reagem com o carbazol a temperatura elevada (Li *et al.*, 2007).

É um método colorimétrico simples e reprodutível, que permite uma rápida análise de várias amostras, requerendo pouco volume de amostra. No entanto, pode ser afetado pela presença de açúcares neutros e NaCl nas amostras a analisar (Cesaretti *et al.*, 2003; Gabriel, 2023).

Os β -1,3-D-glucanos são doseados facilmente pelo método colorimétrico com o corante Congo red (Figura 1.15) de forma sensível, rápida e barata. Nitschke *et al.* e Semedo *et al.* estudaram a detecção de β -D-glucanos de tripla hélice com o corante Congo Red, verificando que o corante Congo red apresenta interação seletiva e sensível com β -(1,3)-(1,6)-glucanos de tripla hélice (Semedo *et al.*, 2015; Nitschke *et al.*, 2011).

Os grupos amino deste corante azo estabelecem pontes de hidrogénio com os grupos hidroxilo, e interações Van der Waals com a tripla hélice dos β -1,3-D-glucanos (Kupetz *et al.*, 2015). Consequentemente essas interações resultam num desvio batocrómico de 488 para 516 nm não interagindo com outros polissacáridos (Semedo *et al.*, 2015).

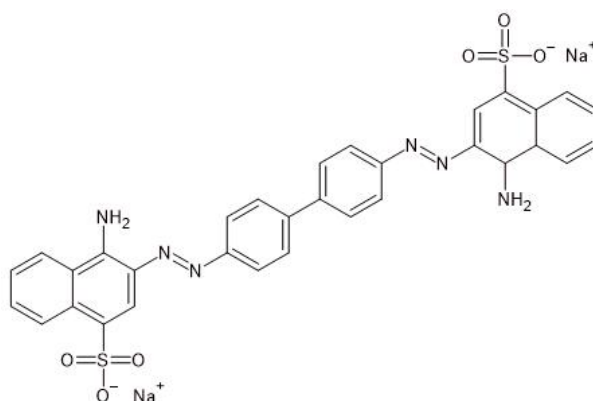


Figura 1.15 Estrutura química do corante Congo red (adaptado de Merck, 2024).

1.7.2.3 Método de Bradford

O método espectrofotométrico de ligação do Azul de Coomassie desenvolvido por Bradford (1976), tornou-se num método útil para deteção e quantificação de proteínas com uma vasta aplicação por ser um método expedito, reprodutível, sensível e economicamente viável, e ao facto de apresentar menos interferentes do que outros métodos desenvolvidos para o mesmo efeito (Sapan *et al.*, 1999). Este método envolve a ligação do corante Azul Brilhante Coomassie G-250 (Figura 1.16) à proteína através de interações eletrostáticas com aminoácidos básicos protonados (lisina, arginina e histidina) e por associações hidrofóbicas com resíduos aromáticos de proteínas separadas, formando um complexo corante-proteína de cor azul, uma vez que o corante passa à forma aniónica, resultando numa mudança da absorção máxima do corante de 465 para 595 nm. Para quantificar o teor total de proteína, é necessário construir uma curva calibração com uma proteína de referência, usualmente a albumina de soro bovino (BSA), devido à sua maior reprodutibilidade de resultados. (Bradford, 1976; Sundaram *et al.*, 2012).

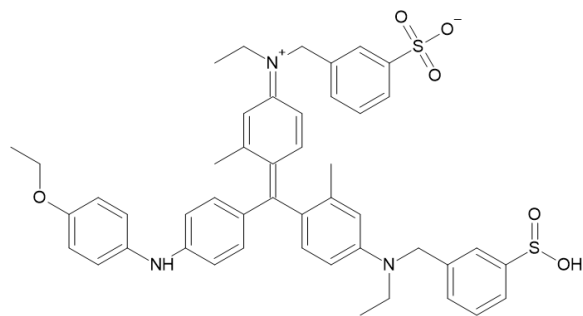


Figura 1.16 Estrutura do corante Azul de Coomassie G-250 (adaptado de Merck, 2024).

O método de Bradford apresenta pouca interferência de cationes e de carboidratos, no entanto, há substâncias como o glicerol, detergentes, sulfato de amónio e alguns tampões alcalinos, que podem interferir no método. Outra lacuna deste método é a incapacidade do corante criar complexos com proteínas ou péptidos com massa molar inferior a 3000 Da (Moreno *et al.*, 1986; Bio-Rad, 2007).

1.7.2.4 Doseamento de Pigmentos

Usualmente, recorre-se a espectroscopia de UV-Vis para quantificar o teor de pigmentos, baseado na determinação de coeficientes de absorção específicos a determinados comprimentos de onda associados ao pigmento específico. De forma a determinar as concentrações destes compostos presentes nas amostras analisadas, os valores de absorvância registados são aplicados a equações matemáticas características do solvente utilizado na extração dos pigmentos. Neste trabalho foram avaliados clorofilas, carotenoides totais, fucoxantina e ficobiliproteínas.

Para a quantificação de clorofilas e carotenoides totais, geralmente recorre-se à extração com solventes orgânicos, e as absorvâncias dos extratos são lidas em vários comprimentos de onda. A partir das equações apresentada por Lichtenthaler (1987), determina-se o teor de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenoides totais. As equações de Lichtenthaler (1987) variam consoante a proporção dos solventes utilizados, para extratos com acetona utilizaram-se as Equações 1.1 a 1.4 e para extratos aquosos utilizou-se uma aproximação às Equações 1.5 a 1.8 aplicada a extratos em éter dietílico saturado em água (Lichtenthaler, 1987).

1.7.2.4.1 Equações para extratos com acetona:

$$[C_a] = 11,24 \times Abs_{661,6} - 2,04 \times Abs_{644,8} \quad (1.1)$$

$$[C_b] = 20,13 \times Abs_{644,8} - 4,19 \times Abs_{661,6} \quad (1.2)$$

1.7.2.4.2 Equações para extratos aquosos:

$$[C_{a+b}] = 7,05 \times Abs_{661,6} + 18,09 \times Abs_{644,8} \quad (1.3)$$

$$[C_{Carotenoides}] = \frac{100 \times Abs_{470} - 1,90 \times C_a - 63,14 \times C_b}{214} \quad (1.4)$$

$$[C_a] = 10,36 \times Abs_{661,6} - 1,28 \times Abs_{643,2} \quad (1.5)$$

$$[C_b] = 17,49 \times Abs_{643,2} - 2,72 \times Abs_{661,6} \quad (1.6)$$

$$[C_{a+b}] = 7,64 \times Abs_{661,6} + 16,21 \times Abs_{643,2} \quad (1.7)$$

$$[C_{Carotenoides}] = \frac{1000 \times Abs_{470} - 1,38 \times C_a - 48,05 \times C_b}{211} \quad (1.8)$$

Para quantificação de fucoxantina em extratos aquosos são efetuadas leituras de absorvância a 480, 582, 631, 665 e 750 nm, e através da aproximação das Equação 1.9 para extratos com DMSO e água, apresentada por Osório *et al.* (2020), quantifica-se a concentração de fucoxantina em mg/g amostra.

$$[\text{Fucoxantina}] = 7,69 \times \left((Abs_{480} - Abs_{750}) - 5,55 \times \left[(Abs_{631} - Abs_{750}) + (Abs_{582} - Abs_{750} - 0,297 \times (Abs_{665} - Abs_{750})) \right] - 0,377 \times (Abs_{665} - Abs_{750}) \right) \quad (1.9)$$

De forma a quantificar ficobiliproteínas em extratos aquosos, são realizadas leituras de absorvância a 565, 620 e 650 nm. Através das equações Equações 1.10 a 1.12 desenvolvidas por Bennett *et al.* (1973), Bryant *et al.* (1979), Román *et al.* (2002) e utilizando os coeficientes de extinção molar das ficobiliproteínas determinados por Juin *et al.*, (2015), é possível estimar a concentração de ficobiliproteínas em mg/g amostra.

$$[\text{Ficocianina}] = \frac{Abs_{620} - 0,62 \times Abs_{650}}{3,22} \quad (1.10)$$

$$[\text{Aloficocianina}] = \frac{Abs_{650} - 0,20 \times Abs_{620}}{5,73} \quad (1.11)$$

$$[\text{Ficoeritrina}] = \frac{Abs_{565} - 1,26 \times [PC] - 0,615 \times [APC]}{5,53} \quad (1.12)$$

1.7.2.5 Método Folin-Ciocalteu

O método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, é um método simples, de baixo custo e de rápida execução, é frequentemente utilizado para quantificar o teor de compostos fenólicos totais em macroalgas (Santos *et al.*, 2019). Inicialmente, o método foi desenvolvido em 1912 por Folin e Denis para quantificar ácido úrico; os autores concluíram que o reagente formulado também interagia com tirosina e derivados de fenol (Folin *et al.*, 1912). Em 1927, Folin e Ciocalteu adaptaram o método para a quantificação de proteínas através do doseamento de tirosina e triptofano (Folin *et al.*, 1927). O método só foi inteiramente adaptado para a quantificação do teor total de compostos fenólicos em 1959 por Swain e Hillis em ameixa, *Prunus domestica*, e em 1965 foi adaptado por Singleton e Rossi para a quantificação de compostos fenólicos em vinhos (Swain *et al.*, 1959; Singleton *et al.*, 1965). Ambos os ensaios são atualmente utilizados para a quantificação de compostos fenólicos totais, tendo já sido adaptado para a quantificação de lipofílicos anti-oxidantes (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

Este método baseia numa reação de transferência de elétrons e que mede a capacidade redutora da espécie anti-oxidante. É realizado utilizando reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico, que são reduzidos em condições alcalinas pelos compostos fenólicos presentes na amostra, formando os cromogéneos oxotungstato e

oxomolibdato A formação da cor é proporcional à concentração de compostos fenólicos, sendo a efetuada a leitura da absorvância a 765 nm (Nikolaeva *et al.*, 2022; Sánchez-Rangel *et al.*, 2013; Lamuela-Raventós *et al.*, 2017).

Considera-se que o método envolve uma sequência de reações reversíveis de redução de um ou dois elétrões (Figura 1.17) (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

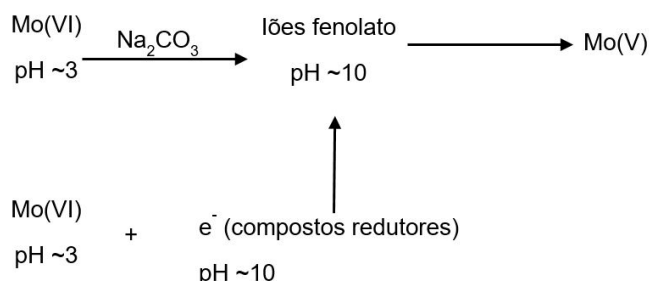


Figura 1.17 Reações do método de Folin-Ciocalteu (adaptado de Sánchez-Rangel *et al.*, 2013)

No entanto, a reação é lenta a pH ácido e carece de especificidade, uma vez que poderá sofrer interferências com outros compostos, como ácido ascórbico, aminas aromáticas e açúcares. Devido às várias adaptações que este método sofreu, não há um grande consenso quanto ao volume e à concentração dos reagentes e extratos, bem como o tempo de incubação, que pode variar entre 20 a 30 min até ensaios de duas horas. Relativamente ao padrão, o mais utilizado para a quantificação do teor de compostos fenólicos totais em macroalgas é o ácido gálico ou o floroglucinol, sendo também frequente utilizar-se catecol e ácido tânico (Santos *et al.*, 2019).

1.7.2.6 Método do Cloreto de Alumínio

O método colorimétrico do cloreto de alumínio é habitualmente o mais utilizado para a terminação de compostos flavonoides, e foi inicialmente proposto por Christ e Muller em 1960 para a determinação de derivados de flavonol em medicamentos (Christ *et al.*, 1960). O método tem por base a capacidade quelante dos flavonoides para com iões metálicos (Figura 1.18) (Sharaim *et al.*, 2021). As interações ocorrem entre o Al(III) e os grupos carbonilo do C4 e hidroxilo do C3 ou do C5 dos flavonoides em meio alcalino, formando complexos ácidos estáveis detetáveis na gama do visível (Magalhães *et al.*, 2012). Para a construção da curva de calibração, usualmente recorre-se a catequina, a quercetina ou a rutina (Magalhães *et al.*, 2012).

O método utilizado neste trabalho foi o protocolo descrito por Bao *et al.* (2005) adaptado por Yeh *et al.* (2010), onde a reação de nitrosilação não é realizada, formando-se um complexo amarelado que absorve a um comprimento de onda entre 410 a 440 nm (Sharaim *et al.*, 2021; Yeh *et al.*, 2010; Bao *et al.*, 2005).

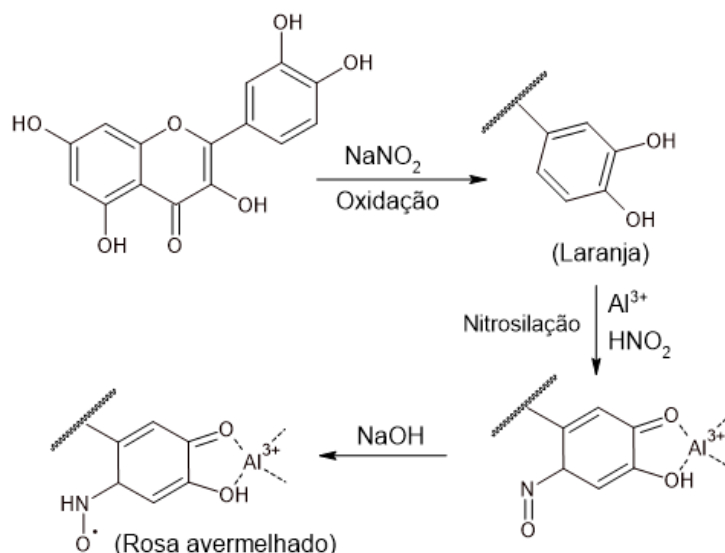


Figura 1.18 Formação do complexo ácido estável do método do cloreto de alumínio (adaptado de Sharaim *et al.*, 2021).

1.8 Atividade Biológica

As macroalgas são estudadas devido ao interesse nas suas propriedades biológicas, como fonte de compostos bioativos que promovem a saúde e previnem ou reduzem o impacto de várias doenças, através das suas propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais e antibacterianas (Boris-Dorhoi *et al.*, 2020). Neste trabalho, a atividade biológica das algas em estudo foi explorada através das atividades anti-oxidante, antibacteriana e citotóxica.

1.8.1 Atividade Anti-oxidante

As espécies reativas de oxigénio (ROS) como o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido e hidrogénio (H_2O_2), e os radicais hidroxilo ($\cdot OH$), são produtos resultantes do funcionamento normal das células, que participam no sistema de imunidade inata, vasodilatação, neurotransmissão e regulação genética (Tziveleka *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2023). Também existem espécies reativas de nitrogénio (RNS) que são radicais livres de nitrogénio com alta capacidade oxidativa (Wei *et al.*, 2023).

O *stress* oxidativo (Figura 1.19) ocorre quando o equilíbrio entre compostos oxidantes e anti-oxidantes é perturbado num sistema biológico, causando danos às proteínas, lipídios e DNA, e morte celular por apoptose (Wei *et al.*, 2023). Geralmente é provocado por uma produção excessiva de ROS e RNS no organismo ou pela exposição a ambientes redox, onde a produção de radicais livres é favorecida. (Tziveleka *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2023).

O *stress* oxidativo de um modo geral está associado aos processos patológicos de muitas doenças inflamatórias, neurodegenerativas, distúrbios do sistema imunológico e envelhecimento (Figura 1.19) (Tziveleka *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2023).

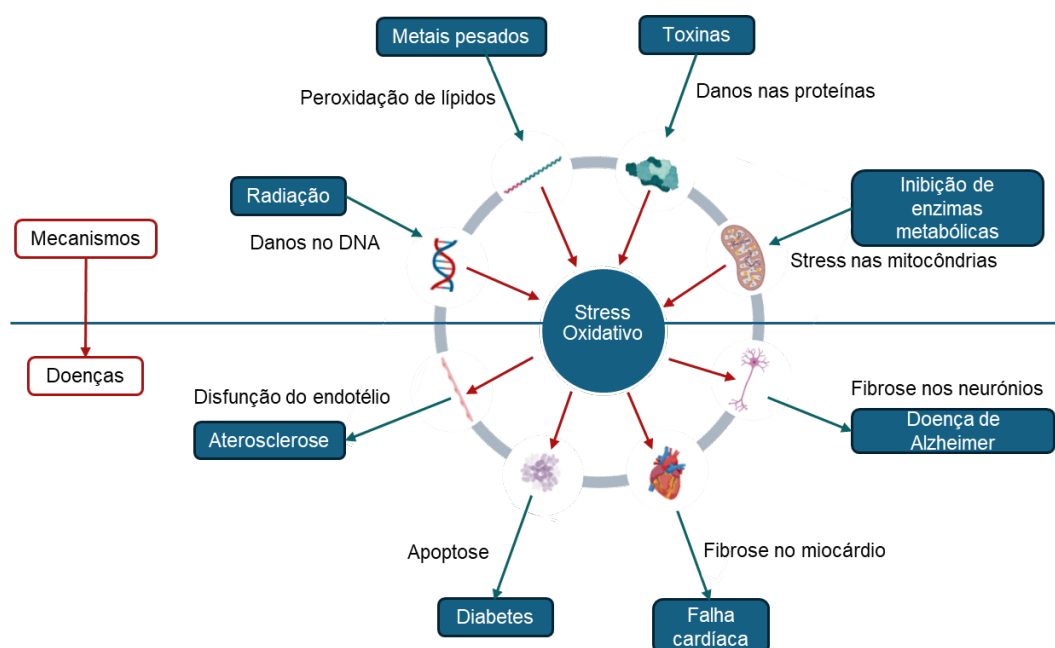


Figura 1.19 Mecanismos patogênicos derivados do *stress oxidativo* (adaptado de Wei *et al.*, 2023).

Os anti-oxidantes podem reduzir a produção de ROS no organismo, prevenindo o *stress oxidativo* e, conseqüentemente prevenir e tratar doenças afetadas por este fenômeno (Wei *et al.*, 2023). Como sistema de defesa, os organismos produzem anti-oxidantes enzimáticos, como por exemplo, superóxido dismutases, catalases, lactoperoxidases e glutathione peroxidases. Além disso, também podem ser atenuados por anti-oxidantes exógenos, como por exemplo, ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), β -caroteno, flavonoides e polifenóis (Tziveleka *et al.*, 2021).

A estratégia mais eficaz e amplamente utilizada para diminuir o *stress oxidativo* é a suplementação com anti-oxidantes exógenos (Tziveleka *et al.*, 2021). No entanto, uso generalizado de anti-oxidantes é preocupante, uma vez que determinados compostos em certas concentrações, podem exibir toxicidade e agir como pró-oxidantes. Por este motivo, a investigação de compostos anti-oxidantes naturais tem aumentado, devido principalmente à sua biocompatibilidade (Wei *et al.*, 2023). As algas marinhas constituem uma boa fonte de compostos anti-oxidantes, como compostos fenólicos, flavonoides, pigmentos, proteínas e polissacáridos (Tziveleka *et al.*, 2021).

A atividade anti-oxidante destes compostos pode ser avaliada por ensaios, que são classificados em dois tipos, de acordo com as reações envolvidas nos métodos de análise: reações que quantificam a capacidade de doação de átomos de hidrogênio (HAT), reações 1 e 2 abaixo indicadas, e reações que quantificam a capacidade redutora do anti-oxidante pela transferência de elétrons (SET), reações 3 a 5 (Huang *et al.*, 2005; Schaich *et al.*, 2015).

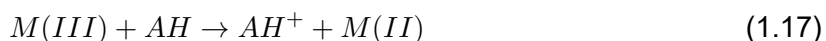
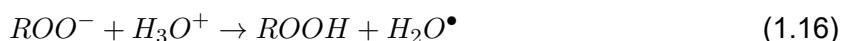
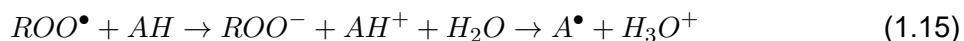
HAT – Transferência de átomos de hidrogênio

Átomo de H transferido para o radical



SET – Transferência de eletrão

Um ou mais eletrões são transferidos para reduzir o composto alvo (radical, oxidante, metal)



Os métodos mais utilizados que envolvem este tipo de reação incluem o ensaio da capacidade de absorção de radicais de oxigénio e o ensaio do potencial de captura de radicais totais. Os métodos mais utilizados através de reações que envolvem a transferência de eletrões incluem a inibição do radical catiónico ABTS [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], ou do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) em comparação com o padrão trolox, bem como o ensaio da capacidade redutora de Fe^{3+} e capacidade quelante de Fe^{2+} . (Tziveleka et al., 2021). Neste trabalho recorreu-se aos métodos da inibição do radical ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) e a capacidade quelante de Fe^{2+} , para a avaliação da capacidade oxidante dos extratos obtidos a partir das algas em estudo.

Atualmente, é utilizado para avaliar a atividade anti-oxidante através da capacidade redutora de um composto pela transferência de eletrões. O radical catiónico é formado através da oxidação do ABTS com persulfato de potássio, sendo reduzido na presença de compostos oxidantes doadores de hidrogénio. O radical $ABTS^{\bullet+}$ tem uma cor azul característica que apresenta máximos de absorvância a 645 nm, a 734 nm e a 815 nm, e na presença de compostos anti-oxidantes é reduzido à sua forma original incolor, ABTS (Figura 1.20) (Re et al., 1998; Erel, 2004). O método pode ser aplicado no estudo de compostos anti-oxidantes solúveis em água ou lípidos, e de extratos alimentares (Re et al., 1998).

Muitas espécies oxidativas e radicais são formados em reações na presença de iões, Fe^{2+} , devido à sua capacidade de transferir eletrões. Assim, a quelação de Fe pode ser uma abordagem terapêutica para evitar a formação de radicais e remover Fe indesejado nos tecidos sob a forma de complexos solúveis, que são eliminados por secreções. No entanto, devido à ausência de ligandos eficazes, a descoberta de moléculas capazes de quelar, recebe a devida atenção por parte dos investigadores (Adjimani et al., 2015).

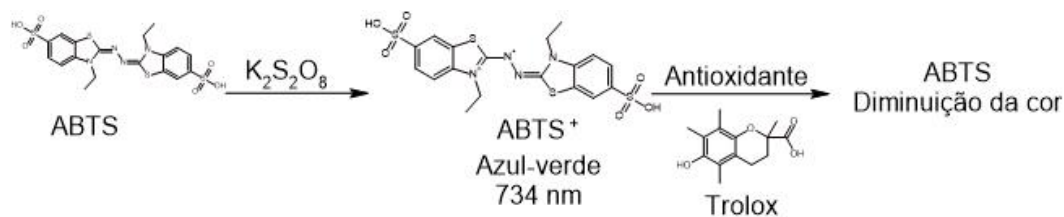


Figura 1.20 Esquema da reação do método do radical catiónico ABTS (adaptado de Schaich *et al.*, 2015).

O método espectrofotométrico para averiguar a capacidade quelante de iões Fe^{2+} foi proposto por Cártter em 1971, através do uso de ferrozina, hidrato de sal monossódico do ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-dissulfónico (Santos *et al.*, 2017). A reação entre a ferrozina e o Fe^{2+} forma um complexo cor de rosa detetado a 560 nm, que na presença de um composto com capacidade quelante forma-se um complexo com o metal quelado, e observa-se a diminuição da cor, Figura 1.21 (Adjimani *et al.*, 2015; Canabady-rochelle *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2017).

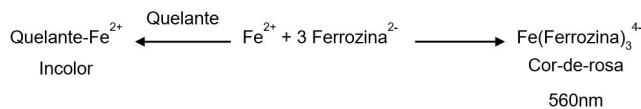


Figura 1.21 Esquema reacional do método da capacidade quelante dos iões Fe^{2+} (adaptado de Canabady-rochelle *et al.*, 2015).

1.8.2 Atividade Antibacteriana

A procura por novas moléculas com capacidade antibacteriana tem sido cada vez mais explorada, considerando a rapidez com que as bactérias têm adquirido mecanismos de resistência a antibióticos cada vez mais sofisticados nas últimas décadas. Assim, a resistência de microrganismos patogénicos a antibióticos sintéticos tornou-se um perigo significativo para a saúde pública, tornando imperativo explorar novas alternativas para enfrentar este problema (Pérez *et al.*, 2016).

Como já foi explorado na Seção 1.3, sobre Biocompostos, as algas marinhas são uma excelente fonte de compostos biologicamente ativos, uma vez que, contêm uma infinidade de compostos diferentes, com propriedades e efeitos biológicos variados, atuando de forma sinérgica.

A atividade antibacteriana dos lipídios foi atribuída à sua capacidade de inibir a cadeia de transporte de eletrões e a fosforilação oxidativa nas membranas celulares, levando à formação de produtos oxidativos que provocam a lise celular (Shannon *et al.*, 2016; Kasanah *et al.*, 2019).

As propriedades antimicrobianas dos polissacáridos de macroalgas são atribuídas à interação entre glicorreceptores da parede celular bacteriana, constituintes da membrana, e ácidos nucleicos. A interação dos polissacáridos com esses alvos causa a instabilidade da membrana e compromete o funcionamento celular (Shannon *et al.*, 2016). O efeito dos polissacáridos

pode variar conforme o peso molecular, grupos funcionais e conformação (Abu-Ghannam *et al.*, 2013). Por exemplo, os fucoidanos conseguem interagir com proteínas de membrana, induzindo a ruptura desta, causando a morte celular (Liu *et al.*, 2017). Extratos de *Laminaria* spp., ricos em fucoidanos e laminarina, demonstraram inibição bacteriana de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Liu *et al.*, 2017; Kadam *et al.*, 2015). Outros estudos apontam a capacidade dos fucoidanos de reterem nutrientes, tornando-os menos biodisponíveis para as bactérias (Id *et al.*, 2015).

Outros compostos como os peptídeos e proteínas, como por exemplo as lectinas, exibem atividade antibacteriana devido à sua natureza anfílica, que permite a interação com locais polares e não polares da membrana citoplasmática, formando poros que podem causar a ruptura celular (Beaulieu *et al.*, 2015; Silva, *et al.*, 2020).

Peptídeos isolados de *Porphyra yezoensis* demonstraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* através de mecanismos de interação com a parede e a membrana celular, provocando a lise celular, conseqüentemente, à morte da bactéria (Jiao *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos têm a capacidade de alterar a permeabilidade da membrana celular das bactérias e inibir enzimas interferindo nas vias metabólicas. A atividade antibacteriana destes compostos fenólicos está relacionada com os grupos hidroxilo e o grau de polimerização das suas estruturas (Abu-Ghannam *et al.*, 2013; Bhowmick *et al.*, 2020). Uma vez que estes compostos pertencem a uma vasta gama de classes estruturais e funcionais, o mecanismo de ação antibacteriana de todos estes grupos funcionais, até à data, não foi completamente descrito. No entanto, para compostos como polifenóis e polissacáridos, já foram propostos alguns destes mecanismos (Bhowmick *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). As propriedades antibacterianas conferidas pelos polifenóis ocorrem normalmente através de diversas interações com a célula bacteriana, como a ligação a moléculas adesivas de superfície, a inibição de enzimas de diferentes vias metabólicas ou perturbando a permeabilidade da membrana. O mecanismo subjacente à atividade antibacteriana conferida pelos polissacáridos foi proposto como sendo baseado na presença de recetores de glicoproteínas nestes compostos, que se podem ligar às moléculas presentes na parede celular bacteriana, na membrana e nos ácidos nucleicos. Estas interações resultam cumulativamente na desorganização da estrutura da membrana, perda de permeabilidade da membrana, fuga de proteínas e disfuncionalidade do DNA bacteriano (Bhowmick *et al.*, 2020).

O 1,8-di-hidroxi-antraquinona extraída de *Porphyra haitanensis* exibiu forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* pela interação da antraquinona com a parede e a membrana celular, provocando a lise celular (Wei *et al.*, 2014).

Os florotaninos exibem maior atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, provavelmente devido à simplicidade da membrana celular destas bactérias em comparação com as Gram-negativas (Bogolitsyn *et al.*, 2019).

Quanto aos pigmentos, o mecanismo antimicrobiano ainda não foi totalmente compreendido.

Os principais mecanismos propostos consistem no aumento da permeabilidade da membrana celular que provoca lise celular, e na inibição da produção de ácidos nucleicos (Karpinski *et al.*, 2019). Estudos indicam que os carotenoides provocam acumulação de lisozima, que digere a parede celular bacteriana (Abu-Ghannam *et al.*, 2013).

A resistência aos antibióticos é atualmente uma preocupação da sociedade moderna, revelando-se as algas e os cogumelos como uma excelente fonte para a descoberta de novos medicamentos alternativos aos antibióticos, uma vez que vários metabolitos primários e secundários destes organismos têm demonstrado propriedades antibacterianas promissoras (Bhowmick *et al.*, 2020; Lomartire *et al.*, 2023).

Um estudo com vários extratos de algas marinhas concluiu que o extrato de alga kombu exibiu a maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, enquanto o extrato de alga wakame teve menor atividade antimicrobiana tanto contra bactérias Gram-positivas como contra Gram-negativas (Čmiková *et al.*, 2022). Com base nas informações dos trabalhos desenvolvidos por Čmiková *et al.* (2022), Wei *et al.* (2014) e Jiao *et al.* (2019), prevê-se que as algas estudadas neste trabalho apresentem atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas, salientando-se a alga kombu.

Nessa perspectiva, a actividade antibacteriana dos extratos obtidos será avaliada contra bactérias patogénicas, utilizando o método de susceptibilidade de difusão em disco, também designado por teste de Kirby-Bauer, e testes de microdiluição em meio líquido para determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) (Bhowmick *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2021; Slusarczyk *et al.*, 2021).

A determinação da concentração mínima inibitória (MIC) é realizada a partir de uma técnica simples que fornece aproximadamente a menor concentração de composto antibacteriano que inibe o crescimento de uma determinada bactéria em $\geq 80,0\%$ do crescimento bacteriano comparativamente ao controlo, através da observação direta da turbidez (Wiegand *et al.*, 2008; Kowalska-Krochmal *et al.*, 2021). Para determinar essa concentração, são realizadas microdiluições sucessivas em poços de microplacas de 96 poços, em meio de cultura inoculado com a mesma concentração de células. Após 24 horas, o resultado é observado pela turbidez. No entanto, quando se estudam extratos, fitoquímicos, leite, óleos essenciais e biossurfactantes, a observação da turbidez pode ser combinada com o uso de um indicador de atividade bacteriana (Chakansin *et al.*, 2022).

Um dos indicadores de viabilidade celular mais utilizado é a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) que é um corante azul fracamente fluorescente, e que na presença de oxidoreduzases produzidas por bactérias ativas, é irreversivelmente reduzida a resorufina um corante rosa com altíssima fluorescência (Figura 1.22)(Csepregi *et al.*, 2018).

O ensaio colorimétrico com resazurina é amplamente utilizado para testar a viabilidade celular, uma vez que é um método simples, pouco dispendioso e relativamente rápido, pois não requer etapas adicionais de lise celular necessárias noutros métodos. Este ensaio exige apenas a aplicação de 10% do volume da cultura a ser testada e pode ser determinado por espectro-

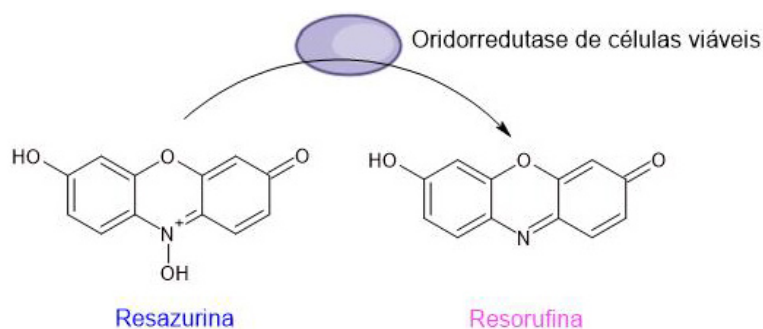


Figura 1.22 Redução da resazurina a resorufina na presença oxidoreductases produzidas por células viáveis (adaptado de Csepregi *et al.*, 2018).

fotometria ou espectrofluorometria. Os máximos de excitação e emissão de fluorescência da resorufina estão aproximadamente em 570 nm e 585 nm, respectivamente. No entanto, para o ensaio de viabilidade celular, a fluorescência da resorufina é determinada com comprimentos de onda de excitação entre 530 e 580 nm e de emissão entre 570 e 620 nm (Csepregi *et al.*, 2018).

1.8.3 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica permite avaliar se as macroalgas exibem toxicidade para quem as ingere, mesmo quando consideradas comestíveis. Alguns dos compostos presentes nas macroalgas possuem propriedades biológicas e mecanismos de ação que exibem um potencial antitumoral, tornando-se assim importante perceber se esses compostos são seletivos para células tumorais sem prejudicar as células saudáveis. Caso se verifique seletividade, os compostos presentes em macroalgas são considerados biocompatíveis, permitindo a aplicação em terapias antitumorais e imunomoduladoras, bem como em suportes para engenharia de tecidos e transporte de fármacos (*drug delivery*) (Mashjoor, *et al.*, 2016).

Em muitos estudos, os fitoesteróis de plantas exibiram efeitos tóxicos em células do cancro da mama, cólon e próstata (Awad *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1992). A atividade antitumoral é atribuída à inibição do crescimento, interrupção do ciclo celular e apoptose de células tumorais (MS *et al.*, 2018). As *Phaeophyceae*, a classe das algas castanhas, são conhecidas na literatura pela produção de alguns tipos de fitoesteróis, incluindo fucosteróis e saringoesteróis (Priyanka *et al.*, 2022).

A carragenina é um polissacárido sulfatado produzido principalmente de macroalgas vermelhas, *Rhodophyta* (Priyanka *et al.*, 2022). É utilizada comercialmente nas indústrias farmacêuticas como um agente antitumoral, antiviral, anticoagulante e imunomodulador, uma vez que induz a produção de anticorpos. Devido à sua capacidade de retenção de água e à capacidade de formar um gel resistente, a carragenina é amplamente utilizada em engenharia de tecidos, demonstrando assim a sua biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (Priyanka *et al.*, 2022; Cheng *et al.*, 2021; Chee *et al.*, 2019).

A laminarina é um glucano específico das *Phaeophyceae*, descrito na literatura pela sua bi-

ocompatibilidade, baixa citotoxicidade e como material de suporte à proliferação celular. Outras propriedades atribuídas a este polissacárido incluem atividades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e anti-oxidantes. Pode ser utilizada em imunoterapia e no desenvolvimento de vacinas, além de servir como mecanismo de *drug delivery* devido às suas capacidades de encapsulamento e formação de uma estrutura porosa. Também pode ser aplicada em engenharia de tecidos na fabricação de produtos para a regeneração de tecidos, uma vez que permite boa adesão e migração celular, podendo assim ser utilizada como suporte no crescimento de células animais (Pramanik, *et al.*, 2024).

As proteínas de macroalgas como a lectina testão identificadas com efeitos antitumorais, inibindo a proliferação celular, interferindo no ciclo celular e induzindo a apoptose por meio da regulação das vias intrínsecas e extrínsecas. Estas proteínas têm exibido também atividade imunomoduladora (Santana de Arruda *et al.*, 2023).

O consumo de alimentos ricos em carotenoides e outros componentes ativos está associada à redução do risco de malignidades em tumores do cólon, pulmão e mama (Kim *et al.*, 2011). Um carotenoide que tem sido extensivamente investigado pela sua atividade antitumoral e capacidade de prevenir tumores é a fucoxantina, produzido principalmente por algas castanhas (Satomi *et al.*, 2017). Este exibe a capacidade de inibir o crescimento celular, induzir apoptose e autofagia em várias linhas de células tumorais, além de danificar ou impedir a correção do DNA de células tumorais. O tratamento através de quimioterapia combinado com fucoxantina permite a inibição dos mecanismos de metástase e angiogênese, bem como a redução da resistência aos medicamentos (Méresse *et al.*, 2020).

Extratos da alga vermelha *Porphyra tenera* mostraram, em ensaios *in vitro* com células de murganhos, uma melhoria na resposta imune dos macrófagos, interferindo com vias de sinalização de cinases (Song *et al.*, 2017). Estudos com extrato da alga nori seca, (*Porphyra yezoensis*), demonstraram atividade imunomoduladora em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro*, observaram a indução da atividade do interferão IFN- γ em células do baço de murganho, e também verificaram em linhas celulares humanas um aumento da citotoxicidade das células *natural killer* (que são células do sistema imunológico) (Kitajima *et al.*, 2013).

Num estudo *in vivo* com murganhos, os investigadores suplementaram a alimentação dos animais com kombu e com um composto carcinogénico, e determinaram a taxa de mortalidade dos animais. Concluíram que a suplementação com kombu não afetava a expectativa de vida dos murganhos em comparação com os animais receberam uma fonte de fibra vegetal. No entanto, os animais que foram suplementados com kombu e com o carcinogénico apresentaram uma taxa de mortalidade menor em comparação com aqueles que foram alimentados com outra fibra alimentar suplementada com o carcinogénico. Observaram ainda que os animais suplementados com kombu tinham uma melhor capacidade de eliminar o carcinogénico por secreções, em comparação com aqueles que receberam outras fibras alimentares (Sakakibara, *et al.*, 2005).

Vlaisavljević e seus colaboradores estudaram os efeitos da citotoxicidade dos extratos das algas kombu e wakame numa linha celular tumoral de cancro da próstata. Neste estudo, ava-

liaram o conteúdo de biomoléculas e concluíram que os extratos exibem uma boa atividade anti-oxidante *in vitro*, e não foram observados efeitos citotóxicos contra as células tumorais estudadas (Vlaisavljević *et al.*, 2021). Tang e seus colaboradores também investigaram a citotoxicidade de extratos obtidos a partir das algas kombu e wakame, contra as linhas celulares não tumorais de murganhos 3T3 e SV-T2, verificando baixa ou nenhuma citotoxicidade para a maioria dos extratos aquosos, enquanto os extratos etanólicos exibiram elevada citotoxicidade, especialmente as frações de elevado peso molecular (Tang *et al.*, 2008).

O método colorimétrico do MTT (sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)), desenvolvido por Mosmann em 1983, é um ensaio para avaliar a viabilidade celular através da detecção de células vivas. O MTT entra nas células viáveis e, dentro das mitocôndrias, o composto amarelo é reduzido por oxidoredutases, como o NAD(P)H, a formazan, que precipita na forma de cristais roxos, provocando a lise celular (Figura 1.23). Para a leitura da absorvância entre 500 a 600 nm, os cristais insolúveis de formazan precisam de ser solubilizados. A intensidade da cor roxa é proporcional à viabilidade celular, se a cor amarela permanecer, traduz a ausência de células viáveis, indicando morte celular na presença do composto a testar (Berridge *et al.*, 1993).

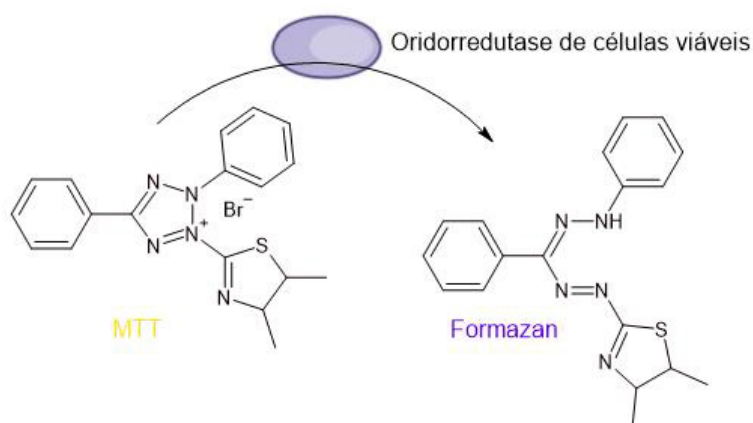


Figura 1.23 Redução do MTT a formazan na presença de oxidoredutases produzidas por células viáveis (adaptado de Berridge *et al.*, 1993).

1.9 Técnicas de Caracterização Estrutural de Biocompostos

As principais técnicas utilizadas para a caracterização estrutural de compostos naturais incluem a espectrometria de massa (MS), a ressonância magnética nuclear (NMR) e cristalografia de raios X. Estes métodos são essenciais para determinar estruturas moleculares em compostos complexos, identificar grupos funcionais e interações químicas. A MS mede a relação massa-carga dos íons e através dessa relação é possível determinar a massa molecular e a estrutura dos compostos, sendo amplamente utilizada na análise de misturas complexas. Nesta técnica houve grandes avanços tecnológicos com a introdução de técnicas acopladas, como por exemplo a espectrometria de massa por imagem (MSI), espectrometria de massa por ionização rápida por evaporação induzida por laser (REIMS) e espectrometria de massa com mobilidade

iónica (IM-MS). Estas técnicas quando combinadas permitem estabelecer protocolos padronizados mais eficientes (Přichystal *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019; Matins *et al.*, 2023).

A NMR oferece detalhes sobre os átomos numa molécula, permitindo identificar ligações entre átomos e conformação da molécula. A difração de raios X é usada para determinar a estrutura cristalina dos compostos, fornecendo uma visão direta do arranjo dos átomos na molécula, ou seja, a sua conformação. Atualmente a cristalografia de raios X tem vindo a tornar-se mais acessível, pelo aumento das fontes de radiação, inovação tecnológica dos aceleradores de partículas e a diminuição dos custos de utilização, permitindo determinar estruturas complexas de forma mais rápida e eficiente (Přichystal *et al.*, 2016).

Apesar destes métodos apresentarem uma mais-valia para o conhecimento estrutural de moléculas biológicas complexas, existem algumas desvantagens associadas, uma vez que são técnicas de alta precisão, verificam-se muitas vezes interferência de contaminantes presentes nas amostras, como por exemplo moléculas de ácidos nucleicos, o que leva à dificuldade da aplicação e principalmente à interpretação dos resultados obtidos (Ciko *et al.*, 2018).

A espectroscopia de infravermelho (IV) é extensamente aplicada no estudo da estrutura molecular. Ao incidir numa amostra radiação eletromagnética compreendida entre os números de onda 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , situada na região do infravermelho, existe absorção de parte desse espectro pela amostra, devido a determinadas frequências desta gama correspondem a frequências de vibração de ligações em moléculas orgânicas. O espectro resultante é detetado por um espectrómetro, cuja análise permite identificar a presença de grupos funcionais pela presença das bandas características (Thompson, 2018).

Na década de 60 a introdução da técnica de transformada de Fourier, permitiu desenvolver o espectrómetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Griffiths *et al.*, 2017).

Existem inúmeras vantagens da espectroscopia FTIR como a identificação universal de diferentes tipos de amostras e estruturas. A aquisição do espectro é rápida, relativamente económica e sensível, uma vez que, requer quantidades mínimas de amostra. No entanto, é necessário ter em consideração o teor de humidade da atmosfera durante o ensaio, podendo esta interferir drasticamente na obtenção do espectro. Também é necessário ter em conta que a análise de misturas, como no caso deste trabalho, onde foram analisados extratos liofilizados não purificados, os espectros obtidos tornam-se muito complexos pela presença de diversos compostos em simultâneo. Contudo já existem estudos, que determinaram padrões para determinadas misturas de compostos, como no caso dos polissacáridos, onde se identifica cinco regiões características (Hong *et al.*, 2021).

A região I, compreendida entre os números de onda entre 4000 a 2500 cm^{-1} . A região II, ou região de alongamento de ligações duplas, fica situada entre os números de onda de 1800 e 1500 cm^{-1} . A região III, também denominada de região de simetria, compreende os números de onda entre 1500 a 1200 cm^{-1} . A região IV de impressão digital, está compreendida entre 1200 a 800 cm^{-1} . A região V, abaixo dos 800 cm^{-1} , é conhecida como região de esqueleto devido às vibrações C-C dos polissacáridos (Pasandide *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022).

Os polissacáridos sulfatados podem ser evidenciados por três bandas entre 1200 a 1270; 1010 a 1060 e 900 a 800 cm^{-1} , que são características da extensão simétrica da ligação dupla SO e assimétrica de C-O-S, geralmente utilizadas para confirmar as ligações de grupos sulfonilo (Caputo *et al.*, 2019).

Os grupos acetil estão presentes em polissacáridos com ligações ao oxigênio ou ao nitrogênio. A presença deste grupo pode ser caracterizada pela banda forte entre 1365 a 1380 cm^{-1} , correlacionado com a vibração simétrica de flexão de CH_3 . A banda situada a 1740 cm^{-1} está correlacionada com a vibração de extensão da ligação dupla CO; quando esta ligação está ligada ao nitrogênio, a absorção ocorre em torno dos 1640 cm^{-1} (Lucas *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2017).

Os polissacáridos fosforilados também podem ser identificados no espectro de FTIR. Os grupos fosforila podem ser identificados pela vibração de extensão de PO e pela flexão de COP entre 1250 e 915 cm^{-1} (Wang *et al.*, 2018).

As configurações anoméricas de carbono α ou β podem ser identificadas pelas bandas fracas em 890 cm^{-1} , correspondendo à conformação β , enquanto as bandas a 840 cm^{-1} ou a 920 cm^{-1} correspondem à conformação α . Múltiplas bandas entre 920 a 840 cm^{-1} indicam a presença de ambas as conformações (Hong, *et al.*, 2021).

Capítulo 2

Materiais e Métodos

Neste capítulo descrevem-se os reagentes e materiais biológicos utilizados bem como os métodos aplicados na realização deste estudo desde a extração dos biocompostos, avaliação do conteúdo bioquímico e mineral até à avaliação da atividade biológica.

2.1 Reagentes e Material Biológico

Hidróxido de potássio (Panreac 121515.1211), ácido clorídrico (Scharlau AC07441000), hidróxido de sódio (Scharlau SO04250500), azul de Coomassie G250 quick start Bradford 1x dye reagente (Biorad # 5000205), albumina de soro bovino (Acros 268131990), óleo de colza biológico (Vitaquell), ácido sulfúrico (Panreac Applichem 131058.1212), fenol (VWR 20599.260), ácidos cítrico mono-hidratado (Riedel-de-Häen 33114), citrato de sódio di-hidratado (Baker FW29 4.111), ácido poligalacturónico (Alfa Aeser L04206), ABTS (Sigma A1888), Trolox (Aldrich 238813), carbazol (Sigma C5132), tetraborato de di-sódio (Merck 6306), ácido D(+)-galacturónico (Fluka 48280), azul toluidina (Fluka WA23035), sulfato de dextrano 200 000 (Sigma 67578), cloreto de potássio (Merck 4936), cloreto de sódio (WWR 27810.295), hidrogenofosfato de disódio hepta-hidratado (Panreac 132656.1211), fosfato de dipotássio (Scharlau 7002581000), Congo red (Sigma C6767), b-(1,3)-D-glucano de cevada (Sigma G6513), DNS (Sigma D-0550), tartarato de sódio-potássio tri-hidratado (Riedel-de-Häen 25508), D(+)-glucose anidra (Scharlau 01271000), carbonato de sódio (Riedel-de-Häen 31432), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich F9252), ácido gálico (Sigma G7384), cloreto de alumínio (Merck 801081), nitrato de sódio (Merck 1.06549.0100), catequina (Thermoscientific 463020010), metanol (Riedel-de-Häen 603-001-00-X), ácido ortofosfórico (Fluka O/0500/PB17), etanol (Fluka E/0650DF/C17), acetona (Carlo Erba Reagents 400974), cloreto de ferro(II) (Merck 103861), ferrozina (Aldrich 160601), ETDA (Merck 8418), MTT (Applichem A2231,0001), Tween® 20 (Bio-Rad 161078), azul de tripano (GIBCO Thermo Fisher Scientific 15250061), Dulbecco's Modified Eagle Medium – Meio Dulbecco Modificado por Eagle (Merck T 043-10), Fetal bovine serum (GIBCO 10270), Mueller Hinton Broth (Oxoid CM0405), Mueller Hinton Agar (Scharlau 01-136-500), sal de sulfato de gentamicina (Sigma G1264), sal de sódio resazurina (TCI R0203).

Os restantes reagentes utilizados foram selecionados de acordo com a sua aplicabilidade, qualidade e pureza. Estes produtos foram usados diretamente como recebidos, sem tratamento prévio.

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados com as seguintes estirpes bacterianas: *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. A citotoxicidade dos extratos foi avaliada nas seguintes linhas celulares saudáveis 3T3 (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658) e Vero (ATCC® CCL-81) e tumorais S180 (ATCC® TIB-66) e HeLa (ATCC® CCL-2).

2.2 Amostras

Todas macroalgas estudadas foram adquiridas em estabelecimentos de venda ao público de alimentos em Portugal. Os critérios de seleção, considerando a disponibilidade do mercado, incluíram produtos desidratados e com origem de cultivo indicado nas embalagens, de forma a comparar diferentes espécies e origens.

De modo a identificar e a facilitar a designação destas macroalgas foram atribuídos acrónimos apresentados na Tabela 2.1, no entanto, como se tratam de produtos alimentares, algumas embalagens não especificam a espécie da macroalga, apenas permitindo identificar o género, atribuindo-se por esse motivo o acrónimo com base no nome comum. A Tabela 2.2 apresenta os valores nutricionais indicados nas embalagens das macroalgas estudadas, expeto a amostra UPC cuja embalagem não apresentava qualquer informação nutricional.

Tabela 2.1 Identificação dos acrónimos atribuídos às amostras das macroalgas estudadas.

Nome comum	Nome científico	Origem	Acrónimo
Wakame	<i>Undaria pinnatifida</i>	China	UPC
	<i>Undaria pinnatifida</i>	Japão	UPJ
Kombu	<i>Laminaria spp.</i>	Japão	LLJ
	<i>Laminaria spp.</i>	Coreia	KK
Nori	<i>Porphyra spp.</i>	China	NC

Tabela 2.2 Valores nutricionais das macroalgas estudadas por 100 g de amostra indicados na embalagem comercial (ND - Não Determinado).

	NC	UPJ	LLJ	KK	Unidades
Valor Energético	345	132	209	159	kcal
Gorduras Totais	6,5	0,5	3	0	g
Gorduras Saturadas	0	0	1,13	0	g
Carboidratos Totais	14	1,2	54,2	40	g
Açúcares	0	0	<0,1	0	g
Fibra	ND	37	ND	0	g
Proteína	50,4	12	7,8	0	g
Sal	1,25	19,5	6,57	8	g
Sódio	ND	ND	ND	3200	mg
Potássio	ND	5200	ND	8000	mg
Cálcio	ND	780	ND	800	mg
Ferro	ND	2,6	ND	6	mg
Magnésio	ND	1100	ND	ND	mg
Vitamina A	ND	1670	ND	ND	mg
Vitamina C	ND	27	ND	ND	mg
Humidade	ND	ND	10,6	ND	g
Cinza	ND	ND	24,4	ND	g

2.3 Métodos

2.3.1 Pré-tratamento das amostras

As macroalgas desidratadas foram previamente trituradas num moinho de lâminas (Tefal).

2.3.2 Análise Elementar por Espectrometria de Fluorescência de Raio X por Energia Dispersiva (EDXRF)

A análise elementar das amostras estudadas foi efetuada através de espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) (Bruker M4 Tornado). Para tal, as amostras foram prensadas durante 2 min sob uma pressão de dez toneladas para formar uma pastilha com espessura de 1 mm. Estas pastilhas foram colocadas em suporte não detetável, constituído por molduras de plástico com folha de *Mylar*. O conjunto amostra-suporte foi posicionado diretamente sobre o raio-X para a análise.

Os espectros foram adquiridos com um sistema tri-axial configurado para reduzir o limite de deteção, através de um feixe polarizado que incide em um alvo secundário composto por 99,999 % de molibdénio (Passanha *et al.*, 2017). O tubo de raio X com ânodo W (Philips PW1400), arrefecido com água, fornece 100 KV e 80 mA. Posicionado abaixo do alvo secundário, foi colocado um filtro de prata de 100 µm de espessura que absorve a radiação de baixa energia emitida pelo tubo, sendo esta radiação de fundo para o alvo secundário e amostra (Guerra *et*

al., 2013).

A radiação característica dos elementos presentes na amostra são detetados pelo detetor de silício-lítio com uma área ativa de 50 mm^2 , com uma janela de $8 \mu\text{m}$ de berílio com resolução de 135 eV a 6,4 keV, arrefecido a nitrogénio líquido. Para restringir o detetor a uma área efetiva, foram posicionados à frente deste dois colimadores de prata, excluindo assim regiões próximas das extremidades do cristal. A aquisição do espectro decorreu durante 1000 segundos em condições operacionais do tubo de raio X de 50 kV, 20 mA. Os dados foram armazenados num computador com Nucleus PCA card. Os espectros foram avaliados pelo método dos parâmetros fundamentais (Pessanha *et al.*, 2009; Reboredo *et al.*, 2020). Os valores fora do limite encontram-se na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Limites de deteção para amostras vegetais determinados pelos padrões: folhas de orquídea (NBS 1571) e folhas de álamo (GBW 07604) com valores de recuperação entre 93 % e 113 % (Reboredo *et al.*, 2021).

Elemento	mg/kg
K	180
S	3500
Cl	4
Ca	105
Fe	6
Zn	3
Br	3
As	3
Sr	3
Cu	3
P	1000
I	30

2.3.3 Extração de compostos bioativos

Para extrair os compostos bioativos presentes nas amostras das algas em estudo recorreu-se a três métodos de extração: multi-etapas (MSE), assistida por autoclave (AAE) e extração assistida por micro-ondas (MAE).

2.3.3.1 Extração por Multi-etapas (MSE)

O método de extração por multi-etapas encontra-se descrito por Semedo, *et al.* (2015), que permite obter cinco frações com o objetivo de extrair compostos de características distintas. Para isso, em cada fração utilizaram-se solventes e condições de extração diferentes.

Previamente, foi necessário hidratar com água desionizada as amostras até à saturação. Devido ao nível de desidratação das amostras, estas apresentaram uma grande capacidade de absorção, dificultando as etapas de extração.

Este método envolve cinco processos de extração sequenciais (Figura 2.1). Entre cada etapa de extração, ocorre um processo de separação por centrifugação durante 20 min a 11000 rpm a 4°C (Hermle Z383K), de forma a recolher as frações líquidas, que foram reservadas, e os *pellets* que foram utilizados nos processos de extração seguintes.

Na primeira extração, adicionaram-se dois volumes de água desionizada para a um volume de amostra previamente hidratada. Agitou-se com auxílio de um agitador vortex (Ika®Vortex 2) e após 5 min centrifugou-se de forma a recolher a primeira fração líquida FW1. O sedimento foi utilizado na etapa de extração à qual se adicionou um volume de água desionizada. Recorreu-se novamente ao agitador para ressuspender a mistura e incubou-se a 100 °C em um banho termostatizado (GFL). Após 3 h, realizou-se novo processo de separação por centrifugação, recolhendo a segunda fração líquida FW2 e o *pellet* resultante foi utilizado na terceira etapa de extração. Nesta etapa adicionaram-se três volumes de solução de KOH 1 M sendo a ressuspensão aquecida até 60 °C, permanecendo 20 min em agitação contínua (Tehtnica), seguida de centrifugação de modo a recolher a fração líquida FKOH. Ao sedimento resultante foram adicionados dois volumes de uma solução de HCl 0,6 M e incubou-se a mistura durante 1 h a 100 °C. De seguida recolheu-se a fração líquida FHCl através de centrifugação e o *pellet* foi aplicado na quinta etapa de extração com um volume de solução de NaOH 1 M. A ressuspensão foi aquecida por 20 min a 60 °C com agitação contínua. De seguida procedeu-se à separação por centrifugação, recolhendo-se a fração FNaOH e a fração sólida FSMSE foi seca em estufa a 50 °C (Memmert) e preservada à temperatura ambiente para posterior avaliação. As frações alcalinas (FKOH e FNaOH) foram neutralizadas com uma solução de HCl 6 M e a fração ácida (FHCl) neutralizada com uma solução de NaOH 6 M. Todas as frações recolhidas foram armazenada a -20 °C.

2.3.3.2 Extração Assistida por Autoclave (AAE)

A extração assistida por autoclave aplicada às amostras em estudo seguiu o procedimento descrito por Fernandes *et al.* (2022) com adaptações. Este método permite extrair compostos solúveis em água presentes na parede celular e no interior da célula e consiste em adicionar o equivalente de dez volumes de água desionizada a um volume de amostra. A suspensão foi submetida à temperatura de 121 °C durante 30 min em autoclave (AJCosta Uniclave 99). Em seguida, procedeu-se a uma centrifugação durante 20 min a 11000 rpm a 4 °C (Hermle Z383K), recolhendo a fração líquida AAE, que foi armazenada a -20 °C, enquanto a fração sólida FSAAE que foi seca em estufa a 50 °C (Memmert) e preservada à temperatura ambiente.

2.3.3.3 Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)

O método de extração assistida por micro-ondas apenas foi aplicado à amostra NC, para tal teve-se como base a metodologia descrita por Fernandes (2022), Ciko *et al.* (2018), Quitain *et al.* (2013) e Lourenço-Lopes *et al.* (2023). A suspensão de extração foi preparada com uma razão massa:volume de 1:20 e foram utilizadas dois solventes de extração: água desionizada

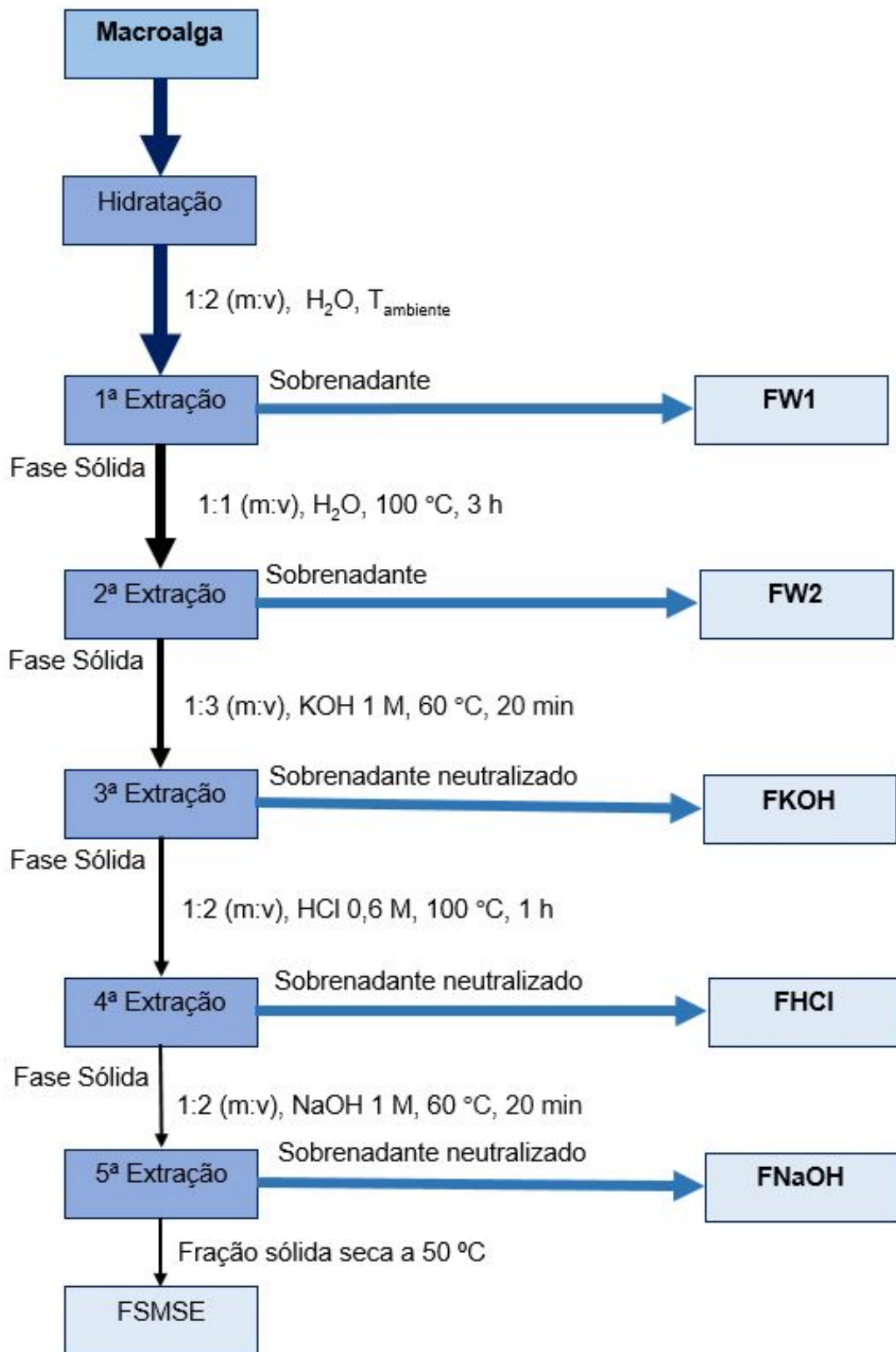


Figura 2.1 Esquema do método de extração por multi-etapas aplicado às amostras das algas em estudo.

e KOH 1 M. Os parâmetros de extração selecionados foram 120 °C para a temperatura de extração e 30 min de tempo de irradiação. De seguida, centrifugou-se por 20 min a 11000 rpm a 4°C (Hermle Z383K), recolhendo a fração líquida MAE, que foi armazenada a - 20 °C. Enquanto a fração sólida FSMAE foi seca em estufa a 50 °C (Memmert) e preservada à temperatura ambiente.

2.3.3.4 Extração de Clorofilas *a*, *b* e Totais e Carotenoides Totais por maceração com acetona

Para a quantificação de clorofilas *a*, *b* e totais e carotenoides totais, foi necessário proceder à extração por maceração utilizando como solvente acetona pura na razão 1:6 (m/v), de modo a aplicar a Equação (1.1 a 1.4) apresentada por Lichtenthaler (1987), que permite determinar teores destes pigmentos em µg/mL de extrato através da leitura das absorvâncias a 470, 661,6 e 644,8 nm.

2.3.3.5 Liofilização dos extratos AAE e MSE

Os extratos obtidos AAE e MSE foram liofilizados de forma a preparar soluções de concentração conhecida para a avaliação da atividade biológica. Para esse efeito foram liofilizadas (UNICRYO MC-2L-60°) alíquotas de 5 mL de cada extrato, previamente congeladas. Depois pesou-se a massa seca resultante, determinado assim a concentração de extrato seco por volume de extrato.

2.3.4 Doseamentos de Biocompostos

Nesta secção serão descritas as metodologias utilizadas para o doseamento da composição bioquímica das macroalgas estudadas a partir dos extratos obtidos por MSE, AAE e MAE.

2.3.4.1 Método Sulfo-Fosfo-Vanilina (SPV)

Para dosear o conteúdo de lípidos totais, utilizou-se o método Sulfo-Fosfo-Vanilina (SPV) baseado nos procedimentos descritos por Anschau *et al.* (2017), Paliwal *et al.* (2017) e Patel *et al.* (2019). As reações foram realizadas em triplicado em tubos de ensaio para onde foram pipetados 20 µL de amostra, os quais foram incubados durante 10 min a 90 °C em banho termostático (GFL) para evaporar o solvente. Após o arrefecimento pipetaram-se 180 µL de ácido sulfúrico concentrado e incubou-se a 100°C durante 10 minutos. Depois de arrefecidos, adicionaram-se 500 µL do reagente SPV (0,0012% (m/V) de vanilina numa solução de ácido *o*-fosfórico a 70,83% (V/V) e realizou-se a última incubação a 37 °C durante 30 min. Após esse tempo e arrefecimento, pipetaram-se 150 µL da mistura reacional para uma microplaca de 96 poços (Nunc). Depois de 45 min ao abrigo da luz, a absorvância foi lida a 528 nm num leitor

de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Os ensaios em branco foram realizados com etanol absoluto. Como padrão, utilizou-se óleo de canola numa gama de 0 a 2,544 µg em etanol absoluto. Os resultados foram expressos em mg/g amostra.

2.3.4.2 Método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

O protocolo descrito por Lindsay *et al.* (1973) com alterações. As reações foram realizadas em triplicado em tubos de vidro roscado onde se colocaram 500 µL de extrato, 1 mL de água desionizada e 500 µL de reagente DNS (1 % (m/v) DNS, 16 % (m/v) hidróxido de sódio e 30 % (m/v) tartarato de sódio-potássio). Os tubos foram incubados a 100 °C em banho termoestabilizado (GFL) durante 10 min. Após arrefecimento da mistura reacional até à temperatura ambiente pipetaram-se 300 µL para uma microplaca de 96 poços (Nunc). A absorvância foi lida a 550 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Os ensaios em branco foram realizados com água desionizada. Como padrão, utilizou-se D-glucose numa gama de 0,02 a 2,0 µg. Os resultados foram expressos em mg/g amostra.

2.3.4.3 Método do Fenol-Ácido Sulfúrico

Para quantificar o teor de carboidratos totais, recorreu-se ao método Fenol-Ácido sulfúrico otimizado por Masuko *et al.* (2005). Para uma microplaca de 96 poços (Nunc), pipetaram-se 50 µL de extrato, 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e 30 µL de fenol 5 % (m/v). Em seguida, a microplaca foi incubada por 5 min a 90 °C num banho termoestabilizado (GFL). Após arrefecimento até à temperatura ambiente, foi lida a absorvância a 680 nm num leitor de microplacas (Bio-Rad 680). Os ensaios foram realizados em triplicado e utilizou-se água desionizada como branco. Como padrão, utilizou-se ácido poligalacturónico (25 – 50 kDa) numa gama de 0 a 500 µg. Os resultados foram expressos em mg/g amostra.

2.3.4.4 Doseamento de Polissacáridos

Devido ao elevado conteúdo em polissacáridos das macroalgas e sendo este biocompostos de elevada importância dada a sua vasta atividade biológica, foi quantificado através de métodos colorimétricos o teor de polissacáridos ácidos, sulfatados e β -D-glucanos nos extratos obtidos.

2.3.4.4.1 Método do Azul de Toluidina

Os polissacáridos sulfatados foram quantificados através do método do Azul de Toluidina proposto por Hahn *et al.* (2016) com adaptações. Numa microplaca de 96 poços (Nunc), pipetaram-se em triplicado 50 µL de extrato, 250 µL de azul de toluidina 0,05 mg/mL. A microplaca foi preservada no escuro por 5 minutos e em seguida foi lida absorvância a 655 nm em leitor de microplacas (Bio-Rad 680). Utilizou-se água desionizada como branco e sulfato de dextrano

40 kDa numa gama de 0 a 6,25 µg como padrão (Hahn *et al.*, 2016). Os resultados foram expressos em mg/g amostra.

2.3.4.4.2 Método do Carbazol-Ácido Sulfúrico

Para dosear polissacáridos ácidos, utilizou-se o método cardazol-ácido sulfúrico descrito por Cesaretti *et al.* (2003), Monsalve-Bustamante *et al.* (2019) e Taylor *et al.* (1993) modificado por Gabriel (2023). As reações foram realizadas em triplicado em tudo de vidro roscado para onde foram pipetados 40 µL extrato, 400 µL água desionizada, 2 mL tetraborato de sódio 0,95 g/L em H₂SO₄ e 40 µL carbazol a 0,2% (m/V) em etanol. A mistura foi homogeneizada no agitador vórtex (Ika®Vortex 2) e os tubos foram incubados a 90 °C por 12 min num banho termoestatizado (GFL). Após o arrefecimento até à temperatura ambiente pipetaram-se 300 µL da mistura reacional para uma microplaca e a absorvância foi lida a 528 nm em leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Utilizou-se água desionizada no ensaio em branco e ácido D-galacturónico como padrão numa gama 0 a 2,5 mg. Os resultados foram expressos em mg/g amostra.

2.3.4.4.3 Método do Corante Congo Red

Para a quantificação de β-(1,3)-D-glucanos, seguiu-se o método do Congo *red* otimizado por Semedo *et al.* (2015). As reações foram realizadas em triplicado em microplaca de 96 poços (Nunc). Para a reação com a amostra, pipetaram-se 140 µL de extrato e 140 µL de solução de Congo *red* 0,017 % (m/v) em PBS. Foram realizados três ensaios em branco B1, B2 e B3: para B1 pipetou-se 140 µL de água desionizada e 140 µL de solução de Congo *red* 0,017 % (m/v), para B2 pipetou-se 140 µL de água desionizada e 140 µL de PBS e para o B3 pipetou-se 140 µL de extrato e 140 µL de PBS. A absorvância foi lida a 510 nm em leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec), e corrigida posteriormente através da Equação (2.1). Como padrão, utilizou-se β-(1,3)-D-glucano de cevada 0,2 mg/mL preparado em NaOH 1M e posteriormente neutralizado numa gama entre 0 a 7 µg. Os resultados foram expressos mg/g amostra.

$$Abs_{corrigida} = Abs_{amostra} - (Abs_{B1} + Abs_{B3} + Abs_{B2}) \quad (2.1)$$

2.3.4.5 Método de Ligação do Corante Azul de Coomassie de Bradford

De modo a quantificar o teor de proteína total, utilizou-se o método de ligação do corante azul de Coomassie de Bradford (1979), com modificações. Para uma microplaca de 96 poços (Nunc), pipetaram-se 100 µL de reagente de Bradford e 100 µL de extrato, em triplicado. Após 2 a 5 min ao abrigo da luz, a absorvância foi lida a 550 nm em leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtech). Como padrão, utilizou-se BSA numa gama de 0 a 10,4 µg e o ensaio em

branco foi realizado com água desionizada. Os resultados obtidos foram expressos em mg de proteína total por g de amostra.

2.3.4.6 Quantificação de Pigmentos

As concentrações de pigmentos presentes nos extratos obtidos, nomeadamente clorofilas *a*, *b*, carotenoides totais, fucoxantina e ficobiliproteínas foram determinadas através da leitura da absorvância a diversos comprimentos de onda (Espectrofotómetro UV6300PC, VWR) e das equações anteriormente descritas em 1.7.2.4.

A quantificação de clorofilas *a*, *b* e totais e carotenoides totais, foi efetuada nos extratos obtidos com acetona e extratos aquosos (descrito em 2.3.3.4). Para os extratos com acetona foram aplicadas as Equações (1.1 a 1.4) e para os extratos aquosos utilizou-se uma aproximação as Equações (1.5 a 1.8) defendidas para extratos com éter dietílico saturado em água (Lichtenthaler, 1987). Para o efeito foram determinadas as absorvâncias a 470; 661,6; 643,2 e 644,8 nm. Os solventes de extração foram utilizados como ensaio em branco para os respetivos extratos e os resultados obtidos foram expressos em mg/g amostra.

A quantificação de ficobiliproteínas e fucoxantina foi avaliada nos extratos AAE, MAE e MSE. O teor de ficobiliproteínas em mg/mL de extrato, foi determinado através das leituras da absorvância a 565, 620 e 650 nm e das Equações 1.10 a 1.12 formuladas por Bennett *et al.* (1973), Bryant *et al.* (1979), Román *et al.* (2002) aplicando os coeficientes de extinção molar das ficobiliproteínas determinados por Juin *et al.* (2015). Realizam-se também as leituras de absorvância aos mesmos comprimentos de onda, dos ensaios em branco, constituídos pelos solventes de extração respetivos, utilizados em cada método de extração. Os resultados obtidos foram expressos em mg/g amostra.

Para quantificação de fucoxantina foram lidas as absorvância a 480, 582, 631, 665 e 750 nm das amostras em análise e aplicou-se a Equação 1.9 apresentada por Osório *et al.* (2020). As leituras das absorvâncias dos ensaios em branco foram efetuadas aos mesmos comprimentos de onda, sendo estes constituídos pelos solventes de extração respetivos. Os resultados obtidos foram expressos em mg/g amostra.

2.3.4.7 Método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu descrito por Reis *et al.* (2012) foi aplicado aos extratos obtidos para determinar o teor de compostos fenólicos totais. Numa microplaca de 96 poços (Nunc) pipetaram-se 30 µL de extrato, 150 µL reagente Folin Ciocalteu 1:10 (V/V) preparado em água desionizada e 120 µL uma solução de Na₂CO₃ 75 g/L. Em seguida a microplaca foi incubada a 40 °C num banho termoestabilizado (GFL) durante 30 min de seguida a absorvância foi lida a 655 nm no leitor de microplacas (Bio-Rad 680). Utilizou-se água desionizada como branco e ácido gálico como padrão numa gama de 0 a 7,5 µg (Reis *et al.*, 2012). Os doseamentos

foram realizado em triplicado e expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de amostra.

2.3.4.8 Método do Cloreto de Alumínio

O método do cloreto de alumínio descrito por Yeh *et al.* (2011) foi utilizado para dosar o conteúdo de flavonoides totais. As reações foram realizadas em triplicado em microplaca de 96 poços (Nunc), pipetando-se 25 µL de extrato, 100 µL água desionizada e 7,5 µL de NaNO₂ 5 % (m/v). Ao fim de 5 min adicionaram-se 7,5 µL de AlCl₃ 10 % (m/v) e após 5 min 100 µL de NaOH 4 % (m/v). Após 10 minutos, a absorvância foi lida a 510 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Utilizou-se água desionizada como branco e catequina em etanol 50 % (v/v) como padrão numa gama de 0 a 25 µg. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de catequina (CE)/g de amostra.

2.3.5 Determinação da Atividade Anti-oxidante

2.3.5.1 Método de Descoloração do Radical Catiónico ABTS

O método o radical ABTS para a avaliação da atividade anti-oxidante nos extratos AAE, MSE e MAE, foi utilizado segundo Re *et al.* (1999). Inicialmente, preparou-se a solução stock de ABTS^{•+} 7 mM com K₂O₈S₂ 2,5 mM em água desionizada, deixando-a no escuro por 12 a 16 h. Após esse período, a solução stock foi diluída com tampão PBS de modo a que a absorvância a 655 nm se aproximasse da unidade, sendo a solução resultante designada por solução de trabalho ABTS^{•+}. Em microplaca de 96 poços (Nunc), pipetaram-se em triplicado 10 µL de extrato e 290 µL solução de trabalho de ABTS^{•+}, sendo a absorvância lida a 655 nm num leitor de microplacas (Bio-Rad 680). Utilizou-se água desionizada como branco e como padrão foi utilizado trolox preparado em metanol a 80 % (v/v) numa gama 0 a 3,33 µg (Figura A.10, Anexo A.1). Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de trolox (TE) em mg/g de amostra.

Adicionalmente, o método também foi aplicado em triplicado a soluções de 5 mg/mL de extrato liofilizado e os resultados foram comparados com padrões com a mesma concentração de ácido ascórbico, ácido gálico, ácido poligalacturónico, butil-hidroxi-tolueno (BHT) e trolox. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de inibição calculada através da Equação (2.2).

$$\text{Inibição ABTS}^{\bullet+} (\%) = \frac{Abs_{Branco} - Abs_{Amostra}}{Abs_{Branco}} \times 100 \quad (2.2)$$

2.3.5.2 Capacidade Quelante de íões Fe²⁺

A capacidade quelante de íões Fe²⁺ dos extratos foi avaliada pelo método descrito por Canabady-Rochelle *et al.* (2015), com modificações. Para uma microplaca de 96 poços (Nunc), pipetaram-se em triplicado 185 µL metanol absoluto, 50 µL de extrato, 50 µL de solução cloreto de ferro (II) 2 mM e 20 µL de solução ferrozina 5 mM. Após 10 min a absorvância foi lida a 550 nm no leitor de microplacas (Bio-Rad 680). Utilizou-se água desionizada como controlo negativo e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2 mg/mL como controlo positivo. A capacidade quelante foi determinada pela Equação (2.3), sendo os resultados obtidos expressos em percentagem.

$$\text{Capacidade Quelante de Fe}^{2+}(\%) = \frac{Abs_{Branco} - Abs_{Amostra}}{Abs_{Branco}} \times 100 \quad (2.3)$$

2.3.6 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada por duas metodologias: o método de suscetibilidade à difusão em disco, descrito por Kirby-Bauer com adaptações e o método de microdiluição em meio líquido com resazurina para determinar os valores de MIC, considerando a menor concentração de um agente antimicrobiano à qual este inibe o crescimento de um microrganismo, existindo uma redução $\geq 80.0\%$ do crescimento bacteriano comparativamente ao controlo (Kowalska-Krochmal *et al.*, 2021; CLSI, 2012; Hudzicki, 2016).

Assim, foram avaliadas as atividades antibacterianas contra *E. coli* ATCC® 25922 e *S. aureus* ATCC® 25923. Para cada método, foram preparadas culturas de pré-inóculo em meio Mueller Hinton Broth (MHB), obedecendo às normas M100 do CLSI e incubadas durante a noite a 37 °C com agitação a 180 rpm (Gallenkamp).

Para o método de difusão em disco, preparou-se o meio nutriente Mueller Hinton Agar (MHA) e distribuiu-se 20 mL por placas de Petri. A turbidez do inoculo foi ajustada para a padrão de 0,5 McFarland em meio MHB suplementado com 0,5% (m/v) de agar, vertendo-se uniformemente 6 mL desta suspensão sobre as placas. Os discos de 9 mm foram impregnados com 50 µL de extrato MSE e AAE filtrados, como controlo negativo foi utilizada água desionizada estéril e como controlo positivo uma solução de gentamicina 2 mg/mL filtrada. Em seguida, os discos impregnados foram posicionados de forma espaçada na superfície das placas de Petri contendo o meio de cultura. Estas foram incubadas a 37°C (Memmert), e os halos de inibição foram medidos com um paquímetro (FIMEC) ao fim do tempo de incubação de 18 horas.

Para a determinação dos valores MIC pelo método colorimétrico de microdiluição em meio líquido com resazurina, onde foram seguidas as etapas descritas anteriormente para a preparação das culturas bacterianas. Nestes ensaios foram testados os extratos MSE e AAE previamente liofilizados numa gama de concentrações compreendida entre 0,078 a 20 mg de biomassa de extrato liofilizado por mL esterilizados por filtração. A turbidez do pré-inóculo foi ajustada ao padrão 0,5 McFarland em meio MHB. de forma a cumprir 5×10^5 UFC/mL, foi

preparada uma diluição adequada, obtendo assim o inóculo de trabalho. Foram pipetados em triplicado 100 µL do inóculo de trabalho para uma microplaca de 96 poços estéril (Orange Scientific), previamente preparada com 200 µL de extrato com as microdiluições 1:2 realizadas em água desionizada estéril.

Após inoculação, a microplaca é incubada (Mettler) aproximadamente durante 18 horas, a 37 °C. Decorrido esse tempo, pipetaram-se 20 µL de resazurina a 0,01% (m/v) em PBS previamente filtrada e a intensidade de fluorescência foi lida a um comprimento de onda de excitação de 550 nm e de emissão de 650 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec), após incubação a 37 °C de 1 a 3 horas.

Todos os meios de cultura utilizados nestes ensaios foram previamente esterelizados em autoclave (AJCosta, Uniclave 99) a 121 °C durante quinze minutos. A manipulação das espécies bacteriana foi realizada numa câmara de fluxo laminar vertical (SafeFAST Classic).

2.3.7 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos MSE e AAE foi avaliada *in vitro* pelo método colorimétrico do MTT (Ketteler *et al.*, 2012, Oh *et al.*, 2022) em quatro linhas de células animais: 3T3 (fibroblastos embrionários de murganho, NIH-3T3 ATCC® CRL-1658), Vero (células epiteliais renais de macaco verde, VERO ATCC® CCL-81), S180 (células de murganho, S180 ATCC® TIB-66) e HeLa (células de cancro do colo do útero, ATCC® CCL-2).

Numa microplaca de 96 poços estéril (Orange Scientific) adicionaram-se em triplicado 100 µL de suspensão celular (1×10^5 células/poço) em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS). As microplacas foram incubadas durante 18 h a 37 °C com atmosfera humidificada a 5 % CO₂. A contagem das células foi efetuada previamente numa câmara de contagem de Neubauer improved (Marienfeld), utilizando azul de tripano com o auxílio de um microscópio invertido (ULWCD 0.30 Olympus).

Decorrido esse tempo o meio foi trocado, pipetaram-se 20 µL de extrato, procedeu-se às diluições 1:2 de forma a testar uma gama de 0,5 a 2 mg/mL e as microplacas foram incubadas durante 18 h a 37 °C com atmosfera humidificada a 5 % CO₂. No dia seguinte, o meio foi descartado e adicionaram-se 100 µL de uma solução de 5 mg/mL de MTT em PBS. As microplacas foram incubadas novamente durante 3 h nas mesmas condições de crescimento. Após este período, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 100 µL de uma solução de 0,1 M Tween® 20 (Bio-Rad), 0,1 % (v/v) ácido clorídrico concentrado em isopropanol. Após dissolução dos cristais, a absorvância foi lida a 570 nm com referência a 650 nm num leitor de microplacas (Tecan NanoQuant Infinite M200 pro).

O meio DMEM modificado foi dissolvido em água Milli-Q® (Milipore Elix Synergy) e esterilizado por filtração. A manipulação das linhas celulares foi realizada numa câmara de fluxo horizontal (Holten TL 2448).

2.3.8 Caracterização Parcial das Estruturas dos Biocompostos por FTIR

Foi utilizada espectroscopia de FTIR para caracterizar parcialmente as estruturas dos biocompostos presentes nos extratos MSE, MAE e AAE. Para o efeito os extratos foram previamente liofilizados (UNICRYO MC-2L-60°C) e secos a 100 °C em estufa (Memmert). Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrómetro (Bruker Vertex 70, software OPUS 5.5), realizando um total de 64 varrimentos com uma resolução de 2 cm^{-1} , numa gama de 400 a 4000 cm^{-1} . Esta análise realizou-se em pastilhas de KBr preparadas numa prensa (CARVER).

Capítulo 3

Resultados e Discussão

A primeira fase deste trabalho consistiu na aquisição e seleção das amostras de algas de diversas origens. Esta seleção teve por base os resultados obtidos através de um equipamento portátil de EDXRF. As amostras selecionadas (Tabela 2.1) foram cinco amostras de algas com diferentes origens de produção: nori (*Porphyra* spp.) da China, amostra NC; wakame (*Undaria pinnatifida*), uma amostra oriunda da China - UPC, outra do Japão - UPJ; kombu (*Laminaria* spp.) uma amostra oriunda do Japão - LLJ, e outra com origem na Coreia do Sul - KK. Estas foram posteriormente submetidas a uma análise elementar por EDXRF num equipamento de bancada e a três métodos de extração: AAE e MSE para todas as amostras estudadas e MAE apenas para a amostra NC devido a indisponibilidade do equipamento. Quantificaram os diversos compostos bioativos, nomeadamente lípidos, carboidratos, proteínas, compostos fenólicos e flavonoides.

A espectrometria de EDXRF possibilitou a análise do conteúdo elementar das algas estudadas, permitindo a quantificação de cálcio, ferro, fósforo, potássio, zinco, cobre e iodo.

Com os extratos obtidos avaliou-se quanto às suas atividades anti-oxidante e antibacteriana. A atividade citotóxica foi avaliada para extratos AAE e MSE. Com o objetivo de identificar potenciais benefícios para a saúde associado ao consumo destas algas.

Posteriormente através de espectroscopia de FTIR foi possível identificar e caracterizar parcialmente alguns compostos presentes nos extratos.

3.1 Análise Elementar

A Tabela 3.1 apresenta os resultados da análise elementar por EDXRF, com os resultados expressos em mg kg^{-1} . Foram analisadas tanto a matriz inicial das amostras quanto a fração sólida dos extratos AAE e MSE, secos em estufa a 50 °C. Pelos resultados obtidos por EDXRF, verifica-se a presença de minerais essenciais ao ser Humano como cálcio, ferro, fósforo, potássio, zinco, cobre e iodo.

Das algas estudadas, a alga kombu foi a que apresentou os teores mais elevados de K, com o máximo registado de 35483 mg/kg em LLJ. Para comparar os resultados obtidos para as algas kombu da Tabela 3.1, apresenta-se a Tabela 3.2 que reúne valores de literatura para algas kombu de diferentes origens. Assim verifica-se que o teor de K obtido foi superior ao determinado por Júnior (2018) para kombu japonesa, assim como o teor de Cl, o teor de Zn foi aproximado e o teor de Ca e I muito inferiores quando comparados com os valores determinados por Júnior (2018). O teor de Fe obtido para LLJ encontra-se aproximado, teor de Cu ligeiramente superior e o teor de P muito inferior quando comparado com os valores determinados por Kolb *et al.* (2024) numa kombu com fornecedor do Japão. Para a amostra KK não se encontrou estudos com kombu proveniente da Coreia do Sul, no entanto, o teor de Fe determinado para KK foi semelhante ao valor determinado para kombu com fornecedor do Japão estudado por Rupérez (2002). Ao observar os resultados para as algas kombu e para os valores na Tabela 3.2 verifica-se valores muito diferentes entre amostras do mesmo género, mas de diferentes áreas geográficas, isso deve-se ao facto de que os ambientes de cultivo proporcionam nutrientes diferentes que são bioacumulados pela alga. Para além disso nem todas as embalagens explicitam a espécie da alga podendo as amostras LLJ e KK serem de espécies diferentes, mas do género *Laminaria*.

De todas as algas estudadas a wakame obteve um teor de Ca mais elevado de 8716 mg/kg para a amostra UPC. Para comparar os resultados obtidos para as algas wakame da Tabela 3.1, apresenta-se a Tabela 3.3 que reúne valores de literatura para algas wakame de diferentes origens. Assim comparando os valores determinados por Mišurcová *et al.* (2009) numa wakame de origem japonesa conclui-se que os teores de UPJ para K e Ca são muito superiores, mas os teores de Fe e Zn são muito inferiores. Para os resultados obtidos na amostra UPC verifica-se que os teores de K e Ca são aproximados dos teores determinados por Domínguez-González *et al.* (2005) numa wakame comercializada na Espanha. Os teores de Fe e Zn da amostra UPC são semelhantes aos determinados por Júnior (2018) numa wakame japonesa e por Kolb *et al.* (2004) numa wakame do mercado japonês, respetivamente.

Ao observar os resultados para as algas wakame de diferentes origens e para os valores na Tabela 3.3 verifica-se que os estes podem ser muito distintos, embora sejam da mesma espécie. Este facto já observado deve-se aos nutrientes disponíveis na cultura destas macroalgas, sendo diferentes de região para região e em época diferentes.

A alga nori foi a que apresentou o teor mais elevado de S de 12320 mg/kg entre todas as algas estudadas, valor aproximado ao determinado por Júnior (2018) num alga nori proveniente da China, os teores de referência podem ser consultados na tabela 3.4 que reúne valores de literatura para algas nori de diferentes origens. Assim verifica-se que o teor de K são superiores, o teor de Ca foi aproximadamente o dobro e os teores de Fe e Zn são inferiores ao determinado por Flores *et al.* (2015) numa nori proveniente China.

Ao observar a Tabela 3.4 verifica-se que os valores de algas provenientes de diferentes áreas geográficas apresentam conteúdo elementar diferente, isso deve-se ao facto já referido e que o ambiente de crescimento tem impacto nas algas. Para além disso os produtos denominados por nori geralmente são uma mistura de algas do género *Porphyria* spp. e *Ulva* spp. (Júnior,

2018) o que provoca ainda mais diferenças quando se compara produtos nori de diferentes locais.

Tabela 3.1 Resultados da análise elementar por EDXRF de bancada da matriz inicial, frase sólida de AAE e MSE de todas as algas estudadas em mg/kg (ND – Não detectado ou inferior ao limite de detecção).

	Nori			Wakame						Kombu					
	NC Inicial	NC AAE	NC MSE	UPC Inicial	UPC AAE	UPC MSE	UPJ Inicial	UPJ AAE	UPJ MSE	LLJ Inicial	LLJ AAE	LLJ MSE	KK Inicial	KK AAE	KK MSE
K	21568	2211	2289	34142	26452	5457	29178	11540	9905	35483	18387	8884	43919	9779	3044
S	12320	7690	ND	ND	ND	ND	4523	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cl	7542	426	36	48663	36748	126	91660	16288	568	51465	15541	837	48002	3281	44
Ca	4112	2322	3446	8716	6312	7608	3768	3308	4113	3347	6146	5629	3051	7487	6035
Fe	88	94	54	33	123	120	16	87	170	13	31	37	42	64	112
Zn	18	27	ND	13	14	16	6	8	5	7	7	3	7	5	4
Br	16	5	ND	169	84	4	178	73	ND	448	279	3	378	107	3
As	5	4	ND	7	13	ND	5	8	ND	30	15	ND	17	8	ND
Sr	5	ND	ND	160	210	358	134	380	325	100	171	118	88	236	88
Cu	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND
P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4014	11210	1418	4547	ND	ND
Si	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	50	ND	115	ND	ND

Tabela 3.2 Conteúdo elementar de algas kombu de provenientes de diferentes áreas geográficas em mg/kg (ND – Não detetado).

Origem	Elemento											Referência
	K	Cl	Ca	Fe	Zn	As	Cu	P	I			
China	ND	ND	ND	ND	ND	28,62 - 60,28	ND	ND	ND	ND	Chen <i>et al.</i> (2021)	
	48,7 - 90,9	ND	4,52 - 5,74	73,8 - 76,4	18,2 - 19,3	ND	1,64 - 1,95	2,35 - 4,76	ND	ND	Mišurcová <i>et al.</i> (2009)	
	22,6	ND	5190	29	362	60	11	ND	2270	ND	Reboredo <i>et al.</i> (2021)	
Japão	22641	38209	5186	29	9	60	11	ND	2273	ND	Júnior (2018)	
	ND	ND	ND	71 - 177	53 - 98	53 - 71	6 - 22	ND	ND	ND	Lunde (1970)	
Mercado Japonês	59510	ND	8800	11,9	8,86	0,87	2,47	3000	1700	ND	Kolb <i>et al.</i> (2004)	
Mercado Espanhol	33000 - 78000	ND	6000 - 8000	19,6 - 84,7	10,4 - 71,3	19,8 - 71,3	1,3 - 3,2	ND	ND	ND	Dominguez-González <i>et al.</i> (2005)	
	115,79	ND	10050	32,9	17,7	ND	<5	ND	ND	ND	Rupérez (2002)	

Tabela 3.3 Conteúdo elementar de algas wakame de provenientes de diferentes áreas geográficas em mg/kg (ND – Não detetado).

Origem	Elemento											Referência
	K	Cl	Ca	Fe	Zn	As	Cu	P	I			
Japão	4310	ND	10030	382	44	ND	3	ND	ND	ND	Flores <i>et al.</i> (2015)	
	1,49 - 64,8	ND	4,94 - 5,31	70,9 - 340	22,5 - 50,7	ND	3,07 - 3,41	3,52 - 6,04	ND	ND	Mišurcová <i>et al.</i> (2009)	
	62066	134050	6958	43	7	47	ND	ND	ND	ND	Júnior (2018)	
Espanha	15353	ND	1341	9,8	1,03	ND	0,11	1865	ND	ND	Sánchez-Moya <i>et al.</i> (2019)	
Mercado Japonês	56910	ND	9500	15,4	9,44	0,55	1,85	4500	260	ND	Kolb <i>et al.</i> (2004)	
Mercado Espanhol	33000 - 78000	ND	6000 - 8000	19,6 - 84,7	10,4 - 71,3	19,8 - 71,3	1,3 - 3,2	ND	ND	ND	Dominguez-González <i>et al.</i> (2005)	
	86990	ND	9310	75,6	17,4	ND	<5	ND	ND	ND	Rupérez (2002)	

Tabela 3.4 Conteúdo elementar de algas nori de provenientes de diferentes áreas geográficas em mg/kg (ND – Não detetado).

Origem	Elemento													Referência
	K	S	Cl	Ca	Fe	Zn	As	Sr	Cu	P				
China	ND	ND	ND	ND	ND	763 - 845	ND	335 - 440	130 - 145	ND				Aahmed et al. (2024)
	16690	ND		2920	271	27	ND	ND	19	ND				Flores et al. (2015)
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	26,72 - 47,44	ND	ND	ND				Chen et al. (2021)
	13798	17723	2242	4682	180	24	19	ND	23	ND				Júnior (2018)
Coreia do Sul	ND	ND	ND	ND	ND	354 - 415	ND	285 - 323	74 - 118	ND				Aahmed et al. (2024)
	29075	6948	8760	3031	153	26	22,7	ND	21	ND				Júnior (2018)
	ND	ND	ND	ND	ND	140 - 460	ND	607 - 835	135 - 145	ND				Aahmed et al. (2024)
Japão	18641	21754	13147	5297	792	18	10,8	ND	10	ND				Júnior (2018)
	26	ND	ND	5,72	1833	19,4	ND	ND	15,8	2,02				Mišurcová et al. (2009)
India	17,6 - 3,19	ND	ND	14,0 - 6,12	330 - 2580	9,3 - 32,7	12,4 - 18,3	ND	5,4 - 10,5	ND				Rao et al. (2007)
Espanha	4044,6	ND	ND	320,1	22	1,121	ND	ND	0,39	652,4				Sánchez-Moya et al. (2019)
Argentina	ND	ND	ND	4240 - 5870	213 - 440	21,1 - 70,1	22,9 - 33,8	ND	1,94 - 5,32	3340 - 5200				Pérez et al. (2007)
	35000	ND	ND	3900	103	22,1	ND	ND	ND	ND				Rupérez (2002)
Mercado Espanhol	53000 - 14000	ND	ND	2000	95,1 - 208,8	46,6 - 158,9	7,1 - 25,2	ND	3,0 - 6,6	ND				Dominguez-González et al. (2005)

Relativamente à informação nutricional embalagem comercial da amostra KK (Tabela 2.2) apresenta teores de Ca e K iguais a 8000 mg/kg, pela análise elementar conclui-se que os teores de Ca são inferiores (3051 mg/kg) e os valores de K são superiores (43919 mg/kg). Para a amostra UPJ o teor de Ca determinado foi inferior e o teor de K foi mais elevado comparativamente aos valores indicados na embalagem de 7800 mg/kg e 5200 mg/kg (Tabela 2.2) respetivamente para Ca e K.

Em todas as amostras analisadas foram detetados elementos tóxicos ao Homem, nomeadamente As, Sr e Br. Em todos os artigos citados nas tabelas 3.2-3.4 também se verifica a presença de As. Entre todas as amostras estudadas foi expetável que as algas kombu contivessem um teor mais elevado de As devido à presença de arsenolípidos (Ventura *et al.*, 2024), facto que se verificou. Em todos os artigos consultados apenas Ahmed *et al* (2024) determinou teor de Sr para nori provenientes da China, Coreia do sul e Japão em tores superiores aos determinado para NC.

Como foram analisadas a matriz inicial e a fração sólida de extração (*pellet*), foi possível verificar as perdas destes minerais para os extratos sobre a forma iónica, assim calculou-se a percentagem de perda dos elementos para a fração líquida presentes na Tabela 3.5. O comportamental expetável dos minerais seria a perda para a fração líquida de extração, sendo o método MSE o que teria mais perda, dado que o *pellet* foi sucessivas lavado por cinco etapas. De facto o método MSE verifica mais perdas. No entanto em algumas amostras verifica-se o aumento do teor do mineral após extração, indicando que durante o processo de extração houve contaminação da amostra por desses elemento. Relativamente as perdas expetáveis, confirma-se que a forma de preparo das algas afeta a ingestão de micronutrientes.

Tabela 3.5 Percentagem de perda de minerais para a fração líquida de extração das algas estudadas em percentagem mássica (ND – Não detetado ou inferior ao limite de deteção).

	Nori			Wakame					Kombu				
	NC AAE	NC MSE	UPC AAE	UPC MSE	UPJ AAE	UPJ MSE	UPJ MSE	LLJ AAE	LLJ MSE	KK AAE	KK MSE		
K	90%	89%	23%	84%	60%	66%	66%	48%	75%	78%	93%		
S	38%	ND	ND	ND	100%	100%	100%	ND	ND	ND	ND		
Cl	94%	100%	-28%	100%	82%	99%	99%	70%	98%	93%	100%		
Ca	44%	16%	-132%	-180%	12%	-9%	-9%	-84%	-68%	-145%	-98%		
Fe	-7%	39%	-273%	-264%	-444%	-963%	-963%	-138%	-185%	-52%	-167%		
Zn	-50%	ND	-8%	-23%	-33%	17%	17%	0%	57%	29%	43%		
Br	69%	94%	50%	98%	59%	99%	99%	38%	99%	72%	99%		
As	20%	ND	-86%	ND	-60%	100%	100%	50%	100%	53%	100%		
Sr	ND	ND	-31%	-124%	-184%	-143%	-143%	-71%	-18%	-168%	0%		
Cu	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100%	100%	100%	100%		
P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-179%	65%	100%	100%		
Si	ND	ND	92%	-411%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50%	100%	100%	100%		
Ni	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100%	100%		

3.1.1 Impacto na Alimentação

Pelos resultados obtidos por EDXRF, verifica-se a presença de minerais essenciais ao ser Humano, como cálcio, ferro, fósforo, potássio, zinco, cobre e iodo. Em comparação com a Tabela 3.6, que apresenta a ingestão diária recomendada de Ca para adultos e considerando uma ingestão diária de 5 g de alga sugerida na embalagem da amostra KK, observam-se valores de cálcio capazes de sustentar a DDR para a amostra UPC e com aproximadamente 2,5 % da DDR para as demais amostras. Observaram-se teores de Cl muito elevados na maioria das amostras analisadas, com valores a rondar os 25 a 50 % da DDR. Observaram-se teores de Fe incapazes de satisfazer a DDR com valores a rondar os 1 % da DDR. Para o K os valores observados são incapazes de satisfazer a DDR com valores a rondar os 5 % a 10 % da DDR. Para o Zn observam-se também teores incapazes de satisfazer a DDR com valores abaixo dos 0,5 % da DDR para a maioria das amostras.

Tabela 3.6 Dose diária recomendada para adultos em mg/dia (Decreto-Lei da República Portuguesa Nº 54/2010).

Minerais essenciais		Concentração (mg/dia)
Potássio	K	2000
Cloro	Cl	800
Cálcio	Ca	800
Ferro	Fe	14
Zinco	Zn	10
Cobre	Cu	1
Fósforo	P	700

De forma alarmante, foi quantificado As com teores superiores aos valores referenciados pelo *Codex Alimentarius* (Tabela 1.2). Os valores obtidos na alga kombu, amostra LLJ, são bastante elevados, especialmente em comparação com os limites estabelecidos pela França de 3 mg/kg e pela norma 2002/32/EC da Comissão Europeia, que é de 2 mg/kg (Tabela 1.1) (Edible Seaweed-French & European Regulation, 2014; 2002/32/EC).

Na literatura, encontra-se que as macroalgas contêm principalmente arsênio na forma orgânica, como no caso particular das algas kombu, sobre a forma de arsenolipídios ou arsenofosfolipídios (Ventura *et al.*, 2024). Assim seria importante realizar uma análise que distinguisse o arsênio orgânico do conteúdo total de arsênio; recorrendo por exemplo, a técnicas espectrometria de massa com plasma acoplado.

3.2 Extração de Compostos Bioativos

A extração de biocompostos a partir das 5 amostras selecionadas (Tabela 2.1) foi realizada através de dois métodos diferentes, de forma a identificar o que conduzia a extratos com teores mais elevados em compostos bioativos, descritos na Secção 2.3.3 do Capítulo 2, designadamente extração por multi-etapas (MSE), extração assistida por autoclave (AAE) (Figura 3.1).

Para alga nori (amostra NC) foi ainda utilizado um terceiro método, a extração assistida por micro-ondas (MAE). Por motivo de avaria do equipamento não foi possível aplicar este método às restantes amostras em estudo.



Figura 3.1 Suspensão de extração sólido-líquido após extração assistida por autoclave.

Os extratos obtidos por MSE e AAE (Figura 3.2) foram liofilizados permitindo determinar as suas concentrações (mg/mL) (Tabelas 3.7 e 3.8) e rendimento de extração para os extratos AAE segundo a Equação (3.1):

$$\text{Rendimento de Extração \% (m/m)} = \frac{V_{\text{Extrato}} \times M_{\text{Extrato Liofilizado}}}{V_{\text{Extrato Liofilizado}} \times M_{\text{Amostra}}} \times 100 \quad (3.1)$$

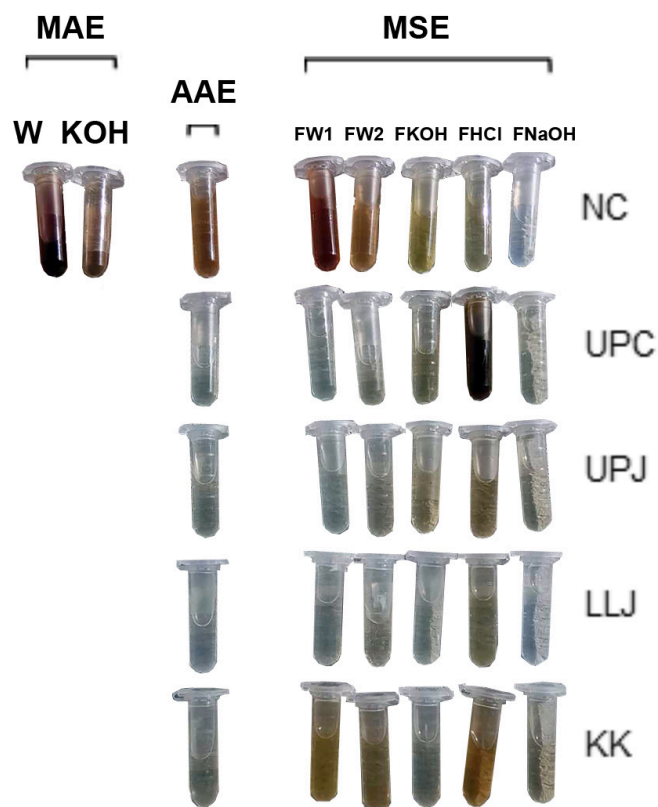


Figura 3.2 Extratos obtidos para amostras em estudo, através dos três métodos de extração aplicados (MSE, AAE e MAE).

Tabela 3.7 Concentração em mg/mL e respectivos rendimentos dos extratos obtidos por AAE.

Extrato	Concentração (mg/mL)	Rendimento de extração % (m/m)
NC(AAE)	1,38	17%
UPC(AAE)	6,22	47%
UPJ(AAE)	3,76	30%
LLJ(AAE)	8,16	70%
KK(AAE)	5,52	41%

Tabela 3.8 Concentração em mg/mL dos extratos obtidos por MSE.

Extrato	Concentração (mg/mL)
NC(FW1)	4,88
NC(FW2)	15,67
NC(FKOH)	14,18
NC(FHCl)	4,38
NC(FNaOH)	9,40
UPC(FW1)	2,88
UPC(FW2)	29,34
UPC(FKOH)	16,16
UPC(FHCl)	12,36
UPC(FNaOH)	49,12
UPJ(FW1)	17,78
UPJ(FW2)	16,16
UPJ(FKOH)	10,74
UPJ(FHCl)	6,48
UPJ(FNaOH)	9,92
LLJ(FW1)	18,56
LLJ(FW2)	16,04
LLJ(FKOH)	14,16
LLJ(FNaOH)	8,12
LLJ(FHCl)	7,62
KK(FW1)	35,64
KK(FW2)	9,12
KK(FKOH)	13,40
KK(FHCl)	11,46
KK(FNaOH)	11,30

Os rendimentos de extração obtidos por AAE, variaram entre 17 - 70 %, para os 3 tipos de alga, verificando-se valores bastante discrepantes para a kombu de origens diferentes (Japão 70 % e Coreia do Sul 41 %).

Quanto aos rendimentos de extração por MSE, não foram determinados, uma vez que este método é sequencial, e o rendimento de extração foi calculado com base na massa de amostra inicial de alga. No entanto, este método fracionado em cinco etapas, tem a capacidade de maximizar, a extração de biomoléculas intracelulares visto que primeiramente, extrai moléculas solúveis em água e nas três etapas seguintes, com soluções aquosas de KOH, de HCl e de NaOH, possibilita a solubilização de biomoléculas insolúveis em água proporcionando condições de pH e temperatura indicadas para a ruptura celular levando a uma extração mais eficaz (Zhu *et al.*, 2015).

O método MAE foi apenas aplicado a amostra NC, como já referido, e dado o reduzido volume de extrato obtido, este não foi possível ser liofilizado e conseqüentemente não foi determinada a sua concentração.

3.3 Quantificação de Biocompostos

Os extratos obtidos pelos métodos MSE, AAE e MAE foram doseados relativamente ao seu conteúdo em lípidos, carboidratos, proteínas, pigmentos, compostos fenólicos e flavonoides, uma vez que compostos bioativos são importantes para a caracterização do conteúdo bioquímico das macroalgas estudadas e relevantes para identificar estas algas como alimento funcional.

3.3.1 Lípidos

Na Figura 3.3, estão representados os conteúdos em lípidos nos extratos de AAE e MSE doseados pelo método colorimétrico SPV expressos em mg/g de amostra através da curva de calibração presente na Figura A.1, Anexo A.1. Os teores quantificados para os extratos MAE da alga NC encontram-se na Tabela 3.9.

Foram quantificados lípidos em todos os extratos de AAE, destacando-se a alga wakame oriunda da China (UPC) com $10,2 \pm 0,05$ mg/g de amostra. Quanto às frações de MSE, foram detetadas estas biomoléculas em todas as frações aquosas e em todas as frações obtidas a partir da UPC. Segundo os indicativos gerais para macroalgas apresentados por Xie *et al.*, (2023) os valores determinados estão dentro dos intervalos estabelecidos, com exceção do determinado para o extrato alcalino MAE da alga nori (NC). Quando comparados com estudos específicos para cada alga, os valores são os expectáveis, embora tenham sido aplicado métodos diferentes de doseamento (Fernández-Segovia *et al.*, 2018 e Taboada *et al.*, 2013).

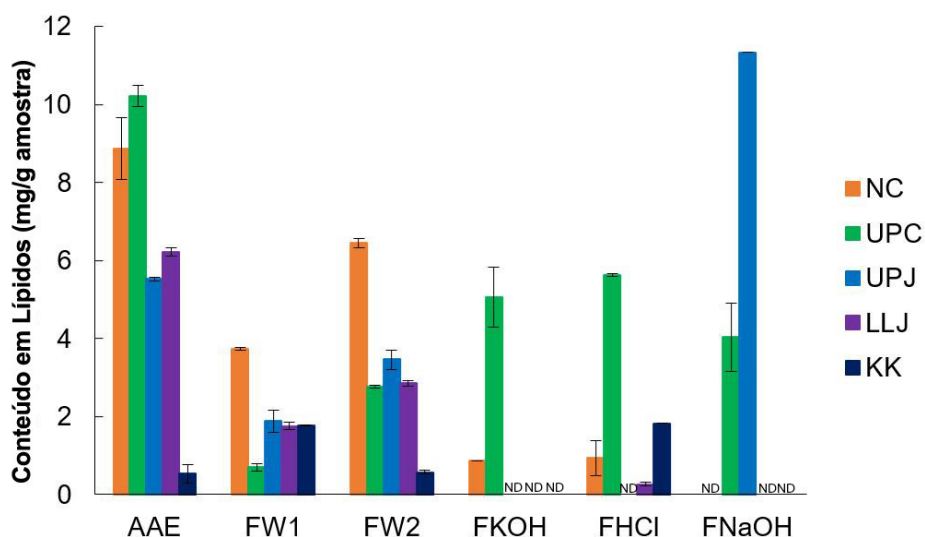


Figura 3.3 Quantificação de lípidos nos extratos de AAE e nas frações de MSE obtidos a partir das algas em estudo pelo método do SPV (ND – Não detetado, $n = 3$).

Tabela 3.9 Quantificação de lípidos nos extratos NC por MAE pelo método do SPV.

Extrato	Conteúdo em Lípidos (mg/g amostra)
NC(MAE_KOH)	6,40 ± 1,20
NC(MAE_W)	399,00 ± 12,00

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Para a NC, o método que permitiu obter um maior conteúdo em lípidos foi MAE utilizando água como solvente, obtendo-se um valor muito superior ao referenciado por Xie *et al.* (2023) para algas vermelhas e superior ao indicado na Tabela 2.2 de valores nutricionais apresentados na embalagem.

Considerando o extrato AAE da amostra UPJ, onde se obteve um teor de lípidos de $5,53 \pm 0,05$ mg/g de amostra, verifica-se que este valor foi próximo do tabelado na embalagem. Para as algas kombu estudadas, na amostra LLJ os valores doseados são inferiores aos tabelados, enquanto na amostra KK, embora os teores doseados sejam baixos, estes encontram-se superiores aos tabelados na embalagem, uma vez que o comerciante indica a ausência de gorduras no seu produto. As diferenças encontradas podem ser justificadas pela utilização de métodos diferentes de doseamento.

O padrão utilizado para a construção da curva de calibração (Figura A.1, Anexo A.1) deste método foi óleo de colza. Anschau *et al.*, quando descreveu a aplicação deste método utilizou azeite, que devido à sua tonalidade esverdeada se assemelha à maioria da cor dos extratos obtidos devido à presença de diversos pigmentos fotossintéticos. Outro aspecto a considerar em relação ao extrato MAE alcalino da NC foi a sua tonalidade avermelhada conferida pelos pigmentos (Figura 3.2), que absorvem no mesmo comprimento de onda que o cromóforo rosa, formado no método do SPV, podendo dar origem a resultados superiores aos espetáveis. Neste caso específico, seria preferível adotar outro método de doseamento, como por exemplo o método gravimétrico.

3.3.2 Carboidratos

3.3.2.1 Açúcares Redutores

O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método do DNS e tendo por base a respetiva curva de calibração obtida para a glucose presente na Figura A.2, Anexo A.1. Na Figura 3.4, estão representados os conteúdos determinados para os extratos MSE e AAE, e na Tabela 3.10 os teores quantificados para os extratos MAE da alga NC.

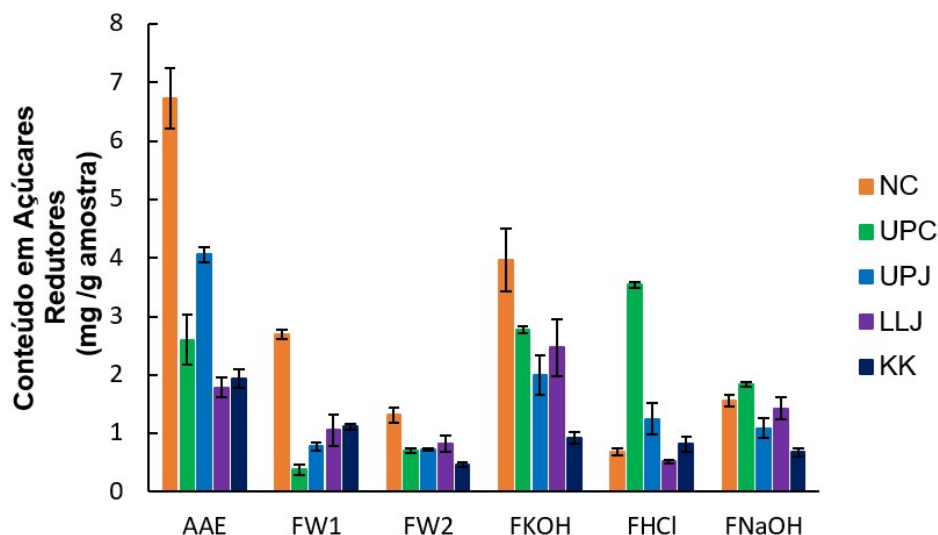


Figura 3.4 Quantificação de açúcares redutores nos extratos de AAE e de MSE das algas em estudo, através do método do DNS ($n = 3$).

Tabela 3.10 Quantificação de açúcares redutores nos extratos NC por MAE através do método do DNS.

Extrato	(Conteúdo em Açúcares Redutores mg/g amostra)
NC(MAE_KOH)	12,07 ± 1,19
NC(MAE_W)	87,83 ± 8,89

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Tendo em conta o somatório das frações MSE, a alga que apresentou teores mais elevados de açúcares redutores foi a alga nori, seguida das algas wakame e por fim as kombu. Verificou-se ainda que a extração por MAE utilizando água como solvente para a amostra NC, permitiu obter um conteúdo nestes compostos consideravelmente superior em comparação com os outros métodos aplicados. Uma justificação para que este valor seja elevado em relação aos outros métodos aplicados podem estar relacionada com a hidrólise da celulose que ocorrer no método de MAE.

Segundo a Tabela 2.2 que contém a informação nutricional das algas em estudo apresentadas pelos produtores, as amostras NC, UPJ e KK não contêm açúcares. No entanto, foram detetados açúcares redutores em todas as amostras. A única amostra com indicação de açúcares na sua composição é a LLJ, com valores inferiores a 1 mg/g amostra, tendo-se obtido valores mais elevados nos extratos.

Estes valores estão de acordo com os determinados por Nova *et al.* (2024) que quantificaram entre 6,5 a 83 mg/g amostra para algas nori. Quanto aos conteúdos determinados para as algas wakame (UPC e UPJ) encontram-se dentro do intervalo de referência de 1,45 a 25 mg/g amostra publicado por Fernandes *et al.* (2022). Relativamente às algas kombu (LLJ e KK), os teores em açúcares redutores detetados são inferiores aos valores de referência para algas castanhas de 20,6 a 39,7 mg/g amostra (Tan *et al.*, 2013).

É de referir ainda que, este método, por desenvolver um produto de reação com cor amarela

muito intensa, não foi visivelmente afetado pelos pigmentos presentes nos extratos doseados, considerando-se um método adequado para dosear açúcares redutores em macroalgas.

3.3.2.2 Carboidratos totais

O conteúdo em polissacáridos determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico em mg/g amostra através da curva de calibração presente na Figura A.3, Anexo A.1 para os extratos AAE e MSE das algas estudadas estão representados na Figura 3.5. Os teores quantificados para estes biocompostos nos extratos MAE da alga NC encontram-se na Tabela 3.11.

Através da análise da Figura 3.5, verificou-se que a alga nori apresentou um teor em polissacáridos mais elevado sendo os extratos aquosos de MAE e AAE os que exibiram conteúdo mais elevados.

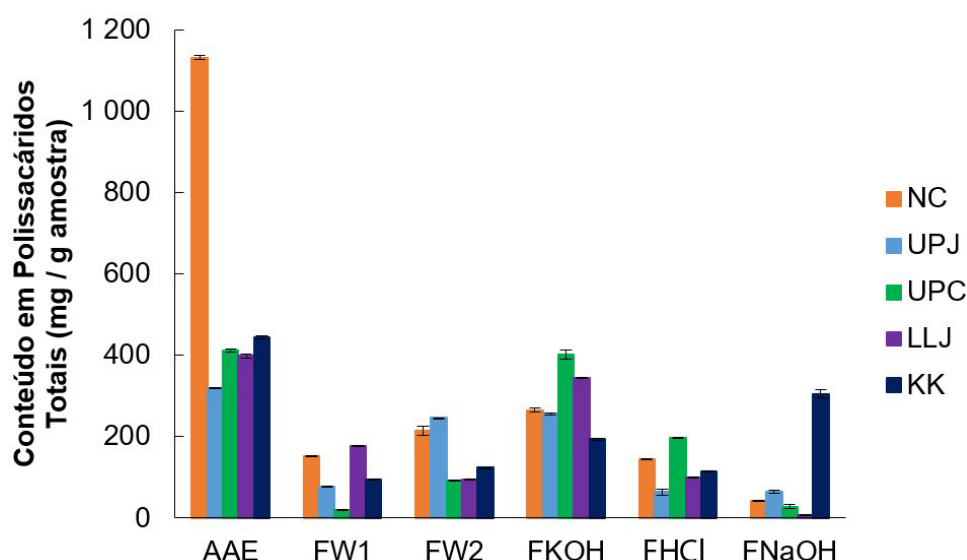


Figura 3.5 Quantificação de carboidratos totais nos extratos de AAE e MSE das algas em estudo através do método do fenol-ácido sulfúrico ($n = 3$).

Tabela 3.11 Quantificação de carboidratos totais nos extratos NC por MAE através do método do fenol-ácido sulfúrico.

Extrato	Conteúdo em carboidratos Totais (mg/g amostra)
NC(MAE_KOH)	156,61 ± 12,38
NC(MAE_W)	1271,26 ± 64,28

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Os valores de carboidratos totais publicados na literatura determinados através do mesmo método para a alga nori são de 46,0 % (m/m), para a alga wakame são de 60,3 % (m/m) e para a alga kombu são de 54,6 % (m/m) (Yim *et al.*, 2021).

Assim verificou-se que para as algas wakame em estudo, os valores quantificados são inferiores, nomeadamente para os extratos AAE 41 % (m/m) para a amostra UPC e 32 % (m/m) para

a amostra UPJ. No entanto, se se considerar o somatório dos extratos MSE o valor fica superior ao referenciado obtendo-se para a amostra UPC 73,91 % (m/m) e para a amostra UPJ 70,76 % (m/m). O mesmo sucede para as algas kombu, em que os valores mais elevados foram nos extratos AAE com 40 % (m/m) para a amostra LLJ e 44 % (m/m) para a amostra KK. Mais uma vez ao considerar-se o somatório das frações MSE o conteúdo em polissacáridos foi superior ao publicado, obtendo-se para a amostra LLJ 72,41 % (m/m) e para a amostra KK 83,38 % (m/m).

O método de extração adotado por Yim e seus colaboradores (2021) foi semelhante ao AAE, no entanto as amostras foram submetidas a dois ciclos de extração consecutivos com água a 100 °C durante seis horas e no fim do processo foi adicionado cloreto de cálcio e etanol para precipitar o alginato. Este processo final de purificação pode afetar os resultados quantificados através do método do fenol-ácido sulfúrico, uma vez que, o alginato é um polissacárido de natureza ácida, tendo assim uma carga aniónica que reage no método do fenol sulfúrico (Albalasmeh *et al.*, 2013).

3.3.2.3 Polissacáridos

3.3.2.3.1 Polissacáridos Sulfatados

Os polissacáridos sulfatados doseados nos extratos AAE e MSE das algas estudadas, pelo método com azul de toluidina através da curva de calibração presente na Figura A.4, Anexo A.1, encontram-se representados na Figura 3.6. Os teores quantificados para os extratos MAE da alga NC encontram-se na Tabela 3.12.

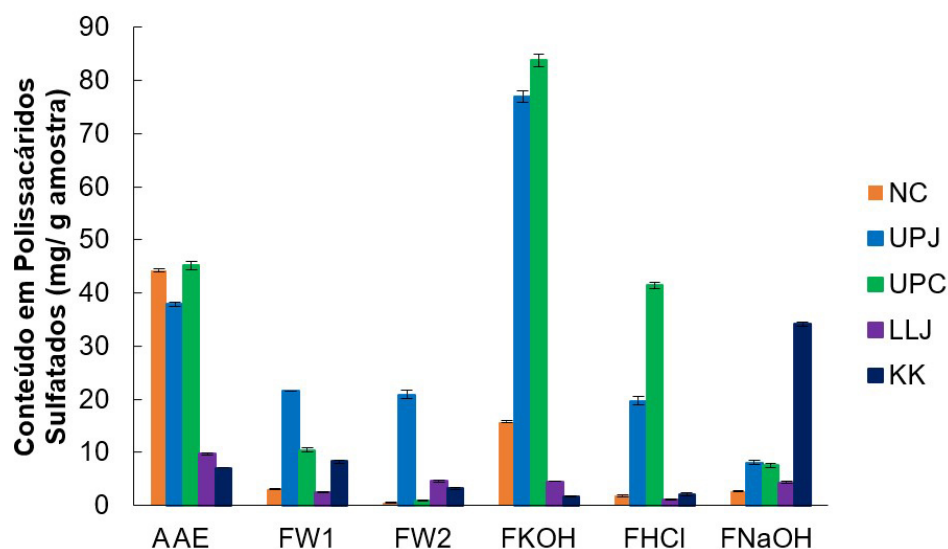


Figura 3.6 Quantificação de polissacáridos sulfatados nos extratos de AA e, MSE das algas em estudo através do método do azul de toluidina ($n = 3$).

Tabela 3.12 Quantificação de polissacáridos sulfatados nos extratos NC por MAE através do método do azul de toluidina.

Extrato	Conteúdo em Polissacáridos Sulfatados(mg/g amostra)
NC(MAE_KOH)	11,58 ± 2,67
NC(MAE_W)	6,53 ± 0,50

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Através da figura 3.6, pode verificar-se que de um modo geral, os extratos alcalinos apresentam maiores conteúdos nestes polissacáridos, contrariante ao referido na literatura (Hahn *et al.*, 2016). As algas wakame (amostras UPC e UPJ) foram as que exibiram quantidade deste biocompostos como foi expectável (Jiao *et al.*, 2011), tendo-se obtido para os extratos AAE 45,2 ± 08 mg/g para a amostra UPC e 37,9 ± 0,3 mg/g para a amostra UPJ.

Na literatura não se encontram dados para polissacáridos sulfatados para as algas estudadas, no entanto, encontram-se para a alga nori valores de carragenanas de 19,9 % (m/m) e 40 % (m/m) (Wahlström *et al.*, 2018; Bito *et al.*, 2017). Para a alga wakame encontra-se 6,64 a 41,5 % (m/m) de grupos sulfato (Han *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2008) e para a alga kombu são referidos valores de éster sulfatado de 33,55 e 35,5 % (m/m) de grupos sulfatados (Zhao *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2017).

Ao comparar os resultados obtidos com os de referência verifica-se que os valores determinados são muito inferiores, excetuado os resultados obtidos para as amostras UPC e UPJ, onde algumas frações apresentam conteúdos superiores a 6,64 % (m/m).

No entanto os valores publicados na literatura não foram quantificados através do método do azul de toluidina e os métodos de extração utilizados foram diferentes. É de referir ainda, que a presença de pigmentos nos extratos analisados pode ter interferido na quantificação dos polissacáridos sulfatados através deste método colorimétrico.

3.3.2.3.2 Polissacáridos Ácidos

A Figura 3.7 apresenta o teor de polissacáridos ácidos nos extratos AA e MSE das algas em estudo, determinado pelo método carbazol-ácido sulfúrico, em mg/g de amostra. Para os extratos MAE da alga NC os valores determinado encontram-se na Tabela 3.13.

De um modo geral, os extratos AAE e a fração de KOH de MSE foram os que exibiram teores de polissacáridos ácidos mais elevados. Este aspeto pode ser justificado, pelo facto de que a altas temperaturas e em condições alcalinas os polissacáridos decompõem-se nos seus monómeros, ocorrendo mais facilmente a reação com o ácido sulfúrico e com o carbazol bem como a correlação com o monómero padrão utilizado (ácido D-galacturónico) na construção da curva de calibração (Figura A.5, Anexo A.1)(Albalasmeh *et al.*, 2013).

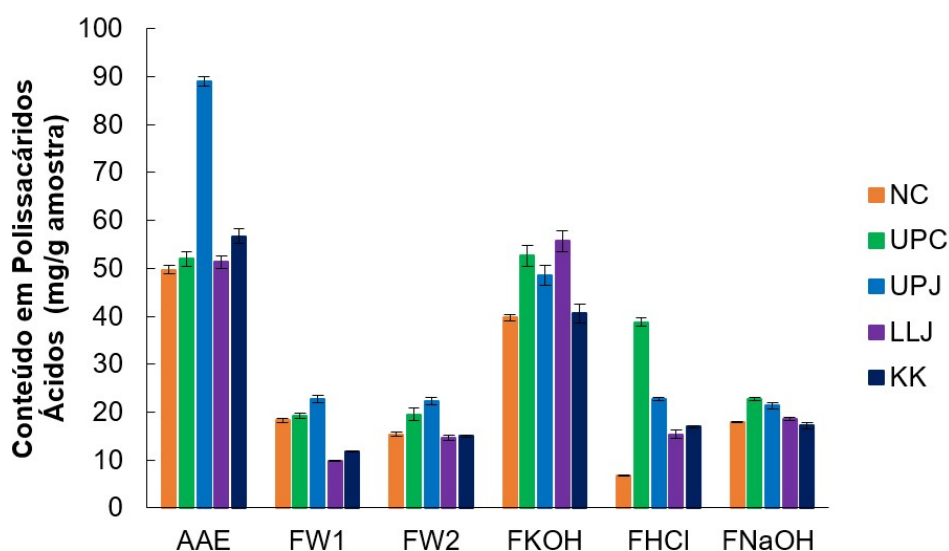


Figura 3.7 Quantificação de polissacáridos ácidos nos extratos de AAE e MSE das algas em estudo, através do método carbazol-ácido sulfúrico ($n = 3$).

Tabela 3.13 Quantificação de polissacáridos ácidos nos extratos NC por MAE, através do método carbazol-ácido sulfúrico.

Extrato	Conteúdo em Polissacáridos Ácidos (mg/g amostra)
NC(MAE_KOH)	26,30 ± 0,13
NC(MAE_W)	28,04 ± 0,50

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

O resultados obtidos são inferiores aos determinados por Yim e seus colaboradores (2021), com valores para ácido D-galacturónico de 30,7 % (m/m) para wakame, 10,2 % (m/m) para kombu e 32,4 % (m/m) para nori. No entanto, embora tenham utilizado um método de extração semelhante, mas mais exaustivo (dois ciclos de extração com água 100 °C durante 6 h) e procederam a uma análise de monossacarídeos por derivatização de 1-fenil-3-metil-5-pirazolona, seguido de cromatografia líquida de alta eficiência.

3.3.2.3.3 β -1,3-D-glucanos

O conteúdo de β -1,3-D-glucanos doseado através da curva de calibração do método do corante Congo *red* (Figura A.6, Anexo A.1) encontra-se apresentado na Tabela 3.14. Estes biocompostos foram detetados apenas em 7 extratos dos 32 analisados, onde o teor mais elevado foi detetado no extrato aquoso obtido por MAE da alga NC. Como já referido anteriormente, este método de doseamento foi específico para β -1,3-D-glucanos com estrutura em tripla hélice, estando este biocompostos associados a diversas atividades biológicas.

Na literatura não se encontram valores publicados para estes biocompostos em macroalgas, identificando-se apenas valores para glucanos entre 1,51 e 6,40 % (m/m), doseados através de kits enzimáticos em algas da ordem Laminariaceae (Garcia-Vaquero *et al.*, 2019). Como

seria expeável, os valores publicados são superiores aos determinados nos extratos obtidos, uma vez que se tratam de glucanos totais.

Tabela 3.14 Quantificação de β -1,3-D-glucanos nas macroalgas em estudo, através do método do corante Congo *red*.

Extrato	Conteúdo em β -1,3-D-glucanos (mg/g amostra)
NC(FHCl)	0,06 \pm 0,03
NC(MAE_KOH)	0,20 \pm 0,00
NC(MAE_W)	4,55 \pm 0,00
UPC(FW1)	0,21 \pm 0,03
UPC(FHCl)	0,65 \pm 0,10
UPJ(AAE)	0,53 \pm 0,05
KK(FW2)	0,06 \pm 0,02

Valores médios \pm DP dos replicados; $n = 3$.

3.3.3 Proteínas

Na Figura 3.8, estão representados os teores de proteína total, doseados pelo método de Bradford, para os extratos de AAE e MSE para as cinco algas estudadas. Os teores quantificados para os extratos MAE da alga NC encontram-se na Tabela 3.15.

Pelos resultados obtidos, foi notório que a extração MSE foi a mais eficaz na obtenção de proteínas, destacando-se as frações extraídas com KOH e HCl. Para as extrações de MAE da alga NC, também se verificou que a extração alcalina foi mais a eficaz.

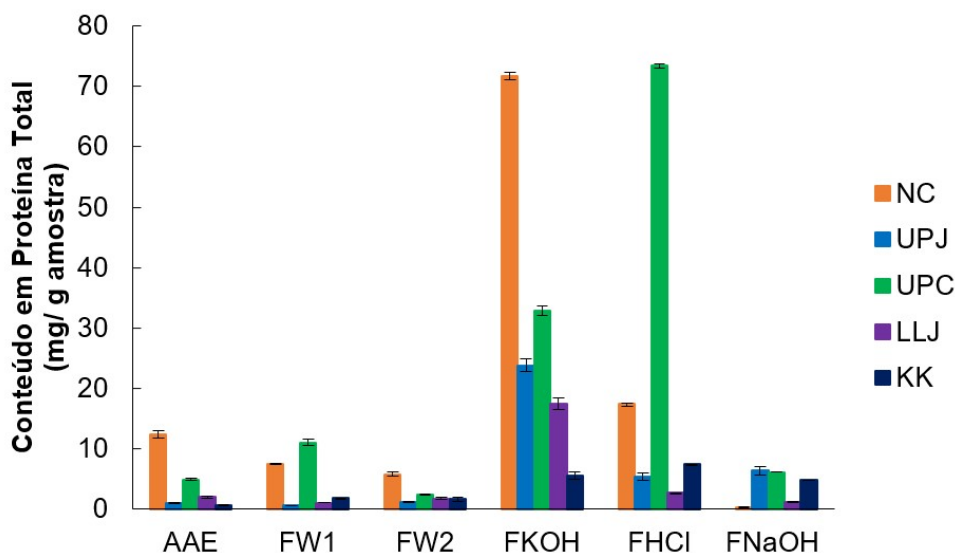


Figura 3.8 Quantificação de proteína total nos extratos de AAE, MAE e MSE das algas em estudo, pelo método de Bradford ($n = 3$).

Tabela 3.15 Quantificação de proteínas totais nos extratos NC por MAE, pelo método de Bradford.

Extrato	Conteúdo em Proteína Total (mg/g amostra)
NC(MAE_KOH)	18,83 ± 2,33
NC(MAE_W)	9,84 ± 1,69

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Os valores de proteína total indicados pelos produtores (Tabela 2.2) são muito superiores aos valores doseados pelo método de Bradford, para os extratos obtidos. Esta discrepância pode ser justificada pela interferência dos pigmentos presentes nos extratos e a eventualmente utilização de outros métodos para determinar proteínas por parte dos produtores. No entanto a alga NC foi a que apresentou teor mais elevado em proteínas, nomeadamente nos extratos AAE e MSE (considerando o somatório de todas as frações), à semelhança do indicado na Tabela 2.2.

Xie *et al.*, (2023) indicam conteúdos de proteína em macroalgas marinhas em gamas compreendidas entre 3,1 - 42,1 % e 3,5 - 47 % do seu peso seco, para algas castanhas e algas vermelhas, respetivamente. Comparando os resultados obtidos verifica-se que os extratos AAE e MAE exibem valores mais baixos, no entanto considerando o somatório das frações de MAE estes estão compreendidos nos intervalos de referência.

Um fator a considerar nestas quantificações, é mais uma vez a presença de pigmentos, observando-se que no doseamento de alguns extratos após a reação com o corante azul de Coomassie, estas não adquiriram a tonalidade azul característica do método de Bradford. Outro aspeto que pode também ter interferido neste método está relacionado com a viscosidade das amostras e a gama de concentração sensível da curva de calibração (A.7, Anexo A.1), uma vez que foi necessário proceder a diluições elevadas das amostras.

É ainda de realçar as diferenças de teores encontradas entre as mesmas espécies, nomeadamente entre as amostras da alga kombu (LLJ e KK) e da alga wakame (UPC e UPJ), que podem estar relacionadas com origem geográfica de produção e a época do ano em que foram recolhidas.

3.3.4 Pigmentos

Uma vez que os pigmentos fotossintéticos, nomeadamente clorofilas (*a* e *b*), carotenoides e ficobiliproteínas, possuem características interessantes com várias aplicações e atividades biológicas, procedeu-se à avaliação do conteúdo destes compostos em todos os extratos, inclusive os obtidos por maceração com acetona Figura 3.9.

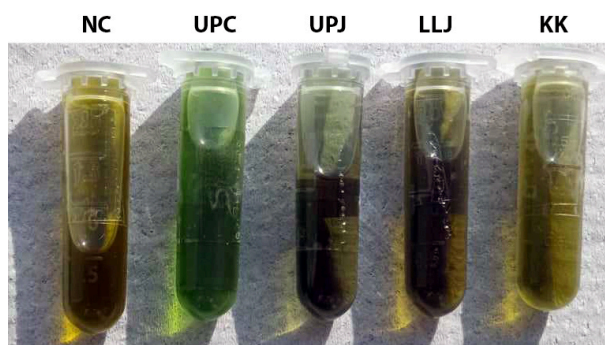


Figura 3.9 Extratos obtidos por maceração com acetona das macroalgas estudadas, utilizados na quantificação dos pigmentos.

3.3.4.1 Clorofilas Totais

As clorofilas *a*, *b* e totais, foram quantificadas através das Equações (1.1 a 1.3) nos extratos com acetona e Equações (1.5 a 1.7) nos restantes extratos, enunciadas em 1.7.2.4 (vide Materiais e Métodos)

Os resultados referentes às diversas extrações das algas nori, wakame e kombu, encontram-se nas Figuras 3.10, 3.11 e 3.12, respetivamente. Como descrito em 2.3.3.4 procedeu-se ainda à extração por maceração com acetona, verificando-se que a extração não foi completa, como se pode observar através da Figura 3.9, onde o *pellet* permaneceu com cor, e através da comparação dos resultados obtidos para restantes extratos, uma vez que nestes extratos foram detetados menores conteúdos destes pigmentos.

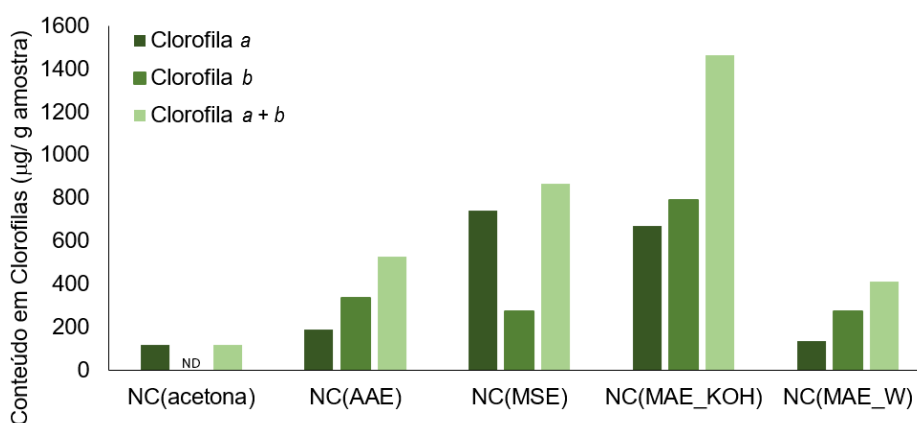


Figura 3.10 Quantificação de clorofilas nos extratos obtidos para a alga nori (ND - Não Detetado).

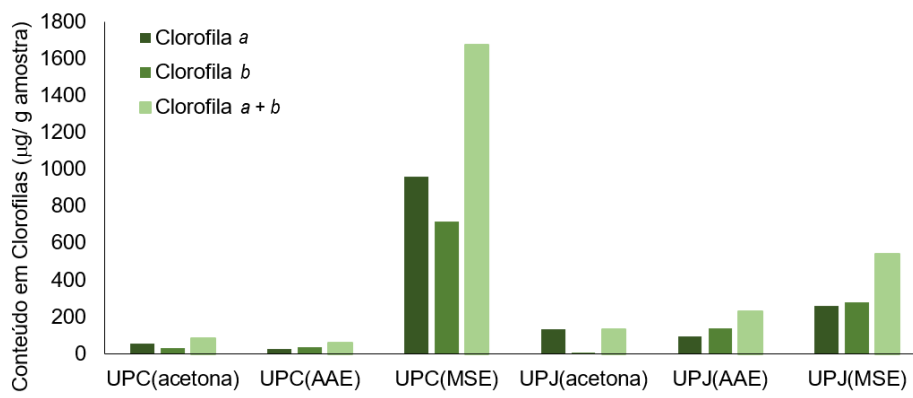


Figura 3.11 Quantificação de clorofilas nos extratos obtidos para as algas wakame (UPC e UPJ).

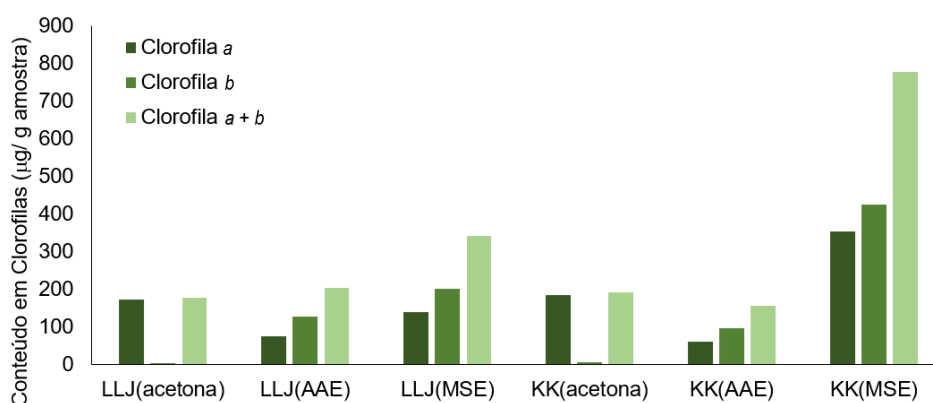


Figura 3.12 Quantificação de clorofilas nos extratos obtidos para as algas kombu (LLJ e KK) (ND - Não Detetado).

Pela análise das Figuras anteriores é possível verificar que a amostra de alga wakame oriunda do China (UPC) foi a que apresentou um maior teor de clorofilas, considerando o somatório dos teores dos extratos de MSE (1679,39 µg/g amostra). No entanto a alga wakame originária da Japão, apresenta um valor bastante mais baixo (541,58 µg/g amostra). Nos extratos obtidos a partir das algas kombu, verifica-se novamente um teor mais elevado para os extratos MSE, considerando o somatório das frações, com 341,27 µg/g amostra e 778,7 µg/g amostra, para as amostras LLJ e KK, respetivamente. Relativamente a alga nori, o extrato alcalino de MAE foi o que apresentou um conteúdo mais elevado destes pigmentos (1466,38 µg/g amostra).

Um estudo apresentado por Garcia-Perez *et al.* (2022) determinou conteúdos de pigmentos fotossintéticos em vários extratos obtidos com diversos solventes e a partir de algas castanhas colhidas na costa noroeste da Península Ibérica, apresentando conteúdos de clorofilas totais entre 68,7 a 911,3 µg/g amostra de uma alga wakame e 670,7 a 3904,8 µg/g amostra de duas algas do género *Laminaria* (kombu). À semelhança deste estudo, Osório *et al.* (2020) avaliaram a o conteúdo de pigmentos em algas comerciais, utilizando diversos solventes de extração, verificando um intervalo de 349,0 a 542,5 µg/g amostra de uma alga wakame, 431,9 a 583,4 µg/g amostra de alga nori e 114,0 a 197,6 µg/g amostra de alga kombu. Outro estudo

desenvolvido por Amorim e seus colaboradores (2012) em algas colhidas na costa atlântica da Galiza (Espanha), determinou um teor de clorofila total de 7261,07 $\mu\text{g/g}$ amostra de uma alga wakame e 4182,32 $\mu\text{g/g}$ de kombu amostra de uma alga. Chen *et al.* (2018 e 2019) indicam valores para clorofilas totais entre 7,21 e 16,45 % (m/m) para a alga kombu e 1,81 e 46,39 % (m/m) para a alga nori.

Como se pode verificar pelos valores recolhidos da literatura, os conteúdos destes pigmentos são muito variáveis, estando dependentes de diversos fatores, nomeadamente a origem geográfica, época de colheita e as condições de crescimento, que vão influenciar a produção destes metabolitos (Cikos *et al.*, 2022). Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar igualmente a disparidade de valores, nomeadamente entre amostras de origens geográficas diferentes.

3.3.4.2 Carotenoides

Os teores de carotenoides totais foram quantificados através da Equação 1.4 para os extratos com acetona, e através da Equação 1.8 para os restantes extratos, descritas em 1.7.2.4. Os teores de fucoxantina foram determinados utilizando a Equação 1.9 descrita na mesma secção. Os valores obtidos estão apresentados nas Figura 3.13, 3.14 e 3.15, para as algas nori, wakame e kombu estudadas, respetivamente.

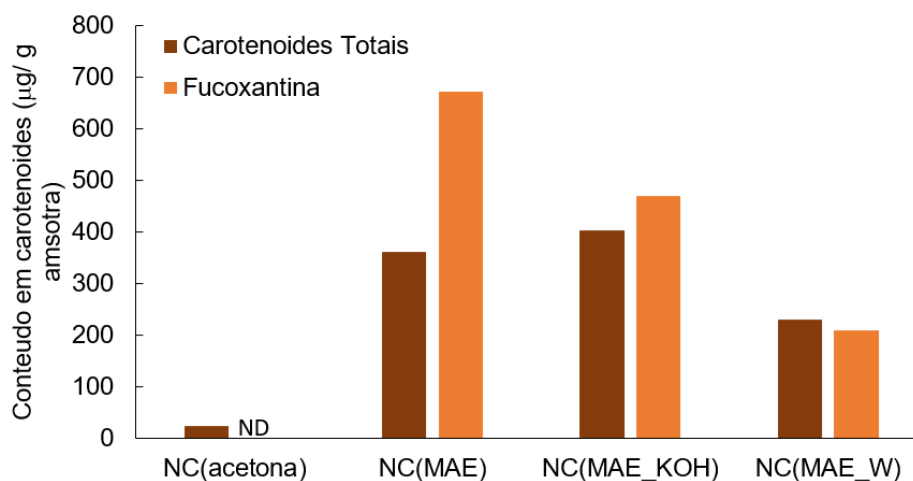


Figura 3.13 Quantificação de carotenoides extratos obtidos para a alga nori (ND - Não Detetado).

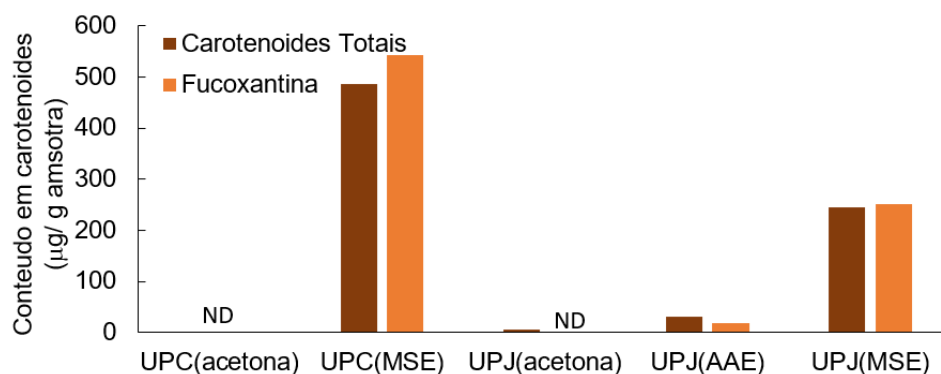


Figura 3.14 Quantificação de carotenoides extratos obtidos para as algas wakame (ND - Não Detetado).

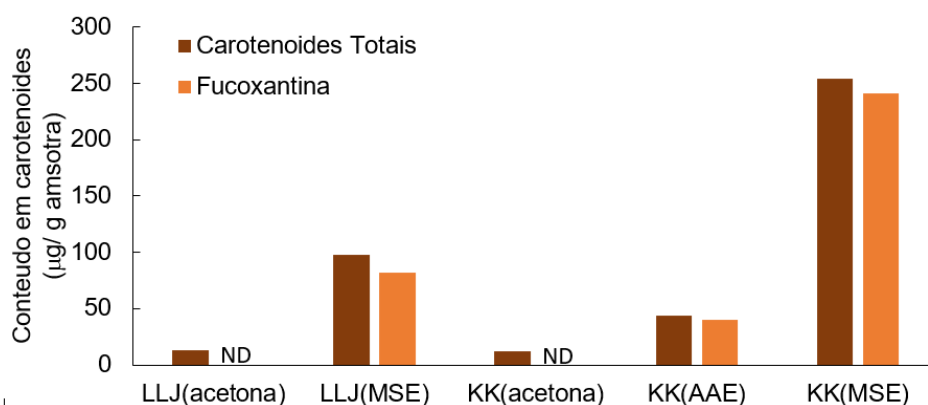


Figura 3.15 Quantificação de carotenoides extratos obtidos para as algas kombu (ND - Não Detetado).

À semelhança das clorofilas, as algas wakame estudadas exibiram um conteúdo mais elevado em carotenoides totais, considerando o somatório das frações MSE (486,04 µg/g amostra). No entanto, a amostra UPJ para este tipo de extração, apresentou um valor cerca de 2 vezes menor (245,11 µg/g amostra). Quanto aos valores obtidos para as amostras da alga kombu, salientam-se também os extratos de MSE, com valores totais de 87,96 µg/g amostra LLJ e 253,75 µg/g amostra KK. Mais uma vez, verifica-se disparidade entre os valores obtidos para amostra de origem geográfica diferente.

Quanto aos extratos da alga nori, destaca-se o teor obtido por MAE com solvente alcalino, com um valor de 402,61 µg/g amostra.

No trabalho desenvolvido por Osório *et al.* (2020) foram determinados conteúdos de carotenoides totais em extratos metanólicos a partir de algas comerciais com valores máximos de 54,6 µg/g amostra de uma alga wakame, 74,5 µg/g amostra de alga nori e 27,0 µg/g amostra de alga kombu. Estes valores são bastante menores relativamente do presente trabalho, sendo apenas comparáveis aos determinados nos extratos obtidos com acetona. No entanto, Garcia-Perez *et al.* (2022) determinou conteúdos destes pigmentos fotossintéticos em vários extratos a partir de algas castanhas, apresentando conteúdos de carotenoides totais entre 1639,3 e 3147,7 µg/g amostra de uma alga wakame e 470,0 a 5675,5 µg/g amostra de algas *Laminaria*

spp. (kombu), sendo estes valores superiores aos determinados neste trabalho.

Através das Figuras anteriores verifica-se que os conteúdos em fucoxantina quantificados nos extratos podem estar inflacionados, principalmente no que diz respeito aos extratos obtidos a partir da alga nori. Dado que a fucoxantina é um carotenoide abundante nas algas castanhas, nomeadamente dos géneros *Undaria* e *Laminaria*, o seu conteúdo representa uma elevada percentagem dos carotenoides totais (Salido *et al.*, 2024). Os teores de fucoxantina também se verificam inflacionado nas algas castanhas estudadas.

Para as algas wakame, encontram-se valores de conteúdos de fucoxantina muito diversos, dependendo do método de extração e purificação utilizados. Por exemplo, em extratos com metanol seguido de secagem com nitrogénio e dissolução com acetonitrilo e metanol, foram quantificados valores entre 4 a 5 mg/g de amostra (Terasaki *et al.*, 2020). Noutro estudo, onde a extração também foi realizada com metanol seguido de evaporação em rota-vapor e dissolução em clorofórmio, metanol e água, os valores quantificados foram entre 728 a 3090 µg/g amostra (Sugimura *et al.*, 2012). Também foram encontrados extratos utilizando metanol e outros solventes orgânicos valores de fucoxantina inferiores a 7 mg/g de amostra (Fung *et al.*, 2013).

Dada a grande variabilidade de valores quantificados, mesmo para métodos de extração semelhantes, torna-se mais uma vez difícil comparar os resultados com os valores de referência. Isto evidencia que a produção deste metabolito é afetada pelas condições externas do meio do cultivo, conforme corroborado o descrito em alguns artigos referenciados (Terasaki *et al.*, 2020; Fung *et al.*, 2013).

As condições de crescimento também influenciam a produção destes pigmentos nas algas kombu, identificando-se uma maior produção durante os períodos de inverno (Cikoš *et al.*, 2022). Por esse motivo, encontram-se estudos com quantificações muito distintas, por exemplo, em extratos com metanol foram quantificados valores entre 56,6 a 213 µg/g amostra (Kanazawa *et al.*, 2008). Enquanto em extrato com água a 100 °C durante 1h, uma extração muito semelhante à fração FW2, obtiveram valores entre 724,16 a 839 µg/g amostra (Amorim *et al.*, 2012).

Segundo Fukushima *et al.*, (2023) foram quantificados 1520 µg/g de amostra de carotenoides totais na alga wakame (dos quais cerca de 95 % corresponderam a fucoxantina) e 120 µg/g de amostra na alga kombu (dos quais 85 % representavam fucoxantina), valores um pouco discrepantes relativamente aos determinados nos extratos das amostras em estudo.

No entanto, um estudo desenvolvido por Koizumi e seus colaboradores (2018) determinaram valores de carotenoides cerca de 5 vezes superior ao determinado neste trabalho (c.a. 2 mg/g de amostra) para uma alga nori, onde 75 % dizem respeito a luteína, carotenoide em maior abundância nas algas vermelhas.

De facto, a fucoxantina possui um grande potencial farmacológico, mas a sua produção é muito variável, o que dificulta a sua extração e aplicabilidade na indústria. Os métodos de extração de pigmentos têm vindo a ser testados e a de forma a serem mais eficazes e sustentáveis

(Manzoor *et al.*, 2024). Assim, neste trabalho considerou-se avaliar os extratos de MAE, AEE e MSE, para além do obtido de forma convencional com acetona, que demonstraram ser mais eficazes na extração destes compostos. No entanto, as clorofilas e os carotenoides podem sofrer degradação e isomerização quando expostos a elevada temperatura e a exposição solar (Cikoš *et al.*, 2022).

3.3.4.3 Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas, nomeadamente ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina, foram avaliadas em todos os extratos aquosos obtidos para as algas em estudo e quantificadas através das Equações 1.10 a 1.12, descritas em 1.7.2.4. Estas proteínas absorvem num intervalo de comprimentos de onda entre 490 e 650 nm, gama em que a clorofila a e os carotenoides apresentam baixos valores de absorvância (Kovaleski *et al.*, 2022).

Na tabela (Tabela 3.16) encontram-se os resultados referentes aos teores de ficobiliproteínas obtidos nas diferentes extrações para a amostra NC.

Tabela 3.16 Quantificação de ficobiliproteínas dos extratos AAE, MSE e MAE da alga nori estudada (ND - Não Detetado).

Ficobiliproteínas (mg/g amostra)			
Amostras	Ficocianina	Aloficocianina	Ficoeritrina
NC(AAE)	7,32	5,13	232,82
NC(FW1)	ND	23,76	83,34
NC(FW2)	3,52	2,49	28,28
NC(FKOH)	2,37	1,79	18,85
NC(FHCl)	0,74	0,55	5,68
NC(FNaOH)	0,17	6,27	4,31
NC(MAE_KOH)	0,27	0,48	0,49
NC(MAE_W)	0,12	0,09	0,12

Pela análise da tabela anterior, é possível verificar que o extrato AAE exibiu um maior conteúdo nestas proteínas, designadamente 232,82 mg/g amostra de ficoeritrina, 5,13 mg/g de amostra de aloficocianina e 7,32 mg/g de amostra de ficocianina, embora tenha sido utilizada uma temperatura superior a 100°C, o que poderia indiciar ocorrência de desnaturação térmica. De um modo geral, verifica-se que os extratos aquosos são os que apresentam valores mais elevados, com exceção do obtido por MAE. Sendo a ficoeritrina responsável pela cor rosa/vermelha das algas vermelhas, como seria expetável, a ficoeritrina é a que está presente em maior quantidade em todos os extratos (AAE, MSE e MAE). Estudos realizados por Cai *et al.*, (2014) e descritos por Kovaleski *et al.*, (2022) e apontam para valores de ficobiliproteínas totais entre 2,09 e 6,95 mg/g de amostra, de ficoeritrina de 1,06 % (m/m) e ficocianina 0,65 % (m/m) para uma alga nori. Comparando estes resultados com os obtidos neste estudo, verifica-se os uma elevada divergência, que pode ser atribuída aos diferentes métodos de extração utilizados e às espécies analisadas. Sendo estes pigmentos proteicos quase exclusivos das algas vermelhas, verifica-se a presença de teores muito menores nas outras famílias de algas (Tabela

3.17 e Tabela 3.17). Por este motivo, não se encontraram na literatura valores de referência para as algas wakame e kombu.

Na Tabela 3.17 para os extratos obtidos a partir das algas wakame (UPC e UPJ), onde se pode verificar que as frações de extração de MSE com KOH (35,03 mg de ficobiliproteínas por g de amostra de UPC e 4,24 mg de ficobiliproteínas por g de amostra de UPJ) e HCl (34,99 mg de ficobiliproteínas por g de amostra de UPC e 2,97 mg de ficobiliproteínas por g de amostra de UPJ), foram as que apresentaram maiores teores destas proteínas, embora na fração FHCl da amostra UPC, não tenha sido detetada ficocianina.

Tabela 3.17 Quantificação de ficobiliproteínas dos extratos AAE, MSE e MAE das algas wakame estudada (ND - Não Detetado).

Ficobiliproteínas (mg/g amostra)			
Amostras	Ficocianina	Aloficocianina	Ficoeritrina
UPC(AAE)	0,36	0,33	0,51
UPC(FW1)	0,21	0,20	0,27
UPC(FW2)	0,09	0,08	0,13
UPC(FKOH)	12,42	10,03	12,58
UPC(FHCl)	ND	6,51	28,48
UPC(FNaOH)	0,41	0,62	0,81
UPJ(AAE)	1,24	1,23	1,42
UPJ(FW1)	0,18	0,18	0,24
UPJ(FW2)	0,12	0,11	0,16
UPJ(FKOH)	0,83	1,55	1,86
UPJ(FHCl)	0,64	0,91	1,42
UPJ(FNaOH)	0,48	0,49	0,77

Ainda através da análise da Tabela anterior, pode-se observar que existe uma elevada discrepância de conteúdos de ficobiliproteínas de algas wakame produzidas na China e no Japão.

Para as algas kombu estudadas, também foi possível quantificar ficobiliproteínas (Tabela 3.18), embora em conteúdos muito baixos. Para a amostra LLJ, o extrato que se destacou na sua generalidade foi a fração FKOH com valores de 2 mg/g de ficoeritrina, 1 mg/g de ficocianina e aloficocianina. Para a amostra KK, a fração FHCl destacou-se em termos da extração de ficoeritrina com 7 mg/g.

Tabela 3.18 Quantificação de ficobiliproteínas dos extratos AAE, MSE e MAE das algas kombu estudada.

Ficobiliproteínas (mg/g amostra)			
Amostras	Ficocianina	Aloficocianina	Ficoeritrina
LLJ(AAE)	1,24	1,14	1,63
LLJ(FW1)	0,13	0,12	0,19
LLJ(FW2)	0,18	0,17	0,22
LLJ(FKOH)	1,17	1,29	1,72
LLJ(FHCl)	0,23	0,29	0,40
LLJ(FNaOH)	0,13	0,13	0,24
KK(AAE)	1,01	0,85	1,23
KK(FW1)	0,37	0,29	2,94
KK(FW2)	0,38	0,33	0,54
KK(FKOH)	0,43	0,69	0,89
KK(FHCl)	0,16	1,39	7,08
KK(FNaOH)	0,33	0,43	0,67

Nestas algas, à semelhança das wakame analisadas, verifica-se uma disparidade de teores desta proteínas, quer no que diz respeito ao método de extração e solvente utilizado, quer relativamente à sua origem de produção. Assim, destacam-se os extratos AAE com conteúdos em ficobiliproteínas totais (4,01 mg/g de amostra de LLJ e 3,09 mg/g de amostra de KK), a fração FKOH da amostra LLJ (4.18 mg/g de amostra) e as frações FW1(3,60 mg/g de amostra) e FHCl (8,83 mg/g de amostra) da amostra KK . Pode-se ainda realçar, o facto de que para as algas wakame e kombu estudadas, o método MSE permitiu a extração de teores mais elevados destes pigmentos.

3.3.5 Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados para os extratos obtidos pelo método de Foli Ciocalteu e foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de amostra.

Através da Figura 3.16, pode-se constatar que a amostra da alga nori foi a que exibiu um teor mais elevado destes compostos, tendo-se obtido para extrato AAE um valor de 9,1 mg GAE/g de amostra e para os extratos de MAE um total de 23,2 mg GAE/g de amostra. Os extratos obtidos por MAE (Tabela 3.19) apresentaram valores bastantes reduzidos de compostos fenólicos.

Os resultados obtidos quando comparados aos da literatura, são mais elevados, uma vez que foram reportados conteúdos de compostos fenólicos totais para este tipo de alga, entre 2,91 e 8,20 mg GAE/g amostra, obtidos através de diferentes métodos e solventes de extração (Kurakake *et al.*, 2021; Fernández-Segovia *et al.*, 2018).

Pode-se observar ainda através da Figura 3.16, que a extração por MSE foi o método que permitiu obter uma maior quantidade destes compostos a partir de todas as amostras, destacando-se a fração alcalina com KOH.

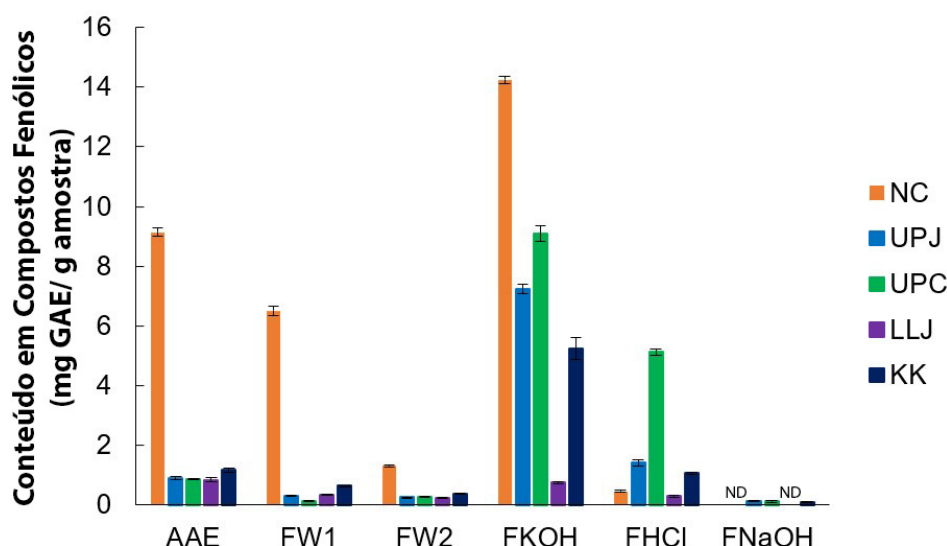


Figura 3.16 Quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos AAE e MSE das algas em estudo, pelo método de Foli Ciocalteu (ND – Não detetado, $n = 3$).

Tabela 3.19 Quantificação de compostos fenólicos totais dos extratos MAE das algas nori estudada, pelo método de Foli Ciocalteu.

Extrato	Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/g amostra)
NC(MAE_KOH)	0,04 ± 0,00
NC(MAE_W)	0,05 ± 0,00

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Quanto aos valores de compostos fenólicos quantificados nas amostras de algas wakame analisadas, verifica-se que estão dentro do esperado, uma vez que estão descritos na literatura valores entre 2,6 e 67,11 mg GAE/g amostra obtidos através de diversos métodos de extração (Gan *et al.*, 2022; Vlaisavljević *et al.*, 2021; López-Hortas *et al.*, 2019; Fernández-Segovia *et al.*, 2018; Amorim *et al.*, 2012; Machu *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2019). É de salientar que não se observaram diferenças significativas entre as duas amostras oriundas de regiões geográficas diferentes.

Relativamente às algas kombu analisadas, foram as que exibiram menores conteúdos em compostos fenólicos, tal como descrito na literatura, onde são referidos valores compreendidos entre 1,7 a 2,77 mg GAE/g amostra (Vlaisavljević *et al.*, 2021; Fernández-Segovia *et al.*, 2018; Amorim *et al.*, 2012). Entre estas duas amostras também não se verificaram diferenças expressivas nos conteúdos de compostos fenólicos totais determinados.

3.3.5.1 Flavonoides

Os teores de flavonoides totais quantificados pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio dos extratos AAE e MSE das algas estudadas encontram-se na Figura 3.17 e para os extratos MAE da alga NC na Tabela 3.20, expressos em mg de equivalentes de catequina (CAE) por g de amostra.

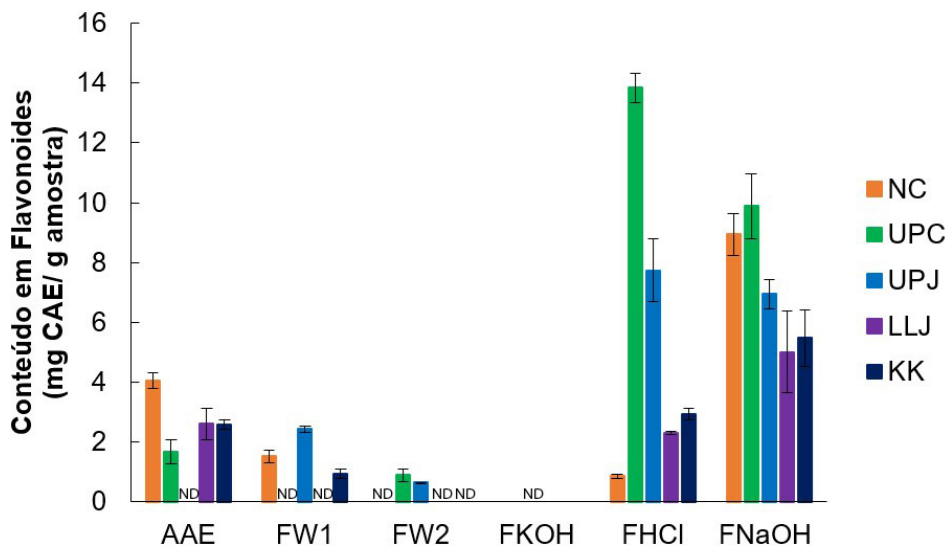


Figura 3.17 Quantificação de flavonoides totais nos extratos AAE e MSE de todas as algas estudadas, pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (ND – Não detetado, $n = 3$).

Tabela 3.20 Quantificação de flavonoides totais dos extratos MAE das algas nori estudada, pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio.

Extrato	Conteúdo em Flavonoides (mg CAE/ g amostra)
NC(MAE_KOH)	11,49 ± 1,88
NC(MAE_W)	16,64 ± 0,49

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Através dos resultados obtidos, verifica-se que os extratos MAE foram os que apresentaram maior teor de flavonoides. Machu e seus colaboradores (2015) quantificaram teores de 18,2 mg CAE/ g de amostra de uma alga nori, verificando-se que os valores obtidos no extrato aquoso de MAE e considerando o total das frações de extração de MSE (11,31 mg CAE/g de NC), foram próximos do valor publicado. Para as algas wakame, obtiveram-se maiores teores destes compostos para a amostra UPC obtendo-se 24,61 mg CAE/g amostra através da extração MSE.

Um estudo desenvolvido por Yin e seus colaboradores (2019) na avaliação de diversos métodos de extração para a obtenção de biocompostos a partir de uma alga wakame, determinou teores de compostos flavonoides entre 32,48 mg CAE/g amostra num extrato obtido através de extração supercrítica com etanol, e cerca de 2,00 mg CAE/g amostra num extrato aquoso. Assim, estes resultados encontram-se semelhantes aos obtidos por extração MSE no presente trabalho.

Quanto às algas kombu, verificou-se que as duas amostras avaliadas não apresentam diferenças significativas, relativamente aos conteúdos destes biocompostos, tendo-se obtido por MSE teores mais elevados, designadamente 7,31 mg CAE/g de amostra LLJ e 9,33 mg CAE/g de amostra KK. Estes resultados são difíceis de comparar com dados disponíveis na literatura, uma vez que estes estão maioritariamente expressos em equivalentes de quercetina (QE) e em equivalentes de rutina (RE). Gajić *et al.* (2024) reportaram um valor de flavonoides totais de

14.9 mg RE/g e Ummat *et al.* (2020) 15.2 mg QE/g de *Laminaria digitata* em extratos etanólicos.

A comparação direta dos resultados obtidos neste estudo com os valores publicados na literatura, pode não ser adequada uma vez que as concentrações de biocompostos nas algas marinhas dependem de muitas variáveis, nomeadamente as condições de crescimento, a época de colheita, o *habitat* e as condições ambientais onde se desenvolvem, incluindo a luz, a temperatura e a salinidade da água (Siddik *et al.*, 2023).

Os teores doseados para os diversos biocompostos podem ser consultados no Anexo A.2 nas Tabelas A.1 a A.11.

3.4 Atividades Biológicas

Os extratos obtidos foram avaliados *in vitro* quanto à capacidade anti-oxidante, antimicrobiana contra duas espécies bacterianas e citotoxicidade contra quatro linhas celulares animais.

3.4.1 Atividade Anti-oxidante

A atividade antioxidante foi determinada através do método de inibição do radical catiónico ABTS em soluções de 5 mg/mL de biomassa liofilizada de AAE e MSE dissolvido em água desionizada de todas as algas estudadas, expressa em % de inibição de ABTS^{•+} (Figura 3.18); nos extratos AAE e MSE de todas as algas estudadas (Figura 3.19) e nos extratos MAE da amostra NC (Tabela 3.21) expressos em mg de equivalente de Trolox (TE) por g de biomassa .

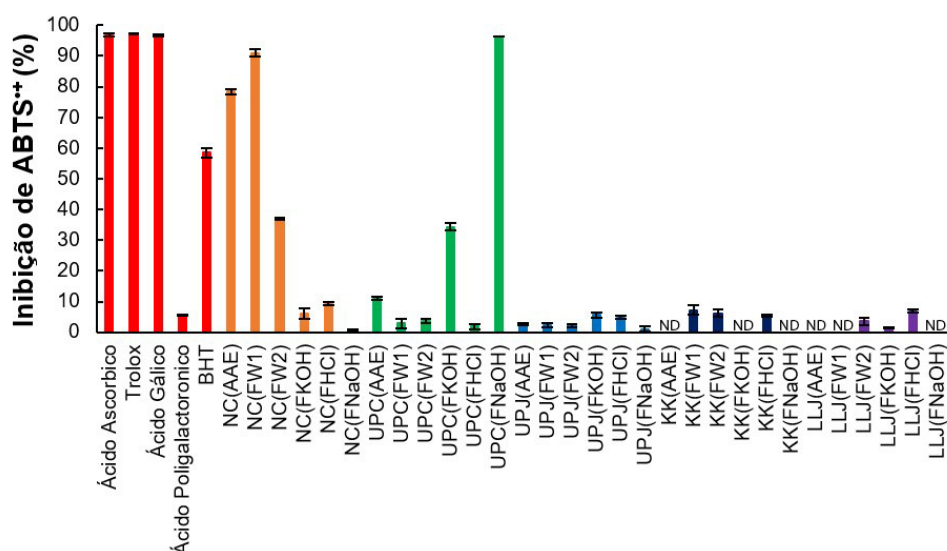


Figura 3.18 Atividade antioxidante dos extratos AAE e MSE (5 mg/mL) das algas em estudo, expressa em % de inibição de ABTS^{•+}, utilizando ácido ascórbico, trolox, ácido gálico, ácido poligalacturónico e BHT como controlos positivos (ND – Não detetado, *n* = 3).

Através da Figura 3.18, observa-se que as algas que apresentam maior atividade antioxidante

são a nori e a wakame oriunda da China (UPC), verificando-se uma % de inibição do ABTS^{•+} equiparável ao dos controlos positivo ácido ascórbico, trolox, ácido gálico para FW1 da NC (90 %) para a FNaOH da UPC (96 %). O extrato AAE da alga nori exibiu uma atividade antioxidante superior ao controlo positivo BHT de 78 %.

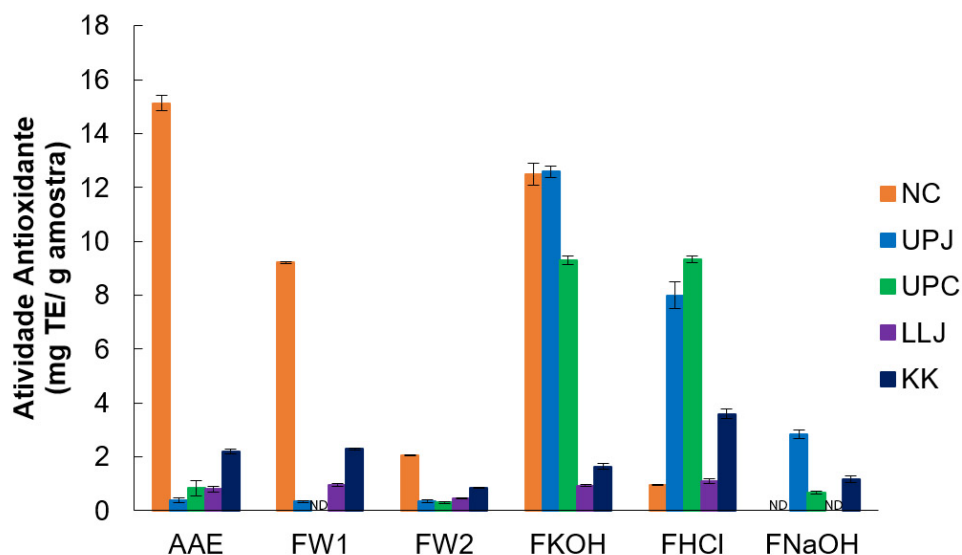


Figura 3.19 Atividade antioxidante determinada pelo método do ABTS^{•+} dos extratos AAE e MSE das algas estudadas, expressa em mg TE por g de amostra (ND – Não detetado, $n = 3$).

Tabela 3.21 Atividade antioxidante determinada pelo método do ABTS^{•+} dos extratos MAE da alga nori, expressa em mg TE por g de amostra.

Extrato	Atividade Antioxidante (mg TE/g amostra)
NC(MAE_KOH)	1,30 ± 0,15
NC(MAE_W)	49,52 ± 10,09

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Os resultados constantes na Figura 3.19 e na Tabela 3.21 corroboram a identificação da alga nori, como a amostra com capacidade antioxidante mais elevada, nomeadamente através do extrato MAE em água (50 ± 6 mg TE/g amostra) e o extrato AAE ($15,1 \pm 0,3$ mg TE/g amostra). É ainda de realçar que em todas as frações alcalinas obtidas com KOH e em todas as frações ácidas de MSE, foi detetada atividade antioxidante. Fernández-Segovia *et al.*, 2018 apresentou um valor de $7,2 \mu\text{g TE/g}$ para a atividade antioxidante de uma alga nori, valor bastante inferior aos determinados neste trabalho, expeto à da fração FNaOH na qual não foi detetada capacidade antioxidante. Vários estudos indicam valores entre $0,0053$ a $45,5$ mg TE/g para a capacidade antioxidante de algas wakame (Fernández-Segovia *et al.*, 2018; Vlaisavljević *et al.*, 2021; Gan *et al.*, 2022), valores comparáveis com os obtidos para as amostras analisadas neste trabalho. Relativamente às algas kombu, foram reportados valores de capacidade antioxidante num intervalo de $0,0123$ a $0,66$ mg TE/g, que corroboram o potencial antioxidante determinado nas amostras LLJ e KK estudadas.

Foi ainda determinada a capacidade quelante de Fe^{2+} dos extratos AAE, MSE, MAE das algas em estudo estão representados na Figura 3.20 apenas os extratos que exibiram essa capaci-

dade.

Analisando a Figura 3.20 verifica-se que apenas alguns dos extratos estudados apresentam capacidade quelante de íons Fe^{2+} , destacando-se os obtidos a partir da alga nori, nomeadamente o de MAE com KOH ($67 \pm 2\%$) e a fração ácida de MSE ($48 \pm 9\%$), a fração ácida da amostra UPC da alga wakame ($82 \pm 6\%$) e a fração ácida da amostra KK da alga kombu ($47 \pm 11\%$).

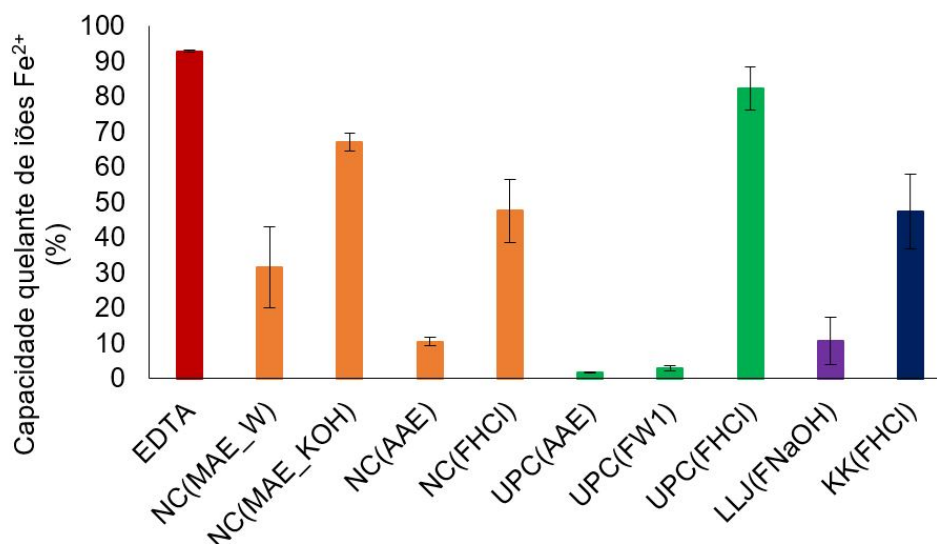


Figura 3.20 Capacidade quelante de íões Fe^{2+} dos extratos das algas estudadas, utilizando EDTA (2 mg/ mL) como controlo positivo, expressa em percentagem ($n = 3$).

Contrariamente às expectativas, as algas castanhas estudadas deveriam ter exibido maior capacidade quelante de íões Fe^{2+} e apenas a fração ácida da amostra UPC apresenta resultados que corroboram com a literatura (Wang *et al.*, 2009; Rajuarua *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos para o potencial antioxidante podem ser justificados pela presença de polissacáridos, compostos fenólicos e flavonoides presentes dos extratos estudados.

3.4.2 Atividade Antibacteriana

A resistência aos antibióticos é atualmente uma preocupação da sociedade moderna, revelando-se as macroalgas marinhas como uma excelente fonte para a descoberta de novos biofármacos alternativos aos antibióticos, uma vez que vários metabolitos destes organismos têm demonstrado propriedades antibacterianas promissoras. Nessa perspectiva, a atividade antibacteriana dos extratos AAE e MSE foi avaliada contra duas espécies bacterianas, *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), pelo método da difusão em disco e pelo método da microdilição em meio líquido, utilizando resazurina como agente marcador da viabilidade celular para a determinação dos valores de concentração mínima inibitória (MIC). Em ambos os métodos foi utilizado o antibiótico gentamicina como controlo positivo.

O primeiro método aplicado foi o da suscetibilidade à difusão em disco, tendo como princípio determinar a sensibilidade dos microrganismos aos extratos e o tamanho das zonas de inibição do crescimento microbiano. Para o efeito foram aplicados 50 µL dos extratos diretos nos discos (a massa de extrato aplicada variou de extrato para extrato) e foram comparados com a gentamicina (10 µg) e com os controlos negativos (água, KOH, HCl e NaOH estéreis).

Após incubação a 37°C durante 18 horas, não foram observadas zonas de inibição de crescimento junto aos discos impregnados com os extratos testados verificando-se apenas halos de inibição ao redor dos discos com gentamicina, indicando à partida ausência de atividade antibacteriana.

Tendo em conta os resultados obtidos através deste método e estando descrito na literatura esta atividade biológica para algumas das algas em estudo (Čmíková *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022), optou-se por reavaliar esta propriedade através do método colorimétrico de microdiluição em meio líquido baseado na redução de resazurina a resorufina, uma vez que é identificado como sendo mais sensível e fiável, comparativamente à técnica aplicada inicialmente.

Este método permitiu determinar o valor de MIC, que é considerado a menor concentração de um agente antimicrobiano à qual este inibe o crescimento de um microrganismo, existindo uma redução $\geq 80,0\%$ do crescimento bacteriano comparativamente ao controlo (Kowalska-Krochmal *et al.*, 2021).

Os valores de MIC obtidos através da viabilidade celular das espécies bacterianas estudadas na presença dos extratos obtidos por AAE e MSE das algas nori, wakame e kombu, numa gama de concentrações compreendida entre 0,078 a 20 mg/mL, estão indicados nas Tabelas 3.22 e 3.23. As representações gráficas da viabilidade celular (%) das bactérias em função da concentração de extratos, encontram-se no Anexo A.3 nas Figuras A.11 a A.15.

Tabela 3.22 Valores MIC dos extratos obtidos por AAE e MSE das algas nori, wakame (UPC e UPJ) e kombu (LLJ e KK) e aplicados no estudo da atividade antibacteriana contra *E. coli* determinados pelo método de microdiluição em meio líquido.

Extrato	Concentração Mínima Inibitória (mg/mL)
NC(AAE)	10,00
LLJ(AAE)	0,31
LLJ(FW1)	5,00
KK(FW1)	5,00

Tabela 3.23 Valores MIC dos extratos obtidos por AAE e MSE das algas nori, wakame (UPC e UPJ) e kombu (LLJ e KK) e aplicados no estudo da atividade antibacteriana contra *S. aureus*, determinados pelo método de microdiluição em meio líquido.

Extrato	Concentração Mínima Inibitória (mg/mL)
LLJ(AAE)	5,00
LLJ(FW1)	10,00
LLJ(FW2)	10,00
KK(AAE)	5,00
KK(FW1)	5,00

Neste estudo, as algas kombu exibiram efeitos inibitórios de crescimento bacteriano nas duas bactérias estudadas. Todos os extratos aquosos da amostra oriunda do Japão (LLJ) inibiram o crescimento da *S. aureus*, com uma gama de MIC entre 5 e 10 mg/mL. Os extratos FW1 e AAE desta amostra também exibiram efeitos inibidores contra *E. coli*, tendo este último demonstrado maior eficiência com um MIC de 0,3 mg/mL. O extrato aquoso FW1 da amostra KK demonstrou a capacidade de inibir o crescimento celular das duas bactérias.

Estes resultados estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Čmiková *et al.* (2022) onde estudaram a actividade antimicrobiana de seis amostras de algas comerciais (wakame, arame, dulce, kombu (2 amostras) e hijiki) contra diversas espécies bacterianas, três Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) e três Gram-negativas (*Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*), verificando que o extrato com maior eficácia contra *S. aureus* foi o obtido a partir de uma das amostras da alga kombu e tendo este mesmo extrato demonstrado efeitos inibitórios no crescimento de todos os microrganismos estudados. Estes autores observaram ainda que o extrato da alga wakame apresentou baixa atividade microbiana e à semelhança do presente trabalho, verificaram também, que amostras da alga kombu de origens diferentes (Japão e China) exibiram atividades antimicrobianas diferentes.

Relativamente à alga nori observou-se que apenas o extrato AAE demonstrou atividade antibacteriana contra *E. coli*, com menor eficiência (MIC 10 mg/mL), quando comparada com os extratos de kombu. Ao contrário do esperado, nenhum dos extratos das algas wakame demonstrou atividade antibacteriana. Embora a investigação sobre as propriedades antimicrobianas dos compostos de algas marinhas seja um tema de grande interesse e de constante desenvolvimento, até agora a atribuição de um determinado composto a essa atividade era um desafio, uma vez que são geralmente avaliados como extratos e não como um composto constituído por diferentes biomoléculas; na maioria dos casos, o efeito antimicrobiano é provavelmente uma consequência de um efeito sinérgico entre estes compostos. No entanto, biocompostos como proteínas, compostos fenólicos, pigmentos e polissacáridos isolados já foram associados a estas propriedades em diversos estudos (Silva *et al.*, 2020).

A única proteína de algas descrita na literatura como antibacteriana é a lectina, no entanto informação sobre péptidos bioactivos com propriedades antibacterianas é escassa (Silva *et al.*, 2020). Quanto aos polissacáridos, diversos estudos identificaram polissacáridos sulfatados isolados de *Laminaria japonica* (kombu) que confirmaram efeitos de inibição celular em *E. coli* and *S. aureus* (Liu *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2013). Estes estudos corroboram os resultados obtidos no presente trabalho.

Relativamente aos compostos fenólicos, diversos autores estudaram as propriedades antibacterianas de florotaninos, demonstrando eficácia na inibição do crescimento das espécies bacterianas patogénicas *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Bogolitsyn *et al.*, 2019; Eom *et al.*, 2014).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana dos pigmentos, existem poucos estudos que avaliam a atividade destes compostos isolados. Um estudo desenvolvido por Shannon e cola-

boradores avaliaram as propriedades antimicrobianas da fucoxantina contra diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando que este pigmento é mais eficaz contra bactérias Gram-positivas. A presença destes pigmentos nos extratos analisados neste trabalho pode também estar atribuída à atividade antibacteriana detetada.

Outro aspeto a ter em consideração na avaliação dos resultados deste estudo, uma vez que a viabilidade celular dos microrganismos foi determinada através de um método colorimétrico, é o facto de que estes podem ter sido afetados pela presença de pigmentos nos extratos. Através da Figura 3.21 pode-se verificar esta possível interferência, onde nas microplacas de 96 poços à medida que a concentração dos extratos aumenta, observar-se uma tonalidade avermelhada para os extratos NC(AAE) e UPC(FHCl) quando testado contra *E. coli*, e uma tonalidade esverdeada para o extrato UPC(FHCl) quando testada contra *S. aureus*.

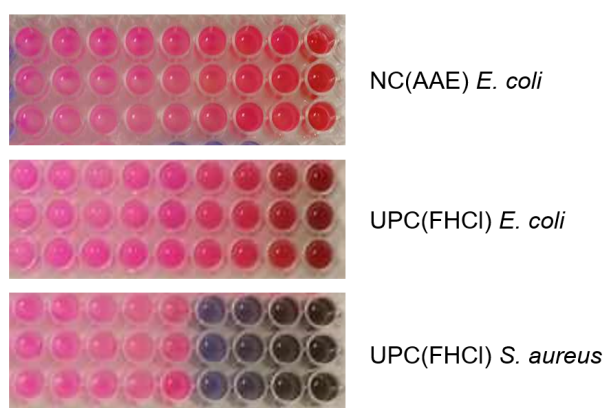


Figura 3.21 Microplacas de 96 poços onde foi realizado o método da microdiluição em meio líquido com resazurina, para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos NC(AAE) e UPC(FHCl) contra *Escherichia coli* e do extrato UPC(FHCL) contra *Staphylococcus aureus*.

3.4.3 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos AAE e MSE foi realizada através do método colorimétrico do MTT, contra linhas celulares animais, após incubação com os extratos numa gama de concentração de 0 a 2 mg/mL.

Este estudo foi efetuado através da determinação da viabilidade celular de duas linhas celulares animais normais, Vero ATCC® CCL-81 (células epiteliais renais de macaco verde africano) e NIH-3T3 ATCC® CRL-1658 (fibroblastos embrionários), e uma linha celular animal tumoral S180 ATCC® TIB-66 (células de sarcoma de murganho). Os extratos obtidos a partir das amostras das algas nori e wakame (UPC) foram ainda testados contra uma linha celular tumoral humana HeLa ATCC® CCL-2 (células de cancro do colo do útero).

Segundo a norma ISO 10993-5, quanto mais baixo for o valor de viabilidade celular (%), maior o potencial citotóxico do composto em análise, considerando-se que este possui um efeito citotóxico perante uma diminuição para menos de 70 %.

Os resultados obtidos estão representados da Figura 3.22 à Figura 3.26.

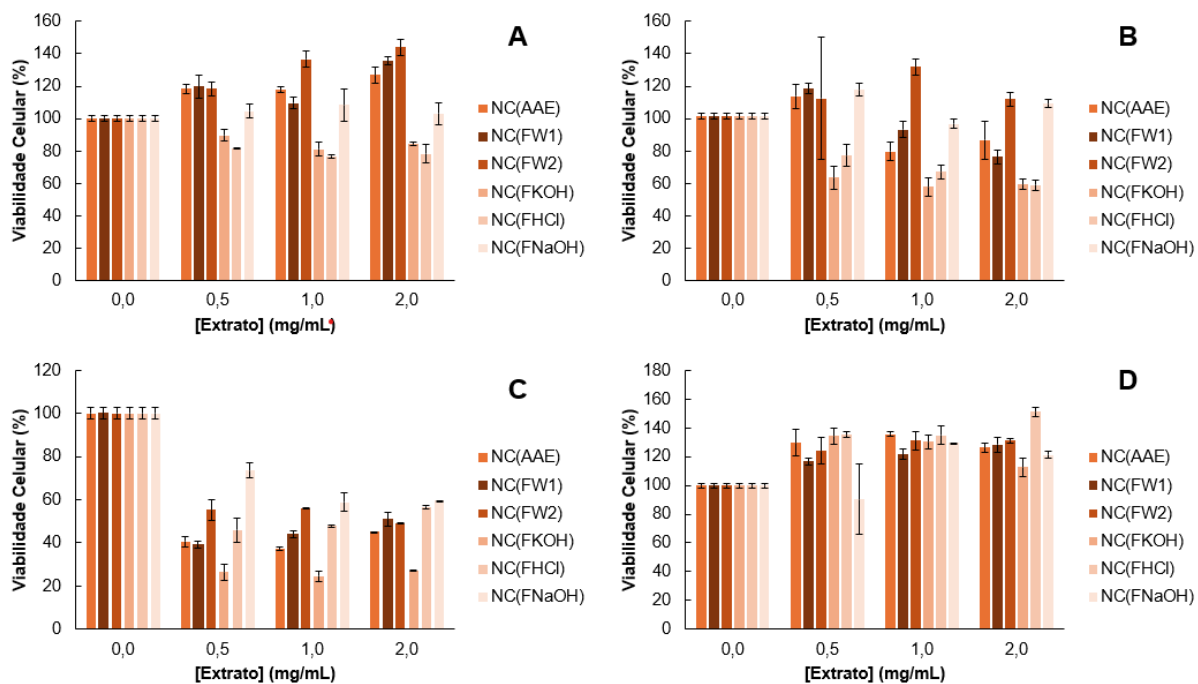


Figura 3.22 Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra NC, contra as linhas celulares: **A** - Vero, **B** - 3T3, **C** - S180, **D** - HeLa, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).

Através da análise da Figura 3.22 pode-se verificar que os extratos obtidos a partir da alga nori, não são citotóxicos para as células Vero, ao passo que os extratos FKOH e FHCl de MSE apresentam alguma toxicidade a partir da concentração 1,0 mg/mL contra célula 3T3 (Figura 3.22 B). Relativamente às células S180 (Figura 3.22 C) aparentemente todos os extratos exibiram toxicidade contra estas células tumorais, destacando-se a fração FKOH, que apresentou uma viabilidade celular de $27,2 \pm 0,3$ % numa concentração de 2 mg/mL. Contrariamente, a presença destes extratos parece promover o crescimento celular das HeLa (Figura 3.22 D).

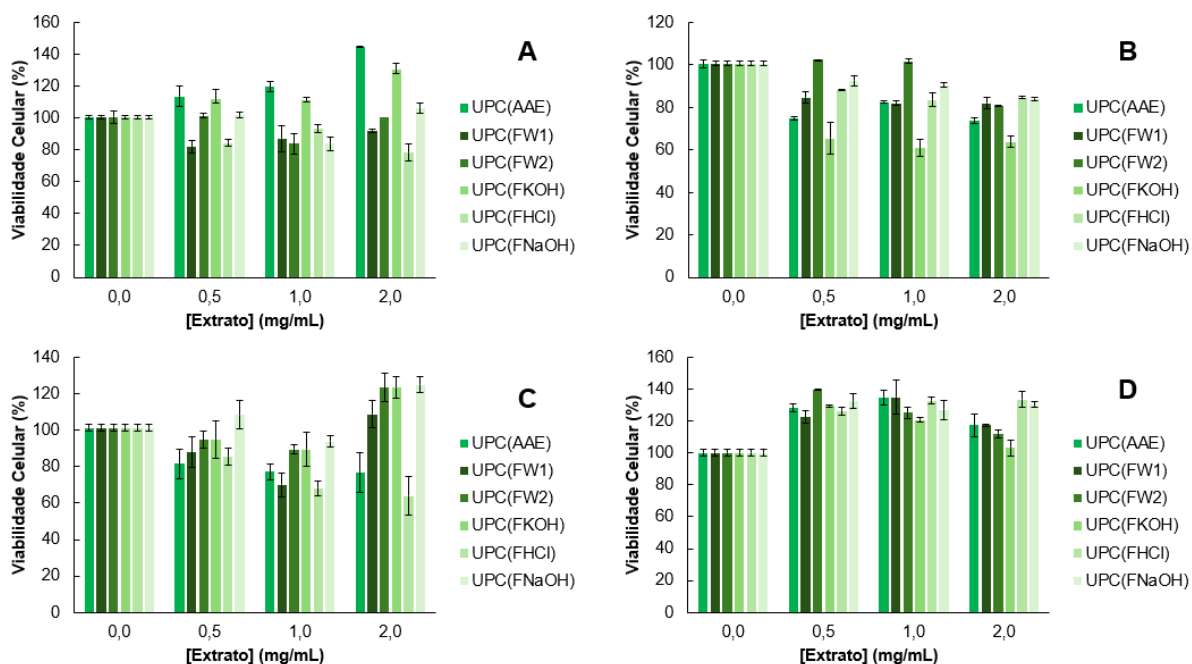


Figura 3.23 Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra UPC, contra as linhas celulares: **A** - Vero, **B** - 3T3, **C** - S180, **D** - HeLa, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).

Relativamente à amostra UPC da alga wakame, esta não apresentou toxicidade contra as células Vero (Figura 3.23 A). No entanto, a fração FKOH demonstrou toxicidade contra as células 3T3, a partir da concentração 0,5 mg/mL (Figura 3.23 B). Os resultados obtidos contra as células S180 foram pouco consistentes, verificando-se uma grande oscilação de valores, com exceção da fração FHCl que demonstrou ligeira citotoxicidade à concentração de 2,0 mg/mL (Figura 3.23 C). Através da análise da Figura 3.23 D, ao contrário do expectável a presença destes extratos estranhamente parece promover o crescimento das células HeLa. As algas wakame produzem fucoidanos, que pertencem à classe dos polissacáridos sulfatados e que são compostos com atividade antitumoral, contra linhas celulares humanas HeLa, PC-3 (células tumorais da próstata), A549 (células de carcinoma alveolar) e HepG2 (células de carcinoma hepático) (Synytsya *et al.*, 2010). Assim, tendo sido a amostra UPC a que exibiu um teor mais elevado destes polissacáridos, seria expectável que a viabilidade das linhas celulares S180 e HeLa fosse afetada na presença dos seus extratos. No entanto, num estudo com extratos ricos em polissacáridos extraídos de wakame, conduzido por Song *et al.* (2024), não se registou efeito inibitório em células HeLa, verificando-se que este efeito só é observado em extratos purificados de fucoidano e em elevadas concentrações.

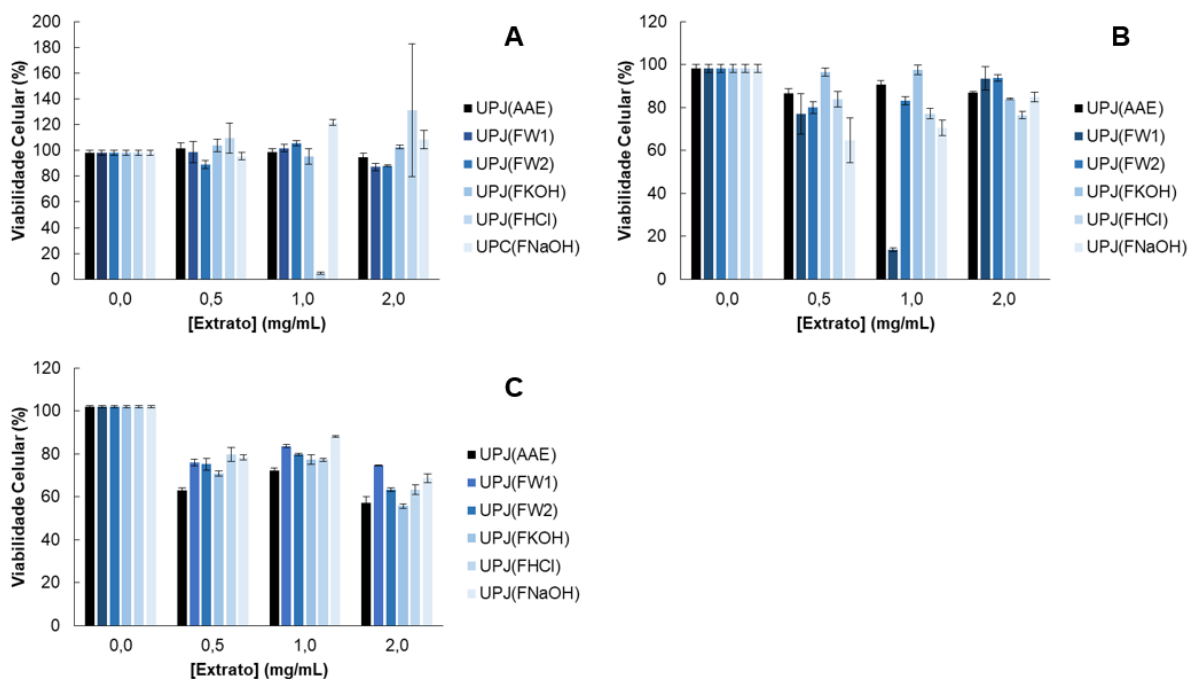


Figura 3.24 Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra UPJ, contra as linhas celulares: **A** - Vero, **B** - 3T3, **C** - S180, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).

Quanto à citotoxicidade dos extratos da amostra wakame oriunda do Japão (UPJ), não se verifica contra as células Vero (Figura 3.24 A), embora se observe um resultado anómalo para a FHCl a 1,0 mg/mL. O mesmo se observa contra as células 3T3 (Figura 3.24 B), verificando-se outro resultado irregular para a FW1 à mesma concentração. Relativamente à linha celular S180 (Figura 3.24 C), os extratos parecem exibir baixa toxicidade, com exceção da AAE e da FW2, à concentração de 2,0 mg/mL.

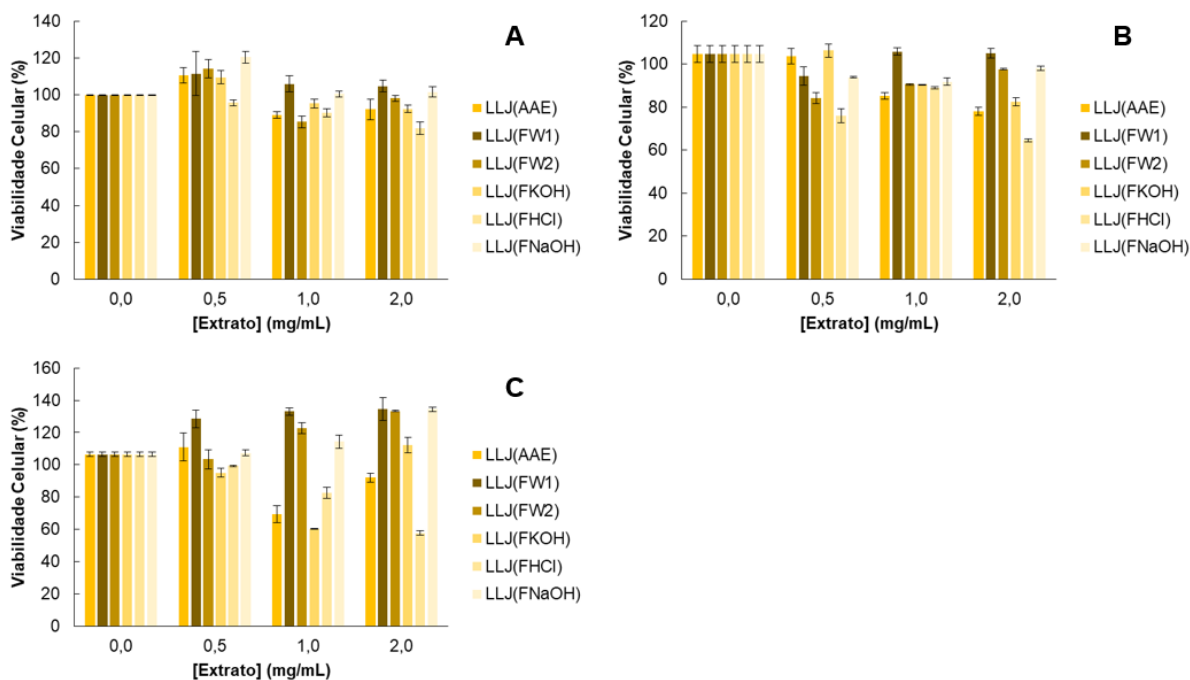


Figura 3.25 Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra LLJ, contra as linhas celulares: **A** - Vero, **B** - 3T3, **C** - S180, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).

A presença dos extratos da amostra LLJ de kombu, não afetou a viabilidade celular das vero (Figura 3.25 A), no entanto a fração ácida FHCl parece indiciar citotoxicidade nas células 3T3 (Figura 3.25 B), à concentração de 2,0 mg/mL. Quanto à toxicidade contra a linha celular S180 (Figura 3.25 C), os resultados obtidos são pouco consistentes, uma vez que apresentam uma grande oscilação de valores, verificando-se uma aparente tendência de aumento da viabilidade celular na presença dos extratos aquosos FW1 e FW2.

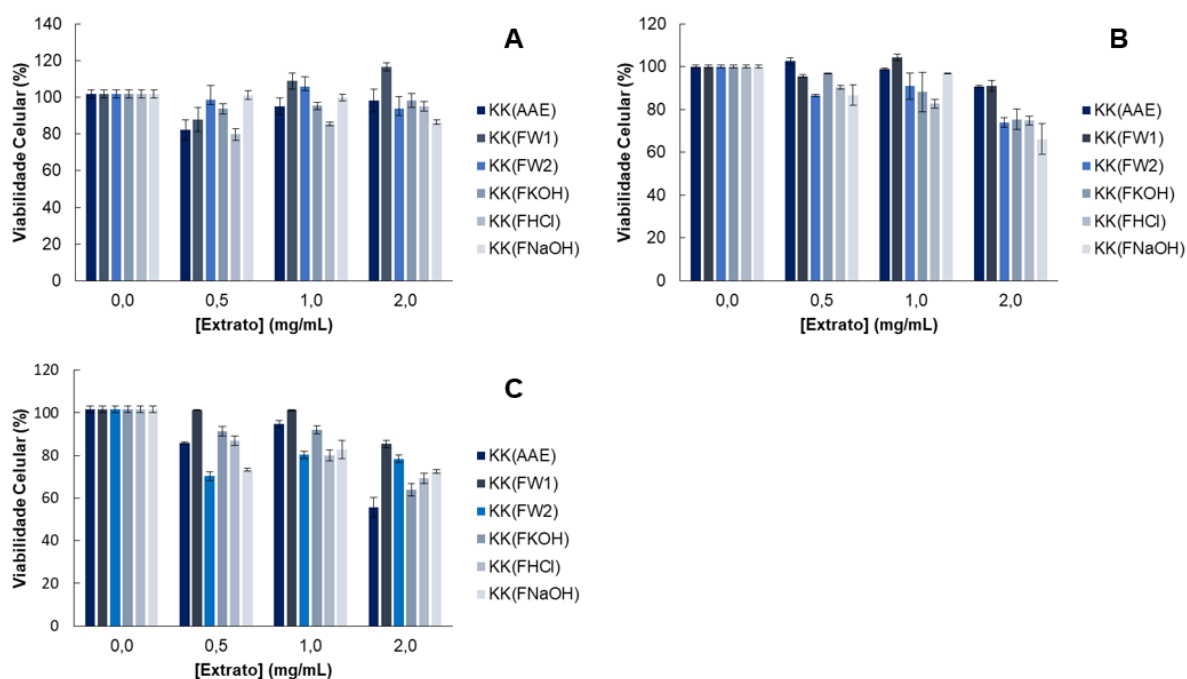


Figura 3.26 Ciotoxicidade celular dos extratos AAE e MSE obtidos a partir da amostra KK, contra as linhas celulares: **A** - Vero, **B** - 3T3, **C** - S180, através da viabilidade celular (%) avaliada pelo método do MTT ($n = 3$).

Por fim, a avaliação da citotoxicidade dos extratos da amostra kombu, proveniente da Coreia, estes não demonstraram efeitos citotóxicos contras as linhas celulares Vero e 3T3 (Figuras 3.26 A e B). No entanto, à concentração de 2,0 mg/mL todos os extratos apresentam toxicidade contra as células S180 (Figura 3.26 C), que pode ser justificada pela presença de polissacáridos, nomeadamente sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos.

Na literatura não foram encontrados resultados de citotoxicidade contra as linhas celulares Vero, 3T3 e S180, tornando-se mais difícil validar os resultados obtidos. No entanto, Vlasisavljević *et al.* (2021) estudou extratos de algas wakame e kombu e avaliou a viabilidade de células PC-3, verificando que estes não apresentavam efeito significativo nas células.

Outro aspeto a considerar nestes resultados, é a possível influência de elementos tóxicos (e.g. arsénio) nos extratos, uma vez que se verificou a presença deste elemento nas amostras iniciais, verificando-se a sua perda nos pellets a pós extração. Pelo contrário, a viabilidade celular também pode ser favorecida pela presença de macro e micronutrientes que pode estimular crescimento das células.

De referir, que não foi possível avaliar a citotoxicidade dos extratos de MAE da alga Nori, uma vez que não havia volume suficiente para a realização deste estudo.

Por fim, de forma a validar os resultados obtidos, seria necessário repetir estes ensaios, com uma gama de concentrações de extratos mais alargada, de forma a avaliar a influência destes nas vias metabólicas das células.

3.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

De modo a detetar características estruturais dos compostos presentes apenas nos extratos AAE e MSE, realizou-se espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) qualitativa. Através desta técnica, foi possível confirmar que os extratos obtidos por AAE e MSE são de um modo geral ricos em polissacáridos. Para estes biocompostos, como já referido anteriormente, estão identificadas cinco regiões características no infravermelho, que fornecem informações sobre uma gama de grupos funcionais vibracionalmente ativos que podem ser utilizados na determinação da sua composição. De modo a analisar os espectros de FTIR de uma forma mais expedita, foi construída a Tabela A.11 (Anexo A.4), onde estão identificadas as cinco regiões de *footprint* dos polissacáridos, a atribuição das bandas características e respetivos grupos funcionais (Hong *et al.*, 2021; Delattre *et al.*, 2016; Esther *et al.*, 2020). Posteriormente com esta informação, foi elaborado um código Python que permitiu facilitar a identificação das bandas de interesse nos espectros obtidos (Anexo A.5).

Na Figura 3.27, estão representados os espectros de FTIR dos extratos AAE de todas as algas estudadas, onde foi possível identificar as cinco regiões características dos polissacáridos: (i) $3800\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, (ii) $1500\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, (iii) $1200\text{--}950\text{ cm}^{-1}$, (iv) $950\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ e (v) $< 700\text{ cm}^{-1}$.

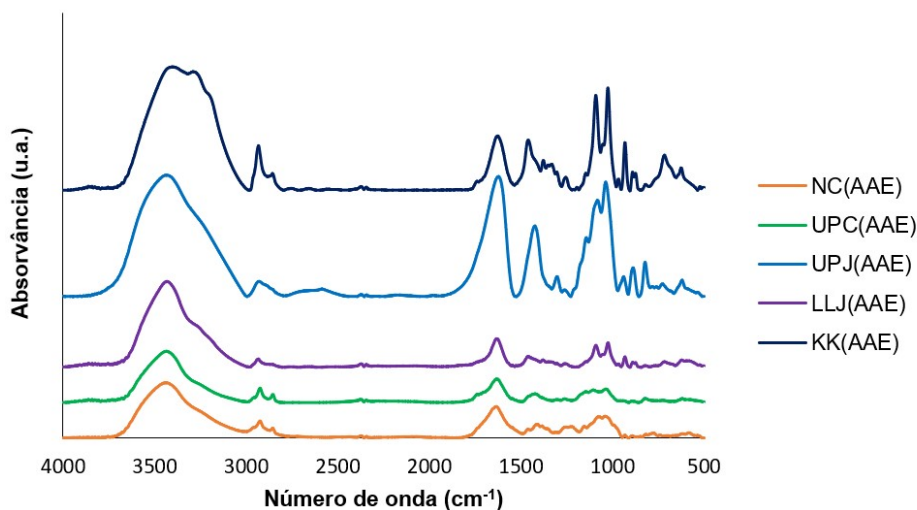


Figura 3.27 Espectros de FTIR dos extratos AAE das algas estudadas, em pastilha de KBr.

Assim, analisando a Figura anterior, é possível identificar a presença de uma banda com elevada intensidade entre $3419\text{ e }3423\text{ cm}^{-1}$ correspondente a vibração de extensão da ligação OH e as bandas no intervalo $2875\text{ e }2580\text{ cm}^{-1}$ das vibrações de extensão simétricas e assimétricas da ligação CH e CH_2 . Nos espectros dos extratos NC(AAE), UPC(AAE) e KK(AAE), foi identificada uma banda estreita de elevada a média intensidade, a 1710 cm^{-1} , atribuída à vibração de extensão da ligação dupla de carbono, evidenciando a possível presença de complexos proteína-polissacáridos. A banda de intensidade média a 1214 cm^{-1} presente no

espectro do extrato NC(AAE) que sugere a presença de ésteres sulfatados e a banda de intensidade fraca a 1428 cm^{-1} no extrato UPJ(AAE) atribuída à vibração de alongamento da ligação dupla SO do grupo sulfato, permitem identificar a presença de polissacáridos sulfatados nestes extratos.

As bandas que surgem entre 1087 e 1020 cm^{-1} , observadas em todos os espectros dos extratos AAE, podem ser atribuídas às ligações glicosídicas dos polissacáridos. Quanto ao carbono anomérico, foi possível atribuir a conformação α a uma banda média a 926 cm^{-1} , no espectro do extrato LLJ(AAE), e a conformação β a uma banda fraca e estreita a 891 cm^{-1} , no espectro do extrato UPJ(AAE). As bandas fracas a 886 e 869 cm^{-1} nos espectros dos extratos NC(AAE) e KK(AAE), respetivamente, podem ser atribuídas a ambas as conformações do carbono anomérico. No espectro do extrato KK(AAE), foi ainda identificada uma banda de intensidade fraca a 1246 cm^{-1} pode ser atribuída a derivados de furanose e pentose, e uma banda de intensidade média a 2850 cm^{-1} à vibração de extensão da ligação CH do metoxilo glicosídico.

A presença de duas bandas a 1654 cm^{-1} que representam a ligação C=O característica da amida I e a 1549 cm^{-1} banda característica da extensão C-N da amida II evidenciam a presença de proteínas em todos os extratos AAE.

A avaliação da presença de lípidos nos extratos de AAE por FTIR revela a existência de bandas a ca. de 2900 cm^{-1} , correspondentes a vibrações de extensão simétricas e assimétricas de CH e CH_2 e ainda uma banda de extensão a 1745 cm^{-1} , correspondente à ligação C=O presente em ésteres de triglicéridos.

A Figura 3.28 apresenta os espectros de FTIR das frações FW1 obtidas por MSE a partir das algas estudadas, onde se podem verificar as cinco regiões características dos polissacáridos e um perfil muito semelhante entre os extratos das algas kombu e alga wakame oriunda do Japão (UPJ).

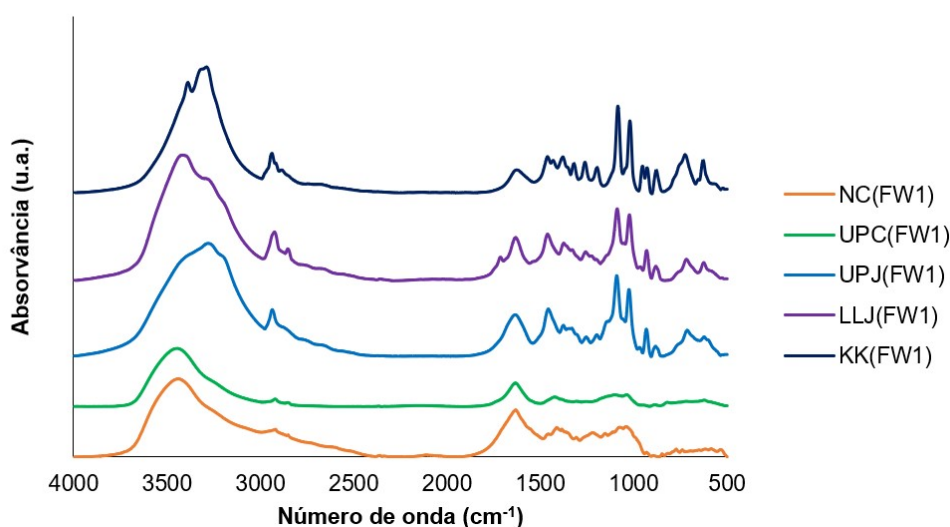


Figura 3.28 Espectros de FTIR das frações FW1 de MSE das algas estudadas, em pastinha de KBr.

Observa-se nos diferentes espectros uma banda de elevada intensidade entre 3448 e 3392 cm^{-1}

correspondente à ligação OH e entre 2941 e 2916 cm^{-1} uma banda atribuída às vibrações de extensão de CH. Os espectros dos extratos NC(FW1), LLJ(FW1) e KK(FW1) apresentam bandas entre 1263 e 1213 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao grupo éster sulfatado, indicando a presença de polissacáridos sulfatados. As bandas atribuídas às ligações glicosídicas de polissacáridos também foram identificadas em todos os espectros das frações FW1. No espectro do extrato LLJ(FW1), identificou-se uma banda a 2858 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo metoxilo. Todos os espectros dos extratos FW1 apresentam uma banda na região dos carbonos anoméricos, entre 989 e 900 cm^{-1} , que correspondem às conformações α e β

Foram ainda identificadas bandas entre 1709 e 1583 cm^{-1} correspondentes à presença da amida I e amida II, respetivamente, indicando a presença de proteínas. A presença de lípidos foi igualmente detetada pela identificação de bandas entre 3050 e 2900 cm^{-1} em todos os espetros.

Na Figura 3.29, estão representados os espectros de FTIR das frações FW2 obtidas por MSE a partir das algas em estudos. Mais uma vez, verificam-se perfis semelhantes entre os extratos das algas kombu e alga wakame oriunda do Japão (UPJ).

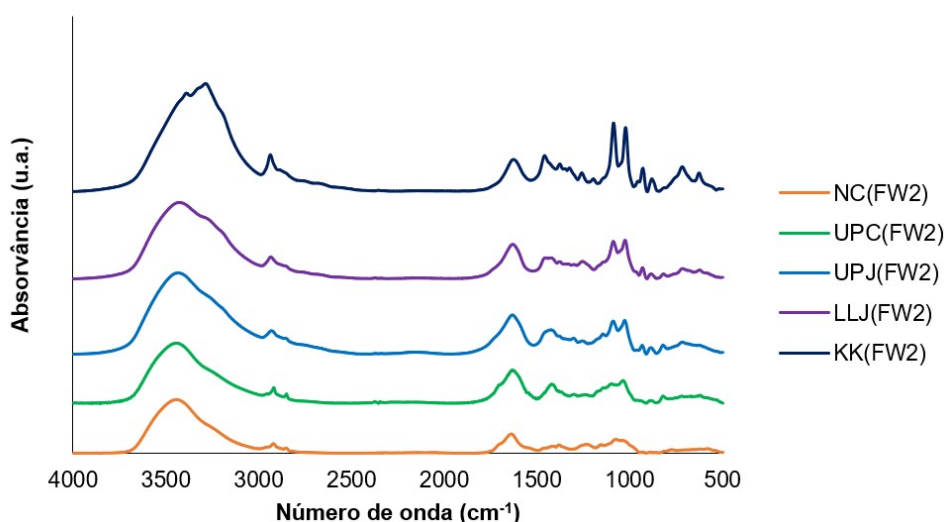


Figura 3.29 Espectros de FTIR das frações FW2 de MSE das algas estudadas, em pastinha de KBr.

Através da figura anterior é possível observa-se nos diferentes espetros bandas características dos polissacáridos, nomeadamente entre 3440 e 3284 cm^{-1} uma banda com elevada intensidade correspondente à ligação OH e uma banda entre 2684 e 2544 cm^{-1} correspondente à vibração de extensão das ligações CH e CH_2 .

A presença de lípidos pode ser atribuída às bandas de intensidade moderada entre 2954 e 2850 cm^{-1} , identificadas em todos os espectros dos extratos FW2. Nos espectros dos extratos NC(FW2), UPC(FW2) e UPJ(FW2), as bandas localizadas a 2852, 2850 e 2856 cm^{-1} , respetivamente, podem ser atribuídas à presença do grupo metoxilo glicosídico. As bandas identificadas entre 1795 e 1627 cm^{-1} em todos os espetros evidenciam a presença de proteínas e eventualmente a de complexos proteína-polissacáridos. A presença de polissacáridos

sulfatados em todos os espectros, com exceção do extrato KK(FW2), é justificada através das bandas entre 1255 e 1232 cm^{-1} atribuídas a ésteres sulfatados. As ligações glicosídicas podem ser atribuídas às bandas a 1155 e 1145 cm^{-1} nos espectros dos extratos NC(FW2) e UPJ(FW2), respetivamente.

Na região do IV dos carbonos anoméricos, identifica-se uma banda entre 887 e 885 cm^{-1} nos espectros dos extratos da alga wakame UPJ e das algas kombu, relacionada com conformações α e β . Adicionalmente, verifica-se a presença de banda abaixo de 700 cm^{-1} nestes extratos, indicativa da presença da conformação β de polissacáridos.

Pela análise da Figura 3.30, pode-se observar que os espectros de FTIR das frações FKOH da MSE obtidas a partir de todas as algas estudadas são muito semelhantes entre si, e permitiram mais uma vez, identificar as cinco regiões características dos polissacáridos, designadamente as bandas intensas situadas entre 3444 e 3404 cm^{-1} atribuídas à vibração de extensão da ligação OH e as bandas de intensidade moderada e baixa entre 2960 e 2854 cm^{-1} , que identificam a vibração de extensão das ligações CH e CH_2 .

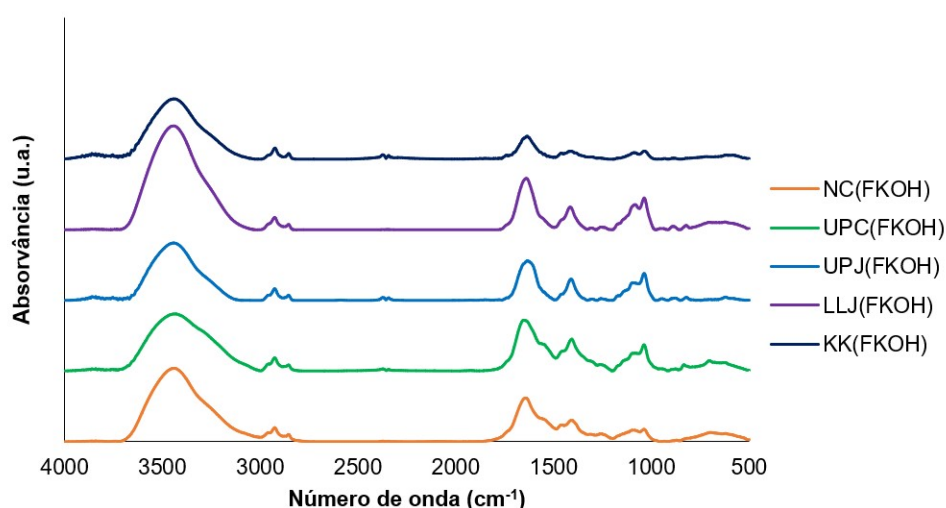


Figura 3.30 Espectros de FTIR das frações FKOH de MSE das algas estudadas, em pastinha de KBr.

A presença das bandas a 1239 cm^{-1} e a 1245 cm^{-1} , nos espectros dos extratos NC(FKOH) e UPC(FKOH), respetivamente, poderá corresponder à extensão simétrica e assimétrica de O-SO₃ e a banda de extensão de C-O-S observável a ca. 1050 cm^{-1} . Estas bandas permitem inferir a existência de polissacáridos sulfatados, já que confirmam a ligação de grupos sulfonilo aos polissacáridos. É de realçar que o extrato UPC(FKOH) exibiu um dos teores mais elevados destes biocompostos, quantificados através do método do azul de toluidina.

As bandas presentes no intervalo entre 1100 e 1033 cm^{-1} , em todos os espectros da Figura 3.30, com exceção do extrato LLJ(FKOH), podem ser atribuídas à vibração de extensão CH das ligações glicosídicas de polissacáridos.

No espectro do extrato UPJ(FKOH) foi possível identificar uma banda de fraca intensidade a 890 cm^{-1} atribuída à conformação β do carbono anomérico.

A presença de proteínas em todos os espectros foi revelada através da identificação da banda da vibração de extensão da ligação C=O da amida I, entre 1709 a 1583 cm^{-1} e a banda resultante da deformação da ligação N-H conjuntamente com a vibração de extensão da ligação C-N da amida II, entre 1585 – 1481 cm^{-1} .

Os espectros de FTIR das frações FHCl obtidas através do método de extração MSE estão representados na Figura 3.31. Os espectros para as frações de extração ácidas das algas kombu, da amostra da alga wakame originária da China (UPC) e da alga nori, apresentam um perfil muito semelhante.

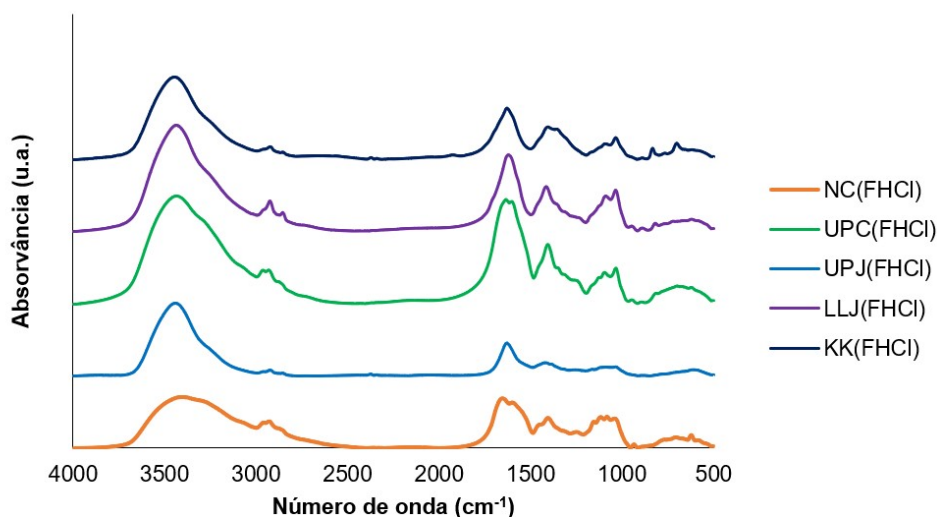


Figura 3.31 Espectros de FTIR das frações FHCl de MSE das algas estudadas, em pastilha de KBr.

Em todos os espectros representados na Figura 3.31, foi possível identificar as cinco regiões características dos polissacáridos. A banda de elevada intensidade entre 3444 e 3404 cm^{-1} indicadora da vibração de extensão da ligação OH e as bandas entre 2960 e 2854 cm^{-1} referentes à vibração de extensão das ligações CH e CH₂ foram identificadas.

As ligações glicosídicas podem ser identificadas através das bandas a 1153 cm^{-1} e a 1163 cm^{-1} nos espectros dos espectros NC(FHCl) e UPJ(FHCl), respetivamente. Na região do carbono anomérico, identificou-se uma banda relacionada com a conformação β nos espectros das algas kombu a 889 cm^{-1} e da alga nori a 891 cm^{-1} . Nos espectros das algas wakame, verifica-se uma banda de intensidade fraca a 894 cm^{-1} , relacionada com ambas as conformações α e β . A presença de proteínas verificou-se em todas as frações de extração FHCl, através das bandas entre 1652 e 1622 cm^{-1} . Estas bandas podem ser também indicadoras da presença de complexos proteína-polissacáridos.

Na Figura 3.32, estão representados os espectros de FTIR das frações FNaOH da extração por MSE obtidas a partir de todas as algas estudadas, verificando-se um perfil muito semelhante entre os extratos, com exceção do extrato UPC(FNaOH). Assim, foi possível identificar em todos os espectros da figura anterior as bandas responsáveis pela vibração de extensão da ligação OH, entre 3446 e 3437 cm^{-1} e as bandas associadas à vibração de extensão das ligações CH e CH₂, entre 2957 e 2922 cm^{-1} .

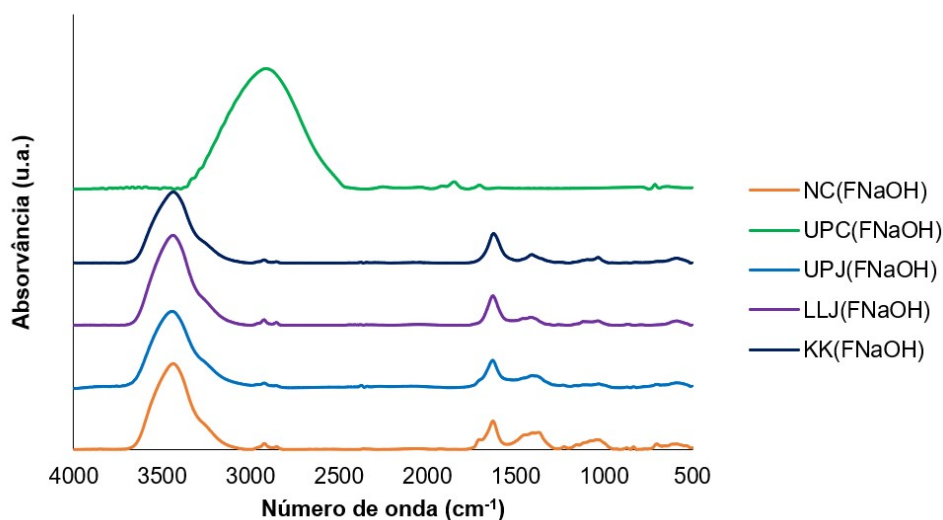


Figura 3.32 Espectros de FTIR das frações FNaOH de MSE das algas estudadas, em pastilha de KBr.

Nos espectros das frações FNaOH das algas wakame e nori, foi possível identificar bandas entre 1258 e 1226 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à presença de ésteres sulfatados, característicos de polissacáridos sulfatados. As ligações glicosídicas foram identificadas através das bandas de 1155 e 1166 cm^{-1} , nos espectros dos extratos NC(FNaOH) e UPJ(FNaOH), respectivamente. Na região do carbono anomérico, foi identificada nos espectros da alga nori uma banda associada às conformações α e β , a 873 cm^{-1} . As bandas a 1789 e 1635 cm^{-1} permitiram identificar a presença de proteínas em todos os extratos. A presença destas bandas também pode indicar a presença de complexos proteína-polissacáridos. A presença de lípidos é notória no extrato UPC(FHCl) através da banda intensa observada a $3050 - 2800\text{ cm}^{-1}$.

Os espectros de FTIR realizados permitiram identificar vários biocompostos presentes nos extratos de AAE e MSE, corroborando a detecção e quantificação efetuada anteriormente através de métodos colorimétricos.

No Anexo A.6 encontram-se os espectros de FTIR individuais para cada extrato nas Figuras A.16 a A.45.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas Futuras

Este trabalho final de mestrado teve como objetivo estudar macroalgas comercializadas em Portugal em locais de venda ao público de bens alimentares, tendo em consideração a origem da sua produção. Para o efeito foram selecionadas três algas das mais consumidas e utilizadas em várias indústrias: nori (*Porphyra* spp.) proveniente da China (NC), wakame (*Undaria pinnatifida*) com origem na China (UPC) e no Japão (UPJ), e kombu (*Laminaria* spp.) originárias do Japão (LLJ) e da Coreia do Sul (KK). Assim, foram estudadas no total cinco amostras de algas, relativamente à sua composição química e bioquímica, e às suas propriedades bioativas, de forma a compreender o seu valor como “superalimento”.

As algas foram analisadas por EDRXF verificando-se a presença de minerais essenciais ao ser humano como Ca, Fe, P, K, Zn, Cu e I. Os resultados obtidos corroboram com a identificação das macroalgas como uma importante fonte de Ca e K. As algas wakame, por exemplo, são sugeridas como suplemento alimentar para ajudar a cumprir a dose diária recomendada de certos minerais, macronutrientes e oligoelementos (Shalaby *et al.*, 2011). No entanto, nesta análise foi também detetado As em todas amostras, em níveis relevantes que podem representar um risco para os consumidores. No entanto, teria sido importante quantificar o As orgânico e o As inorgânico, do As total determinado, uma vez que o As orgânico é menos nocivo e as macroalgas contêm habitualmente mais As sob esta forma (Circuncisão *et al.*, 2018; Ventura *et al.*, 2024).

As algas marinhas de diferentes origens geográficas apresentaram uma distribuição heterogénea de elementos. Relativamente à origem, as concentrações mais elevadas de elementos tóxicos foram encontrados em algas asiáticas (Čmiková *et al.*, 2022; Paz *et al.*, 2019), consequência da poluição ambiental, especialmente para aquelas cultivadas e colhidas em mar aberto. A identificação de elementos tóxicos em macroalgas cultivadas em sistemas fechados evidencia a falta de controlo e regulamentação da presença desses contaminantes.

A lista de espécies aprovadas pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, estimulando o interesse por produtos que contêm algas, desencadeando um esforço na União Europeia para aumentar a produção rentável destes alimentos, promovendo em simultâneo, a sua integração nos mercados para consumo

humano e animal e melhorando a sua segurança alimentar. No entanto, os produtores europeus enfrentam uma elevada concorrência por parte dos produtores asiáticos, essencialmente devido aos custos de produção mais elevados, com reflexo no preço do produto final. Contudo, os produtores asiáticos são frequentemente criticados pelo impacto ambiental causado pelos seus sistemas de aquicultura em águas eutróficas na produção de algas (Mendes *et al.*, 2022).

A presença de elementos tóxicos como o As pode ser preocupante devido à sua elevada toxicidade, mesmo em doses mínimas, mas por outro lado elementos essenciais como Cu, Fe e Zn podem também afetar diferentes vias bioquímicas nas algas, interferindo na produção de compostos bioativos (Čmiková *et al.*, 2022). De forma a avaliar a composição em biocompostos das amostras em estudo, foram utilizados três métodos de extração convencional: em multi-etapas (MSE), assistida por autoclave (AAE) e maceração (apenas realizado com objetivo de dosear pigmentos fotossintéticos) e um método de extração não-convencional assistida por micro-ondas (MAE). A análise quantitativa e qualitativa de compostos bioativos a partir de algas baseia-se principalmente na seleção de métodos de extração adequados, pois esta desempenha um papel crucial nos resultados finais e respetivas conclusões. Após a aplicação dos vários métodos de extração analisou-se o teor em biomoléculas dos vários extratos obtidos, verificando-se teores muito diversificados em lípidos, carboidratos, compostos fenólicos, proteína e pigmentos fotossintéticos.

Comparando os resultados obtidos por AAE com os obtidos por MSE, verificou-se que o segundo método apresentou melhores resultados para a extração de biomoléculas, provavelmente pelo facto da MSE utilizar quatro solventes diferentes, que poderá solubilizar mais eficazmente os compostos bioativos presentes na amostra devido às várias etapas sucessivas, enquanto que a AAE limita a solubilização das biomoléculas no único solvente utilizado. Por outro lado, a MSE pelo facto de ser um método fracionado, tem a vantagem de agrupar e isolar ao longo do processo de extração, compostos com base na sua solubilização. As frações alcalinas FKOH de MSE demonstraram, de um modo geral, os maiores conteúdos nos biocompostos avaliados, exceto em lípidos e flavonoides. O MAE demonstrou ser um método promissor para a extração de biocompostos a partir de macroalgas, nomeadamente na extração de lípidos, açúcares redutores, polissacáridos (totais, sulfatados e β -1,3-D-glucanos) e flavonoides, embora só tenha sido aplicado à amostra da alga nori. Os extratos obtidos por maceração utilizando acetona como solvente de extração, ao contrário do expetável, não exibiram os teores mais elevados em pigmentos fotossintéticos.

Devido às concentrações de biocompostos nas macroalgas marinhas variam amplamente devido a diversas variáveis, como condições de crescimento, época de colheita, *habitat* e fatores ambientais, incluindo luz, temperatura e salinidade da água (Siddik *et al.*, 2023), a comparação direta dos resultados deste estudo com os valores da literatura pode não ser apropriada. Assim, a obtenção de informação mais detalhada sobre o local de cultivo, época do ano, método de colheita e eventuais processos que as algas sofreram após colheita, é bastante relevante para este tipo de análise (Fleurence, 2004).

Outro aspeto a considerar e que pode ter interferido na quantificação dos biocompostos neste estudo, através de métodos espectrofotométricos, foi a presença de pigmentos nos extratos

avaliados. Seria de grande interesse, para trabalho futuro, proceder a uma eliminação seletiva prévia destes pigmentos. A bioatividade dos compostos presentes nos extratos foi avaliada *in vitro* através da determinação do seu potencial antioxidante e antibacteriano, bem como da sua citotoxicidade contra linhas celulares animais. Os resultados sugerem que as algas estudadas contêm biocompostos com atividade antioxidante, com capacidade de inibição do crescimento de bactérias, e com baixos efeitos citotóxicos em células animais. Os extratos obtidos com KOH como solvente revelaram maior atividade antioxidante determinada pelo método do radical ABTS, com $12,48 \pm 0,70$ mg TE /g de amostra para a FKOH da alga nori e $12,58 \pm 0,39$ mg TE /g de amostra para a FKOH da alga wakame proveniente do Japão (UPJ). No que diz respeito à capacidade quelante de íons Fe^{2+} , destaca-se a fração ácida da alga wakame proveniente da China, UPC(FHCl), com $82,56 \pm 8.65$ %.

As algas kombu exibiram atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, verificando-se que todos os extratos aquosos da amostra oriunda do Japão (LLJ) inibiram o crescimento da *S. aureus*, com uma gama de MIC entre 5 e 10 mg/mL. Por outro lado, o extrato LLJ(AAE) demonstrou maior eficiência contra *E. coli*, apresentando um valor de MIC de 0,3 mg/mL. Assim, uma vez mais verificaram-se resultados diferentes para a mesma alga, mas com origens diferentes (Japão e Coreia do Sul). A alga nori avaliada apenas exibiu potencial antibacteriano através do extrato AAE contra *E. coli*, embora com menor eficiência relativamente aos extratos da alga kombu. Relativamente aos extratos das algas wakame, nenhum apresentou esta capacidade, ao contrário do esperado.

Quanto à avaliação do efeito citotóxico dos extratos contra linhas animais normais e tumorais, de um modo geral não se verificou contra as linhas celulares Vero e 3T3, no entanto, os extratos obtidos a partir das amostras NC e KK, parecem interferir na viabilidade celular da linha tumoral S180. Quanto à atividade citotóxica contra a linha celular HeLa, apenas foram testados os extratos provenientes das algas nori e wakame originária da China (UPC), tendo os resultados sido inconclusivos. Os resultados referentes à bioatividade dos extratos, embora promissores, sugerindo a utilização destas algas como alimentos funcionais e em aplicações terapêuticas e nutracêuticas, necessitam de ser confirmados e expandidos, testando a atividade antimicrobiana contra mais espécies patogénicas de microrganismos (bactérias e fungos), determinando a capacidade antioxidante através de outros métodos descritos para o efeito, bem como avaliando a atividade citotóxica contra mais linhas celulares humanas e/ou o efeito imunomodulador contra células do sistema imunológico, como macrófagos. Outro estudo complementar de interesse, seria avaliar a ação dos extratos sobre as proteínas celulares, ou seja, analisar o proteoma das suspensões celulares após contacto com os extratos das algas, por exemplo, através de electroforese SDS-PAGE e Western blotting.

A seleção de métodos de extração que permitiram solubilizar o máximo de compostos e a utilização dos extratos obtidos diretamente sem purificação, revelou-se uma escolha adequada para a realização deste trabalho, tendo em conta que ao utilizar métodos seletivos ou métodos de purificação teria sido anulado o efeito sinérgico dos diferentes biocompostos presentes, na sua atividade biológica. Contudo, a importância de estudar os compostos de forma isolada tem o seu interesse, dado que determinados compostos podem potenciar a atuação de outros, ou

vice-versa, permitindo explicar, por exemplo, que o baixo teor de carotenoides da amostra UPC poderá resultar na inexistência de atividade antibacteriana.

A identificação e caracterização parcial dos compostos presentes nos extratos, nomeadamente os obtidos por AAE e MSE, foram efetuadas por FTIR, onde foram identificadas, em todos os extratos, as regiões de *footprint* dos polissacáridos, bandas características de proteínas (amidas I e II) e, ainda, em grande parte dos extratos bandas que podem indicar a presença de polissacáridos sulfatados e de polissacáridos com conformação β . No entanto, verificou-se que, independentemente dos processos de extração, do solvente utilizado, da temperatura e do tempo de extração, os polissacáridos não apresentaram diferenças estruturais significativas. Estes espectros de FTIR corroboraram os resultados obtidos através dos métodos colorimétricos utilizados para a quantificação dos biocompostos.

Assim, a caracterização dos extratos obtidos, através de outras técnicas analíticas como HPLC-MS, e a identificação e caracterização através de técnicas como ^1H e ^{13}C NMR e GC-MS, seria de todo o interesse, de forma validar os resultados obtidos neste trabalho, bem como proceder à identificação de outras biomoléculas.

Os estudos desenvolvidos revelaram a presença de elementos tóxicos como As, evidenciando ausência de controlo na comercialização deste tipo de alimentos no mercado nacional. No entanto, as amostras testadas demonstraram ser uma excelente fonte de biocompostos, possuindo atividade antioxidante, propriedades antibacterianas e baixa citotoxicidade, resultados que impulsionam a sua aplicação nas indústrias alimentar e biofarmacêutica. Estes resultados vão ao encontro da previsão de que os avanços na biotecnologia das algas terão um grande impacto no atual panorama industrial e vão estimular o surgimento de uma bioeconomia sustentável e eficiente baseada nestes organismos, que será fundamental para ultrapassar os desafios e constrangimentos que a agricultura e a indústria convencional enfrentarão nos próximos anos.

Capítulo 5

Referências

- Abdella, A. A., Ulber, R., & Zayed, A. (2023). A spectroscopic response factor-based toluidine blue assay towards a universal assay protocol for sulfated polysaccharides: Application to fucoidan content in crude extract. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 235, 115616. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115616>
- Abu-Ghannam, N., & Rajauria, G. (2013). *Antimicrobial activity of compounds isolated from algae*. Woodhead Publishing.
- Adarshan, S., Sree, V. S. S., Muthuramalingam, P., Nambiar, K. S., Sevanan, M., Satish, L., Venkidasamy, B., Jeelani, P. G., & Shin, H. (2024). A comprehensive exploration of nutraceutical, pharmaceutical, and omics dimensions. *Plantas*, 13(1), 113. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants13010113>
- Adjimani, J. P., & Asare, P. (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology reports*, 2, 721–728. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.005>
- Ahmed, H., Al-Rasheed, M., & Almoaen, R. A. (2024). ICP-OES method for the determination of trace metals in nori seaweed: Application for the analysis of different samples from different countries. *Food Analytical Methods*, 17, 523–533. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02587-9>
- Alabiyik, I., Durmaz, Y., Öner, B., et al. (2018). Using spray-dried microalgae as a natural coloring agent in chewing gum: effects on color, sensory, and textural properties. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 1031–1039. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-017-1324-y>
- Alassali, A., & Cybulska, I. (2016). Methods for upstream extraction and chemical characterization of secondary metabolites from algae biomass. *Advances in Tech. Biology and Medicine*, 4(1), 1–16.
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Alga+. (s.d.). Website [n.d.]. <https://www.algaplus.pt/>
- Allmicroalgae. (s.d.). Website [n.d.]. <https://www.allmicroalgae.com/pt-pt/>

- Almatroodi, S. A., Almatroudi, A., Khan, A. A., Alhumaydhi, F. A., Alsahli, M. A., & Rahmani, A. H. (2020). Potential therapeutic targets of epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, and its role in the therapy of various types of cancer. *Molecules*, 25(14), 3146. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules25143146>
- Amado-Filho, G. M., Salgado, L. T., Rebelo, M. F., Rezende, C. E., Karez, C. S., & Pfeiffer, W. C. (2008). Heavy metals in benthic organisms from Todos os Santos Bay, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68(1), 95–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000100013>
- Amawi, H., Ashby, J., C. R., & Tiwari, A. K. (2017). Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting? *Chinese Journal of Cancer*, 36(1), 50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40880-017-0217-4>
- Amorim, K., Lage-Yusty, M. A., & López-Hernández, J. (2012). Changes in bioactive compounds content and antioxidant activity of seaweed after cooking processing. *CyTA - Journal of Food*, 10(4), 321–324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/19476337.2012.658871>
- Anestopoulos, I., Kioussi, D.-E., Klavaris, A., Maijo, M., Serpico, A., Suarez, A., Sanchez, G., Salek, K., Chasapi, S. A., Zompra, A. A., Galanis, A., Spyroulias, G. A., Gombau, L., Euston, S. R., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2020). Marine-derived surface active agents: Health-promoting properties and blue biotechnology-based applications. *Bio-molecules*, 10(6). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom10060885>
- Anschau, A., Caruso, C. S., Kuhn, R. C., & Franco, T. T. (2017). Validation of the sulfophosphovanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(1), 19–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170341s20140222>
- Arias, A., Feijoo, G., & Moreira, M. T. (2023). Macroalgae biorefineries as a sustainable resource in the extraction of value-added compounds. *Algal Research*, 69, 102954. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102954>
- Associação Portuguesa de Produtores de Algas. (s.d.). Website [n.d.]. <https://proalga.pt/>
- Australia New Zealand Food Standards Authority. (2013). Australia New Zealand Food Standards Code, Standard 1.4.1—Contaminants and natural toxicants [accessed on 12 September 2021]. <https://www.foodstandards.gov.au/code/Pages/default.aspx>
- Azeem, M., Iqbal, N., Mir, R. A., et al. (2019). Harnessing natural colorants from algal species for fabric dyeing: a sustainable eco-friendly approach for textile processing. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3941–3948. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-019-01848-z>
- Babich, O., Sukhikh, S., Larina, V., Kalashnikova, O., Kashirskikh, E., Prosekov, A., Noskova, S., Ivanova, S., Fendri, I., & Smaoui, S. (2022). Algae: Study of edible and biologically active fractions, their properties and applications. *Plants*, 11, 780. <https://doi.org/10.3390/plants11060780>
- Bae, J., Kim, N., Shin, Y., et al. (2020). Activity of catechins and their applications. *Biomed Dermatol*, 4(8). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s41702-020-0057-8>
- Balasubramanian, S., Allen, J. D., Kanitkar, A., & Boldor, D. (2011). Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system—design, optimization, and qua-

- lity characterization. *Bioresource Technology*, 102(3), 3396–3403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.119>
- Bao, J., Cai, Y., Sun, M., Wang, G., & Corke, H. (2005). Anthocyanins, Flavonols, and Free Radical Scavenging Activity of Chinese Bayberry (*Myrica rubra*) Extracts and Their Color Properties and Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2327–2332. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf048312z>
- Barba, F. J., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2015). New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Engineering Reviews*, 7(1), 45–62. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9095-6>
- Beaulieu, L., Bondu, S., Doiron, K., Rioux, L.-E., & Turgeon, S. L. (2015). Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicuris* and identification of peptides implicated in bioactivity. *Journal of Functional Foods*, 17, 685–697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.026>
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*, 58(2), 419–435. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-3468\(89\)80710-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-3468(89)80710-9)
- Bernardi, G., & Springer, G. F. (1962). Properties of highly purified fucan. *Journal of Biological Chemistry*, 237(1), 75–80. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81363-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81363-1)
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Bhowmick, S., Mazumdar, A., Moulick, A., & Adam, V. (2020). Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. *Biotechnology Advances*, 43, 107571. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107571>
- Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* [Published by ISO]. (2009). International Organization for Standardization.
- Biris-Dorhoi, E.-S., Michiu, D., Pop, C. R., Rotar, A. M., Tofana, M., Pop, O. L., Socaci, S. A., & Farcas, A. C. (2020). Macroalgae—A sustainable source of chemical compounds with biological activities. *Nutrients*, 12(10), 3085. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nu12103085>
- Bito, T., Teng, F., & Watanabe, F. (2017). Bioactive compounds of edible purple laver *Porphyra* sp. (Nori). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(49), 10685–10692. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04688>
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedi, J., Rodenas, S., & Sanchez-Muniz, F. J. (2009). Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, 12(2), 236–258.
- Bogolitsyn, K., Dobrodeeva, L., Druzhinina, A., et al. (2019a). Biological activity of a polyphenolic complex of Arctic brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 31(5), 3341–3348. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-019-01840-7>

- Bogolitsyn, K., Dobrodeeva, L., Druzhinina, A., Ovchinnikov, D., Parshina, A., & Shulgina, E. (2019b). Biological activity of a polyphenolic complex of Arctic brown algae. *Journal of Applied Phycology*, *31*, 3341–3348.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brodowska, K. (2017). Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*, *7*(2), 108–123. <https://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/ejbr/article/view/175>
- Brown, E. S., Allsopp, P. J., Magee, P. J., Gill, C. I., Nitecki, S., Strain, C. R., & McSorley, E. M. (2014). Seaweed and human health. *Nutrition Reviews*, *72*(3), 205–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nure.12091>
- Brownlee, I. A., Seal, C. J., Wilcox, M., Dettmar, P. W., & Pearson, J. P. (2009). Applications of alginates in food. Em B. H. A. Rehm (Ed.), *Alginates: Biology and Applications* (pp. 211–228). Springer-Verlag.
- Bryant, D. A., Guglielmi, G., de Marsac, N. T., Castets, A. M., & Cohen-Bazire, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: A model. *Archives of Microbiology*, *123*(2), 113–127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00446810>
- Cai, C., Wang, Y., Li, C., et al. (2014). Purification and photodynamic bioactivity of phycoerythrin and phycocyanin from *Porphyra yezoensis* Ueda. *Journal of Ocean University of China*, *13*, 479–484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11802-014-2148-x>
- Canabady-Rochelle, L. L. S., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., & Aymes, A. (2015). Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry*, *183*, 129–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.147>
- Caputo, H. E., Straub, J. E., & Grinstaff, M. W. (2019). Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides. *Chemical Society Reviews*, *48*(8), 2338–2365.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, *40*(2), 450–458. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90405-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90405-2)
- Centre for the Promotion of Imports (CBI). (2022, February 14). The European market potential for seaweed. <https://www.cbi.eu/market-information/fish-seafood/seaweed/market-potential>
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., & Volpi, N. (2003). A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers*, *54*, 59–61. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00144-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00144-9)
- Cesário, M. T., da Fonseca, M. M. R., Marques, M. M., & de Almeida, M. C. M. D. (2018). Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnology Advances*, *36*(3), 798–817. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.006>
- Chakansin, C., Yostaworakul, J., Warin, C., Kulthong, K., & Boonrungsiman, S. (2022). Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparti-

- cles: Potential, limitations and precautions. *Analytical Biochemistry*, 637, 114449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114449>
- Chee, B. S., & Nugent, M. (2019). Electrospun natural polysaccharide for biomedical application. Em M. S. Hasnain & A. K. Nayak (Eds.), *Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications* (pp. 589–615). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817055-7.00026-1>
- Chellappan, D. K., Chellian, J., Rahmah, N. S. N., Gan, W. J., Banerjee, P., Sanyal, S., Banerjee, P., Ghosh, N., Guith, T., Das, A., Gupta, G., Singh, S. K., Dua, K., Kunnath, A. P., Norhashim, N. A., Ong, K. H., & Palaniveloo, K. (2023). Hypoglycaemic molecules for the management of diabetes mellitus from marine sources. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 16, 2187–2223.
- Chen, K., & Roca, M. (2018a). Cooking effects on chlorophyll profile of the main edible seaweeds. *Food Chemistry*, 266, 368–374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.045>
- Chen, K., & Roca, M. (2018b). In vitro bioavailability of chlorophyll pigments from edible seaweeds. *Journal of Functional Foods*, 41, 25–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.029>
- Chen, K., & Roca, M. (2019). Cooking effects on bioaccessibility of chlorophyll pigments of the main edible seaweeds. *Food Chemistry*, 295, 101–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.092>
- Chen, W., Gao, L., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2023). An improved phenol-sulfuric acid method for the quantitative measurement of total carbohydrates in algal biomass. *Algal Research*, 70, 102986. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.102986>
- Chen, Y., Liu, Y., Wang, F., et al. (2021). An Investigation of Toxic Metal Levels (Pb, Cd, Cr, As, Hg) in Dried *Porphyra* and *Laminaria* Collected from Coastal Cities, China. *Biological Trace Element Research*, 199, 3987–3997. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02509-w>
- Cheng, H., Zhang, X., Cui, Z., & Mao, S. (2021). Grafted polysaccharides as advanced pharmaceutical excipients. Em A. K. Nayak, K. Pal, I. Banerjee, S. Maji & U. Nanda (Eds.), *Advances and challenges in pharmaceutical technology* (pp. 75–129). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820043-8.00010-4>
- Christ, B., & Müller, K. H. (1960). Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 293(12), 1033–1042. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ardp.19602931202>
- Cian, R. E., Drago, S. R., De Medina, F. S., & Martínez-Augustin, O. (2015). Proteins and carbohydrates from red seaweeds: Evidence for beneficial effects on gut function and microbiota. *Marine Drugs*, 13(8), 5358–5383. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md13085358>
- Ciko, A. M., Jokić, S., Šubarić, D., & Jerković, I. (2018). Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, 16(10), 348. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md16100348>

- Cikoš, A. M., Aladić, K., Velić, D., et al. (2023). Evaluation of ultrasound-assisted extraction of fucoxanthin and total pigments from three Croatian macroalgal species. *Chemical Papers*, 77, 1545–1559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11696-022-02524-2>
- Cikoš, A. M., Šubarić, D., Roje, M., Babić, J., Jerković, I., & Jokić, S. (2022). Recent advances on macroalgal pigments and their biological activities (2016–2021). *Algal Research*, 65, 102748. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102748>
- Circuncisão, A. R., Catarino, M. D., Cardoso, S. M., & Silva, A. M. S. (2018). Minerals from macroalgae origin: Health benefits and risks for consumers. *Marine Drugs*, 16(11), 400. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md16110400>
- CLSI. (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - 9th CLSI M07-A9*.
- Čmiková, N., Galovičová, L., Miškeje, M., Borotová, P., Kluz, M., & Kačániová, M. (2022). Determination of antioxidant, antimicrobial activity, heavy metals and elements content of seaweed extracts. *Plants*, 11(11), 1493. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants11111493>
- Csepregi, R., Lemli, B., Kunsági-Máté, S., Szente, L., Kőszegi, T., Némethi, B., & Poór, M. (2018). Complex formation of resorufin and resazurin with β -cyclodextrins: Can cyclodextrins interfere with a resazurin cell viability assay? *Molecules*, 23(2), 382. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules23020382>
- da Silva Lucas, A. J., Oreste, E. Q., Costa, H. L. G., López, H. M., Saad, C. D. M., & Prentice, C. (2021). Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. *Food Chemistry*, 343, 128550.
- Dębowski, M., Zieliński, M., Kazimierowicz, J., Kujawska, N., & Talbierz, S. (2020). Microalgae Cultivation Technologies as an Opportunity for Bioenergetic System Development — Advantages and Limitations. *Sustainability*, 12(23), 9980. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/su12239980>
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., & Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1159–1179. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
- Denis, C., Le Jeune, H., Gaudin, P., & et al. (2009). An evaluation of methods for quantifying the enzymatic degradation of red seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 153–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-008-9344-2>
- Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 180–185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>
- Devillé, C., Damas, J., Forget, P., Dandrifosse, G., & Peulen, O. (2004). Laminarin in the dietary fibre concept. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(9), 1030–1038. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.1754>
- Di Leo, N., Battaglini, M., Berger, L., Giannaccini, M., Dente, L., Hampel, S., Vittorio, O., Cirillo, G., & Raffa, V. (2017). A catechin nanoformulation inhibits WM266 melanoma cell proliferation, migration and associated neo-angiogenesis. *European Journal of Pharma-*

- ceutics and Biopharmaceutics*, 114, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.024>
- Dische, Z. (1949). Spectrophotometric method for the determination of free pentose and pentose in nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 181(1), 379–392. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)56657-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)56657-6)
- Domínguez-González, R., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A., & Bermejo-Barrera, P. (2005). Application of ultrasound-assisted acid leaching procedures for major and trace elements determination in edible seaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Talanta*, 66(4), 937–942. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.12.051>
- D’Orazio, N., Gemello, E., Gammone, M. A., De Girolamo, M., Ficoneri, C., & Riccioni, G. (2012). Fucoxantin: A treasure from the sea. *Marine Drugs*, 10(3), 604–616. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md10030604>
- Duarte, K., Justino, C. I. L., Gomes, A. M., Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2014). Green analytical methodologies for preparation of extracts and analysis of bioactive compounds. Em T. Rocha-Santos & A. C. Duarte (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry* (pp. 59–78, Vol. 65). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63359-0.00004-5>
- Edible Seaweed-French & European Regulation. (2014). <http://www.cybercolloids.net/sites/default/files/seaweed%5C%20and%5C%20regulation2014.pdf>
- Elkaliny, N. E., Alzamel, N. M., Moussa, S. H., Elodamy, N. I., Madkor, E. A., Ibrahim, E. M., Elshobary, M. E., & Ismail, G. A. (2024). Macroalgae bioplastics: A sustainable shift to mitigate the ecological impact of petroleum-based plastics. *Polymers*, 16(9), 1246. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym16091246>
- El-Ramady, H., Abdalla, N., Badgar, K., Llanaj, X., Törös, G., Hajdú, P., Eid, Y., & Prokisch, J. (2022). Edible mushrooms for sustainable and healthy human food: Nutritional and medicinal attributes. *Sustainability*, 14(9), 4941. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/su14094941>
- EN 17399:2020: Algae and algae products - Terms and definitions. (2020). <https://www.cen.eu/>
- Eom, S. H., Lee, D. S., Jung, Y. J., Park, J. H., Choi, J. I., Yim, M. J., Jeon, J. M., Kim, H. W., Son, K. T., Je, J. Y., et al. (2014). The mechanism of antibacterial activity of phlorofucofuroeckol-A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 9795–9804.
- Epstein, G., & Smale, D. A. (2017). *Undaria pinnatifida*: A case study to highlight challenges in marine invasion ecology and management. *Ecology and Evolution*, 7, 8624–8642. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ece3.3430>
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>
- Esther Elizabeth Grace, K., Kiruthika Lakshmi, P., Meenakshi, S., Vaidyanathan, S., Srisudha, S., & Briget Mary, M. (2020). Biomolecular transitions and lipid accumulation in green microalgae monitored by FTIR and Raman analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 224, 117382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117382>

- EU Commission. (2008). Commission Regulation (EC) No. 629/2008 of 2 July 2008 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- European Commission. (2002). Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed.
- European Commission. (2019). The future of the EU algae sector. [https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2023/733114/IPOL_STU\(2023\)733114_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2023/733114/IPOL_STU(2023)733114_EN.pdf)
- European Commission. (2022). Rumo a um setor das algas da UE forte e sustentável (COM(2022) 361 final). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/T>
- European Parliament. (2023). The future of the EU algae sector (Research for the PECH Committee). [https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2023/733114/IPOL_STU\(2023\)733114_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2023/733114/IPOL_STU(2023)733114_EN.pdf)
- FAO. (2007). *The state of world fisheries and aquaculture 2006*. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699e/a0699e.pdf>
- FAO. (2010). *The state of food insecurity in the world: Addressing food insecurity in protracted crises*.
- FAO. (2021). *The state of food and agriculture 2021*. Food; Agriculture Organization of the United Nations. <https://openknowledge.fao.org/handle/10568/111532>
- Farghali, M., Mohamed, I., Osman, A., & Rooney, D. (2022). Seaweed for climate mitigation, wastewater treatment, bioenergy, bioplastic, biochar, food, pharmaceuticals, and cosmetics: A review. *Environmental Chemistry Letters*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10311-022-01520-y>
- Ferdous, U. T., & Yusof, Z. N. B. (2021). Insight sobre a potencial atividade anticâncer de flavonoides de algas: status atual e desafios. *Molecules*, 26(22), 6844. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26226844>
- Fernandes, H., Martins, N., Vieira, L., Salgado, J. M., Castro, C., Oliva-Teles, A., Belo, I., & Peres, H. (2022). Pre-treatment of *Ulva rigida* improves its nutritional value for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Algal Research*, 66, 102803. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102803>
- Fernandes, J. (2022). *Efeito da altitude e sombreamento na bioatividade do grão de café produzido na Serra da Gorongosa* [Dissertação de Mestrado]. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- Fernández-Segovia, I., Lerma-García, M. J., Fuentes, A., & Barat, J. M. (2018). Characterization of Spanish powdered seaweeds: Composition, antioxidant capacity and technological properties. *Food Research International*, 111, 212–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.037>
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197(1), 157–162. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90372-Z](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90372-Z)
- Fleurence, J. (2004). Seaweed proteins. Em R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing* (pp. 197–213). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781855738379.1.197>

- Flores, S. R. L., Dobbs, J., & Dunn, M. A. (2015). Mineral nutrient content and iron bioavailability in common and Hawaiian seaweeds assessed by an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.06.008>
- Foegeding, E. A., & Davis, J. P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1853–1864. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.008>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–650.
- Folin, O., & Denis, W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 12(2), 239–243. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)88697-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)88697-5)
- Foroughi, J., Ruhparwar, A., Aloko, S., & Wang, C. H. (2024). Manufacturing ulvan biopolymer for wound dressings. *Macromolecular Materials and Engineering*, 309(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mame.202300268>
- Fu, Y., Luo, J., Qin, J., & Yang, M. (2019). Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 168, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.02.027>
- Fukushima, Y., Taguchi, C., Kishimoto, Y., & Kondo, K. (2023). Japanese carotenoid database with α - and β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, lycopene, and fucoxanthin and intake in adult women [Epub 2021 May 7]. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 93(1), 42–53. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000707>
- Fung, A., Hamid, N., & Lu, J. (2013). Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chemistry*, 136(2), 1055–1062. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.024>
- Gabriel, C. (2023). *Avaliação e Caracterização de Bioprodutos de Valor Acrescentado Isolados de uma Microalga Produzida Industrialmente* [Dissertação de Mestrado]. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- Gan, A., & Baroutian, S. (2022). Subcritical water extraction for recovery of phenolics and fucoxanthin from New Zealand Wakame (*Undaria pinnatifida*) seaweed. *The Journal of Supercritical Fluids*, 190, 105732. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105732>
- Garcia-Perez, P., Lourenço-Lopes, C., Silva, A., Pereira, A., Fraga-Corral, M., Zhao, C., Xiao, J., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. (2022). Pigment Composition of Nine Brown Algae from the Iberian Northwestern Coastline: Influence of the Extraction Solvent. *Marine Drugs*, 20(2), 113. <https://doi.org/10.3390/md20020113>
- Garcia-Vaquero, M., O'Doherty, J. V., Tiwari, B. K., Sweeney, T., & Rajauria, G. (2019). Enhancing the extraction of polysaccharides and antioxidants from macroalgae using sequential hydrothermal-assisted extraction followed by ultrasound and thermal technologies. *Marine Drugs*, 17(8), 457. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md17080457>
- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., & Tiwari, B. (2020). Conventional extraction techniques: Solvent extraction. Em M. D. Torres, S. Kraan & H. Dominguez (Eds.), *Advances in Green and Sustainable Chemistry: Sustainable Seaweed Technologies* (pp. 171–189). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00006-8>

- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., Tiwari, B., Sweeney, T., & O'Doherty, J. (2018). Extraction and yield optimisation of fucose, glucans and associated antioxidant activities from *Laminaria digitata* by applying response surface methodology to high intensity ultrasound-assisted extraction. *Marine Drugs*, *16*(8), 257. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md16080257>
- Gierlinger, N. (2017). New insights into plant cell walls by vibrational microspectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, *53*(7), 517–551. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1363052>
- Godvin Sharmila, V., Dinesh Kumar, M., Pugazhendhi, A., Bajhaiya, A. K., Gugulothu, P., & Banu, J. R. (2021). Biofuel production from Macroalgae: Present scenario and future scope. *Bioengineered*, *12*(2), 9216–9238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1996019>
- Gordalina, M., Pinheiro, H. M., Mateus, M., da Fonseca, M. M. R., & Cesário, M. T. (2021). Macroalgae as protein sources—A review on protein bioactivity, extraction, purification and characterization. *Applied Sciences*, *11*(17), 7969. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app11177969>
- Graiff, A., Ruth, W., Kragl, U., & Karsten, U. (2016). Chemical characterization and quantification of the brown algal storage compound laminarin—A new methodological approach. *Journal of Applied Phycology*, *28*(1), 533–543. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-015-0563-z>
- Guerra, M., Manso, M., Pessanha, S., Longelin, S., & Carvalho, M. L. (2013). Theoretical and experimental study on the angular dependence of scattering processes in X-ray fluorescence systems. *X-ray Spectrometry*, *42*(5), 402–407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/xrs.2491>
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(6), 315–326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>
- Gurria Albusac, P., Gonzalez Hermoso, H., Cazzaniga, N., Jasinevičius, G., Mubareka, S., De Laurentiis, V., Patinha Caldeira, C., Sala, S., Ronchetti, G., Guillen Garcia, J., Ronzon, T., & M'barek, R. (2022). *EU Biomass Flows*. Publications Office of the European Union. <https://doi.org/https://doi.org/10.2760/082220>
- Hahn, T., Schulz, M., Stadtmüller, R., Zayed, A., Muffler, K., Lang, S., & Ulber, R. (2016). A Cationic Dye for the Specific Determination of Sulfated Polysaccharides. *Analytical Letters*, *49*, 1195–1204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1126839>
- Halaby, E. (2011). Algae as Promising Organisms for Environment and Health. *Plant Signaling & Behavior*, *6*, 1338–1350.
- Han, Y., Wu, J., Liu, T., Hu, Y., Zheng, Q., Wang, B., Lin, H., & Li, X. (2016). Separation, characterization and anticancer activities of a sulfated polysaccharide from *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *83*, 42–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.049>
- Haris, P. I., & Severcan, F. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *7*(1–4), 207–221. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00030-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00030-2)

- Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2011). Bioactive Proteins, Peptides, and Amino Acids from Macroalgae. *Journal of Phycology*, 47(2), 218–232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00969.x>
- Healy, L. E., Zhu, X., Pojic, M., Poojary, M. M., Curtin, J., Tiwari, U., Sullivan, C., & Tiwari, B. K. (2022). Impact of dry, particle-size fractionation on protein and amino acid content of three seaweed species. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 2073–2088. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2120001>
- Healy, L. E., Zhu, X., Pojčić, M., Sullivan, C., Tiwari, U., Curtin, J., & Tiwari, B. K. (2023). Biomolecules from macroalgae—Nutritional profile and bioactives for novel food product development. *Biomolecules*, 13(2), 386. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom13020386>
- Hédouin, L., Bustamante, P., Fichez, R., & Warnau, M. (2008). The tropical brown alga *Loxophora variegata* as a bioindicator of mining contamination in the New Caledonia lagoon: A field transplantation study. *Marine Environmental Research*, 66(4), 438–444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.07.005>
- Heo, S. J., Ko, S. C., Kang, S. M., & et al. (2008). Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage. *European Food Research and Technology*, 228(1), 145–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00217-008-0918-7>
- Hidari, K. I. P. J., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K., & Suzuki, T. (2008). Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(1), 91–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.100>
- Hong, T., Yin, J.-Y., Nie, S.-P., & Xie, M.-Y. (2021). Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. *Food Chemistry: X*, 12, 100168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100168>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Hudzicki, J. (2016). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol* [<https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>]. American Society for Microbiology.
- Iberagar. (s.d.). Iberagar [n.d.]. <https://iberagar.com/?lang=pt-pt>
- Iso, H. (2011). Lifestyle and cardiovascular disease in Japan. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18(2), 83–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.5551/jat.6866>
- Jain, B. P., Goswami, S. K., & Pandey, S. (2021). Carbohydrate. Em *Protocols in Biochemistry and Clinical Biochemistry* (pp. 5–22). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822007-8.00007-6>
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9(2), 196–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md9020196>

- Jiao, K., Gao, J., Zhou, T., Yu, J., Song, H., Wei, Y., & Gao, X. (2019). Isolation and purification of a novel antimicrobial peptide from *Porphyra yezoensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), e12864. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfbc.12864>
- Jönsson, M., Allahgholi, L., Sardari, R. R. R., Hreggviðsson, G. O., & Nordberg Karlsson, E. (2020). Extraction and modification of macroalgal polysaccharides for current and next-generation applications. *Molecules*, 25(4), 930. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules25040930>
- Juin, C., Carrière, J., Rigal, M., François, B., Garnier, M., & Peltier, G. (2015). Microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from *Porphyridium purpureum*. *Journal of Biobiochemical and Biotechnological Research*, 175(1), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12010-014-1250-2>
- Jun, J.-Y., Jung, M.-J., Jeong, I.-H., Yamazaki, K., Kawai, Y., & Kim, B.-M. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activities of sulfated polysaccharides from marine algae against dental plaque bacteria. *Marine Drugs*, 16(9), 301. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md16090301>
- Júnior, W. (2018). *Avaliação da composição mineral de alimentos funcionais (algas e fungo) por fluorescência de raios-X* [Dissertação de mestrado]. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia [[Dissertação de mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia]].
- Kadam, S. U., O'Donnell, C. P., Rai, D. K., Hossain, M. B., Burgess, C. M., Walsh, D., & Tiwari, B. K. (2015). Laminarin from Irish brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: Ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity. *Marine Drugs*, 13(7), 4270–4280. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md13074270>
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4667–4675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf400819p>
- Kalasariya, H. S., & Pereira, L. (2022). Benefícios Dermocosméticos de Compostos Fenólicos Derivados de Macroalgas Marinhas. *Ciências Aplicadas*, 12(23), 11954. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app122311954>
- Kamala-Kannan, S., Prabhu Dass Batvari, B., Lee, K. J., Kannan, N., Krishnamoorthy, R., Shanthi, K., & Jayaprakash, M. (2008). Assessment of heavy metals (Cd, Cr, and Pb) in water, sediment, and seaweed (*Ulva lactuca*) in the Pulicat Lake, South East India. *Chemosphere*, 71(7), 1233–1240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.12.004>
- Kanazawa, K., Ozaki, Y., Hashimoto, T., Das, S. K., Matsushita, S., Hirano, M., Okada, T., Komoto, A., Mori, N., & Nakatsuka, M. (2008). Commercial-scale preparation of biofunctional fucoxanthin from waste parts of brown sea algae *Laminaria japonica*. *Food Science and Technology Research*, 14(6), 573. <https://doi.org/https://doi.org/10.3136/fstr.14.573>
- Karpiński, T. M., & Adamczak, A. (2019). Fucoxanthin—An antibacterial carotenoid. *Antioxidants*, 8(8), 239. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox8080239>
- Kasanah, N., Amelia, W., Mukminin, A., Triyanto & Isnansetyo, A. (2018). Antibacterial activity of Indonesian red algae *Gracilaria edulis* against bacterial fish pathogens and cha-

- racterization of active fractions. *Natural Product Research*, 33(22), 3303–3307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1471079>
- Kawai, S., & Murata, K. (2016). Produção de biocombustíveis com base em carboidratos de macroalgas marrons e vermelhas: desenvolvimentos recentes em biotecnologias-chave. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 145. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms17020145>
- Ketteler, R. (2012). *Methods in Molecular Biology, Volume 716: Drug Design and Discovery: Methods and Protocols* (Vol. 73). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04041.x>
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 60–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>
- Ki, S.-K. (Ed.). (2013). *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*. Wiley-Blackwell.
- Kim, K.-N., Heo, S.-J., Kang, S.-M., Ahn, G., & Jeon, Y.-J. (2010). Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicology in Vitro*, 24(6), 1648–1654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.023>
- Kim, S.-K., Thomas, N. V., & Li, X. (2011). Anticancer compounds from marine macroalgae and their application as medicinal foods. Em *Advances in food and nutrition research* (pp. 213–224, Vol. 64). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374549-1.00013-2>
- Kim, Y.-H., Kim, J. H., Jin, H.-J., & Lee, S. Y. (2013). Antimicrobial Activity of Ethanol Extracts of *Laminaria japonica* against Oral Microorganisms. *Anaerobe*, 21, 34–38.
- Kitajima, H., Komizu, Y., Ichihara, H., Goto, K., Inano, T., & Ueoka, R. (2013). Immunostimulatory effects of extract from nori (*Porphyra yezoensis*) in vitro and in vivo. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 39(4), 359–362.
- Knight, J. A., Anderson, S., & Rawle, J. M. (1972). Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical Chemistry*, 18(3), 199–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/clinchem/18.3.199>
- Koizumi, J., Takatani, N., Kobayashi, N., Mikami, K., Miyashita, K., Yamano, Y., Wada, A., Mataka, T., & Hosokawa, M. (2018). Carotenoid Profiling of a Red Seaweed *Pyropia yezoensis*: Insights into Biosynthetic Pathways in the Order Bangiales. *Marine Drugs*, 16(11), 426. <https://doi.org/10.3390/md16110426>
- Kolb, N., Vallorani, L., Milanović, N., & Stocchi, V. (2004). Evaluation of marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and kombu (*Laminaria digitata japonica*) as food supplements [Retrieved from <https://hrcak.srce.hr/110723>]. *Food Technology and Biotechnology*, 42(1), 57–61.
- Kotake-Nara, E., Asai, A., & Nagao, A. (2005). Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 220(1), 75–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.07.048>
- Kovaleski, G., Kholany, M., Dias, L. M. S., Correia, S. F. H., Ferreira, R. A. S., Coutinho, J. A. P., & Ventura, S. P. M. (2022). Extraction and purification of phycobiliproteins from algae

- and their applications. *Frontiers in Chemistry*, 10, 1065355. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1065355>
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2011). Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Analytical Biochemistry*, 415(2), 134–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.010>
- Kupetz, M., Procopio, S., Sacher, B., & Becker, T. (2015). Critical review of the methods of β -glucan analysis and its significance in the beer filtration process. *European Food Research and Technology*, 241, 10.1007/s00217-015-2498–7.
- Kurakake, M., Itakura, K., & Nakano, M. (2021). Functional Properties of Nori Seaweed (*Pyropia yezoensis*) with Different Quality and *Ulva* sp. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 30(2), 188–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10498850.2020.1868642>
- Lafarga, T., Acién-Fernández, F. G., & Garcia-Vaquero, M. (2020). Bioactive peptides and carbohydrates from seaweed for food applications: Natural occurrence, isolation, purification, and identification. *Algal Research*, 48, 101909. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101909>
- Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. Em R. Apak, E. Capanoglu & F. Shahidi (Eds.), *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>
- Langyan, S., Yadava, P., Khan, F. N., Dar, Z. A., Singh, R., & Kumar, A. (2022). Sustaining protein nutrition through plant-based foods. *Frontiers in Nutrition*, 8, 772573. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fnut.2021.772573>
- Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2020). Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Marine Drugs*, 18(1), 17. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md18010017>
- Lee, H.-H., Kim, J.-S., Jeong, J.-H., Park, S. M., Sathasivam, R., Lee, S. Y., & Kim, C. S. (2022). Effect of different solvents on the extraction of compounds from different parts of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(9), 1193. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jmse10091193>
- Lee, T., Chang, J., & Wang, H. (2013). Current developments in high-throughput analysis for microalgae cellular contents. *Journal of Biotechnology*, 8(11), 1301–1314. <https://doi.org/10.1002/biot.201200391>
- Leite, B. S. M. (2017). *Estudo do crescimento e da produção de algas marinhas em cultivos de pequena escala* [tese de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia]. <http://hdl.handle.net/10362/23801>
- Li, J., Kisara, K., Danielsson, S., Lindström, M. E., & Gellerstedt, G. (2007). An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 342(11), 1442–1449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.03.031>

- Li, M., Feng, H., Ouyang, X., & Ling, J. (2021). Determination of fucoxanthin in bloom-forming macroalgae by HPLC–UV. *Journal of Chromatographic Science*, 59(10), 978–982. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab043>
- Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148C, 350–382. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lindsay, H. (1973). A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3,5-dinitrosalicylic acid. *Potato Research*, 16, 176–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02356048>
- Liu, C. L., Liang, A. L., & Hu, M. L. (2011). Protective effects of fucoxanthin against ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress in murine hepatic BNL CL.2 cells. *Toxicology in Vitro*, 25(7), 1314–1319. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.023>
- Liu, M., Liu, Y., Cao, M., Liu, G., Chen, Q., Sun, L., & Chen, H. (2017). Antibacterial activity and mechanisms of depolymerized fucoidans isolated from *Laminaria japonica*. *Carbohydrate Polymers*, 172, 294–305.
- Liu, M., Liu, Y., Cao, M. J., Liu, G. M., Chen, Q., Sun, L., & Chen, H. (2017). Antibacterial activity and mechanisms of depolymerized fucoidans isolated from *Laminaria japonica*. *Carbohydrate Polymers*, 172, 294–305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.060>
- Llorente-Mirandes, T., Rubio, R., & López-Sánchez, J. F. (2017). Inorganic arsenic determination in food: A review of analytical proposals and quality assessment over the last six years. *Applied Spectroscopy*, 71(1), 25–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/0003702816652374>
- Lomartire, S., Cotas, J., Pacheco, D., Marques, J. C., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2021). Environmental Impact on Seaweed Phenolic Production and Activity: An Important Step for Compound Exploitation. *Marine Drugs*, 19(5), 245. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md19050245>
- Lomartire, S., & Gonçalves, A. M. M. (2023). An overview on antimicrobial potential of edible terrestrial plants and marine macroalgae Rhodophyta and Chlorophyta extracts. *Marine Drugs*, 21, 163. <https://doi.org/10.3390/md21020163>
- López, A., Rico, M., Santana-Casiano, J. M., González, A. G., & González-Dávila, M. (2015). Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(19), 14820–14828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-015-4717-y>
- López-Fernández, O., Domínguez, R., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., & Lorenzo, J. M. (2020). Determination of polyphenols using liquid chromatography-tandem mass spectrometry technique (LC-MS/MS): A review. *Antioxidants*, 9(6), 479. <https://doi.org/10.3390/antiox9060479>
- López-Hortas, L., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., Ferreira-Anta, T., Casas, M. P., Balboa, E. M., Falqué, E., & Domínguez, H. (2021). Applying seaweed compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics. *Marine Drugs*, 19(10), 552. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md19100552>
- López-Hortas, L., Gely, M., Falqué, E., Domínguez, H., & Torres, M. D. (2019). Alternative environmental friendly process for dehydration of edible *Undaria pinnatifida* brown se-

- aweed by microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 261, 15–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.001>
- Lourenço-Lopes, C., Carreira-Casais, A., Carpena, M., Barral-Martinez, M., Chamorro, F., Jiménez-López, C., Cassani, L., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2023). Emerging Technologies to Extract Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: Microwave vs. Ultrasound Assisted Extractions. *Marine Drugs*, 21(5), 282. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md21050282>
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Metabolites from macroalgae and its applications in the cosmetic industry: A circular economy approach. *Resources*, 9(9), 101. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/resources9090101>
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Soria-Lopez, A., Nuñez-Estevez, B., Barral-Martinez, M., Silva, A., Li, N., Liu, C., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2022). Fucoxanthin's Optimization from *Undaria pinnatifida* Using Conventional Heat Extraction, Bioactivity Assays and In Silico Studies. *Antioxidants*, 11(7), 1296. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox11071296>
- Lunde, G. (1970). Analysis of trace elements in seaweed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21(8), 416–418. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740210806>
- Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., & Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*, 20(1), 1118–1133. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules20011118>
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Takahashi, N., Kawada, T., & Miyashita, K. (2006). Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 18, 147–152. <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/ijmm.18.1.147>
- Magalhães, L. M., Almeida, M. I. G. S., Barreiros, L., & Segundo, M. A. (2012). Automatic aluminum chloride method for routine estimation of total flavonoids in red wines and teas. *Food Analytical Methods*, 5, 530–539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12161-011-9278-1>
- Manzoor, M. F., Afraz, M. T., Yilmaz, B. B., Adil, M., Arshad, N., Goksen, G., Ali, M., & Zeng, X.-A. (2024). Recent progress in natural seaweed pigments: Green extraction, health-promoting activities, techno-functional properties and role in intelligent food packaging. *Journal of Agriculture and Food Research*, 15, 100991. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.100991>
- Martins, A., Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., & Pedrosa, R. (2023). Sulfated Polysaccharides from Macroalgae—A Simple Roadmap for Chemical Characterization. *Polymers*, 15(2), 399. <https://doi.org/10.3390/polym15020399>
- Maruyama, H., Tamauchi, H., Hashimoto, M., & Nakano, T. (2005). Suppression of The immune responses by Mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls. *International Archives of Allergy and Immunology*, 137(4), 289–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000086422>

- Mashjoor, S., Yousefzadi, M., Esmaeili, M. A., & et al. (2016). Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (Dictyotaceae and Ulvaceae) from the Persian Gulf. *Cytotechnology*, 68(6), 1717–1726. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9921-6>
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- Matos, G. S., Pereira, S. G., Genisheva, Z. A., Gomes, A. M., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. R. (2021). Advances in extraction methods to recover added-value compounds from seaweeds: Sustainability and functionality. *Foods*, 10(3), 516. <https://doi.org/10.3390/foods10030516>
- Matsuno, T. (2001). Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Science*, 67, 771–783. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00323.x>
- Maure, H. K. (2015). *Seaweed proteins – how to get to them? Effects of processing on nutritional value, bioaccessibility and extractability* [tese de doutoramento, Norwegian College of Fishery Science, Faculty of Biosciences, Fisheries e Economics]. <https://hdl.handle.net/10037/9130>
- Mautner, H. G. (1954). The chemistry of brown algae. *Economic Botany*, 8, 174–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02984737>
- Meliker, J. R., Slotnick, M. J., AvRuskin, G. A., Schottenfeld, D., Jacquez, G. M., Wilson, M. L., & Nriagu, J. O. (2010). Lifetime exposure to arsenic in drinking water and bladder cancer: A population-based case–control study in Michigan, USA. *Cancer Causes & Control*, 21, 745–757.
- Menea, F., Wijesinghe, U., Thiripuranathar, G., Althobaiti, N. A., Albalawi, A. E., Khan, B. A., & Menea, B. (2021). Marine Algae-Derived Bioactive Compounds: A New Wave of Nano-drugs? *Marine Drugs*, 19(9), 484. <https://doi.org/10.3390/md19090484>
- Mendes, M. C., Navalho, S., Ferreira, A., Paulino, C., Figueiredo, D., Silva, D., Gao, F., Gama, F., Bombo, G., & Jacinto, R. (2022). Algae as food in Europe: An overview of species diversity and their application. *Foods*, 11(13), 1871. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods11131871>
- Mendes, M. C., Navalho, S., Ferreira, A., Paulino, C., Figueiredo, D., Silva, D., & Speranza, L. G. (2022). Algae as Food in Europe: An Overview of Species Diversity and Their Application. *Foods*, 11(13), 1871. <https://doi.org/10.3390/foods11131871>
- Merck. (n.d. a). Congo Red High Purity (CAS 573-58-0) - Calbiochem [Retrieved July 12, 2024]. https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Congo-Red-High-Purity-CAS-573-58-0-Calbiochem,EMD_BIO-234610
- Merck. (n.d. b). Coomassie Brilliant blue G 250 (C.I. 42655) [Sigma-Aldrich]. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/mm/115444?icid=sharepdp-clipboard-copy-productdetailpage>
- Merck. (n.d. c). Protein quantitation [Sigma-Aldrich]. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/applications/protein-biology/protein-quantitation>
- Méresse, S., Fodil, M., Fleury, F., & Chénais, B. (2020). Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: A promising bioactive compound for cancer

- therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9273. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21239273>
- Mintel. (2016). Seaweed-flavoured food and drink launches increased by 147% in Europe between 2011 and 2015. <https://www.mintel.com/press-centre/seaweed-flavoured-food-and-drink-launches-increased-by-147-in-europe-between-2011-and-2015/>
- Misra, N. N., Rai, D. K., & Hossain, M. (2015). Analytical techniques for bioactives from seaweed. Em B. K. Tiwari & D. J. Troy (Eds.), *Seaweed Sustainability* (pp. 271–287). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418697-2.00010-6>
- Mišurcová, L., Stratilová, I., & Kráčmar, S. (2009). Mineral Contents in Food Products from Freshwater Algae and Seaweed. *Chemické Listy*, 103, 1027–1033. <https://www.researchgate.net/publication/288120957>
- Mizuno, M., Minato, K., Kawakami, S., Tatsuoka, S., Denpo, Y., & Tsuchida, H. (2001). Contents of anti-tumor polysaccharides in certain mushrooms and their immunomodulating activities. *Food Science and Technology Research*, 7(1), 31–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.3136/fstr.7.31>
- Monsalve-Bustamante, Y. A., Rincón-Valencia, S., Mejía-Giraldo, J., Moreno-Tirado, D., & Puertas-Mejía, M. (2019). Screening of the UV absorption capacity, proximal and chemical characterization of extracts, and polysaccharide fractions of the *Gracilariopsis tenuifrons* cultivated in Colombia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(10), 85–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.91014>
- Montero, L., Sánchez-Camargo, A. P., Ibáñez, E., & Gilbert-López, B. (2018). Phenolic compounds from edible algae: Bioactivity and health benefits. *Food Reviews International*, 25(37), 4808–4826. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/0929867324666170523120101>
- Morais, T., Cotas, J., Pacheco, D., & Pereira, L. (2021). Seaweeds compounds: An ecosystem-sustainable source of cosmetic ingredients? *Cosmetics*, 8(8), 8. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cosmetics8010008>
- Moreno, M. R. d., Smith, J. F., & Smith, R. V. (1986). Mechanism studies of Coomassie blue and silver staining of proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(9), 907–911.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mouritsen, O. G. (2013). *Seaweeds: Edible, available & sustainable* (1st). University of Chicago Press.
- MS, U., Ferdosh, S., Haque Akanda, M. J., Ghafoor, K., Ali, M. E., & Islam Sarker, M. Z. (2018). Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: A review. *Separation Science and Technology*, 53(14), 2206–2223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1454472>
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 773–791. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/138161207780363068>
- Nagata, N., Bueno, M. I., & Peralta-Zamora, P. G. (2001). Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluores-

- cência de raios-X. *Química Nova*, 24, 531–539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000400015>
- National Institutes of Health. (n.d.). Nutrient recommendations and databases [Office of Dietary Supplements]. <https://ods.od.nih.gov/HealthInformation/nutrientrecommendations.aspx>
- Necton. (n.d.). Necton. <https://necton.pt/>
- Nie, Z. Y., Yang, L., Liu, X. J., Yang, Z., Yang, G. S., Zhou, J., Qin, Y., Yu, J., Jiang, L. L., Wen, J. K., & Luo, J. M. (2019). Morin inhibits proliferation and induces apoptosis by modulating the miR-188-5p/PTEN/AKT regulatory pathway in CML cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 18(12), 2296–2307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0051>
- Nikolaeva, T. N., Lapshin, P. V., & Zagorskina, N. V. (2022). Method for determining the total content of phenolic compounds in plant extracts with Folin–Denis reagent and Folin–Ciocalteu reagent: Modification and comparison. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(12), 1519–1525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1134/S1068162022070214>
- Nikonenko, N. A., Buslov, D. K., Sushko, N. I., & Zhabankov, R. G. (2005). Spectroscopic manifestation of stretching vibrations of glycosidic linkage in polysaccharides. *Journal of Molecular Structure*, 752(1-3), 20–24.
- Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., Wantoch von Rekowski, R., Altenbach, H.-J., & Mülleken, H. (2011). A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 127(2), 791–796. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.149>
- Nova, P., Cunha, S. A., Costa-Pinto, A. R., & Gomes, A. M. (2024). Chemical and Antioxidant Properties of Solvent and Enzyme-Assisted Extracts of *Fucus vesiculosus* and *Porphyra dioica*. *Marine Drugs*, 22(7), 319. <https://doi.org/10.3390/md22070319>
- Nwosu, F., Morris, J., Lund, V. A., Stewart, D., Ross, H. A., & McDougall, G. J. (2011). Antiproliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*, 126(3), 1006–1012. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.111>
- Ogawa, K., Tsurugi, J., & Watanabe, T. (1972). Complex of gel-forming β -1,3-D-glucan with Congo red in alkaline solution. *Chemistry Letters*, 1(8), 689–692. <https://doi.org/https://doi.org/10.1246/cl.1972.689>
- Oh, Y. J., & Hong, J. (2022). Application of the MTT-based colorimetric method for evaluating bacterial growth using different solvent systems. *LWT*, 153, 112565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112565>
- Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F. B., Alves, C., & Oliveira, M. B. P. P. (2020). Pigments content (Chlorophylls, Fucoxanthin and Phycobiliproteins) of different commercial dried algae. *Separations*, 7(2), 33. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/separations7020033>
- Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., Asenuga, E. R., Afolabi, J. M., Adejumobi, O. A., Adedapo, A. A., & Yakubu, M. A. (2017). Effect of arsenic acid withdrawal on hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defense system. *Toxicology Reports*, 4, 521–529.

- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, *244*, 1216–1226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>
- Panagiotopoulos, C., & Sempéré, R. (2005). Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions. *Limnology and Oceanography: Methods*, *3*(10), 419–454. <https://doi.org/https://doi.org/10.4319/lom.2005.3.419>
- Park, J., Jeong, H. J., Yoon, E. Y., & Moon, S. J. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*, *31*(4), 391–401. <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.12.7>
- Pasandide, B., Khodaiyan, F., Mousavi, Z. E., & Hosseini, S. S. (2017). Optimization of aqueous pectin extraction from *Citrus medica* peel. *Carbohydrate Polymers*, *178*, 27–33.
- Patel, A., Antonopoulou, I., Enman, J., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2019). Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: An overview of the current state of the art. *BMC Chemical Engineering*, *1*(1), 13–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s42480-019-0013-9>
- Paz, S., Rubio, C., Frías, I., Gutiérrez, Á. J., González-Weller, D., Revert, V. C. M., & Hardisson, A. (2019). Toxic metals (Al, Cd, Pb and Hg) in the most consumed edible seaweeds in Europe. *Chemosphere*, *218*, 879–884. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.165>
- Pereira, L. (2016). *Edible seaweeds of the world* (1st). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b19970>
- Pereyra-Vergara, F., Olivares-Corichi, I. M., Perez-Ruiz, A. G., Luna-Arias, J. P., & García-Sánchez, J. R. (2020). Apoptosis induced by (–)-Epicatechin in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species. *Molecules*, *25*(5), 1020. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules25051020>
- Pérez, A. A., Farías, S. S., Strobl, A. M., Pérez, L. B., López, C. M., Piñeiro, A., Roses, O., & Fajardo, M. A. (2007). Levels of essential and toxic elements in *Porphyra columbina* and *Ulva sp.* from San Jorge Gulf, Patagonia Argentina. *Science of the Total Environment*, *376*(1-3), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.013>
- Pérez, L., Conde, E., & Domínguez, H. (2014). Microwave hydrodiffusion and gravity processing of *Sargassum muticum*. *Process Biochemistry*, *49*(6), 981–988. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.020>
- Pérez, M. J., Falqué, E., & Domínguez, H. (2016). Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine Drugs*, *14*(3), 52. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md14030052>
- Pessanha, S., Alves, M., Sampaio, J. M., Santos, J. P., Carvalho, M. L., & Guerra, M. (2017). A novel portable energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer with triaxial geometry. *Journal of Instrumentation*, *12*(01), P01014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/1748-0221/12/01/P01014>
- Pessanha, S., Guilherme, A., & Carvalho, M. L. (2009). Comparison of matrix effects on portable and stationary XRF spectrometers for cultural heritage samples. *Applied Physics A*, *97*(2), 497–505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00339-009-5251-x>

- Pliego-Cortés, H., Wijesekara, I., Lang, M., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2020). Current knowledge and challenges in extraction, characterization and bioactivity of seaweed protein and seaweed-derived proteins. Em N. Bourgougnon (Ed.), *Advances in Botanical Research* (pp. 289–326, Vol. 95). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.11.008>
- Poojary, M. M., Barba, F. J., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, D. A., & Juliano, P. (2016). Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs*, *14*(11), 214. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md14110214>
- Pramanik, S., Singh, A., Abualsoud, B. M., Deepak, A., Nainwal, P., Sargsyan, A. S., & Bellucci, S. (2024). From algae to advancements: Laminarin in biomedicine. *RSC Advances*, *14*(5), 3209–3231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/D3RA08161C>
- Přichystal, J., Schug, K. A., Lemr, K., Novák, J., & Havlíček, V. (2016). Structural Analysis of Natural Products. *Analytical Chemistry*, *88*(21), 10338–10346. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02386>
- Priyanka, K. R., Rajaram, R., & Sivakumar, S. R. (2022). A critical review on pharmacological properties of marine macroalgae. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13399-022-03134-4>
- Pugazhendi, A., Bajhaiya, A. K., Gugulothu, P., & J, R. B. (2021). Biofuel production from macroalgae: Present scenario and future scope. *Bioengineered*, *12*(2), 9216–9238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1996019>
- Quitain, A., Kai, T., Sasaki, M., & Goto, M. (2013). Microwave–Hydrothermal Extraction and Degradation of Fucoïdan from Supercritical Carbon Dioxide Deoiled *Undaria pinnatifida*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *52*, 7940–7946. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ie400527b>
- Quitain, A. T., Kai, T., Sasaki, M., & Goto, M. (2013). Supercritical carbon dioxide extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(24), 5792–5797. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf400740p>
- Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2010). Effect of hydrothermal processing on colour, antioxidant and free radical scavenging capacities of edible Irish brown seaweeds. *Food Science and Technology*, *75*(9), C298–C304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02449.x>
- Rajauria, G. (2019). In-Vitro Antioxidant Properties of Lipophilic Antioxidant Compounds from 3 Brown Seaweed. *Antioxidants*, *8*(12), 596. <https://doi.org/10.3390/antiox8120596>
- Rao, A. V., & Janezic, S. A. (1992). The role of dietary phytosterols in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, *18*(1), 43–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/01635589209514203>
- Rao, P. V. S., Mantri, V. A., & Ganesan, K. (2007). Mineral composition of edible seaweed *Porphyra vietnamensis*. *Food Chemistry*, *102*(1), 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.009>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free*

- Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231–1237. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Reboredo, F. H., Barbosa, A., & Silva, M. M. (2020). Mineral content of food supplements of plant origin, by energy dispersive X-ray fluorescence: A risk assessment. *Expo Health*, 12, 917–927. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12403-020-00354-9>
- Reboredo, F. H., Junior, W., Pessoa, M. F., Lidon, F. C., Ramalho, J. C., Leitão, R. G., Silva, M. M., Alvarenga, N., & Guerra, M. (2021). Elemental composition of algae-based supplements by energy dispersive X-ray fluorescence. *Plants*, 10(2041). <https://doi.org/10.3390/plants10102041>
- Reis, F. S., Martins, A., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2012). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1201–1207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.013>
- Ren, Y., Bai, Y., Zhang, Z., Cai, W., & Del Rio Flores, A. (2019). The preparation and structure analysis methods of natural polysaccharides of plants and fungi: A review of recent development. *Molecules*, 24(17), 1–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules24173122>
- República Portuguesa. (2010). Decreto-Lei n.º 54/2010, de 28 de maio.
- Román, R. B., Álvarez-Pez, J. M., Fernández, F. G. A., & Grima, E. M. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93(1), 73–85. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6)
- Rubiño, S., Peteiro, C., Aymerich, T., & Hortós, M. (2022). Major lipophilic pigments in Atlantic seaweeds as valuable food ingredients: Analysis and assessment of quantification methods. *Food Research International*, 159, 111609. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111609>
- Rupérez, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79, 23–26. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00171-1)
- Sakakibara, H., Nakagawa, S., Wakameda, H., Nakagiri, Y., Kamata, K., Das, S. K., Tsuji, T., & Kanazawa, K. (2005). Effects of Japanese kelp (kombu) on life span of benzo[a]pyrene-fed mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 51(5), 369–373. <https://doi.org/https://doi.org/10.3177/jnsv.51.369>
- Salido, M., Soto, M., & Seoane, S. (2024). Seaweed: Nutritional and gastronomic perspective. A review. *Algal Research*, 77, 103357. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103357>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Sanjeewa, A., & Jeon, Y.-J. (2018). Edible brown seaweeds: A review. *Journal of Food Bioactives*, 2018, 37–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.31665/JFB.2018.2139>
- Santana de Arruda, M. C., Oliveira Bezerra da Silva, M. R., Ribeiro Cavalcanti, V. L., Pedrosa Costa Brandao, R. M., de Araújo Viana Marques, D., Rayanna Amorim de Lima, L., Figueiredo Porto, A. L., & Pedrosa Bezerra, R. (2023). Antitumor lectins from algae: A

- systematic review. *Algal Research*, 70, 102962. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102962>
- Santos, J. S., Alvarenga Brizola, V. R., & Granato, D. (2017). High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. *Food Chemistry*, 214, 515–522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.091>
- Santos, S. A. O., Félix, R., Pais, A. C. S., Rocha, S. M., & Silvestre, A. J. D. (2019). The quest for phenolic compounds from macroalgae: A review of extraction and identification methodologies. *Biomolecules*, 9(12), 847. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom9120847>
- Sapan, C. V., Lundblad, R. L., & Price, N. C. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 99–108.
- Sapatinha, M., Oliveira, A., Costa, S., Pedro, S., Gonçalves, A., Mendes, R., Bandarra, N. M., & Pires, C. (2022). Red and brown seaweeds extracts: A source of biologically active compounds. *Food Chemistry*, 393, 133453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133453>
- Satomi, Y. (2017). Antitumor and cancer-preventative function of fucoxanthin: A marine carotenoid. *Anticancer Research*, 37(4), 1557–1562. <http://ar.iiarjournals.org/content/37/4/1557.abstract>
- Savić Gajić, I., Savić, I., Ivanovska, A., Vunduk, J., Mihalj, I., & Svirčev, Z. (2024). Improvement of Alginate Extraction from Brown Seaweed (*Laminaria digitata* L.) and Valorization of Its Remaining Ethanolic Fraction. *Marine Drugs*, 22, 280. <https://doi.org/10.3390/md22060280>
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Schmitt, M. R., & Budde, A. D. (2009). Calcofluor fluorescence assay for wort β -glucan in a microplate format. *Cereal Chemistry*, 86, 33–36.
- Sekar, S., & Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20, 113–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>
- Semedo, M. C., Karmali, A., & Fonseca, L. (2015). A high throughput colorimetric assay of. *Molecular Informatics*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.020>
- Seoane, P. R., Flórez-Fernández, N., Piñeiro, E. C., & González, H. D. (2017). Microwave-assisted water extraction. Em *Water extraction of bioactive compounds* (pp. 163–198). Elsevier.
- Shan, T., & Pang, S. (2021). Breeding in the economically important brown alga *Undaria pinnatifida*: A concise review and future prospects. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.801937>
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016a). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14(4), 81. <https://doi.org/10.3390/md14040081>
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016b). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14.

- Shariati, S., Kalantar, H., Pashmforoosh, M., Mansouri, E., & Khodayar, M. J. (2019). Epicatechin protective effects on bleomycin-induced pulmonary oxidative stress and fibrosis in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *114*, 108776. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108776>
- Sheng, Z. Z. (2020). Anticancer effects of catechin flavonoid in human glioma cells are mediated via autophagy induction, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and targeting MAPK/ERK signalling pathway. *J. BUON*, *25*, 1084–1090.
- Shi, X. D., Nie, S. P., Yin, J. Y., Que, Z. Q., Zhang, L. J., & Huang, X. J. (2017). Polysaccharide from leaf skin of *Aloe barbadensis* Miller: Part I. Extraction, fractionation, physicochemical properties and structural characterization. *Food Hydrocolloids*, *73*, 176–183.
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, *150*, 111932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Siddik, M., Francis, P., Rohani, M., Azam, M., Mock, T., & Francis, D. (2023). Seaweed and Seaweed-Based Functional Metabolites as Potential Modulators of Growth, Immune and Antioxidant Responses, and Gut Microbiota in Fish. *Antioxidants*, *12*, 2066. <https://doi.org/10.3390/antiox12122066>
- Silva, A., Silva, S. A., Carpena, M., Garcia-Oliveira, P., Gullón, P., Barroso, M. F., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Macroalgae as a source of valuable antimicrobial compounds: Extraction and applications. *Antibiotics*, *9*(10), 642. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100642>
- Singh, D. P., Prabha, R., Meena, K. K., Sharma, L., & Sharma, A. K. (2014). Induced accumulation of polyphenolics and flavonoids in cyanobacteria under salt stress protects organisms through enhanced antioxidant activity. *American Journal of Plant Sciences*, *5*(5), 550–557. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.55087>
- Singh, I. P., & Sidana, J. (2013). 5 - Phlorotannins. In *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals* (pp. 181–204). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.1.181>
- Singh, R. P., Rajarammohan, S., Thakur, R., & Hassan, M. (2020). Linear and branched β -glucans degrading enzymes from versatile *Bacteroides uniformis* JCM 13288T and their roles in cooperation with gut bacteria. *Gut Microbes*, *12*(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1826761>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Smith, A. H., Marshall, G., Yuan, Y., Ferreccio, C., Liaw, J., von Ehrenstein, O., & Selvin, S. (2006). Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environmental Health Perspectives*, *114*(8), 1293–1296.
- Song, J.-H., Kang, H.-B., Park, S.-H., Jeong, J.-H., Park, J., You, Y., Lee, Y.-H., Lee, J., Kim, E., Choi, K.-C., & Jun, W. (2017a). Extracts of *Porphyra tenera* (nori seaweed) activate the immune response in mouse RAW264.7 macrophages via NF- κ B signaling. *Journal of Medicinal Food*, *20*(12).

- Song, J.-H., Kang, H.-B., Park, S.-H., Jeong, J.-H., Park, J., You, Y., Lee, Y.-H., Lee, J., Kim, E., Choi, K.-C., & Jun, W. (2017b). Extracts of *Porphyra tenera* (Nori Seaweed) Activate the Immune Response in Mouse RAW264.7 Macrophages via NF- κ B Signaling. *Journal of Medicinal Food*, 20(12), 1152–1159. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.4014>
- Song, L., Niu, Y., Chen, R., Ju, H., Liu, Z., Zhang, B., Xie, W., & Gao, Y. (2024). A comparative analysis of the anti-tumor activity of sixteen polysaccharide fractions from three large brown seaweed, *Sargassum horneri*, *Scytosiphon lomentaria*, and *Undaria pinnatifida*. *Marine Drugs*, 22, 316. <https://doi.org/10.3390/md22070316>
- Sundaram, R. K., Balasubramanian, N., & Sundaram, P. (2012). Protein stains and applications. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 451–464, Vol. 869).
- Synytsya, A., Kim, W.-J., Kim, S.-M., Pohl, R., Synytsya, A., Kvasnička, F., Čopíková, J., & Park, Y. I. (2010). Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.052>
- Taboada, M. C., Millán, R., & Míguez, M. I. (2013). Valor nutricional das algas marinhas wakame (*Undaria pinnatifida*) e nori (*Porphyra purpurea*) como suplementos alimentares. *Journal of Applied Phycology*, 25(6), 1271–1276. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9951-9>
- Talarico, L. B., Duarte, M. E. R., Zibetti, R. G. M., Nosedá, M. D., & Damonte, E. B. (2007). An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. *Planta Medica*, 73(14), 1464–1468. <https://doi.org/10.1055/s-2007-990241>
- Tan, I. S., Lam, M. K., & Lee, K. T. (2013). Hydrolysis of macroalgae using heterogeneous catalyst for bioethanol production. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 561–566. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.042>
- Tang, H., Inoue, M., Uzawa, Y., & Kawamura, Y. (2008). Anti-tumorigenic components of a seaweed, *Eteromorpha clathrata*. *BioFactors*, 32(2), 101–107. <https://doi.org/10.1002/biof.5520220121>
- Taylor, D. N., Trofa, A. C., Sadoff, J., Chu, C., Bryla, D., Shiloach, J., Cohen, D., Ashkenazi, S., Lerman, Y., Egan, W., & et al. (1993). Synthesis, characterization, and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of the O-specific polysaccharides of *Shigella dysenteriae* type 1, *Shigella flexneri* type 2a, and *Shigella sonnei* (*Plesiomonas shigelloides*) bound to bacterial toxoids. *Infection and Immunity*, 61(9), 3678–3687. <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3678-3687.1993>
- Terasaki, M., Kuramitsu, Y., Kojoma, M., Kim, S.-Y., Tanaka, T., Maeda, H., Miyashita, K., Kawagoe, C., Kohno, S., & Mutoh, M. (2020). High fucoxanthin wakame (*Undaria pinnatifida*) prevents tumor microenvironment formation in an AOM/DSS mouse carcinogenic model. *Journal of Functional Foods*, 64, 103709. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103709>
- Thompson, J. M. (2018). *Infrared spectroscopy* (1st). Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/9781351206037>
- Tounsi, L., Ben Hlima, H., Hentati, F., Hentati, O., Derbel, H., Michaud, P., & Abdelkafi, S. (2023). Microalgae: A promising source of bioactive phycobiliproteins. *Marine Drugs*, 21(8), 440. <https://doi.org/10.3390/md21080440>

- Tramper, J., Battershill, C., & Brandenburg, W. (2003). What to do in marine biotechnology? *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 467–471. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00077-7)
- Tziveleka, L.-A., Tammam, M. A., Tzakou, O., Roussis, V., & Ioannou, E. (2021). Metabolites with antioxidant activity from marine macroalgae. *Antioxidants*, 10(9), 1431. <https://doi.org/10.3390/antiox10091431>
- Ummat, V., Tiwari, B., Jaiswal, A., Condon, K., Garcia-Vaquero, M., O'Doherty, J., O'Donnell, C., & Rajauria, G. (2020). Optimisation of ultrasound frequency, extraction time and solvent for the recovery of polyphenols, phlorotannins and associated antioxidant activity from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 18, 250.
- Ventura, G., Bianco, M., Calvano, C. D., Bianco, G., Di Capua, A., Coniglio, D., Losito, I., & Cattaldi, T. R. I. (2024). Mass spectrometric characterization of aminophospholipids containing N-(2-hydroxyethyl)glycine in kombu algae extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1002/rcm.9843>
- Vlaisavljević, S., Rašeta, M., Berežni, S., Passamonti, S., & Tramer, F. (2021a). Four selected commercial seaweeds: Biologically active compounds, antioxidant and cytotoxic properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(6), 757–766. <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1866503>
- Vlaisavljević, S., Rašeta, M., Berežni, S., Passamonti, S., & Tramer, F. (2021b). Four selected commercial seaweeds: Biologically active compounds, antioxidant and cytotoxic properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(6), 757–766. <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1866503>
- Vo, T.-S., Ngo, D.-H., & Kim, S.-K. (2012). Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics. *Process Biochemistry*, 47(3), 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.014>
- Wahlström, N., Harrysson, H., Undeland, I., & Edlund, U. (2018). A strategy for the sequential recovery of biomacromolecules from red macroalgae *Porphyra umbilicalis* Kützling. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 57(1), 42–53. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b03768>
- Wang, F., Wang, L., Qu, C., & et al. (2021). Kaempferol induces ROS-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells via TGM2-mediated Akt/mTOR signaling. *BMC Cancer*, 21, 396. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08158-z>
- Wang, J., Wang, Y., Xu, L., Wu, Q., Wang, Q., Kong, W., & Zhang, J. (2018). Synthesis and structural features of phosphorylated *Artemisia sphaerocephala* polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 181, 19–26.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>
- Wang, Y., Fang, X., Wang, C., Ding, C., Lin, H., Liu, A., Wang, L., & Cao, Y. (2017). Exogenous PTHrP repairs the damaged fracture healing of PTHrP+/- mice and accelerates fracture healing of wild mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 337. <https://doi.org/10.3390/ijms18020337>

- Wei, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Yoshida, K., Endo, G., & et al. (2002). Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis*, 23(8), 1387–1397.
- Wei, P., Deng, M., Ding, Y., Xia, D., Yan, Z., & Chen, T. (2023). Antioxidant activity of polysaccharides from natural sources. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 80(5), 705–716. <https://doi.org/10.32383/appdr/173189>
- Wei, Y., Liu, Q., Yu, J., Feng, Q., Zhao, L., Song, H., & Wang, W. (2014). Antibacterial mode of action of 1,8-dihydroxy-anthraquinone from *Porphyra haitanensis* against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*, 29(10), 976–979. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.964705>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wiley. (2005). Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions. *Limnology and Oceanography: Methods*, 3, 419. <https://doi.org/10.4319/lom.2005.3.419>
- Witvrouw, M., & De Clercq, E. (1997). Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology*, 29, 497–511. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(96\)00563-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00563-0)
- World Health Organisation. (2017). Arsenic [Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/#.WV5hIWgAVaM>.mendeley (accessed on 6 July 2017)].
- World Health Organization. (2018). Arsenic [Available online: <https://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/Metals/ucm280202.htm> (accessed on 8 March 2018)].
- Wuryatmo, E., Suri, A., & Naufalin, R. (2021). Antioxidant activities of lemongrass with solvent multi-step extraction microwave-assisted extraction as natural food preservative. *Journal of Functional Food and Nutraceutical*, 2(2), 117–128. <https://doi.org/10.33555/jffn.v2i2.61>
- Xie, C., Lee, Z. J., Ye, S., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2023). A Review on Seaweeds and Seaweed-Derived Polysaccharides: Nutrition, Chemistry, Bioactivities, and Applications. *Food Reviews International*, 1–36. <https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2212055>
- Xu, N., Fan, X., Yan, X., Li, X., Niu, R., & Tseng, C. K. (2003). Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry*, 62(8), 1221–1224. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00004-9)
- Xu, S.-Y., Huang, X., & Cheong, K.-L. (2017). Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. *Marine Drugs*, 15, 388. <https://doi.org/10.3390/md15120388>
- Yamamoto, S., Konishi, Y., Matsuda, T., Murai, T., Shibata, M. A., Matsui-Yuasa, I., & Fukushima, S. (1995). Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Research*, 55(6), 1271–1276.
- Yang, C., Chung, D., Shin, I.-S., Lee, H., Kim, J., Lee, Y., & You, S. (2008). Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of

- Undaria pinnatifida. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(5), 433–437. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.08.006>
- Yang, F., & Cheung, P. C. K. (2023). Fungal β -glucan-based nanotherapeutics: From fabrication to application. *Journal of Fungi*, 9(4), 475. <https://doi.org/10.3390/jof9040475>
- Yang, J., Gao, T., Wang, Q., Xu, J., Zhou, F., Ding, Y., Du, H., Pan, S., Tao, Y., & Wu, Y. (2024). Ultrasound-assisted fermentation of *Porphyra yezoensis* sauce at different growth stages using *Lactiplantibacillus plantarum*: Metabolic response and biological activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 102, 106727. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106727>
- Yasuda, M., Ohzeki, Y., Shimizu, S., Naito, S., Ohtsuru, A., Yamamoto, T., & Kuroiwa, Y. (1998). Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with Ets-1 in endothelial cells. *Life Sciences*, 64(4), 249–258. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00560-8)
- Yeh, J. Y., Hsieh, L. H., Wu, K. T., Tsai, C. F., & Chung, K. T. (2011). Antioxidant properties and antioxidant compounds of various extracts from the edible basidiomycete *Grifola frondosa* (Maitake). *Molecules*, 16(4), 3197–3211. <https://doi.org/10.3390/molecules16043197>
- Yim, S.-K., Kim, K., Kim, I., Chun, S., Oh, T., Kim, J.-U., Kim, J., Jung, W., Moon, H., & Ku, B. (2021). Inhibition of SARS-CoV-2 virus entry by the crude polysaccharides of seaweeds and abalone viscera in vitro. *Marine Drugs*, 19(4), 219. <https://doi.org/10.3390/md19040219>
- Yin, S., Shibata, M., & Hagiwara, T. (2019). Extraction of bioactive compounds from stems of *Undaria pinnatifida*. *Food Science and Technology Research*, 25(6), 765–773. <https://doi.org/10.3136/fstr.25.765>
- Yoshie-Stark, Y., Hsieh, Y. P., & Suzuki, T. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 89, 1–6.
- Zakaria, S. M., & Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Engineering Reviews*, 8, 23–34. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9119-x>
- Zayed, A., & Ulber, R. (2019). Fucoïdan production: Approval key challenges and opportunities. *Carbohydrate Polymers*, 211, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.105>
- Zhang, L., Wang, H., & Fan, Y. (2017). Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways. *Scientific Reports*, 7, 46763. <https://doi.org/10.1038/srep46763>
- Zhao, X., Li, B., Xue, C., & Sun, L. (2012). Effect of molecular weight on the antioxidant property of low molecular weight alginate from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 24, 295–300. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9679-y>
- Zhao, X., Xue, C. H., & Li, B. F. (2008). Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 20(4), 431–436. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9282-4>

Capítulo 6

Anexos

A.1 Curvas de calibração dos doseamentos colorimétricos.

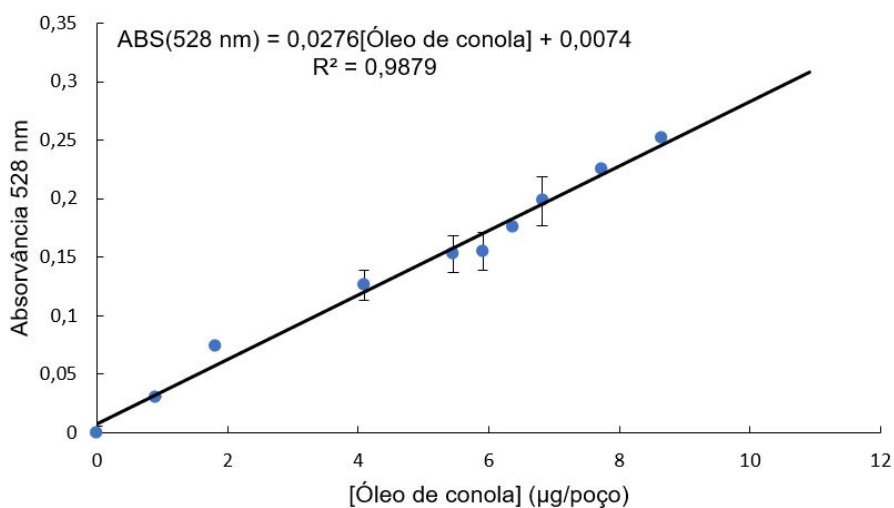


Figura A.1 Curva de calibração do óleo de canola para o método do SPV para a quantificação de lípidos ($n = 3$).

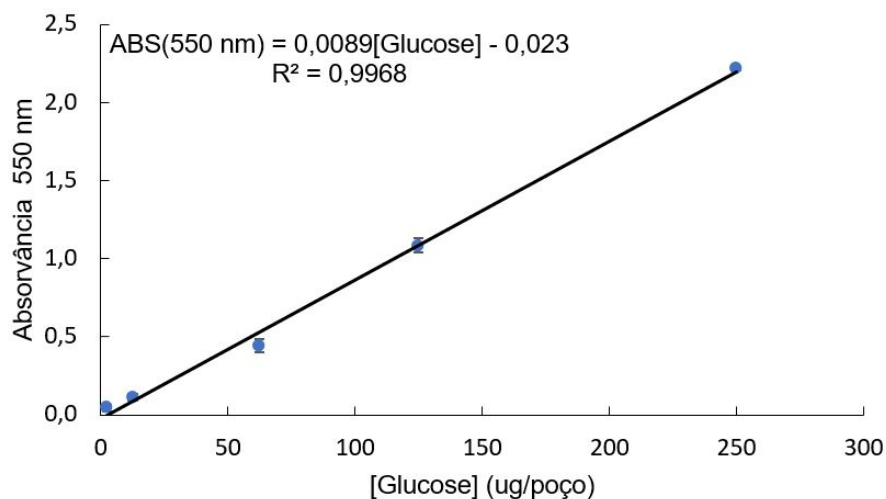


Figura A.2 Curva de calibração da glicose para o método DNS para a quantificação de açúcares redutores ($n = 3$).

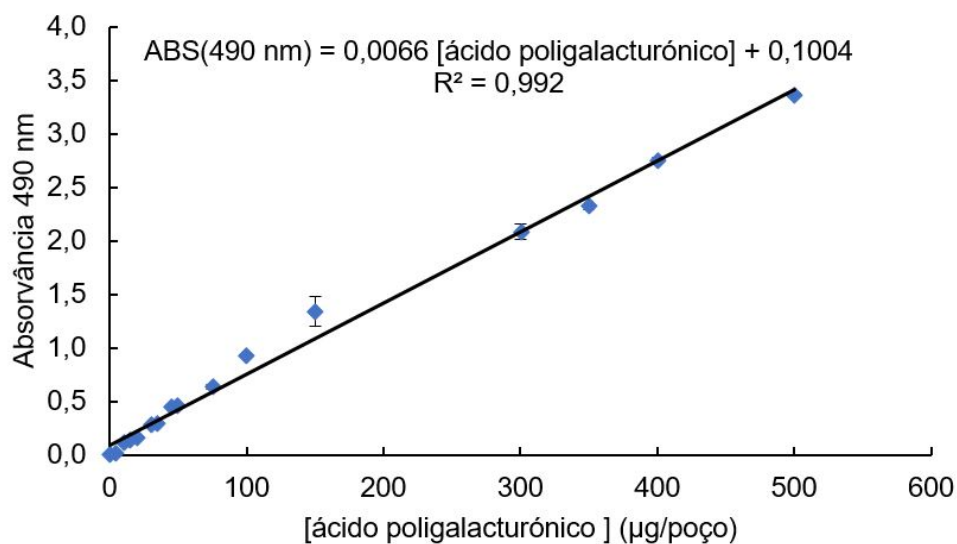


Figura A.3 Curva de calibração de ácido poligalacturônico para o método fenol ácido sulfúrico para a quantificação de carboidratos totais ($n = 3$).

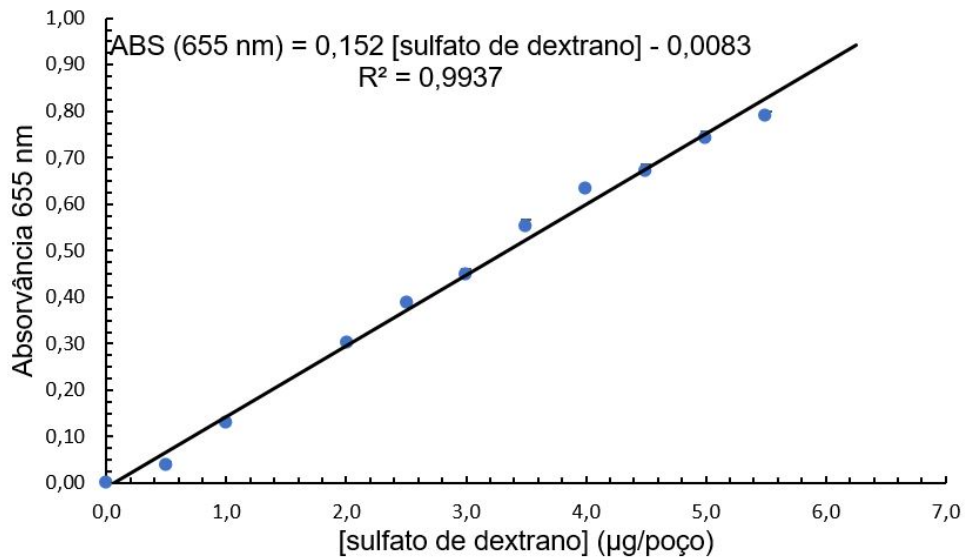


Figura A.4 Curva de calibração de sulfato de dextrano para o método com azul de toluidina para a quantificação de polissacáridos sulfatados ($n = 3$).

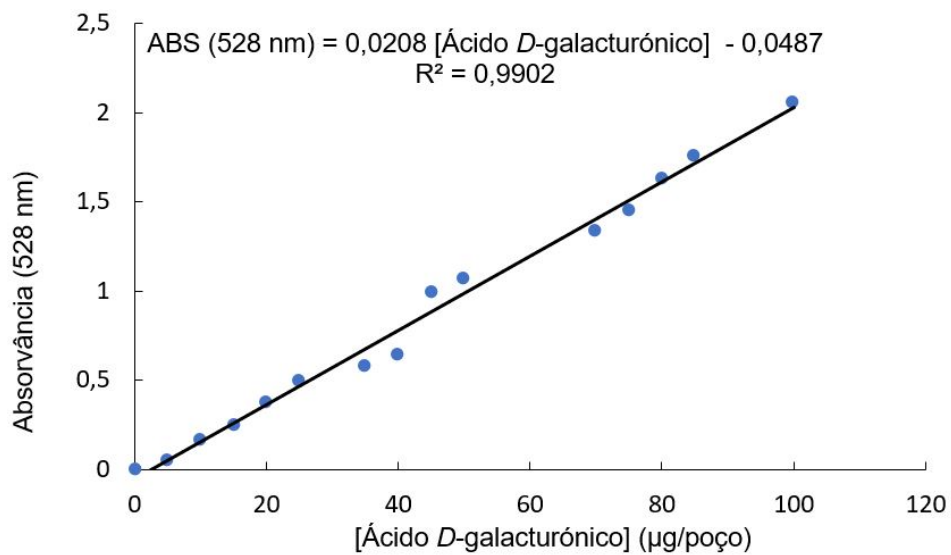


Figura A.5 Curva de calibração de ácido D-galacturônico para o método Carbazol ácido sulfúrico para a quantificação de polissacáridos ácidos ($n = 3$).

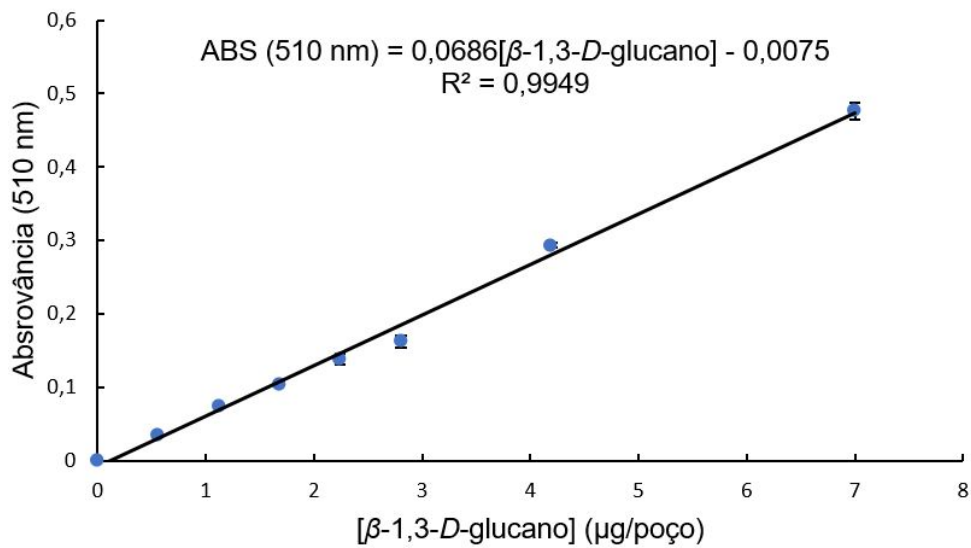


Figura A.6 Curva de calibração de β -1,3-D-glucano de cevada para o método do corante Congo red para a quantificação de β -1,3-D-glucano ($n = 3$).

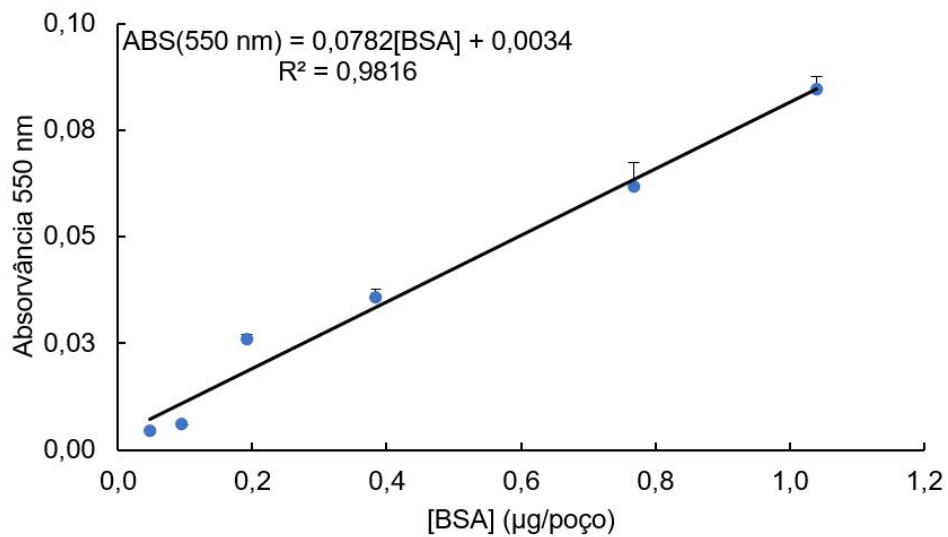


Figura A.7 Curva de calibração da BSA para o método de Bradford para a quantificação de proteína total ($n = 3$).

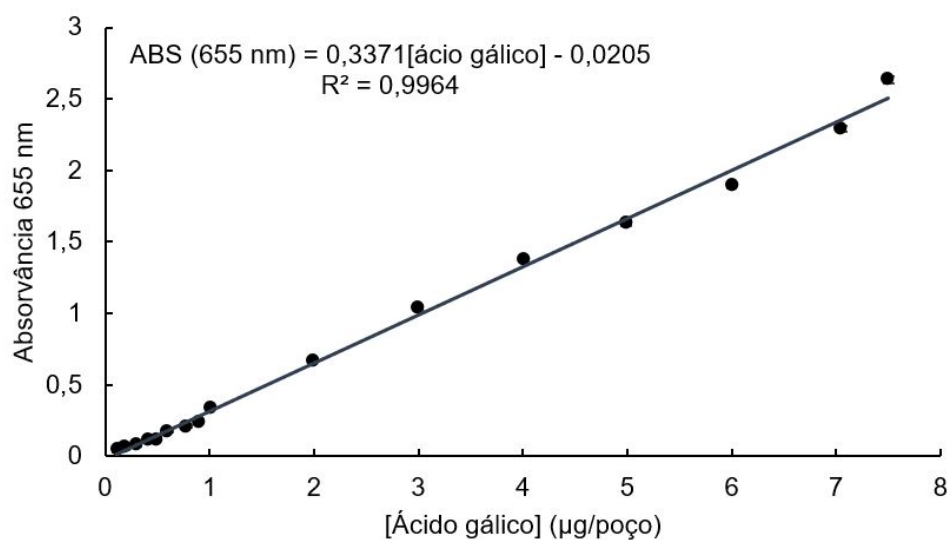


Figura A.8 Curva de calibração de ácido gálico para o método de Folin Ciocalteu para a quantificação de compostos fenólicos totais ($n = 3$).

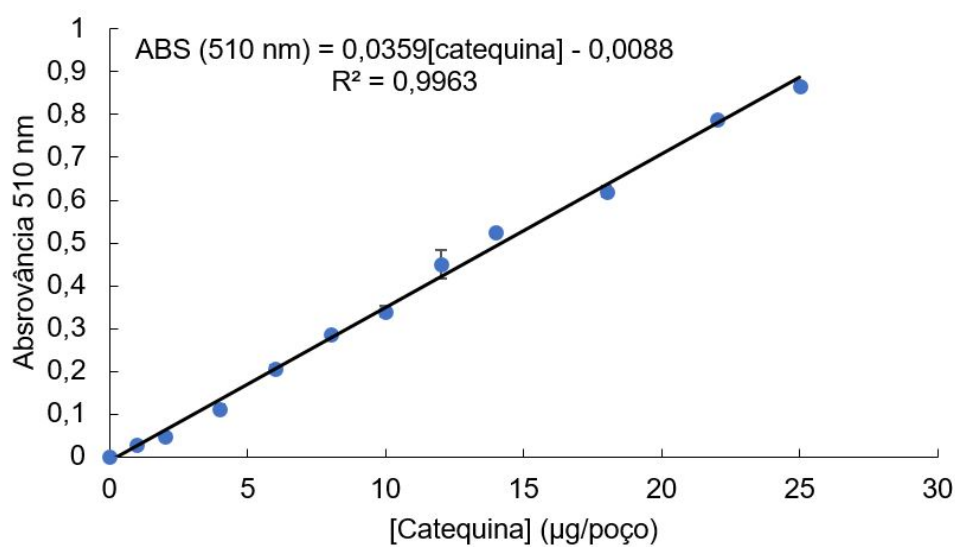


Figura A.9 Curva de calibração de catequina para o método do cloreto de alumínio para a quantificação de compostos flavonoides totais ($n = 3$).

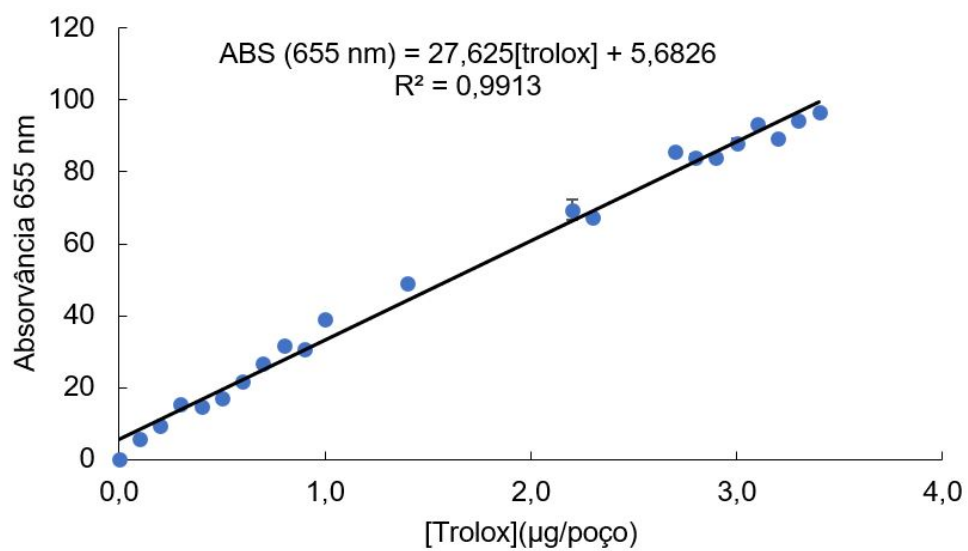


Figura A.10 Curva de calibração de trolox para o método de descoloração do radical catiónico ABTS ($n = 3$).

A.2 Doseamentos por métodos colorimétricos dos biocompostos

Tabela A.1 Doseamentos por métodos colorimétricos dos extratos AAE de todas as algas estudadas (ND – Não detetado).

Extratos AAE	NC	UPJ	UPC	LLJ	KK
Lípidos (mg/g amostra)	8,97 ± 1,12	5,53 ± 0,08	10,22 ± 0,39	6,22 ± 0,18	0,53 ± 0,34
Açúcares redutores (mg/g amostra)	6,73 ± 0,89	4,06 ± 0,22	2,60 ± 0,74	1,78 ± 0,30	1,9
Polissacáridos totais (mg/g amostra)	1131,01 ± 7,29	319,09 ± 2,00	410,70 ± 4,88	398,08 ± 5,90	443,82 ± 6,30
Polissacáridos sulfatados (mg/g amostra)	44,26 ± 0,38	37,90 ± 0,49	45,19 ± 1,14	9,70 ± 0,24	7,09 ± 0,00
Polissacáridos ácidos (mg/g amostra)	49,69 ± 1,52	88,98 ± 1,44	51,95 ± 2,70	51,33 ± 2,36	56,73 ± 2,71
β -1,3-D-glucanos (mg/g amostra)	ND	0,53 ± 0,05	ND	ND	ND
Proteína (mg/g amostra)	12,35 ± 1,09	1,04 ± 0,02	4,89 ± 0,29	1,98 ± 0,16	0,63 ± 0,12
Fenólicos (mg GAE/g amostra)	9,14 ± 0,24	0,91 ± 0,10	0,87 ± 0,02	0,84 ± 0,11	1,17 ± 0,11
Flavonoides (mg CAE / g amostra)	4,05 ± 0,37	1,71,66 ± 0,68	ND	2,60 ± 0,76	2,58 ± 0,22
Atividade antioxidante (mg TE/ g amostra)	15,13 ± 0,48	0,38 ± 0,14	0,85 ± 0,50	0,80 ± 0,18	2,19 ± 0,17
Capacidade quelante de íões Fe ²⁺ (%)	10,00	1,67 ± 0,13	ND	ND	ND

Valores médios ± DP dos replicados; n = 3.

Tabela A.2 Doseamentos de lípidos, proteínas, compostos fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante para os extratos MSE de todas as algas estudadas (ND – Não detetado).

Extratos MSE	Lípidos (mg / g amostra)	Proteína (mg / g amostra)	Fenólicos (mg GAE/g amostra)	Flavonoides (mg CAE / g amostra)	Atividade antioxidante ABTS++ (mg TE/ g amostra)	Capacidade quelante de íões Fe2+ (%)
NC(FW1)	3,74 ± 0,05	7,42 ± 0,13	6,50 ± 0,26	1,51 ± 0,30	9,21 ± 0,04	ND
NC(FW2)	6,45 ± 0,21	5,78 ± 0,52	1,30 ± 0,05	ND	2,06 ± 0,04	ND
NC(FKOH)	0,87 ± 0,00	71,69 ± 0,85	14,25 ± 0,23	ND	12,48 ± 0,70	ND
NC(FHCl)	0,93 ± 0,64	17,36 ± 0,39	0,46 ± 0,05	0,85 ± 0,10	0,94 ± 0,02	47,56 ± 12,60
NC(FNaOH)	ND	0,29 ± 0,03	ND	8,95 ± 0,99	ND	ND
UPJ(FW1)	1,88 ± 0,50	0,60 ± 0,00	0,31 ± 0,02	2,42 ± 0,15	0,33 ± 0,05	ND
UPJ(FW2)	3,46 ± 0,35	1,17 ± 0,24	0,26 ± 0,01	0,64 ± 0,02	0,35 ± 0,11	ND
UPJ(FKOH)	ND	23,79 ± 1,49	7,24 ± 0,21	0,9ND	12,58 ± 0,39	ND
UPJ(FHCl)	ND	5,43 ± 0,85	1,41 ± 0,17	7,73 ± 1,48	8,00 ± 0,84	ND
UPJ(FNaOH)	11,33 ± 0,00	6,36 ± 1,15	0,14 ± 0,04	6,94 ± 0,71	2,83 ± 0,27	ND
UPC(FW1)	0,70 ± 0,14	11,05 ± 0,80	0,13 ± 0,02	ND	ND	2,84 ± 1,15
UPC(FW2)	2,76 ± 0,06	2,39 ± 0,21	0,26 ± 0,01	0,88 ± 0,31	0,30 ± 0,07	ND
UPC(FKOH)	5,06 ± 1,08	32,9 ± 1,12	9,10 ± 0,46	ND	9,30 ± 0,25	ND
UPC(FHCl)	5,63 ± 0,05	73,39 ± 0,55	5,12 ± 0,20	13,84 ± 0,82	9,33 ± 0,20	82,56 ± 8,65
UPC(FNaOH)	4,03 ± 1,52	6,09 ± 0,00	0,12 ± 0,04	9,89 ± 1,89	0,67 ± 0,12	ND
LLJ(FW1)	1,76 ± 0,13	1,05 ± 0,00	0,35 ± 0,03	ND	0,96 ± 0,10	ND
LLJ(FW2)	2,85 ± 0,01	1,77 ± 0,41	0,24 ± 0,01	ND	0,47 ± 0,02	ND
LLJ(FKOH)	ND	17,45 ± 1,39	0,75 ± 0,04	ND	0,93 ± 0,07	ND
LLJ(FHCl)	0,26 ± 0,07	2,69 ± 0,06	0,29 ± 0,06	2,30 ± 0,09	1,09 ± 0,13	ND
LLJ(FNaOH)	ND	1,12 ± 0,12	ND	5,01 ± 1,92	ND	ND
KK(FW1)	1,77 ± 0,02	1,79 ± 0,07	0,64 ± 0,00	0,94 ± 0,21	ND	10,58 ± 9,39
KK(FW2)	0,57 ± 0,07	1,60 ± 0,70	0,39 ± 0,01	ND	2,28	ND
KK(FKOH)	ND	5,54 ± 0,06	5,25 ± 0,52	ND	0,85	ND
KK(FHCl)	1,82 ± 0,00	7,40 ± 0,87	1,06 ± 0,09	2,92 ± 0,33	1,6	ND
KK(FNaOH)	ND	4,85 ± 0,00	0,09 ± 0,01	5,48 ± 1,34	3,6	47,36 ± 15,00

Valores médios ± DP dos replicados; n = 3.

Tabela A.3 Doseamentos de carboidratos os extratos MSE de todas as algas estudadas (ND – Não detetado).

Extratos MSE	Açúcares Redutores (mg / g amostra)	Carboidratos totais (mg/ g amostra)	Polissacáridos sulfatados (mg/g amostra)	Polissacáridos ácidos (mg/g amostra)	β -1,3-D-glucanos (mg/g amostra)
NC(FW1)	2,70 \pm 0,13	152,05 \pm 1,33	3,09 \pm 0,13	18,28 \pm 0,36	ND
NC(FW2)	1,32 \pm 0,22	213,90 \pm 15,82	0,55 \pm 0,08	15,33 \pm 0,45	ND
NC(FKOH)	3,96 \pm 0,94	265,39 \pm 5,73	15,78 \pm 0,22	39,76 \pm 0,64	ND
NC(FHCl)	0,69 \pm 0,11	144,496 \pm 0,98	1,88 \pm 0,03	6,85 \pm 0,11	0,06 \pm 0,03
NC(FNaOH)	1,57 \pm 0,17	42,40 \pm 2,32	2,70 \pm 0,03	17,96 \pm 0,16	ND
UPJ(FW1)	0,78 \pm 0,12	76,68 \pm 2,34	21,55 \pm 0,00	22,73 \pm 0,70	ND
UPJ(FW2)	0,73 \pm 0,03	246,51 \pm 0,49	20,87 \pm 1,35	22,28 \pm 0,81	ND
UPJ(FKOH)	2,00 \pm 0,60	255,72 \pm 2,14	77,01 \pm 1,56	48,58 \pm 2,10	ND
UPJ(FHCl)	1,25 \pm 0,50	63,53 \pm 11,28	19,68 \pm 1,11	22,79 \pm 0,38	ND
UPJ(FNaOH)	1,09 \pm 0,30	65,19 \pm 7,30	8,03 \pm 0,70	21,32 \pm 0,64	ND
UPC(FW1)	0,38 \pm 0,15	20,380,31	10,44 \pm 0,76	19,25 \pm 0,47	0,21 \pm 0,03
UPC(FW2)	0,70 \pm 0,06	91,88 \pm 0,90	0,97 \pm 0,20	19,50 \pm 1,31	ND
UPC(FKOH)	2,77 \pm 0,12	401,62 \pm 15,84	83,75 \pm 1,65	52,61 \pm 2,15	ND
UPC(FHCl)	3,54 \pm 0,10	197,68 \pm 1,28	41,41 \pm 0,87	38,78 \pm 0,82	0,65 \pm 0,10
UPC(FNaOH)	1,84 \pm 0,05	27,49 \pm 6,96	7,56 \pm 0,70	22,81 \pm 0,36	ND
LLJ(FW1)	1,05 \pm 0,45	176,28 \pm 1,60	2,49 \pm 0,05	9,78 \pm 0,16	ND
LLJ(FW2)	0,83 \pm 0,25	95,78 \pm 1,78	4,59 \pm 0,29	14,59 \pm 0,58	ND
LLJ(FKOH)	2,47 \pm 0,85	344,83 \pm 1,82	4,51 \pm 0,00	55,66 \pm 2,22	ND
LLJ(FHCl)	0,51 \pm 0,04	100,09 \pm 1,71	1,16 \pm 0,06	15,34 \pm 0,84	ND
LLJ(FNaOH)	1,43 \pm 0,27	7,18 \pm 1,46	4,30 \pm 0,32	18,54 \pm 0,37	ND
KK(FW1)	1,11 \pm 0,07	94,84 \pm 2,92	8,30 \pm 0,52	11,78 \pm 0,10	ND
KK(FW2)	0,47 \pm 0,08	123,86 \pm 0,84	3,26 \pm 0,31	14,97 \pm 0,24	0,06 \pm 0,02
KK(FKOH)	0,93 \pm 0,16	193,98 \pm 4,78	1,71 \pm 0,06	40,58 \pm 2,00	ND
KK(FHCl)	0,82 \pm 0,22	115,59 \pm 0,79	2,17 \pm 0,40	16,98 \pm 0,23	ND
KK(FNaOH)	0,68 \pm 0,12	305,56 \pm 15,05	34,11 \pm 0,57	17,18 \pm 0,59	ND

Valores médios \pm DP dos replicados; $n = 3$.

Tabela A.4 Doseamentos por métodos colorimétricos dos extratos MAE da alga nori.

Extratos MAE	NC(MAE_KOH)	NC(MAE_W)
Lípidos (mg/g amostra)	6,4 ± 1,2	399 ± 12
Açúcares redutores (mg/g amostra)	12,07 ± 1,19	87,83 ± 8,89
Carboidratos totais (mg/g amostra)	156,61 ± 12,38	1271,26 ± 64,28
Polissacarídeos sulfatados (mg/g amostra)	11,58 ± 2,67	6,53 ± 0,50
Polissacarídeos ácidos (mg/g amostra)	26,30 ± 0,13	28,04 ± 0,50
β -1,3-D-glucanos (mg/g amostra)	0,20 ± 0,00	4,55 ± 0,00
Proteína (mg/g amostra)	18,83 ± 2,33	9,84 ± 1,69
Ficocianina (mg/g amostra)	0,27	0,12
Aloficocianina (mg/g amostra)	0,48	0,09
Ficoeritrina (mg/g amostra)	0,49	0,12
Fucoxantina (ug/ g amostra)	866,78	1047,83
Compostos fenólicos (mg GAE/g amostra)	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Flavonoides totais (mg CAE/ g amostra)	11,49 ± 1,88	16,64 ± 0,49
atividade Antioxidante (mg TE/ g amostra)	1,29 ± 0,15	49,52 ± 10,09
Capacidade quelante de íões Fe ²⁺ (%)	31,48 ± 16,30	67,17 ± 1,79

Valores médios ± DP dos replicados; $n = 3$.

Tabela A.5 Quantificação de clorofilas dos extratos acetona, AAE, MSE e MAE da alga nori estudada (ND - Não Determinado).

Conteúdo em clorofilas ($\mu\text{g/g}$ amostra)			
Extrato	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a + b</i>
NC(acetona)	119,22	ND	119,21
NC(AAE)	190,65	336,03	526,69
NC(FW1)	50,95	100,56	151,51
NC(FW2)	40,16	72,14	112,30
NC(FKOH)	600,85	55,08	509,36
NC(FHCl)	41,51	39,65	81,16
NC(FNaOH)	7,02	6,93	13,95
NC(MAE_KOH)	673,24	793,14	1466,38
NC(MAE_W)	137,01	273,51	410,52

Tabela A.6 Quantificação de clorofilas dos extratos acetona, AAE e MSE da alga wakame estudada (ND - Não Determinado).

Conteúdo em clorofilas ($\mu\text{g/g}$ amostra)			
Extrato	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a + b</i>
UPC(acetona)	57,70	29,48	87,18
UPC(AAE)	24,92	35,12	60,04
UPC(FW1)	14,60	20,90	35,50
UPC(FW2)	5,93	9,14	15,07
UPC(FKOH)	156,49	138,15	294,64
UPC(FHCl)	729,84	499,47	1229,31
UPC(FNaOH)	53,55	51,32	104,87
UPJ(acetona)	133,98	1,08	135,05
UPJ(AAE)	93,21	136,07	229,29
UPJ(FW1)	12,14	19,96	32,10
UPJ(FW2)	7,09	11,79	18,88
UPJ(FKOH)	132,05	119,61	251,65
UPJ(FHCl)	66,56	86,88	153,45
UPJ(FNaOH)	43,95	41,54	85,50

Tabela A.7 Quantificação de clorofilas dos extratos acetona, AAE e MSE da alga kombu estudada (ND - Não Determinado).

Conteúdo em clorofilas ($\mu\text{g/g}$ amostra)			
Extrato	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a + b</i>
LLJ(acetona)	173,01	4,86	177,87
LLJ(AAE)	75,79	128,43	204,22
LLJ(FW1)	8,21	13,64	21,84
LLJ(FW2)	11,36	18,79	30,16
LLJ(FKOH)	89,14	130,59	219,73
LLJ(FHCl)	22,68	26,10	48,78
LLJ(FNaOH)	8,70	12,06	20,76
KK(acetona)	184,95	6,57	191,52
KK(AAE)	61,50	96,01	157,51
KK(FW1)	77,45	132,77	210,22
KK(FW2)	23,73	36,26	59,99
KK(FKOH)	55,34	59,85	115,19
KK(FHCl)	158,08	162,29	320,37
KK(FNaOH)	39,18	33,75	72,93

Tabela A.8 Quantificação de carotenoides totais e fucoxantina dos extratos acetona, AAE, MSE e MAE da alga nori estudada (ND - Não Determinado).

Conteúdo em carotenoides ($\mu\text{g/g}$ amostra)		
Extrato	Carotenoides Totais	Fucoxantina
NC(acetona)	24,57	ND
NC(AAE)	268,23	263,15
NC(FW1)	160,74	182,52
NC(FW2)	42,40	37,83
NC(FKOH)	132,79	423,99
NC(FHCl)	21,04	23,35
NC(FNaOH)	4,30	4,06
NC(MAE_KOH)	402,61	470,69
NC(MAE_W)	229,55	209,77

Tabela A.9 Quantificação de carotenoides totais e fucoxantina dos extratos acetona, AA e, MSE da alga wakame estudada (ND - Não Determinado).

Conteúdo em carotenoides ($\mu\text{g/g}$ amostra)		
Extrato	Carotenoides Totais	Fucoxantina
UPC(acetona)	1,54	ND
UPC(AAE)	21,75	19,14
UPC(FW1)	9,19	7,25
UPC(FW2)	5,54	4,96
UPC(FKOH)	81,15	83,85
UPC(FHCl)	347,87	403,69
UPC(FNaOH)	42,29	42,42
UPJ(acetona)	6,59	ND
UPJ(AAE)	30,27	19,34
UPJ(FW1)	7,31	5,56
UPJ(FW2)	6,37	5,78
UPJ(FKOH)	100,57	101,17
UPJ(FHCl)	80,03	86,51
UPJ(FNaOH)	50,83	53,30

Tabela A.10 Quantificação de carotenoides totais e fucoxantina dos extratos acetona, AA e, MSE da alga wakame estudada (ND - Não Determinado).

Conteúdo em carotenoides ($\mu\text{g/g}$ amostra)		
Extrato	Carotenoides Totais	Fucoxantina
LLJ(acetona)	13,16	ND
LLJ(AAE)	48,94	38,74
LLJ(FW1)	7,80	7,37
LLJ(FW2)	6,11	4,29
LLJ(FKOH)	56,05	47,79
LLJ(FHCl)	19,03	18,85
LLJ(FNaOH)	8,97	3,51
KK(acetona)	12,54	ND
KK(AAE)	43,66	39,96
KK(FW1)	62,79	46,38
KK(FW2)	24,12	22,70
KK(FKOH)	25,99	21,97
KK(FHCl)	95,16	99,57
KK(FNaOH)	45,69	50,13

A.3 Atividade Antibacteriana

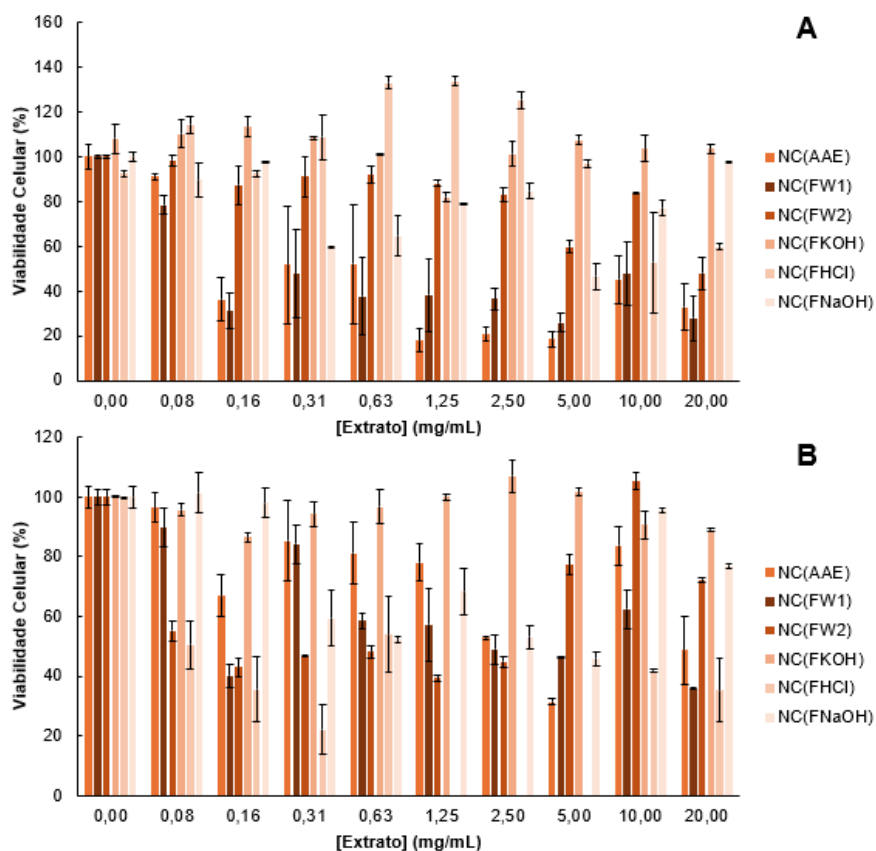


Figura A.11 Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra NC estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: **A** - *E. coli*, **B** - *S. aureus* ($n = 3$).

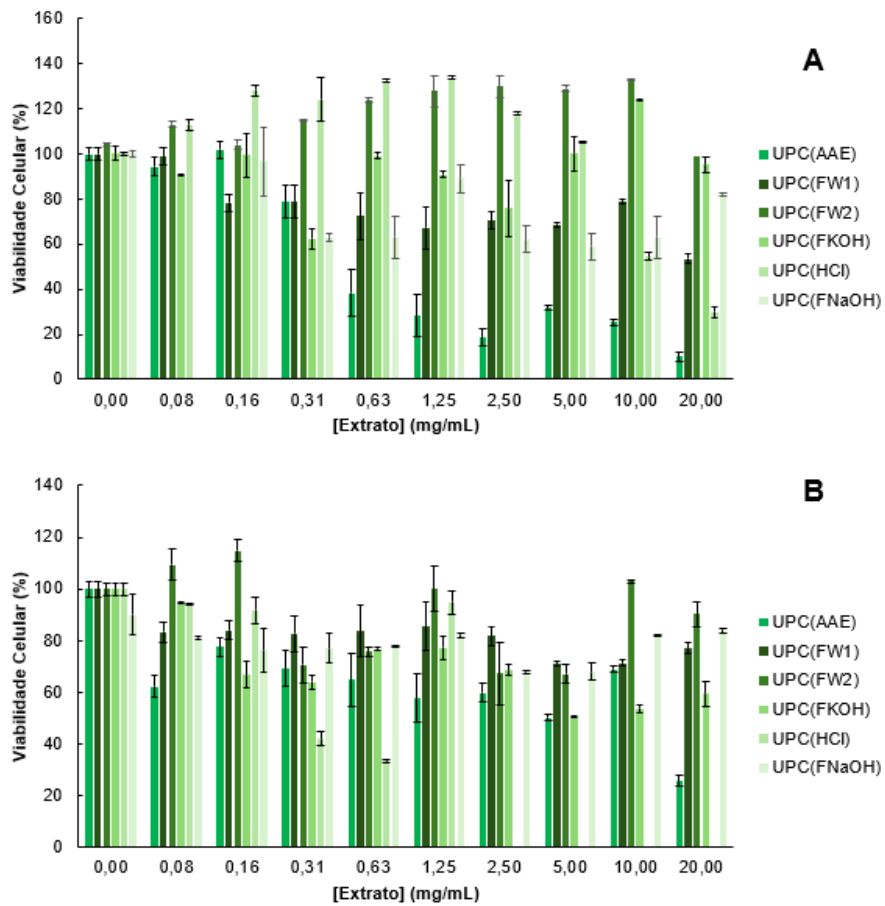


Figura A.12 Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra UPC estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: **A** - *E. coli*, **B** - *S. aureus* ($n = 3$).

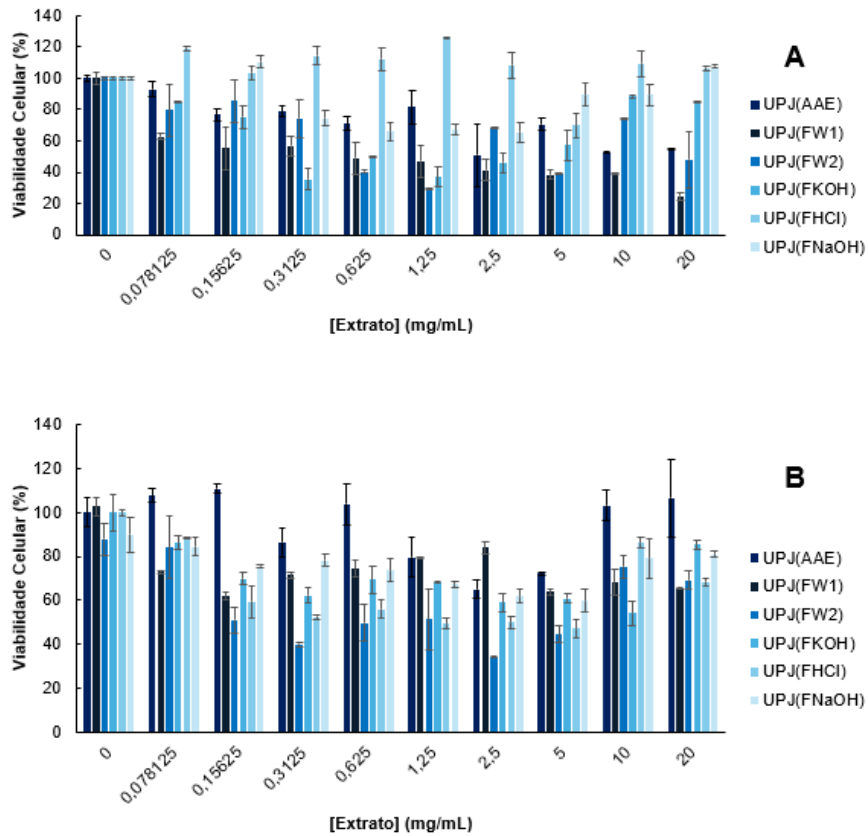


Figura A.13 Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra UPJ estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: **A** - *E. coli*, **B** - *S. aureus* ($n = 3$).

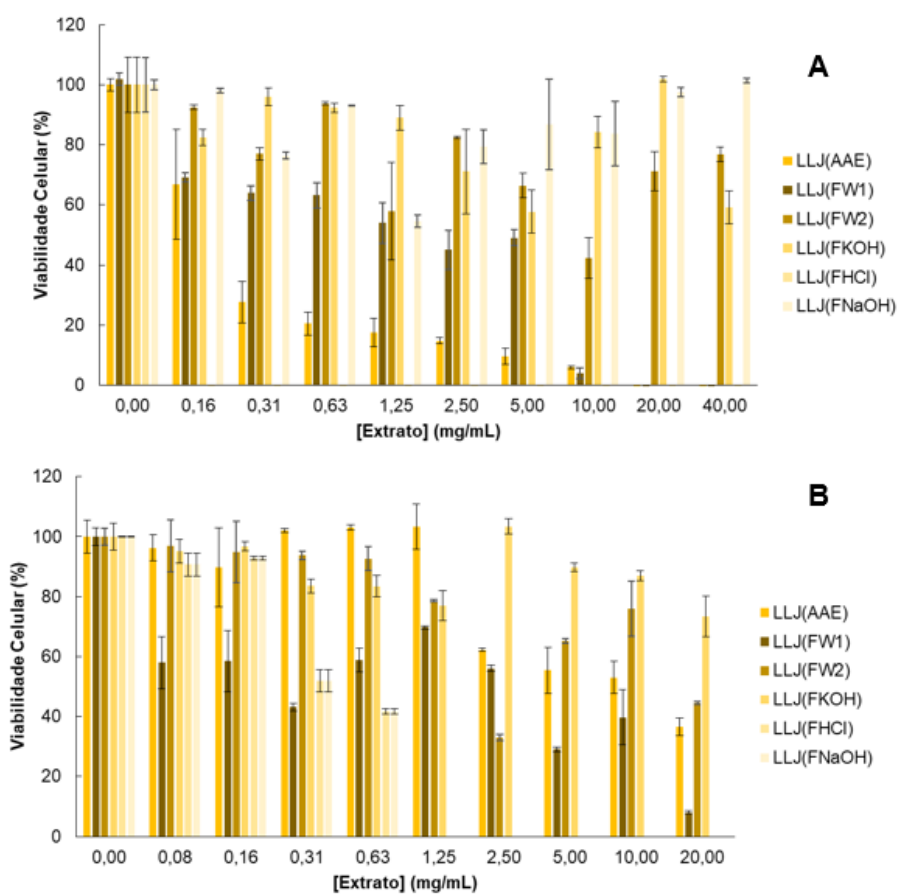


Figura A.14 Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra LLJ estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: **A** - *E. coli*, **B** - *S. aureus* ($n = 3$).

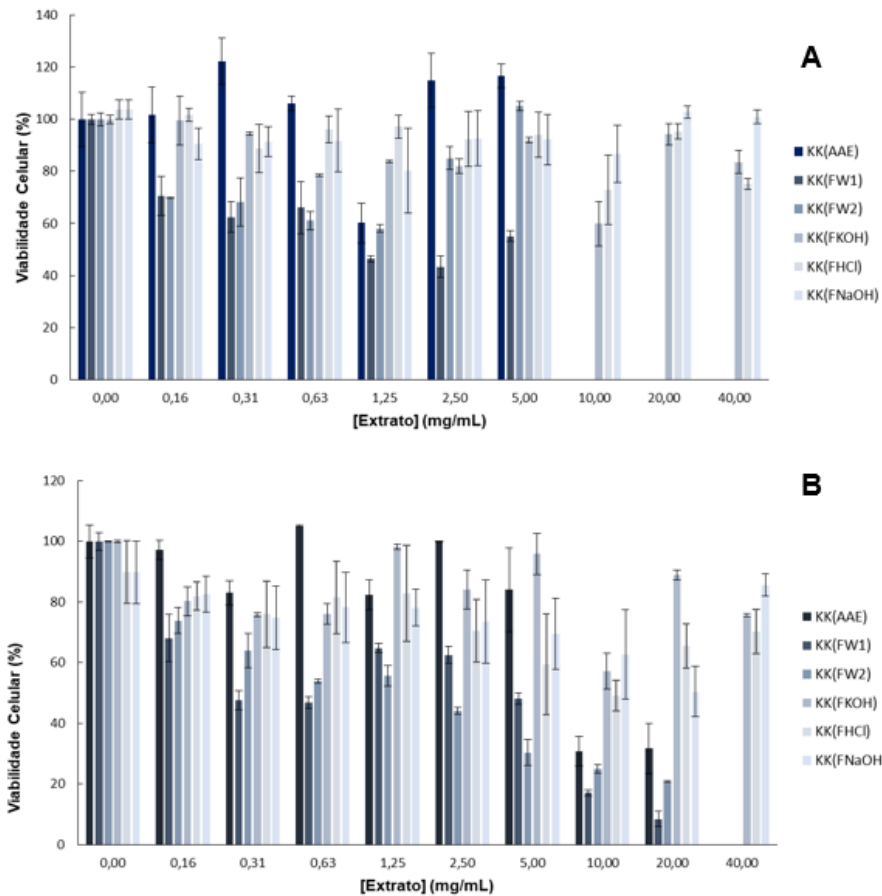


Figura A.15 Viabilidade celular dos ensaios antibacterianos para os extratos AAE e MSE em mg/g da amostra KK estudadas pelo método microdiluição em meio líquido com resazurina: **A** - *E. coli*, **B** - *S. aureus* ($n = 3$).

A.4 Recursos adicionais de FTIR

Tabela A.11 Quadro de atribuições de bandas de FTIR para a caracterização de polissacáridos (Hong *et al.*, 2021; Delattre *et al.*, 2016 e Esther *et al.*, 2020).

Região I	4000 - 2500	
	3600 - 3000	O-H extensão; forte, larga
	3000 - 2500	C-H extensão; moderada; CH e CH ₂
	2880 - 2840	Metoxilo glicosídico
Região II - Ligação duplas extensão	1800 - 1500	Dupletos; COO ⁻ ; polissacáridos peptídicos
	1730 - 1600	Carboxilo; C=O e COO ⁻
Região III - Simetria	1200 - 950	C-OH deformação; carboidratos
		CH ₂ simetria; carboidratos
	1300 - 1250	Ésteres aromáticos
	1260 - 1210	Ésteres sulfatados; O-SO ₃ ; polissacáridos sulfatados
	1250 - 1220	Grupo acetil
	1250	Derivados de furanose de pentose
	1250 - 1170	Ésteres alifáticos
	1175 - 1140	Ligações glicosídicas de polissacáridos
	1000 - 920	Ligações glicosídicas de polissacáridos
Região IV – Impressão digital	950 - 700	
	900 - 800	Região do C anomérico
	890	C β
	840 e 920	C α
	920 - 840	C α β
Região V - Esqueleto	<800	
Outras biomoléculas	1709 - 1583	
	1585 - 1481	Proteínas, amida I e amida II
	1356 - 1191	Ácidos nucleicos
	3050 - 2800	Lípidos
	cm ⁻¹	

A.5 Código Python da tabela de FTIR de polissacáridos

```
1 import pandas as pd
2 import numpy as np
3 from scipy.signal import find_peaks
4
5 # Função para carregar dados e identificar máximos locais
6 def encontrar_maximos_locais(arquivo_excel, lambdamin, lambdamax):
7     # Carregar dados do Excel
8     df = pd.read_excel(arquivo_excel)
9     # Assumindo que o arquivo tem exatamente duas colunas: comprimento de onda e
10     # absorvância
11     comprimento_onda = df.iloc[:, 0].values
12     absorvancia = df.iloc[:, 1].values
13     # Filtrar dados dentro do intervalo de comprimento de onda
14     mask = (comprimento_onda >= lambdamin) & (comprimento_onda <= lambdamax)
15     comprimento_onda_filtrado = comprimento_onda[mask]
16     absorvancia_filtrada = absorvancia[mask]
17     # Encontrar picos (máximos locais)
18     picos, _ = find_peaks(absorvancia_filtrada)
19     # Retornar os comprimentos de onda dos picos
20     comprimentos_onda_picos = comprimento_onda_filtrado[picos]
21     return comprimentos_onda_picos
22
23 def printpicos(arquivo_excel, lambdamax, lambdamin, texto ):
24     picos = encontrar_maximos_locais(arquivo_excel, lambdamin, lambdamax)
25     # Converter os índices dos picos para inteiros
26     picos = picos.astype(int)
27     print(texto,picos)# print label
28     print(" ")      # print blank line
29
30 arquivo_excel = 'FTIR.xlsx' # Nome do arquivo Excel com os dados
31
32 # região I
33 printpicos(arquivo_excel, 3600, 3000,"O-H extensão; forte, larga:" )
34 printpicos(arquivo_excel, 3000, 2500,"C-H extensão; moderada; CH e CH2:" )
35 printpicos(arquivo_excel, 2880, 2840,"Metoxilo glicosídico:" )
36
37 # região II
38 printpicos(arquivo_excel, 1800, 1500,"Dupletos; COO-; polissacáridos peptídicos:" )
39
40 # região III
41 printpicos(arquivo_excel, 1500, 1200,"carboidratos C-OH deformação, CH2 simetria:" )
42 printpicos(arquivo_excel, 1730, 1600,"Carboxilo; C=O e COO-:" )
43 printpicos(arquivo_excel, 1300, 1250,"Ésteres aromáticos:" )
44 printpicos(arquivo_excel, 1260, 1210,"Ésteres sulfatados; O-SO3; polissacáridos
45     sulfatados:" )
46 printpicos(arquivo_excel, 1250, 1220,"Grupo acetil:" )
47 printpicos(arquivo_excel, 1249, 1251,"Derivados de furanose de pentose:" )
48
49 # região IV
50 printpicos(arquivo_excel, 1250, 1170,"Ésteres alifáticos:" )
```

```

50 printpicos(arquivo_excel, 1175, 1140, "Ligações glicosídicas de polissacáridos:" )
51 printpicos(arquivo_excel, 1000, 920, "Ligações glicosídicas de polissacáridos:" )
52 printpicos(arquivo_excel, 900, 800, "Região do C anomérico:" )
53 printpicos(arquivo_excel, 889, 891, "B:" )
54 printpicos(arquivo_excel, 920, 840, "A e B:" )
55
56 # região V
57 printpicos(arquivo_excel, 800, 600, "esqueleto:" )
58
59 # contaminações
60 printpicos(arquivo_excel, 1709, 1583, "Proteínas, amida I e amida II:" )
61 printpicos(arquivo_excel, 1585, 1481, "Proteínas, amida I e amida II:" )
62 printpicos(arquivo_excel, 1356, 1191, "Ácidos nucleicos:" )
63 printpicos(arquivo_excel, 3050, 2800, "Lípidos:" )

```

Listing A.1 Código Pyton da tabela de FTIR de polissacáridos

A.6 Espectros de FTIR

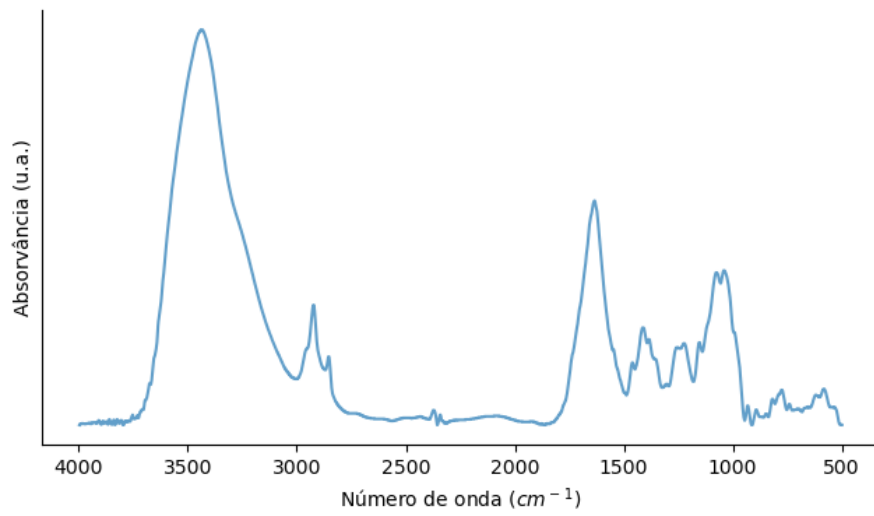


Figura A.16 Espectro FTIR da amostra NC(AAE).

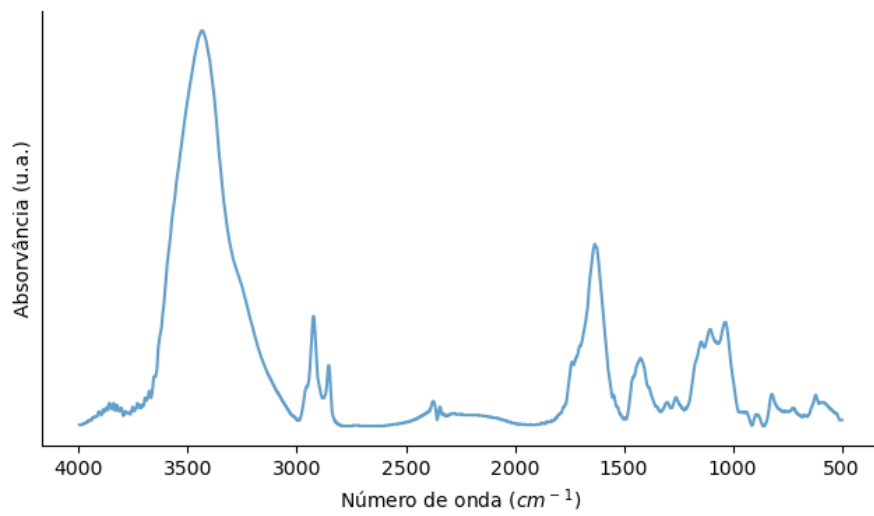


Figura A.17 Espectro FTIR da amostra UPC(AAE).

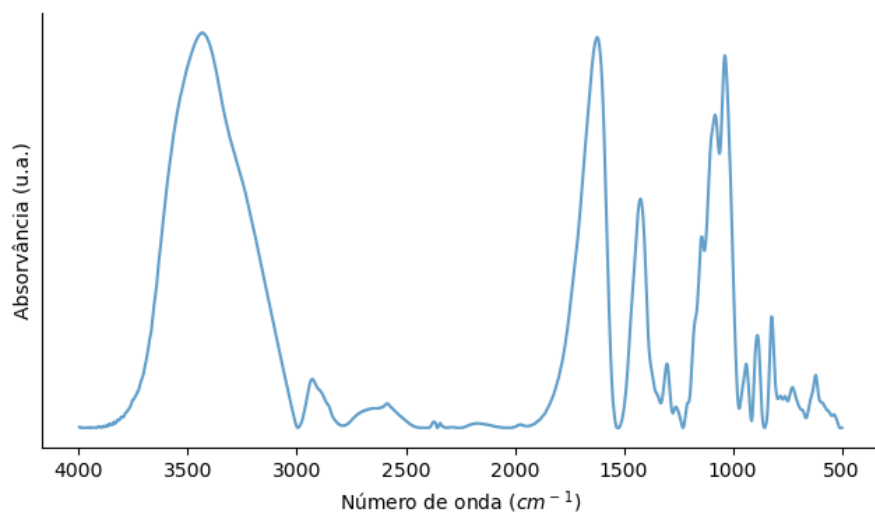


Figura A.18 Espectro FTIR da amostra UPJC(AAE).

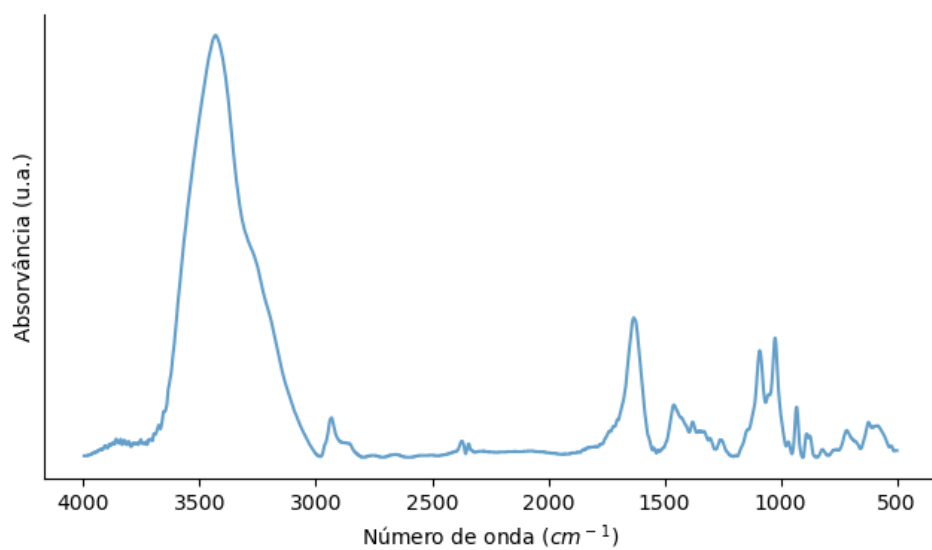


Figura A.19 Espectro FTIR da amostra LL(AAE).

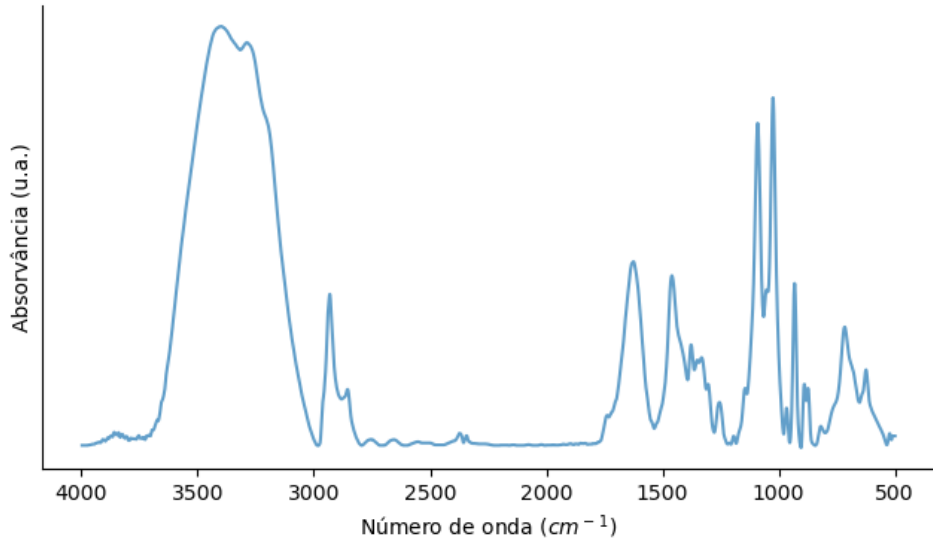


Figura A.20 Espectro FTIR da amostra KK(AAE).

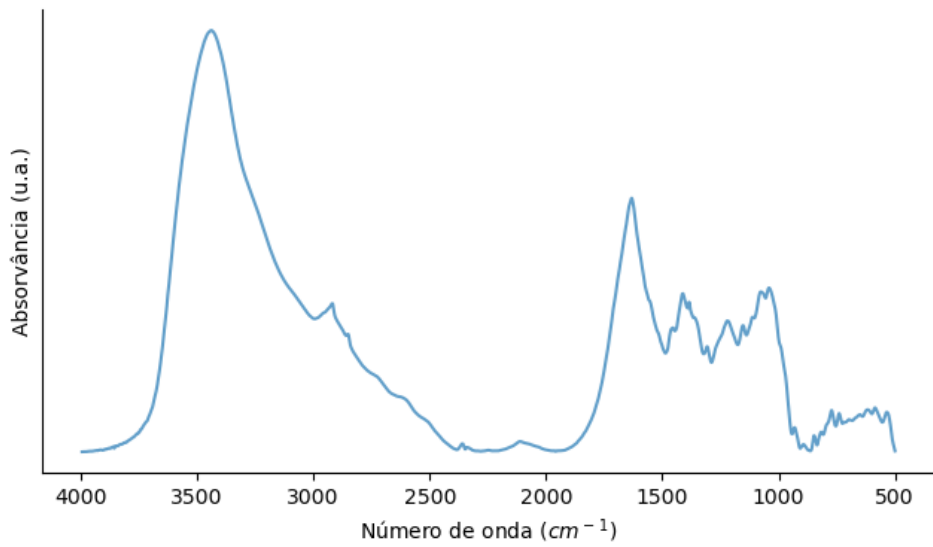


Figura A.21 Espectro FTIR da amostra NC(FW1).

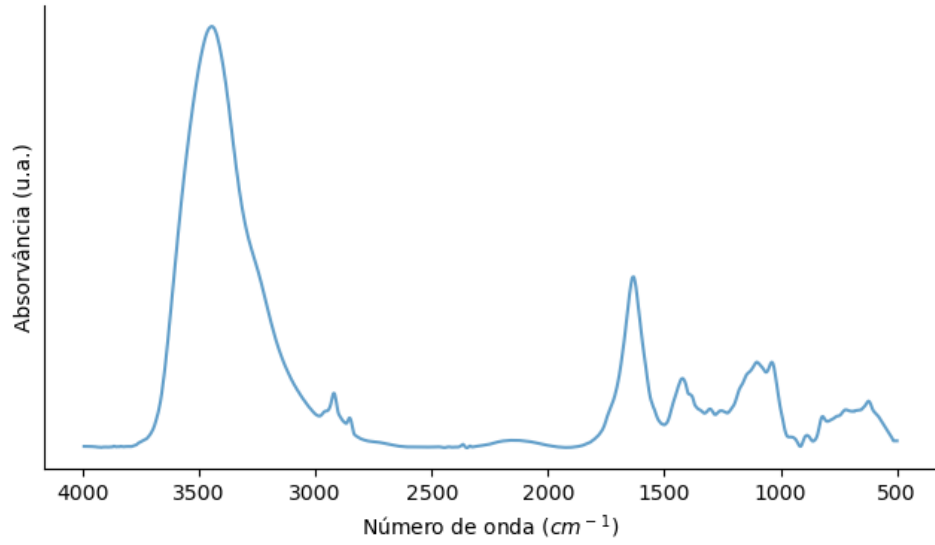


Figura A.22 Espectro FTIR da amostra UPC(FW1).

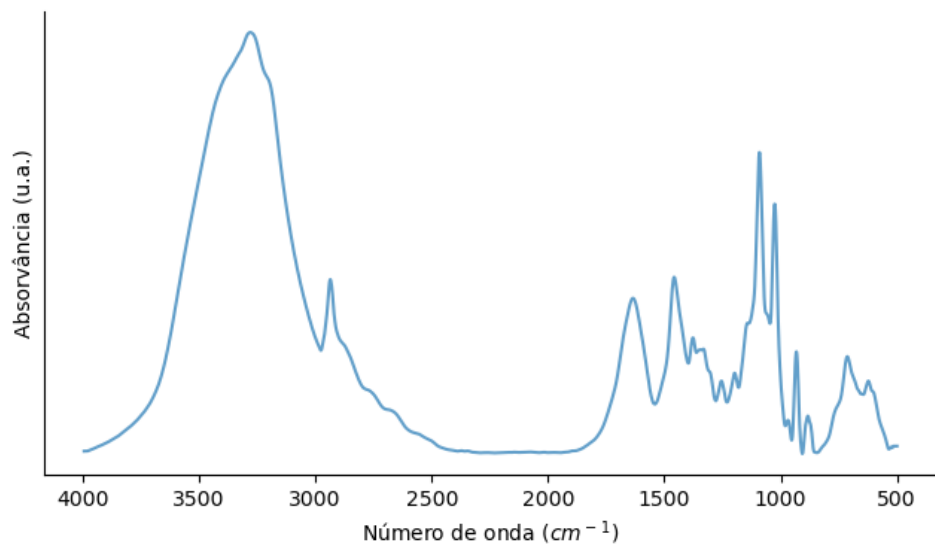


Figura A.23 Espectro FTIR da amostra UPJ(FW1).

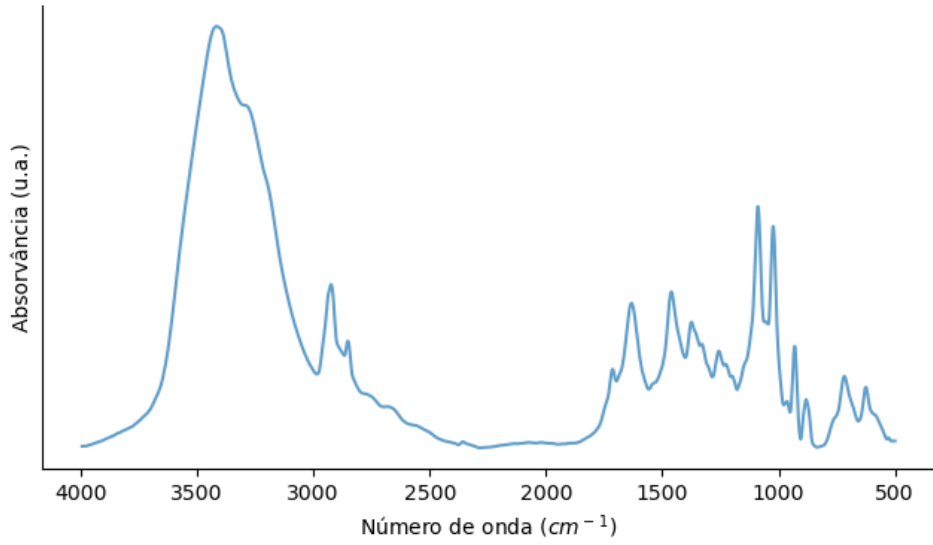


Figura A.24 Espectro FTIR da amostra LLJ(FW1).

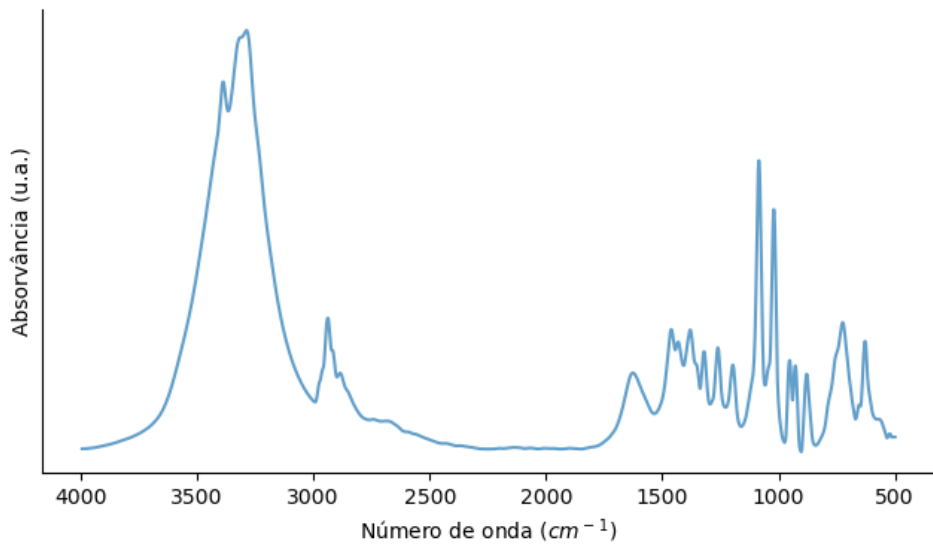


Figura A.25 Espectro FTIR da amostra KK(FW1).

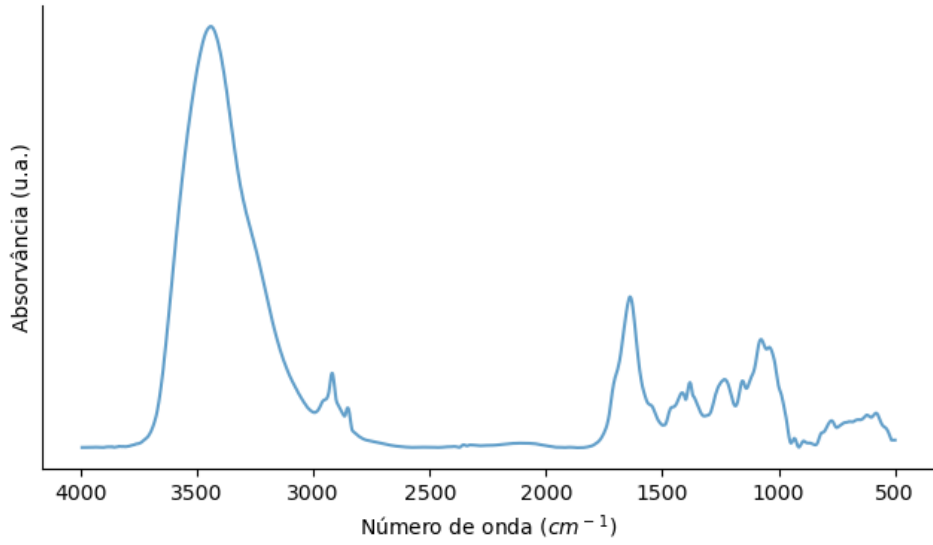


Figura A.26 Espectro FTIR da amostra NC(FW2).

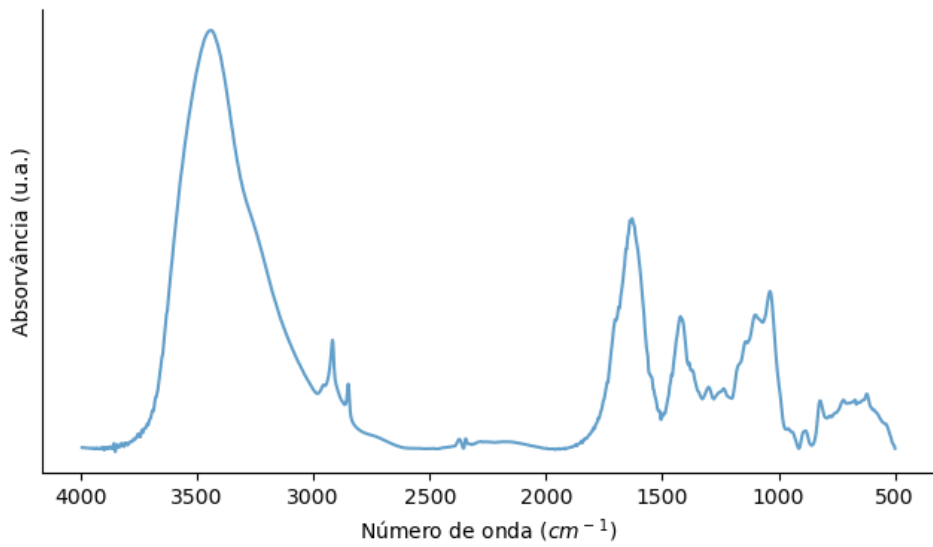


Figura A.27 Espectro FTIR da amostra UPC(FW2).

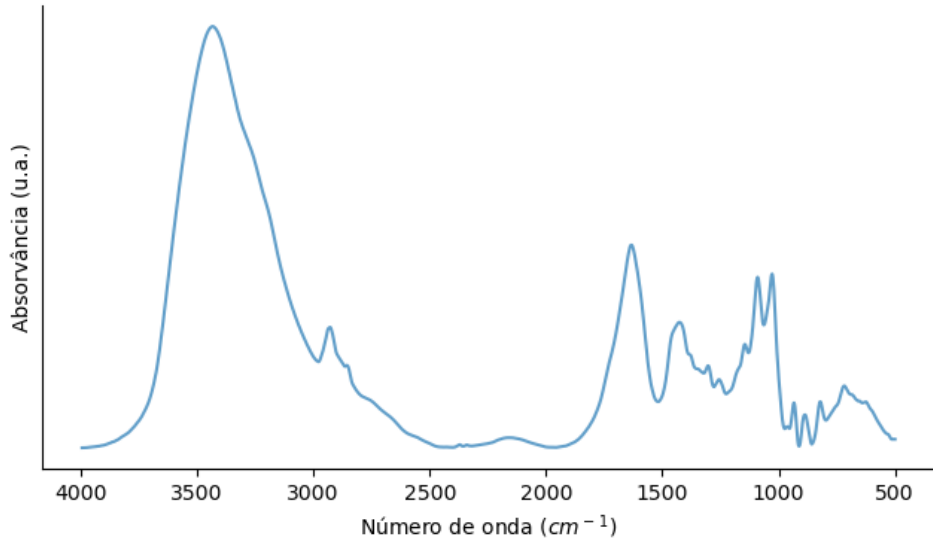


Figura A.28 Espectro FTIR da amostra UPJ(FW2).

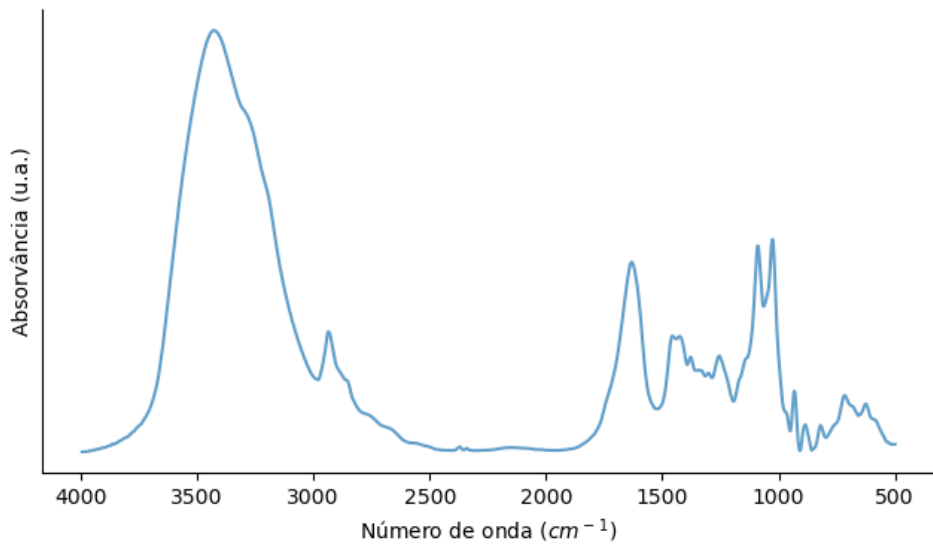


Figura A.29 Espectro FTIR da amostra LLJ(FW2).

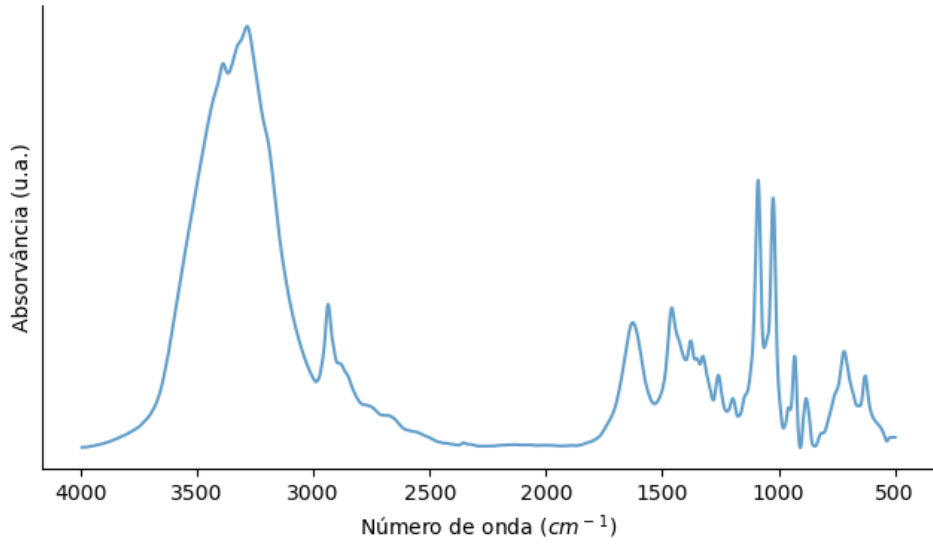


Figura A.30 Espectro FTIR da amostra KK(FW2).

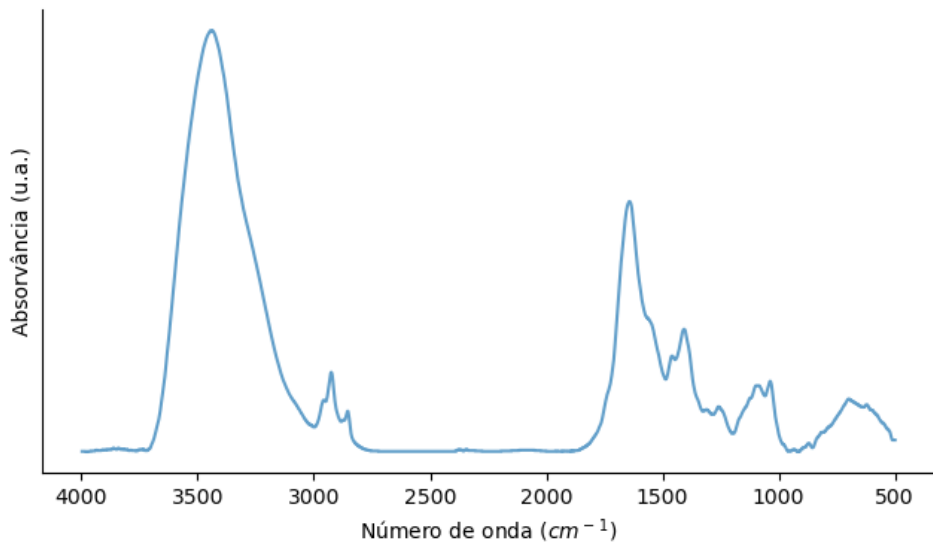


Figura A.31 Espectro FTIR da amostra NC(FKOH).

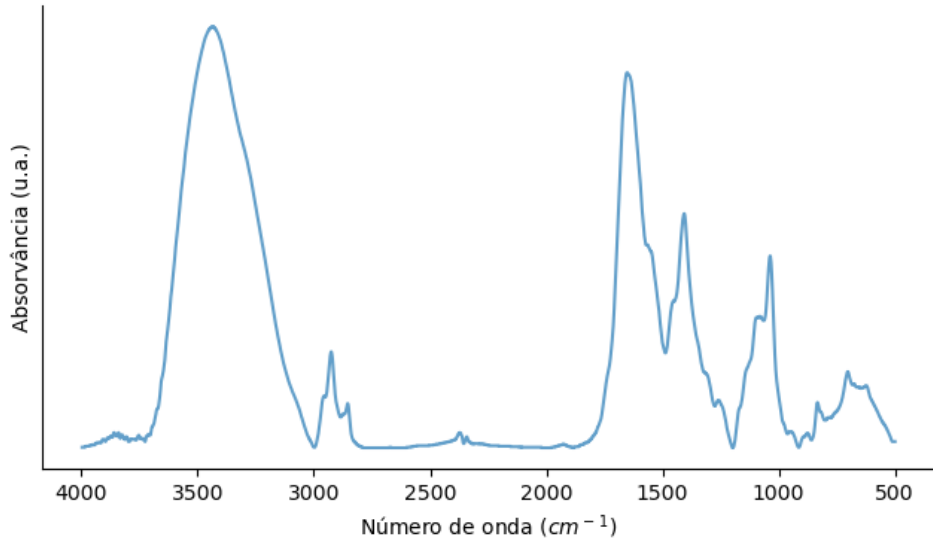


Figura A.32 Espectro FTIR da amostra UPC(FKOH).

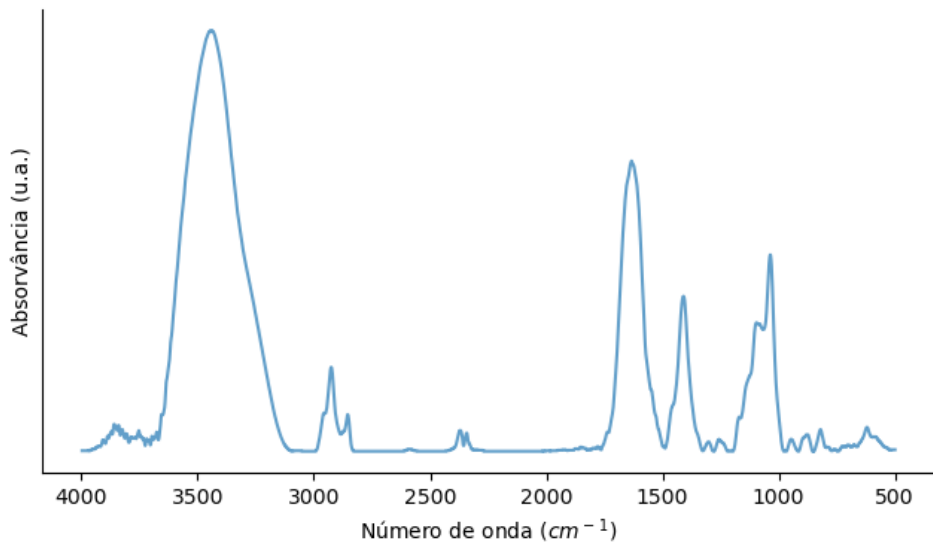


Figura A.33 Espectro FTIR da amostra UPJ(FKOH).

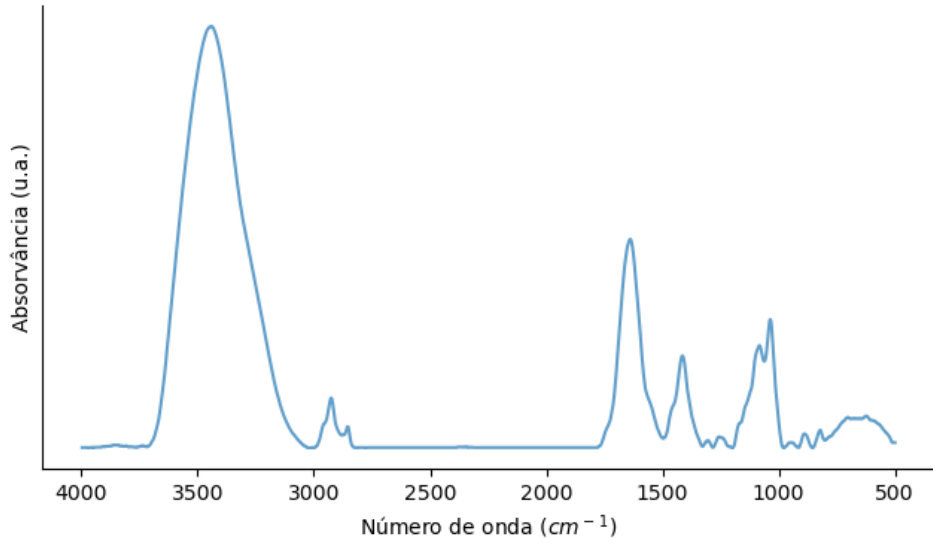


Figura A.34 Espectro FTIR da amostra LLJ(FKOH).

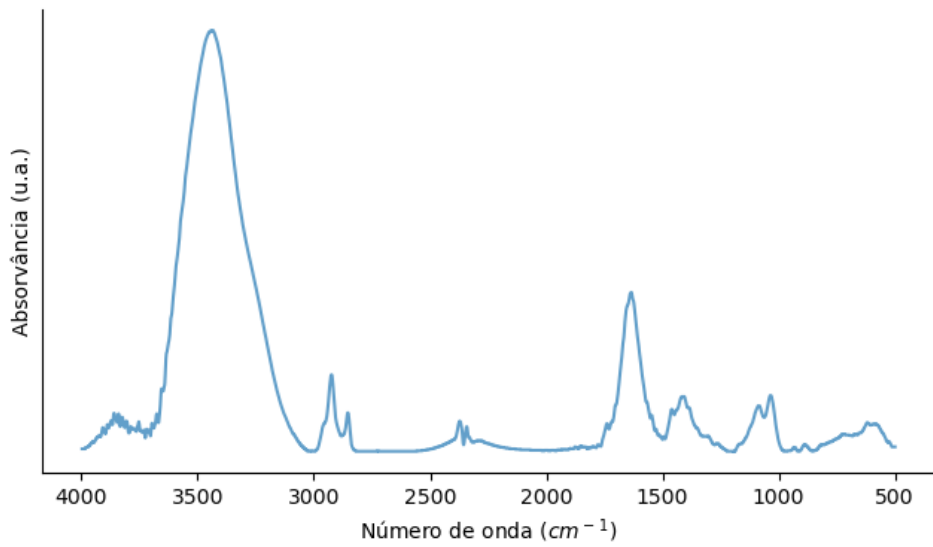


Figura A.35 Espectro FTIR da amostra KK(FKOH).

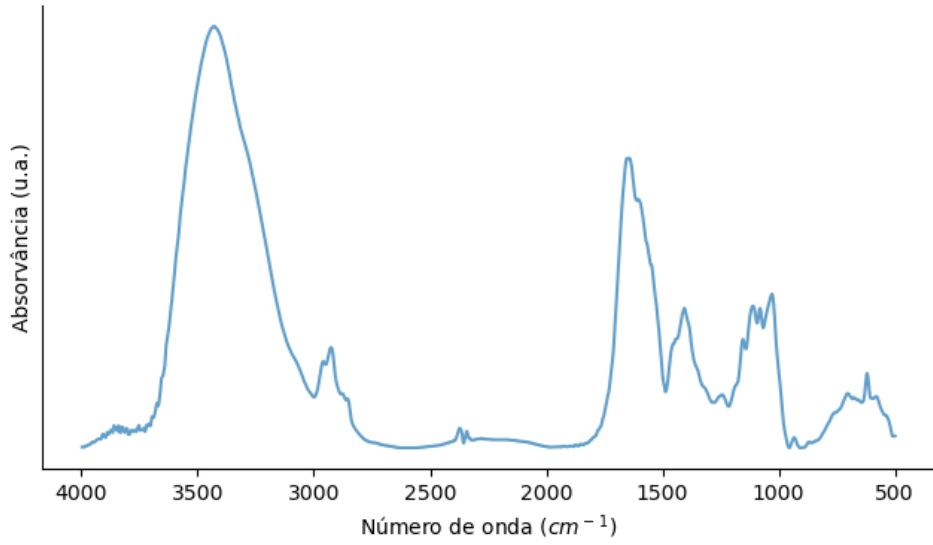


Figura A.36 Espectro FTIR da amostra NC(FHCl).

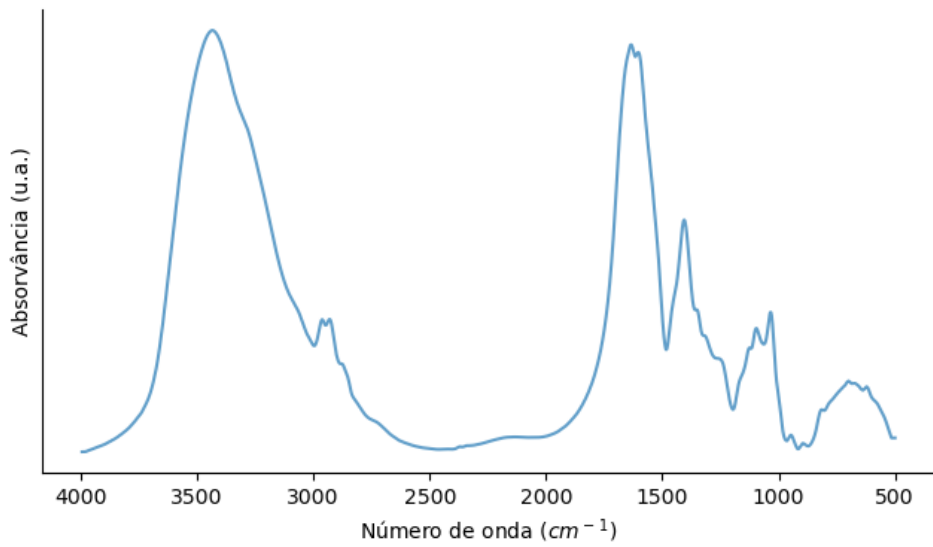


Figura A.37 Espectro FTIR da amostra UPC(FHCl).

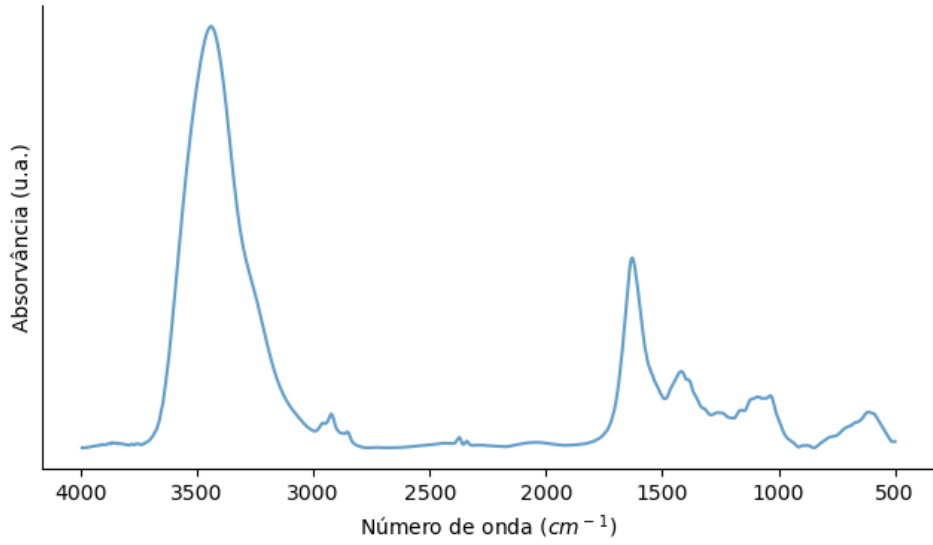


Figura A.38 Espectro FTIR da amostra UPJ(FHCl).

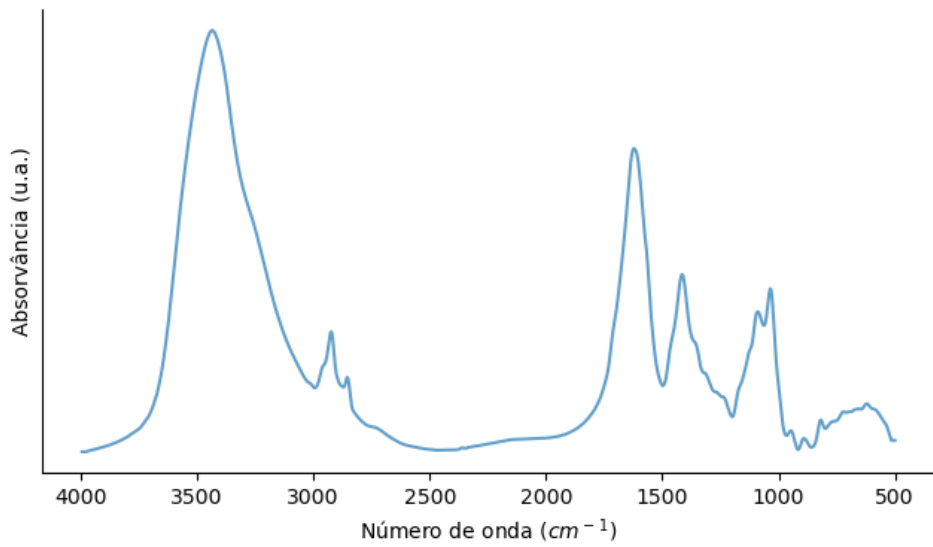


Figura A.39 Espectro FTIR da amostra LLJ(FHCl).

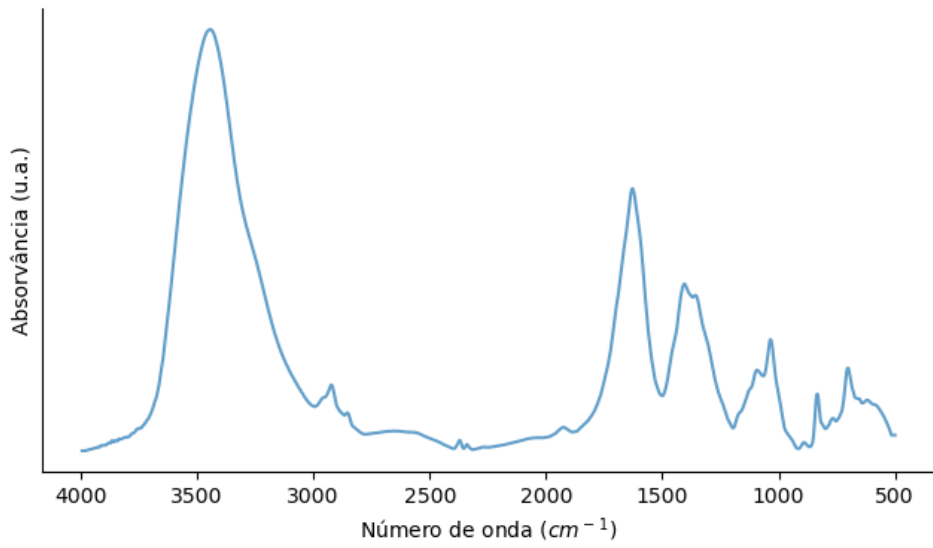


Figura A.40 Espectro FTIR da amostra KK(FHCl).

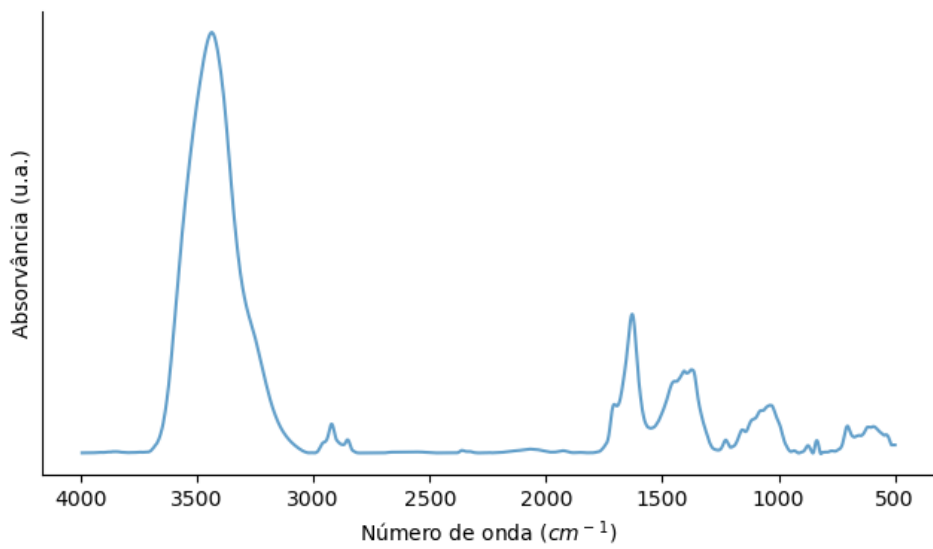


Figura A.41 Espectro FTIR da amostra NC(FNaOH).

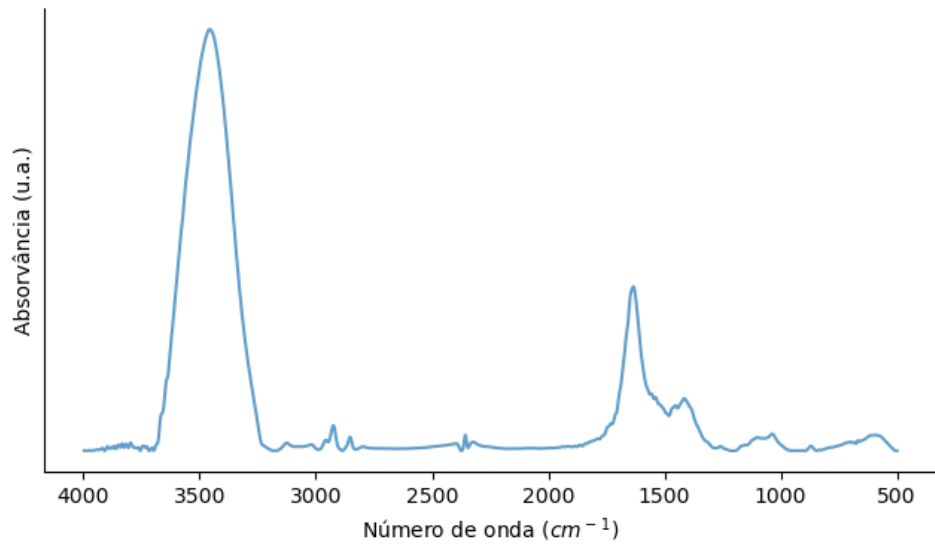


Figura A.42 Espectro FTIR da amostra UPC(FNaOH).

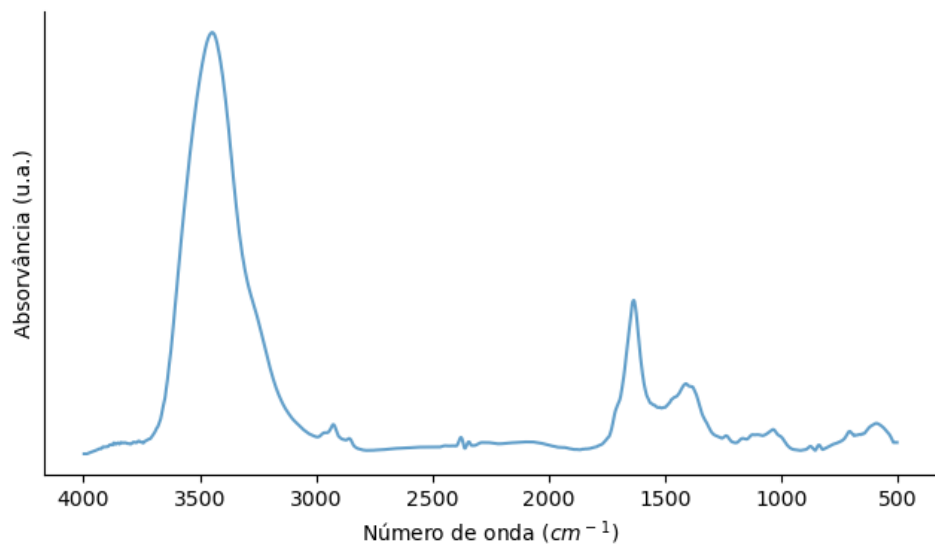


Figura A.43 Espectro FTIR da amostra UPJ(FNaOH).

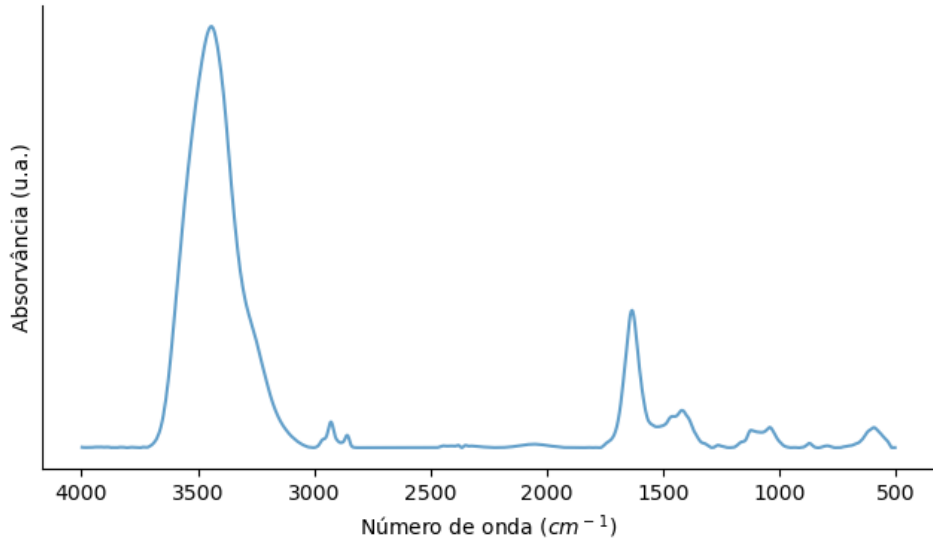


Figura A.44 Espectro FTIR da amostra LLJ(FNaOH).

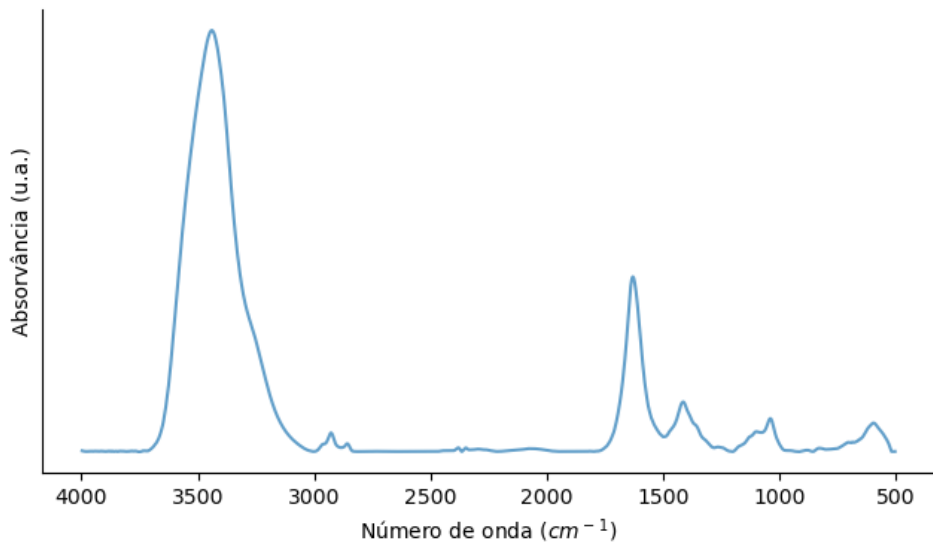


Figura A.45 Espectro FTIR da amostra KK(FNaOH).