



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Fucus ceranoides (Ochrophyta, Phaeophyceae):
Bioatividades dependentes do gradiente salino



João Filipe Pires Cotas

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Fucus ceranoides (Ochrophyta, Phaeophyceae): Bioatividades dependentes do gradiente salino

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

João Filipe Pires Cotas

2015

Agradecimentos

Tenho que começar por agradecer ao Professor Doutor Leonel Pereira por me ter aceiteado enquanto aluno, pela ajuda e oportunidades que me disponibilizou.

Agradeço ao Professor Doutor Artur Figueirinha por toda atenção e ajuda prestada durante a realização desta tese, especialmente no último segmento. E por último, à Professora Doutora Teresa Batista pela disponibilidade, atenção e apoio neste trabalho.

Agradeço às pessoas do Laboratório de Macroalgas, com quem passei a maioria do tempo, pela amizade, companheirismo e ajuda ao longo deste tempo.

Assim como às pessoas com quem trabalhei e convivi na Faculdade de Farmácia, especialmente agradeço ao futuro Doutor Gustavo Costa pela ajuda na realização do trabalho experimental, receptividade e as suas opiniões pertinentes.

Agradeço ao Professor Doutor Paulo Ribeiro-Claro, Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pela disponibilidade e possibilidade em realizar a análise de FTIR, sobretudo na obtenção dos espectros.

Também às pessoas com quem lidei ao longo do trabalho pelos ensinamentos, ajuda e apoio.

Em último mas principalmente há minha família pelo suporte e apoio ao longo deste caminho, e também pela possibilidade de eu ter continuado os estudos. Em especial, ao meu avô que me ensinou muito sobre a vida, que infelizmente não pode ver o finalizar desta etapa.

Índice geral

Agradecimentos	III
Índice geral	V
Abreviaturas.....	IX
Resumo	XI
Abstract.....	XIII
1. Introdução	3
1.1. Género <i>Fucus</i>	4
1.2. Compostos mais importantes no género <i>Fucus</i>	7
1.3. <i>Fucus ceranoides</i>	9
1.4. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	11
1.5. Atividade antioxidante com DPPH	14
1.6. Atividade antioxidante com ABTS.....	14
1.7. Contextualização do objetivo do trabalho.....	14
2. Materiais e Métodos	19
2.1. Locais de colheita da <i>F. ceranoides</i>	19
2.1.1. Zona marinha.....	19
2.1.2. Zona mesohialina	20
2.1.3. Parâmetros físico-químicos das zonas de colheita	20
2.2. Limpeza e secagem da alga	21
2.2.1. Preparação das amostras para o processo extrativo.....	22
2.3. Extração sequencial.....	22
2.3.1. Extração com <i>n</i> -hexano	23
2.3.2. Extração com metanol	24
2.3.3. Extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos	24
2.4. Cálculo do rendimento	26
2.4.1. Cálculo do rendimento para amostras liofilizadas	26
2.4.2. Cálculo do rendimento para os polissacarídeos	27
2.5. Quantificação de fenóis totais – Método de Folin-Ciocalteu	27

2.6. Espectros ultravioleta e visível	27
2.7. Análise por FTIR-ATR	28
2.8. Cromatografia em camada fina (TLC).....	29
2.8.1. Para pigmentos	29
2.8.2. Para florotaninos.....	29
2.9. Ensaio de atividade antioxidante com DPPH	30
2.10. Ensaio de atividade antioxidante com ABTS (pH neutro).....	30
3. Resultados e discussão.....	35
3.1. Análise geral às zonas de colheita	35
3.1.1. Parâmetros físico-químicos das zonas.....	36
3.2. Análise geral do processo de limpeza da alga	36
3.3. Processo extrativo	36
3.3.1. Rendimento da extração sequencial	37
3.3.1.1. Rendimento do extrato metanólico	38
3.3.1.2. Rendimento do extrato aquoso.....	39
3.3.1.3. Rendimento em polissacarídeos.....	40
3.3.1.4. Rendimento extrativo total.....	41
3.4. Otimização do método de quantificação de fenóis totais - Método de Folin - Ciocalteu	42
3.4.1. Otimização do método de Folin- Ciocalteu.....	42
3.4.1.1. Solventes utilizados e concentração dos reagentes	42
3.4.1.2. Luz e temperatura de reação	43
3.4.1.3. Controlo	43
3.4.1.4. Tempo de reação	43
3.4.1.5. Comprimento de onda de medição	44
3.4.1.6. Calibração do método	45
3.4.2. Método de Folin-Ciocalteu – análise das amostras	46
3.5. Espectros UV e V	47
3.6. Análise por FTIR-ATR	51

3.6.1. Análise por FTIR do extrato metanólico.....	52
3.6.2. Análise por FTIR do extrato aquoso e dos polissacarídeos.....	53
3.7. Cromatografia em camada fina (TLC).....	54
3.8. Atividade antioxidante com DPPH	55
3.8.1. Relação entre a atividade antioxidante (DPPH) e o conteúdo fenólico total	57
3.9. Atividade antioxidante com ABTS.....	59
3.9.1. Relação entre a atividade antioxidante (ABTS) e o conteúdo fenólico total	61
3.9.2. Comparação entre os resultados obtidos pelo método do ABTS e pelo método do DPPH	62
3.10. Discussão final	63
4. Conclusão e perspectivas futuras.....	67
5. Referências Bibliográficas	71
6. Anexos.....	81

Abreviaturas

Zona A - Zona de maior salinidade

Zona B - Zona de menor salinidade

Amostra A - Amostra da alga seca ao sol da Zona A

Amostra B - Amostra da alga seca ao sol da Zona B

Amostra LA - Amostra da alga liofilizada da Zona A

Amostra LB - Amostra da alga liofilizada da Zona B

Met ... (A/B/LA/LB) - Extrato metanólico da Amostra... (A/B/LA/LB)

Aq ... (A/B/LA/LB) - Extrato aquoso da Amostra... (A/B/LA/LB)

Poli ... (A/B/LA/LB) - Polissacarídeos da Amostra... (A/B/LA/LB)

PGE - Unidades equivalentes de floroglucinol

SD - Desvio padrão

UV - Ultravioleta

V - Visível

nm - nanómetros

Rf - Fator de retenção

DPPH - Difenil-picril-hidrazilo

ABTS - 2,2-azino-bis- (3-etilbenzotialino-6- ácido sulfónico)

TEAC - Unidade de equivalência á capacidade antioxidante do Trolox (*Trolox equivalent antioxidant capacity*)

BHA - hidroxianisol butilado

BHT - hidroxitolueno butilado

Resumo

Atualmente, as macroalgas começam a ter interesse na área farmacêutica e cosmética pela grande diversidade de compostos bioativos com potencial para aplicações farmacológicas e cosméticas. Muitos destes compostos bioativos são metabolitos secundários cuja quantidade na alga varia com as condições ambientais.

De entre as macroalgas, género *Fucus* é um dos mais comuns e o *Fucus vesiculosus* uma das espécies mais estudadas atualmente. Existe, no entanto, uma espécie de alga, o *Fucus ceranoides*, que pela sua distribuição pode servir de modelo para compreender os efeitos dos fatores ambientais, como a salinidade, na sua composição em compostos bioativos em outras algas do género, permitindo rentabilizar melhor as condições previstas para obtenção de alguns compostos específicos. O *Fucus ceranoides* já foi sujeita a uma bateria de testes de bioatividade num screening geral (Zubia, 2009), com resultados promissores que justificam um estudo mais pormenorizado.

No presente estudo foi avaliada a influência da salinidade e de outros fatores ambientais na composição dos compostos bioativos tais como polissacarídeos e compostos fenólicos no *F. ceranoides*. Analisou-se igualmente a influência do método de secagem.

Os compostos do *F. ceranoides* foram extraídos com recurso a solventes orgânicos e aquosos. Os polissacarídeos, os extratos metanólicos e aquosos foram caracterizados quimicamente e a sua bioatividade avaliada.

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos do radical difenil-picril-hidrazilo (DPPH) e do catião radical 2,2-azino-bis- (3-etilbenzotialino-6-ácido sulfónico) (ABTS). A quantificação dos fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, modificado especificamente para este trabalho. Procurou-se fazer uma identificação sumária dos compostos presentes em cada extrato, em amostras submetidas a diferentes condições ambientais (salinidade por ex.) e tipo de secagem (ao sol e liofilizado).

Com base nos resultados, conclui-se que existem diferenças notórias nos compostos devido à salinidade sobretudo nos compostos antioxidantes e na

concentração dos polissacarídeos. Na zona menos salina, a alga produz mais metabólitos secundários (maior poder antioxidante), e na zona mais salina existe uma maior concentração de polissacarídeos (menor poder antioxidante).

O tipo de secagem sugere uma proteção parcial de alguns compostos, mas não protege totalmente de uma possível oxidação dos compostos mais voláteis.

Palavras-chaves: *Fucus ceranoides*, salinidade, antioxidantes, secagem, compostos fenólicos

Abstract

Currently, the algae begin to have an interest in the pharmaceutical and cosmetic area through the enormous diversity of complex compounds and their bioactivity that can be applied in the future in pharmaceutical and cosmetic applications for humans.

In this case, there is an algae (*Fucus ceranoides*) that can serve as a model for understanding the effects of salinity in of the most dominant genera (*Fucus*) and this genera possess one of the species most studied so far (*Fucus vesiculosus*). Being able to take advantage of this study, to better monetize the conditions for obtaining some specific compounds.

In this case, *Fucus ceranoides* has been subjected to a battery of bioactive tests for a general screening article (Zubia, 2009), with an acceptable performance to move ahead to study in more detail on the effects of salinity. We assessed whether differences occurred in the bioactive compounds and polysaccharides, in *F. ceranoides*, due to differences in salinity in this alga that inhabits the estuary of the River Mondego (Portugal), but it was also examined whether the type of drying interfere and wherein extent the above cited compounds.

The compounds of *F. ceranoides* were extracted using organic solvents and water. Only extracts in methanol, aqueous and the polysaccharides were analyzed us bioactivity assays.

The antioxidant activity was determined by the methods of diphenyl-picrylhydrazyl radical (DPPH) and the radical cation and 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). The quantification of the total phenols it was the Folin-Ciocalteu method modified specifically for this work. Other assays has been used to determine and for identification of compounds of the extracts, the comparison factor was the difference in salinity and the drying type.

Based on the results, it is concluded that there are notorious differences in the compounds, due to the effect of salinity, mainly in the antioxidant compounds and at concentration of the polysaccharides. In the zone with less salinity exists a greater concentration of secondary metabolites (greater antioxidant potency), while in the zone

with more salinity exists a higher concentration of polysaccharides (lesser antioxidant power).

The drying type indicates that there may be a safeguard of some compounds, but not totally protect them from a possible oxidation of the compounds that are more fragile.

Keywords: *Fucus ceranoides*, salinity, antioxidants, drying, phenolic compounds.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

As macroalgas são organismos multicelulares que possuem clorofila e podem ser facilmente observadas e identificadas a olho nu. Estes organismos marinhos encontram-se, organizados taxonomicamente em três grupos principais, com base na cor do seu talo: as Chlorophyta (algas verdes), as Rhodophyta (algas vermelhas) e as Ochrophyta - Phaeophyceae (algas castanhas).

As macroalgas constituem um dos principais elementos da flora marinha e a sua função ecológica é equivalente à da flora terrestre, pois são seres autotróficos e estão na base das cadeias alimentares, essenciais a um ecossistema marinho sustentável. Tal como na flora terrestre, também existem espécies invasoras e nativas, as quais podem servir de bioindicadores e/ou bioacumuladores.

Atualmente, o uso de extratos de algumas espécies de macroalgas tem sido implementado nalgumas áreas da cosmética e da indústria alimentar, como por exemplo os alginatos, amplamente utilizados em todo o mundo. No entanto, existem alguns riscos associados à aplicação de produtos contendo compostos (ex.: polissacarídeos) extraídos de macroalgas bioacumuladoras de iodo (sobretudo de algas castanhas), pois podem agravar os problemas de saúde em pessoas com hipertireoidismo.

Na área da saúde, ainda não existem grandes inovações que estejam disponíveis no mercado, envolvendo compostos extraídos das algas castanhas, por não ser vantajoso do ponto de vista económico, devido à dificuldade na sua obtenção e purificação pois quase sempre o custo monetário é elevado para os procedimentos de extração e sobretudo do processo de obtenção de compostos específicos, com grau de pureza elevado, como por exemplo, fucoïdanas ou florotaninos. Atualmente, a fucoïdana já é vendida como suplemento alimentar (embora com um grau relativamente elevado de impurezas) sendo difícil obter fucoïdanas com mesma estrutura química pois a mesma alga pode apresentar várias subclasses de fucoïdanas, e cada subtipo pode apresentar diferentes tipos de bioatividade (Cumashi, 2007; Imbs, 2013).

Embora já existam muitos estudos que comprovam a eficácia dos compostos bioativos das macroalgas, a indústria farmacêutica tem optado por sintetizar moléculas em vez de apostar nestes compostos dos quais, alguns (florotaninos) já poderiam estar

num estado de estudo mais avançado (isolamento e respetivos ensaios clínicos) para se proceder à sua comercialização e utilização na terapêutica humana, como antibacterianos, antivirais ou antifúngicos, etc.

O único composto bioativo proveniente de algas castanhas que está a ser atualmente utilizado pela indústria farmacêutica, e na área da saúde, é o alginato como transportador de fármacos, gel de cicatrização, entre outras aplicações (Pielesz, 2011).

No entanto, este ponto de vista tem-se modificado, pois a mentalidade do próprio consumidor final voltou-se a favor para o uso de produtos naturais na medicina, isto no 'ocidente', pois no 'oriente' (Asia) esta mentalidade foi sempre mantida. Por outro lado, a indústria farmacêutica está a optar por voltar a utilizar compostos naturais em vez dos de síntese, para contornar o problema das multirresistências, e da crescente ineficácia de certos medicamentos hoje em dia usados na terapêutica humana.

Neste sentido, as macroalgas poderão ser uma das principais fontes de compostos bioativos e de novas repostas terapêuticas neste século.

1.1. Género *Fucus*

As algas do género *Fucus* caracterizam-se por apresentar um talo cartilaginoso de cor castanho-esverdeado com os recetáculos terminais, e apresentam frequentemente aerocistos. O talo é diferenciado (órgão de fixação, estipe e lamina), e os exemplares adultos podem atingir os 60 centímetros de altura. Este género ocupa geralmente a zona intertidal das zonas costeiras. No género *Fucus* estão documentadas em Portugal, as espécies *F. ceranoides*, *F. serratus*, *F. spiralis* e o *F. vesiculosus*, sendo este último o mais conhecido e estudado deste género.

O género *Fucus* tem sido muito estudado, por possuir espécies com um conjunto de características distintivas e por ser em muitos casos o género dominante nas zonas costeiras (sobretudo em zonas estuarinas e portuárias) e, com isso não havendo por essa razão o risco de sobre-exploração por recolha de espécimes, pois este género é reconhecido por ter um crescimento rápido e de elevado poder propagação. Sendo em alguns casos, considerados como algas invasoras em nichos ecológicos não nativos destas algas.

Atualmente, o género *Fucus* (em especial, o *Fucus vesiculosus*) tem sido muito estudado ao nível da extração e identificação dos seus constituintes químicos, embora o estudo das suas aplicações esteja ainda por fazer, com exceção do alginato, sendo usado sobretudo na indústria cosmética, pois como referido anteriormente são algas extremamente adaptáveis e com propriedades interessantes desse ponto de vista. Em termos biorremediação, este género é conhecido por serem bioacumuladores de metais pesados e de iodo não servindo, por essa razão, como bioindicadores.

Como se comprova pela tabela 1, já existe muita informação sobre o género *Fucus* no que respeita aos seus compostos bioativos e as suas aplicações, no entanto, à exceção do alginato, nenhum destes compostos passou da fase da descoberta para ensaios mais importantes na implantação na terapêutica médica e uso humano. Isto devido à dificuldade já supracitada do seu isolamento e respetivo custo.

Tabela 1 - Tabela de compostos e respetiva bioatividade, no género *Fucus*.

Espécie relatada	Composto	Tipo de atividade bioquímica	Referência
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucoïdanas	Anti-HIV	Béress, 1993
		Efeito Hipolipidémico	Vázquez-Freire, 1996
		Agente Anti-trombótico (baixo risco hemorrágico)	Min, 2012
		Inibidor da atividade da α -glucosidase	Souza, 2007
		Antioxidante	Rodríguez-Jasso, 2013
		Antitumor	Ale, 2011
		Anticoagulante	Cumashi, 2007
		Anti-inflamatório	Cumashi, 2007
<i>Fucus evanescens</i>	Fucoïdanas	Anti-inflamatório	Cumashi, 2007
<i>Fucus serratus</i>	Fucoïdanas	Anticoagulante	Cumashi, 2007
<i>Fucus vesiculosus</i>	Florotaninos	Antioxidante	Wang, 2012
<i>Fucus spiralis</i>	Florotaninos	Antimicrobiana	Lopes, 2012
<i>Fucus spiralis</i>	Florotaninos	Antifúngico	Lopes, 2012
<i>Fucus vesiculosus</i>	Alginato	Transportadores de fármacos	Pielesz, 2011
<i>Fucus evanescens</i>	Fucoxantina	Anti-proliferativo e inibidor de crescimento de tumor (anti-tumor)	Imbs, 2013

1.2. Compostos mais importantes no género *Fucus*

Os compostos bioativos mais importantes, presentes no género *Fucus*, são geralmente divididos da seguinte forma: pigmentos (clorofila e fucoxantina) que são os compostos que dão cor à alga, distinguindo-se dos restantes por terem uma cor garrida e diferenciada a olho nu; os polissacarídeos (ácido algínico e fucoïdanas) que quando hidratados formam um gel estável e possuem uma cor esbranquiçada (fator que determina o seu nível de pureza) e finalmente os compostos fenólicos (principalmente florotaninos) que são os metabolitos secundários que servem de defesa ativa da alga, principalmente contra a exposição solar e herbívoria.

Os Florotaninos são compostos fenólicos polares, de peso molecular variável, derivados do floroglucinol, com várias conformações e tipos de ligação. Com base na estrutura e tipo de ligação, os florotaninos podem ser classificados em quatro subclasses: *fuhalóis* e *floretois* (possuem ligações éter); *fucóis* (possuem ligação de fenil); *Fucofluretois* (possuem ligações éter e fenil); e *ecóis* (contendo estruturas do tipo dibenzodioxina) (Singh, 2006).

Neste caso, somente alguns florotaninos estão identificados na *F. vesiculosus* como é o caso do difucol e trifucol, e duas moléculas isoméricas de tetrafucóis (Martinez, 2013).

Os efeitos biológicos mais conhecidos dos florotaninos são as suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngico (ver Tabela 1), mas poderão variar com a subclasse de florotaninos, mas devido à grande dificuldade em identificar cada subclasse, não se consegue obter uma informação mais específica.

De entre os pigmentos, a fucoxantina (Figura 1) é o pigmento carotenoide existente em maior concentração no género *Fucus*, e caracteriza-se por apresentar uma cor alaranjada. Possui uma estrutura conhecida, diferente de outros carotenoides como a astaxantina e o β -caroteno mas, no entanto, é comparativamente idêntica à da neoxantina, dinoxantina e da peridinina.

A fucoxantina tem uma ponte alênica pouco usual (responsável pelo maior poder antioxidante do composto) e um conjunto de grupos funcionais que possuem oxigénio, como epóxi, hidroxilo, carbonil, e carboxil, entre outros (Peng, 2011).

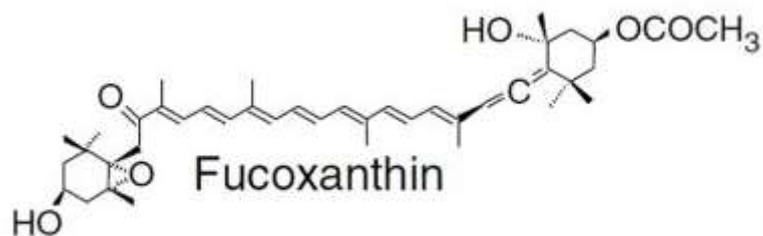


Figura 1 - Molécula de Fucoxantina, de salientar os grupos funcionais com oxigênio e ponte alênica (ponte dupla consecutiva entre carbonos) (retirada de Miyashita, 2011).

Este pigmento possui diversas bioatividades, como por exemplo: elevada atividade antioxidante (Xia, 2013), anti-inflamatória, antidiabética, entre outras (Peng, 2011).

Quanto aos polissacarídeos, as fucoidanas caracterizam-se por serem sulfatadas e enriquecidas em fucose. A sua estrutura base é idêntica diferindo na conformação da molécula de fucopiranosose (da estrutura base), e nas oses (glicose, manose, xilose, entre outros) que estão ligadas à fucopiranosose (Tabela 2). A estrutura química deste composto ainda não foi completamente caracterizada, só se conhecendo a sua estrutura base, não se sabendo-se existem subtipos de fucoidanas presente, na mesma alga (Cumashi, 2007).

São reconhecidos por terem uma elevada atividade antioxidante, e antitrombótica (ver Tabela 1).

Tabela 2 - Composição das fucoidanas no género *Fucus* (em %, peso/peso total seco) (Cumashi,2007).

Espécie	Fucopiranosose	Xilose	Manose	Glucose	Galactose	Ácidos urônicos	SO ₃ Na
<i>Fucus evanescens</i>	58,7	1,6	-	-	1,6	>1	36,3
<i>F. vesiculosus</i>	26,1	2,4	3,1	2,2	5,0	10,3	23,6
<i>F. serratus</i>	24,8	2,4	2,1	2,0	4,8	8,2	29,2
<i>F. distichus</i>	40,8	0,8	-	-	0,8	> 1	34,8
<i>F. spiralis</i>	33,0	2,8	1,4	1,2	3,0	8,2	25,9

O alginate (ácido algínico, na forma natural) é um polímero não sulfatado aniônico de localização extracelular que é responsável pela integridade física da alga, protegendo-a passivamente de danos físicos ou mecânicos.

É atualmente o composto mais estudado dos quatro grupos descritos. Como referido anteriormente, possui várias aplicações na área da saúde e farmacêutica, sendo as mais conhecidas: como componentes de géis de cicatrização rápida e como transportadores de fármacos (Lee, 2012). Atualmente estão a ser estudados como um dos compostos mais promissores na regeneração de tecidos (Kim, 2015).

1.3. *Fucus ceranoides*

O *Fucus ceranoides* é atualmente a espécie do género *Fucus* menos estudada.

Caracteriza-se por ser uma alga castanho-esverdeada com o talo ramificado dicotomicamente. Possui uma proeminente nervura central, que é idêntica à encontrada noutras espécies do género *Fucus*. O talo possui vesículas longitudinais, paralelas à nervura central, que podem ser expandidas, sendo esta a característica de maior diferenciação das outras algas do género *Fucus*.

O *Fucus ceranoides* adulto pode normalmente variar no tamanho entre os 30 e os 60 cm, incluindo os recetáculos terminais.

A presença de *F. ceranoides* ocorre no ambiente estuarino e na zona entre as marés, estando sujeita à água doce devido ao ciclo tidal da zona estuarina, sendo considerada dominante na zona intermédia do estuário do Rio Mondego embora a jusante seja substituída pela *F. vesiculosus* e *F. spiralis* como alga dominante.

Esta alga pode sobreviver entre os 5% e os 34% de salinidade (a salinidade da água do mar é cerca de 34-36%), durante todo o ciclo de vida (Khfaji, 1979). Mas em condições laboratoriais, continua a crescer em valores de salinidade de 1,5% a 45% durante as primeiras 10 semanas mas depois começa a apresentar sinais de danos a nível dos tecidos. A alga também demonstra que pode sobreviver numa ampla gama de temperaturas (7 - 17 °C) sem que isso influencie negativamente o seu crescimento (Back, 1992). Comparativamente a outras espécies como o *F. vesiculosus* por exemplo, o *F. ceranoides* não cresce tão rápido numa zona de salinidade marinha (30-34%), mas numa salinidade intermédia (24%) ele supera as outras espécies do seu género, o que

mostra que a alga está mais adaptada para salinidades mais baixas do que as restantes espécies do seu género, podendo formar zigotos até uma salinidade de 8,5%.

É uma alga endémica no Atlântico Norte, sendo que o Rio Mondego constitui a extremidade sul da sua distribuição europeia. A distribuição do *F. ceranoides* no Rio Mondego é constante numa distância de cerca de 13 Km da Foz do Rio Mondego até próximo da zona de Verride (Montemor-o-Velho). Sendo que o limite de distribuição da alga a jusante será nos molhes, há saída da foz do rio (Fernandes, 2010).

Um espécime do *F. ceranoides* tem um tempo de vida entre os 2-5 anos, possuindo clorofilas a e c (tal como todas as espécies do seu género), mas também fucoxantina e manitol, tendo sido comprovada uma correlação positiva entre a concentração intracelular de manitol e o gradiente de salinidade (Back, 1992).

O ciclo de vida do género *Fucus* é diploide, neste ciclo só os gâmetas são haploides, e conseguem resistir às mudanças drásticas de salinidade num curto espaço de tempo. A libertação dos anterídios e oosferas está dependente da velocidade da água. As oosferas são libertadas no período mais alto da maré devido á menor velocidade da água, durante a lua cheia e nova e também devido ao aumento da salinidade durante a maré cheia (Brawley, 1992).

A espécie é geralmente dioica mas já foram registadas espécimes monoicos, embora tenha sido sugerido que sejam híbridos pois já foram registadas hibridizações do *F. ceranoides* com as *F. spiralis* e *F. vesiculosus* (Coyer, 2002).

O único artigo que discute o poder antioxidante de extratos desta espécie é o de Zubia (2009), que reporta que o extrato bruto da *F. ceranoides* tem um potencial antioxidante superior à *F. serratus*, não especificando, no entanto, em que zona do estuário foi realizada a colheita, pois como um artigo supracitado anteriormente de Back (1992) refere que existe diferenças na concentração de um composto (manitol) devido à salinidade. E segundo Beauchamp (2012), existe diferenças nas *Ulva lactuca* e na *Palmaria palmata* que relata conforme a salinidade descia, maior era a concentração de clorofila e pigmentos nestas espécies.

Mas segundo Neiva (2012), o genoma da alga recolhida nessa zona já possuirá introgressões de ADN provenientes do *F. vesiculosus*, não sendo considerada nativa devido à sua expansão durante a última deglaciação. Deste modo, a variabilidade

genética intraespécie será muito menor na zona não nativa, do que na zona da Península Ibérica (zona considerada nativa para espécie).

1.4. Determinação de fenóis totais e florotaninos pelo método-de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu tem sido utilizado para quantificar os compostos fenólicos totais existentes em extratos de plantas e algas. No caso das algas, e mais concretamente as do género *Fucus*, os compostos fenólicos presentes serão principalmente os florotaninos.

Trata-se de uma variante do método de Folin-Denis sendo menos propenso a interferências que o método original (Waterman, 1994). Consiste na oxidação em condições alcalinas do ião fenolato e consequente redução do reagente fosfomolibdicotúngstico, formando-se um complexo azul que pode ser medido espectrofotometricamente.

Este método tem sido bastante modificado por parte dos investigadores, tornando difícil a análise e comparação de resultados (Tabela 3). Neste caso, as modificações que mais influenciam os resultados são:

- O tempo de incubação da amostra: esta reação é lenta à temperatura ambiente, necessitando de um tempo de incubação longo, se bem que alguns autores utilizam aquecimento para reduzir o tempo de incubação, embora neste caso aumente o risco de degradação dos compostos. Por isso, muitos dos investigadores têm utilizado tempos de incubação de 45 minutos a uma hora, que no geral garantem resultados mais fiáveis;

- Comprimento de onda: será o fator que influencia menos os resultados pois os resultados obtidos serão calculados tendo em conta uma reta de calibração. Mesmo assim deverá ser escolhido o máximo de absorvência do cromóforo obtido por reação com um padrão para se obter um resultado mais coerente. Neste caso, o comprimento de onda mais utilizado é os 750 nm, a variação de comprimentos de ondas utilizados a situarem-se entre 700 nm e os 765 nm;

- Concentração de reagentes: Este é o ponto mais fulcral do protocolo e sobre o qual existe mais informação. Neste caso, o volume de água destilada adicionado à amostra serve para diluir ou para prevenir a formação de precipitados. A concentração

do reagente Folin-ciocalteu no meio reacional depende do teor de compostos fenólicos na amostra, pois o decréscimo deste reagente vai fazer com que o valor de absorvência durante a leitura da amostra desça. Nos vários estudos consultados, a razão entre a amostra e o reagente de Folin-Ciocalteu varia entre 2:1, 1:1 ou 1:5 (amostra: reagente de Folin-Ciocalteu). Já influência do carbonato de sódio foi analisada por Koivikko (2008) que demonstrou a existência de uma correlação positiva entre a sua concentração no ensaio e o valor de absorvência, o que é espectável pois é o catalisador do reagente de Folin-Ciocalteu, tornando o método mais ou menos sensível conforme a quantidade utilizada.

Tabela 3 - Variantes do ensaio de Folin-Ciocalteu para a determinação de florotaninos.

Autor	Concentrações (e o tempo entre adições)	Tempo de incubação/ Aquecimento/ centrifugação	Comprimento de onda da leitura (nm)
Tierney, 2013	100 µl Amostra/ 100 µl of metanol/ 100 µl de Reagente de Folin-Ciocalteu/ 700 µl de carbonato de sódio a 20%	20 minutos/ Temperatura: ambiente/ Centrifugação: 3 minutos a 13000rpm	735nm
Zubia, 2009	100 µl Amostra/ 50µl de Reagente de Folin-Ciocalteu/ 200 µl de carbonato de sódio a 20%/ 650 µl de água destilada	10 minutos/ Temperatura: 70°C	700nm
Wang, 2012	1ml de amostra/5 ml de Reagente de Folin-Ciocalteu (solução aquosa a 10%)/ 4 min: 4 ml de carbonato de sódio a 7.5%	2 horas/ Temperatura: ambiente	725nm
Koivikko, 2005	1ml amostra / 1ml de Reagente de Folin-Ciocalteu/ 3 min: 2.0 ml de carbonato de sódio a 20%	45 minutos/ Temperatura: ambiente/ Centrifugação: 8 minutos a 1600g	730nm
Lordan, 2013	10µl de amostra/ 50 µl de Reagente de Folin-Ciocalteu/ 5 min: 40 µl de carbonato de sódio a 7.5%	2 horas/ Temperatura: ambiente	750nm
Lim,2002	0.1ml amostra/ 7.9ml água destilada/ 0.5ml de Reagente de Folin-Ciocalteu/ 1 min: 1,5 ml de carbonato de sódio a 20%	1 hora/ Temperatura: ambiente	750nm
Samee, 2009	0.1 ml de amostra/0.5 ml água destilada/ 0.5ml de Reagente de Folin-Ciocalteu (2mol/l)/ 3 min: 2 ml de carbonato de sódio a 20%	45 minutos/ Temperatura: ambiente/ Centrifugação: 8 minutos a 1600g	730nm

1.5. Atividade antioxidante com DPPH

O método do radical difenil-picril-hidrazilo (DPPH) tem sido muito utilizado para determinação do potencial de captação de radicais livres em meio aquoso. Baseia-se na utilização de um radical sintético estável (DPPH) que ao sofrer redução por moléculas capazes de captar o eletrão do radical sofre descoloração, que pode ser medida espectrofotometricamente a 517 nm. Permitindo determinar a concentração de extrato que reduz 50% (IC50) do radical inicial (controle).

Tal como no caso do método de Folin-Ciocalteu, existem várias metodologias, que variam na concentração do DPPH, tempo de incubação e o uso de tampão e por esta razão, os resultados não podem ser integralmente comparados (Sharma, 2009).

O método utilizado, nesta tese, é o que está implementado no laboratório onde foi feito este ensaio (Costa, 2015).

1.6. Atividade antioxidante com ABTS

O método do catião 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotialino-6- ácido sulfónico) (ABTS) é método relativamente usual para determinação do potencial antioxidante em meio aquoso.

Baseia-se na transformação do ABTS num catião radical estável com a adição de persulfato de potássio à solução. Este radical, ao sofrer redução por moléculas capazes de captar o seu eletrão sofre uma descoloração que pode ser medida espectrofotometricamente a 734 nm. O uso do padrão de Trolox permite exprimir o valor em TEAC (valor de equivalência à capacidade antioxidante do Trolox) da amostra (Re, 1999).

O método utilizado, nesta tese, é o que está implementado no laboratório onde foi feito este ensaio (Costa, 2015).

1.7. Contextualização do objetivo do trabalho

Conforme já referenciado as características da *F. ceranoides* serão únicas, é a única macroalga que aguenta salinidade abaixo dos 10% e, por outro lado, foi utilizado

um local de colheita que é considerado filogeneticamente nativo para a espécie estudada (Neiva, 2012).

Este trabalho tem como objetivo comprovar a atividade antioxidante do *F. ceranoides*, já testada por Zubia (2009), e se esta atividade depende de fatores externos como a salinidade e o tipo de secagem.

Outro objetivo será uma análise geral dos compostos bioativos da alga, verificando quais serão os melhores métodos de determinação do teor de compostos fenólicos e a necessidade de modificações nos métodos existentes.

O método de Folin-Ciocalteu foi modificado, para ser mais fácil de executar, ter maior sensibilidade e utilizar um volume menor de amostra. O método foi adaptado com base na análise das metodologias propostas por Zubia (2009), Wang (2012), Tierney (2013) e Koivikko (2005). Avaliaram-se as principais variáveis do método optando-se por modificar alguns detalhes (ver pg. 42) e verificou-se a sua aplicabilidade às amostras da alga em estudo.

2. Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Locais de colheita da *F. ceranoides*

O *F. ceranoides* foi colhido em duas zonas distintas, correspondendo às extremidades da distribuição da alga entre a Foz e a zona estuarina do Rio Mondego, Figueira da Foz (Figura 3). A colheita foi realizada no mesmo dia nos dois locais, a 27 de Setembro de 2014, havendo o cuidado de colher a alga sem o seu suporte de fixação.

2.1.1. Zona marinha (A)

Geolocalização: 40° 8'45.81"N; 8°52'25.53"W

A recolha foi feita no molhe norte do porto da Figueira da Foz, em que o nível de salinidade é o equivalente ao ambiente marinho, este é limite a jusante da dispersão do *F. ceranoides* (Fig.2 a); 2 b)).



Figura 2 - local de amostragem de *F. ceranoides*: a) molhe Norte da Figueira da Foz (Zona A); b) colheita da alga (Zona A); c) zona B (CTE Lares); d) detalhe do local de colheita B.

2.1.2. Zona mesohialina (B)

Geolocalização: 40° 7'31.39"N, 8°46'15.76"W

A recolha da alga foi feita numa zona que dista da Foz do Mondego cerca 13 km (Figura 3), próximo da central termoelétrica de Lares, parte limiforme do concelho da Figueira da Foz com o de Montemor-o-Velho. O nível de salinidade desta zona será o mais baixo em que a alga está estavelmente implementada (Fig.2 c); 2 d)).



Figura 3 - Localização dos locais de colheita A e B da *F. ceranoides*.

2.1.3. Parâmetros físico-químicos da água nas zonas de colheita

Através do IMAR foi possível obter os dados dos parâmetros físico-químicos (Tabela 4) e de nutrientes disponíveis na água das zonas A e B (Tabela 5).

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos da água nas zonas de recolha da alga (dados cedidos pelo IMAR).

Zona	pH	Temp. (°C)	Salinidade (%)	Condutividade (S.cm ⁻¹)	Transparência (m) Disco Secchi	Oxigénio (%)	Oxigénio (mg/L)
A	7,73	21,3	34,93	48812	3,5	145,0	10,63
B	7,65	22,3	25,17	37440	1,8	102,7	7,72

Tabela 5 - Teor de nutrientes existentes na água das zonas de recolha da alga (dados cedidos pelo IMAR).

Zona	Silica (ppm Si)	Amónia (ppm N)	Azoto Nitrato NO ₃ +NO ₂ (ppm N)	Nitritos (ppm N)	Fosfato (ppm P)
A	1,173	0,019	0,072	0,035	0,092
B	1,368	0,003	0,303	0,062	0,056

2.2. Limpeza e secagem da alga

Depois da recolha no campo, retiraram-se as impurezas e epibiontes/epífitas, lavando a alga com água destilada. Este processo foi repetido duas vezes (Figura 4). Após a apanha e depois de limpas, as algas foram armazenadas no congelador.

Antes de iniciar o processo de extração sequenciada, parte das algas foi seca ao sol enquanto a outra parte foi liofilizada.

Durante secagem das algas feita ao sol, utilizou-se uma estufa sem vácuo para complementar o processo de secagem durante os períodos noturnos, este tipo de secagem foi executada no período de uma semana.

A liofilização foi feita por sublimação da amostra congelada através de baixa pressão e aumento gradual da temperatura.



Figura 4 - Aparato do processo de lavagem dupla na limpeza da *F. ceranoides*.

Este processo permitirá verificar a influência do processamento no potencial farmacológico da alga para uso humano. Toda a temperatura durante todo o processo é regulada para valores iguais ou inferiores a 40 °C.

2.2.1. Preparação das amostras para o processo extrativo

Numa primeira etapa, as amostras de *F. ceranoides* (secas/liofilizadas) foram trituradas com recurso a um moinho de café (Figura 5a), durante 1-2 minutos, ficando resíduo com tamanho inferior a 0,5 milímetros. As amostras foram subsequentemente armazenadas em recipientes de plástico opaco, identificados, e mantidos num ambiente seco e protegido da luz (Figura 5b, 5c).

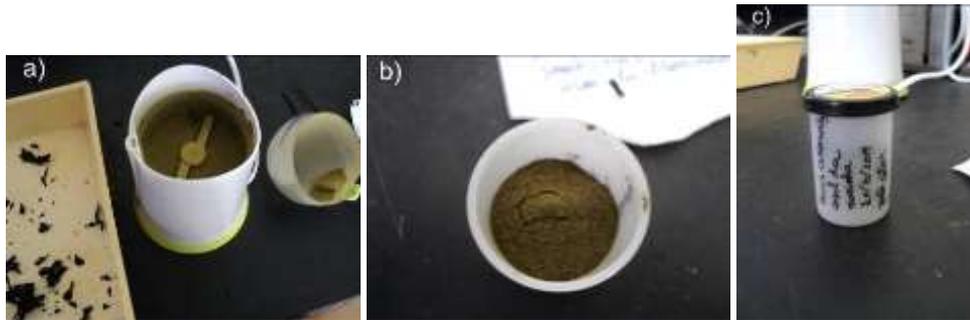


Figura 5 - Processo de trituração: a) trituração; b) aspecto da alga triturada; c) armazenamento da alga triturada.

2.3. Extração sequencial

A extração utilizada baseou-se na metodologia da extração sequencial em macroalgas proposta por Carvalho (2013), com modificações.

No geral, são feitas 3 diferentes extrações, para extrair substâncias apolares, polares e polissacarídeos, dando origem a quatro extratos diferentes.

Na primeira etapa da extração, concretamente dita, extraem-se os compostos apolares com recurso a hexano numa proporção de 1:20, na segunda é utilizado metanol numa proporção de 1:20, para extrair compostos polares, a terceira é aquosa (1:100) à temperatura de 100°C para polissacarídeos e por último é feita uma precipitação com etanol também para o processo de extração de polissacarídeos.

2.3.1. Extração com *n*-hexano

No início do processo, foram adicionados 20 ml de *n*-hexano a 1 g de amostra, num gobelet, o qual se manteve em agitação durante 20 minutos. Decorrido esse tempo, filtrou-se, sob vácuo por tromba de água, usando funis de filtração com sílica de porosidade G3 acoplados em quitasatos. Sob vácuo, o conteúdo do gobelet foi vertido para o filtro e o solvente recuperado para o quitasato ficando a amostra inicial retida no filtro. O solvente recuperado foi depois transferido para um balão erlenmeyer (Figura 6), e reservado. Este processo foi repetido até que a solução ficar translúcida. Os pigmentos são bons indicadores do processo extrativo pelo que a coloração do extrato permite avaliar o esgotamento dos compostos na amostra e o respetivo final desta parte do processo extrativo.

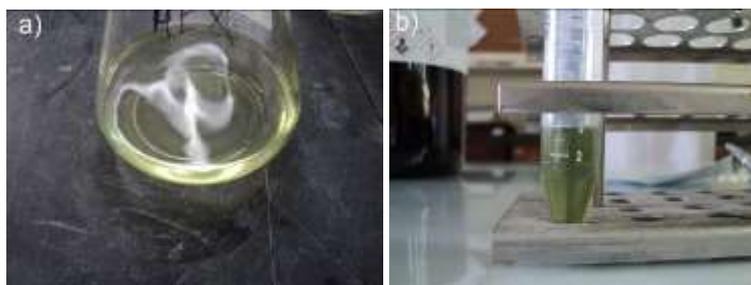


Figura 6 - Processo extração com *n*-hexano: a) solução obtida;
b) solução final concentrada.

A amostra seca (sem resíduos do solvente) foi recuperada facilmente do filtro de sílica sem perdas significativas.

No final, toda a solução de *n*-hexano que foi sendo recolhida ao longo do processo, foi concentrada para volumes muito menores (máximo 20ml) utilizando um evaporador rotativo (vácuo por tromba de água e banho a 37 – 40°C). A solução obtida no final deste processo passa a ser o nosso extrato de hexano (Figura 6b) tendo sido conservado a -22 °C.

2.3.2. Extração com metanol

De seguida, executou-se o mesmo método para o metanol e o solvente recuperado deste procedimento foi recolhido para outro frasco. A amostra seguiu para a próxima extração e a solução de metanol obtida no processo foi também concentrada no evaporador rotativo, exatamente como no procedimento anterior, mas desta vez para um volume menor do que 10 mL.

Esta solução obtida é o nosso extrato metanólico (Figura 7a) que foi depois passado para água destilada por recurso ao evaporador rotativo. Esta técnica consiste na adição de água destilada na proporção de 1:1. E como o metanol evapora primeiro que a água, vai sendo substituído pela mesma até esta deixar de estar presente na solução, passando-o a ter o extrato metanólico ressuspenso em água e pronto para ser congelado (- 22 °C) (Figura 7b). E posteriormente liofilizado, apenas extratos dissolvidos em água podem ser liofilizados.

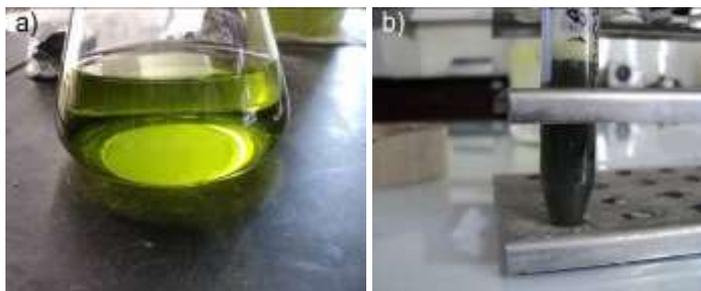


Figura 7 - Processo extrativo com metanol: a) solução obtida;
b) solução final concentrada.

2.3.3. Extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos

Para a extração aquosa, adicionaram-se 100 ml de água destilada num gobelet que foi levado para uma placa de aquecimento para atingir uma temperatura de 100°C. Só depois se adicionou a amostra para que ocorresse a extração aquosa a 100°C durante 2 horas (Figura 8a).

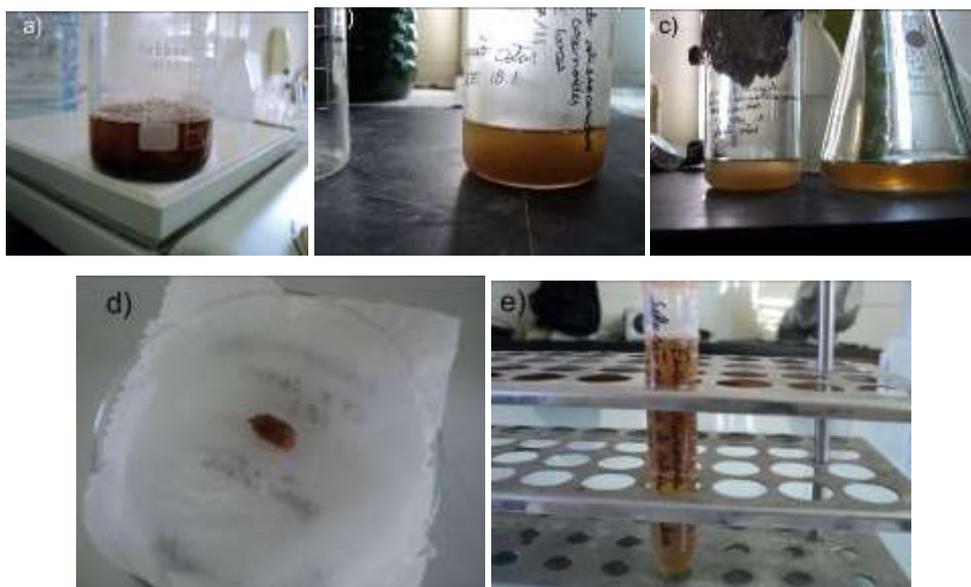


Figura 8 - Processo de extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos: a) aquecimento da solução inicial; b) precipitação dos polissacarídeos; c) polissacarídeos precipitados e solução aquosa; d) polissacarídeos antes do processo de secagem; e) solução aquosa final.

Após as 2 horas de extração aquosa, procedeu-se à filtração a vácuo da solução ainda quente através de filtros de sílica de porosidade G2 e G3, respetivamente. O que ficou retido no filtro de sílica não foi aproveitado, passando-se a trabalhar apenas com a solução aquosa recuperada no quitasato. Esta solução aquosa é rica em polissacarídeos que podem de ser extraídos por precipitação com recurso a etanol. Para isso a solução foi primeiro concentrada no evaporador rotativo (vácuo por tromba de água e banho a 40°C) até atingir cerca de $\frac{1}{4}$ do volume inicialmente obtido, de maneira a diminuir o volume de etanol (96-100%) a ser utilizado. Após a concentração da solução aquosa mediu-se o volume do concentrado transferiu-se para um gobelet onde se adicionou etanol numa proporção 1:1 (Figura 7b). Após a formação de duas fases, a fase líquida (etanol + solução aquosa) e fase sólida em suspensão (polissacarídeos). Deixou-se repousar de um dia para o outro, numa temperatura de 4°C.

O polissacarídeo sólido foi retirado com o auxílio de uma espátula metálica ou de uma vareta de vidro para um gobelet e o restante conteúdo da solução foi filtrado sob vácuo através de filtro de sílica com porosidade G3, para recuperar o máximo de polissacarídeos que ficaram retidos (Figura 7c). A solução líquida recuperada no quitasato, que é uma mistura da solução aquosa com o etanol foi levada ao evaporador

rotativo (banho a 37°C a 40°C) para recuperar o etanol e separar na sua totalidade da solução aquosa. Após a evaporação do etanol, continuamos com a solução no evaporador rotativo (nas mesmas condições) para concentrar a solução final até 1/3 do seu volume inicial (Figura 7e). Este concentrado aquoso passa a ser o nosso extrato aquoso e pode ser congelado (-22°C).

Aos polissacarídeos recuperados no gobelet adicionou-se etanol (96-99%) para que todo o conteúdo em polissacarídeos ficasse submerso durante 24 horas e levou-se a solução, obtida neste último passo, a -4°C antes de se descartar o etanol, através de uma decantação, complementada por uma filtração por vácuo, e levando o material obtido para a estufa com vácuo para secagem (40°C a 60°C) (Figura 7d). O extrato obtido contém os polissacarídeos precipitados pelo etanol.

Os extratos que se encontram em água (extrato metanólico e aquoso) foram subsequentemente liofilizados em recipientes apropriados. Todos os extratos, exceto os de polissacarídeos, foram conservados a -22°C.

2.4. Cálculo do rendimento

O processo de extração foi igual para todas as amostras, com base nos os testes iniciais ao *F. ceranoides*, o processo extrativo para uma única amostra foi o seguinte: 4 repetições do processo com n-hexano; e 5 repetições com metanol. A parte da extração aquosa não se alterou.

2.4.1. Cálculo do rendimento das amostras liofilizadas

Depois do processo de extração estar concluído as amostras foram liofilizadas em frascos previamente pesados. Após a liofilização, os frascos foram novamente pesados, permitindo, por diferença, o cálculo do peso total da amostra e o respetivo rendimento de extração.

2.4.2. Cálculo do rendimento em polissacarídeos

Os polissacarídeos foram desidratados na estufa de vácuo em, caixa de Petri previamente pesada. O peso final pós a desidratação completa permitiu calcular o peso total de polissacarídeos obtidos e o respetivo rendimento de extração.

2.5. Quantificação de fenóis totais - Método de Folin-Ciocalteu

O método utilizado foi previamente otimizado, conforme o descrito nos resultados e discussão (pg.42).

Neste caso as amostras foram solubilizadas consoante o solvente utilizado durante o processo de extração. O volume final da amostra foi de 500µl, com a concentração da amostra a variar (Anexos 1).

Inicialmente para o extrato metanólico, adicionaram-se 100 µl de água MilliQ, 100 µl da amostra em metanol, 100 µl do reagente Folin-Ciocalteu, após agitação no vortex (30 segundos), adicionaram-se 500 µl de carbonato de sódio a 20% e 200 µl de água MilliQ.

No caso, do extrato aquoso, a amostra solubilizada em água MilliQ foi adicionada a 100 µl de metanol 'Pro analise', procedendo-se da mesma forma que para o extrato metanólico.

Em ambos os casos as soluções foram levadas ao vortex, cerca de 30 segundos, e depois mantidas durante 45 minutos, no escuro.

A absorvência das amostras foram lidas no espectrofotómetro, num comprimento de onda de 750 nm. As análises foram feitas em triplicado. A leitura foi feita contra um controlo, contendo os regentes utilizados na solução exceto a amostra. A curva de calibração foi obtida utilizando padrões de floroglucinol (5-40µg/ml)

2.6. Espectros ultravioleta e visível

As amostras já diluídas, entre 4 e 30 x (dependo da amostra e de extrato), foram analisadas num espectrofotómetro (ultravioleta: Hitachi U2000; visível: Cintra 101), Os espectros obtidos permitiram a obtenção dos máximos de absorção na zona de radiação

visível e ultravioleta. O extrato metanólico foi sub-fraccionado para a posterior análise: ao resíduo seco (1mg) adicionaram-se 1ml de solução de acetona a 70%. A fração insolúvel em acetona foi dissolvida em metanol enquanto que a fração solúvel foi posteriormente seca numa estufa de vácuo, e redissolvida em metanol, para análise no espectro UV.

O extrato aquoso foi solubilizado em água MilliQ antes da análise no espectrofotómetro.

Para o extrato metanólico (sub-fracção) e o extrato aquoso, utilizou-se um padrão de floroglucinol, para melhor compreensão dos resultados no espectro UV.

As condições de obtenção dos espectros estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Características técnicas usadas durante a obtenção dos espectros UV e V.

Caracteriscas	UV	V
Comprimento de onda superior	350 nm	750 nm
Comprimento de onda inferior	200 nm	350 nm
Velocidade de leitura	200 nm/min	250 nm/min

2.7. Análise por FTIR-ATR

O FTIR-ATR (Fourier transform infrared spectroscopy- attenuated total reflectance) é um método de espectroscopia numa gama de onda de infravermelhos, que é utilizado no campo do estudo e caracterização dos ficolóides e outros compostos presentes nas algas (Pereira, 2013).

Os espectros foram obtidos pelo grupo do professor Paulo J. A. Ribeiro-Claro, na Universidade de Aveiro, que possui o equipamento e metodologias de processamento de amostras de algas (Pereira, 2013).

2.8. Cromatografia em camada fina (TLC)

2.8.1. Para pigmentos

As condições técnicas para a realização desta TLC foram baseadas no método de Mikami (2013). Recorreu-se a placas de sílica gel 60 F254 (Merck), sendo fase móvel constituída por uma solução de éter de petróleo-acetona (7:3, v/v).

As amostras liofilizadas dos extratos metanólicos foram solubilizadas em metanol, com uma concentração de 5 mg/ml. Após ativação da placa (120°C durante 5 minutos), aplicaram-se 20 µl da solução a 1,5cm da base placa. O eluente foi previamente vertido para a camara de cromatografia deixando-se saturar 30 min, no mínimo. A placa foi inserida na camara e deixou-se que eluente corresse até uma altura de 10 centímetros. No final a placa foi retirada e após a completa evaporação do solvente à temperatura ambiente, observou-se a placa à luz visível.

2.8.2. Para florotaninos

As condições técnicas para a realização desta TLC baseadas com o método de Shibata e colaboradores (2004). Recorreu-se a placas de sílica gel 60 F254 (Merck), sendo fase móvel constituída por uma solução de clorofórmio – metanol - água - ácido acético (65:25:4:3, v/v).

As amostras liofilizadas dos extratos metanólicos foram solubilizadas em metanol, com uma concentração de 5mg/ml, tendo sido utilizado o floroglucinol como padrão. Após ativação da placa (120°C durante 5 minutos), aplicaram-se 20µl da solução a 1,5 cm da base placa. O eluente foi previamente vertido para a camara de cromatografia deixando-se saturar 30 min, no mínimo. A placa inserida na camara e deixou-se que eluente corresse até uma altura de 10 centímetros, ao abrigo da luz. No final a placa foi retirada e após a completa evaporação do solvente, à temperatura ambiente, foi revelada com solução de Vanilina-ácido sulfúrico (1g:100 ml). Após a aplicação do revelador, a placa foi aquecida a 110°C durante 10min e observada à luz visível e ultravioleta.

2.9. Ensaio de atividade antioxidante com o DPPH

Os extratos testados foram o extrato metanólico e o extrato aquoso que foram solubilizados em metanol absoluto e metanol a 40%, respectivamente. Mediram-se 5 diluições a partir de uma concentração inicial de 5mg/ml.

O método utilizado foi descrito por Blois (1958). Utilizou-se uma solução metanólica de DPPH 500 μ M. Antes iniciar o ensaio, a solução de DPPH foi testada para que absorvência do controlo estivesse entre 1,0 e 1,2.

O branco do controlo foi preparado adicionando 1 ml de tampão e de 2 ml de metanol num tubo de ensaio; o controlo preparou-se adicionando 1 ml de tampão, 1,5 ml de metanol e 0,5 ml da solução de DPPH, previamente feita. O controlo foi avaliado previamente devendo apresentar valores de absorvência de 0,91 a 1,2 no comprimento de onda de 517 nm, para que o teste possa prosseguir.

A utilização do tampão de acetato durante o ensaio permite a manutenção do pH a 6,0 em todas as amostras para adequado desenvolvimento da reação. Este tampão foi preparado com acetato de sódio tri-hidratado 0,2 M e calibrado para um pH de 6 com adição de ácido acético.

O branco da amostra foi preparado adicionando 1 ml de tampão, 1,9 ml de metanol e 0,1 ml de amostra num tubo de ensaio. Para a amostra adicionou-se, num tubo de ensaio, 1 ml de tampão, 1,4 ml de metanol, 0,1ml de amostra e 0,5 ml da solução de DPPH previamente feita. Imediatamente à adição do DPPH no tubo de ensaio, este é agitado no vortex, e colocado ao abrigo da luz durante 30 minutos, antes de se ler, num espectrofotómetro, o valor da absorvência a 517nm. Cada concentração foi testada em triplicado.

Calculou-se o valor da diferença entre a absorvência do controlo e o da absorvência das concentrações. Depois de tratados estatisticamente para obter a reta de calibração com r^2 superior a 0,99, calculou-se o valor IC50 para cada amostra.

2.10. Ensaio de atividade antioxidante com o ABTS (pH neutro)

O ensaio realizado foi descrito em Re (1999).

Neste ensaio testaram-se os extratos metanólico, aquoso e os polissacarídeos. Os extratos foram dissolvidos em água MilliQ (extrato aquoso e os polissacarídeos) ou numa solução metanólica a 20% (extrato metanólico). Utilizou-se uma concentração

inicial de 5 mg/ml, da qual se prepararam as seguintes diluições: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 da concentração inicial.

A solução de ABTS foi preparada solubilizando 38,41mg de ABTS e 6,62mg de persulfato de potássio em 10ml de água MilliQ, e armazenando ao abrigo da luz durante cerca 16 horas.

Passado esse tempo, a solução base do ABTS, preparada anteriormente, foi diluída numa proporção de 1:80, de modo a obter uma solução cuja absorvência a 734 nm fosse de $0,7 \pm 0,02$, adicionando-se água MilliQ, se estivesse demasiado concentrada, ou solução base de ABTS caso contrário.

Para o ensaio, num tubo contendo 0,05ml de amostra adicionaram-se 2ml de ABTS com, e agitou-se num vortex, 30 segundos e colocando-se ao abrigo da luz durante 4 minutos. Após esse tempo a absorvência foi lida a 734 nm contra um branco (água MilliQ).

Calculou-se o valor da diferença entre a absorvência do controlo e o da absorvência das concentrações. Depois de tratados estatisticamente para obter a reta de calibração com r^2 superior a 0,99, calculou-se o valor TEAC para cada amostra.

Paralelamente calculou-se a taxa de inibição para uma concentração comum, o teor de inibição das amostras utilizando a equação:

$$\% \text{ Inibição do ABTS} = (1 - AS/AC) * 100.$$

3. Resultados e discussão

3. Resultados e discussão

3.1. Análise geral às zonas de colheita

Optou-se por realizar uma única colheita da alga, de modo, a garantir que ocorresse na mesma data para ambas as zonas, devido à sazonalidade na concentração de alguns compostos neste género (Kim, 2012). A data de colheita foi condicionada pela existência de condições atmosféricas e marítimas favoráveis. Sendo que Setembro de 2014, foi um mês de extremos, com dias de grande pluviosidade entre dias com temperaturas altas, optou-se por recolher as amostras numa semana com melhor previsão meteorológica.

Em ambas as zonas de recolha, foi possível observar que a *F. ceranoides* apresentava comportamentos ecológicos diferenciados. Na zona A, está mais presente no patamar superior da zona intertidal em pequenos nichos, rodeado por *F. vesiculosus*, alga dominante naquela zona, observando-se também a presença de híbridos de *F. ceranoides*, sobretudo com *F. vesiculosus*. Durante um trabalho de campo em Março de 2015, para observar o comportamento do *F. ceranoides*, foi possível observar um aumento exponencial do número de espécimes e uma melhor definição da área ocupada pela espécie. Na zona de colheita, o *F. ceranoides* colonizava o patamar superior da zona da maré-alta enquanto no patamar inferior a alga dominante era o *F. vesiculosus*. Nesta zona os espécimes apresentavam-se muito expostos às agressões mecânicas marítimas e condições meteorológicas adversas.

Na zona B, esta alga coloniza a parte superior da zona afetada pelo efeito das marés, estando maioritariamente protegida por uma espécie de gramínea, não identificada, que também ocorre nesta área, sendo que a dimensão da área que o *F. ceranoides* ocupa é mais reconhecível durante a subida maré, pois existe um denso substrato lamacento, que camufla e protege a alga durante o período entre as marés cheias. No entanto, existem raros espécimes em substrato rochoso não protegido.

Nesta zona os espécimes estão menos expostos às agressões mecânicas marítimas mas, por outro lado, podem existir agressões mecânicas de origem humana.

3.1.1. Parâmetros físico-químicos da água nas zonas em estudo

Os parâmetros físico-químicos da água nas zonas de colheita foram cedidos pela Doutora Ana Carla Garcia (IMAR) demonstram que o fator de diferenciação mais notório entre as zonas é a salinidade, cuja diferença fica situada nos 9,76%. O segundo parâmetro físico-químico mais influente será o Oxigênio, sendo o resultado da maior ou menor agitação da água, o que pode provocar maior possibilidade de danos de origem mecânica na alga.

No que toca aos restantes parâmetros físico-químicos, existem pequenas diferenças, menos importantes do que as que foram referidas anteriormente. De notar por exemplo que, como a alga está no junto ao limite superior do leito, a transparência da água não vai ter influência significativa no seu desenvolvimento.

3.2. Análise geral do processo de limpeza da alga

Após a colheita da alga, e antes de se proceder à secagem da *F. ceranoides*, houve a necessidade de lavar a alga utilizando um procedimento mais complexo do que é habitual para algas de ambiente marinho (lavagem com água destilada para retirar sais e possíveis epífitas/epibiontes). O tipo de lavagem foi idêntico para todas as amostras, a alga foi lavada duas vezes por água destilada, antes de ser aproveitada. Os espécimes contendo zonas deterioradas ou com substrato lamacento de difícil limpeza foram rejeitadas.

3.3. Processo extrativo

No decorrer da extração sequencial no *F.ceranoides* foi possível observar diferenças notórias no comportamento das amostras. Estas diferenças encontram-se ilustradas na figura 9. Durante o processo para obtenção do extrato aquoso e de precipitação dos polissacarídeos, foi possível observar diferenças na cor dos extratos obtidos em cada zona (Figura 9b, c).

A parte mais problemática do método inicial da extração sequencial foi a precipitação dos polissacarídeos, pois esta parte teve que ser modificada do protocolo inicial, devido a uma maior dificuldade na precipitação dos polissacarídeos, neste caso,

utilizou-se etanol a 99% e em regime de *overnight* no frigorífico (4°C), para que este processo fosse mais rentável em termos de separação de fases. Enquanto os polissacarídeos da zona B apresentam uma coloração acastanhada, os da zona A apresentam uma cor mais esbranquiçada (Figura 9c).

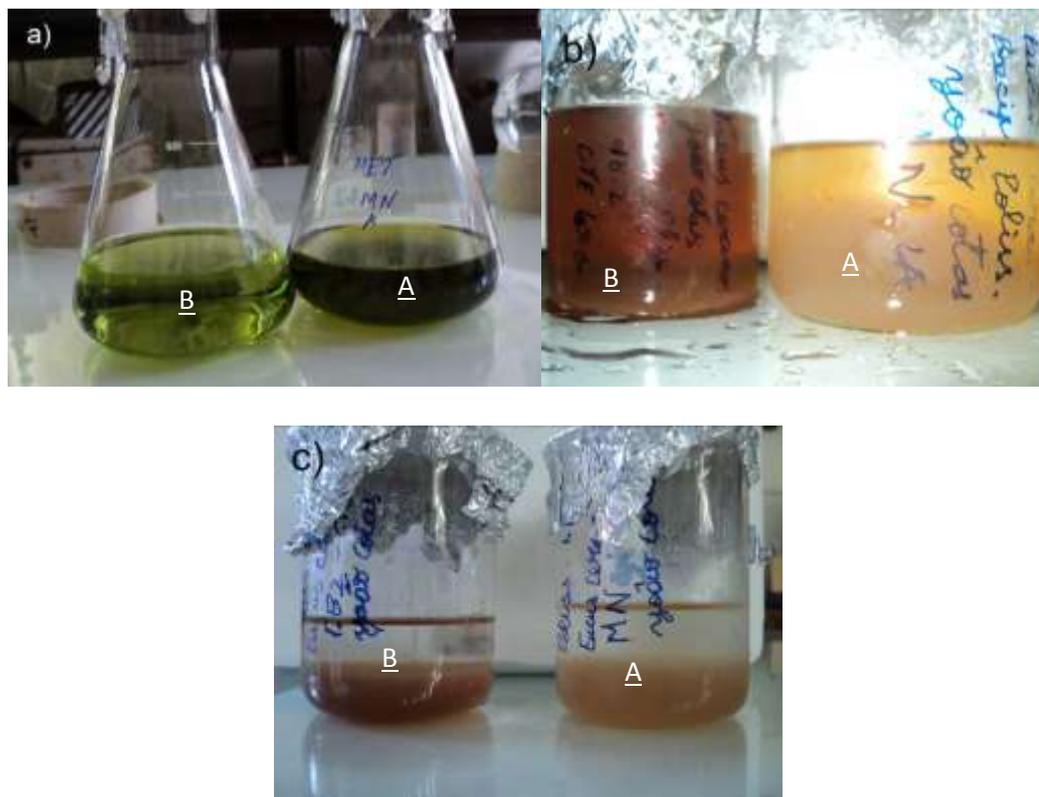


Figura 9 - Diferenças entre as amostras observadas durante o processo de extração sequencial: a) extrato metanólico (amostra B e amostra A); b) solução de precipitação de polissacarídeos (amostra B e amostra A); c) polissacarídeo (em solução de etanol) (amostra B e amostra A).

3.3.1. Rendimento da extração sequencial

O método de extração utilizado é relativamente novo, não havendo bibliografia nem experiência com o *F. ceranoides* que permitam apresentar uma previsão e dos valores do rendimento esperado. Assim, neste caso os valores de rendimento obtidos nas extrações serão discutidos por comparação entre as amostras.

A análise comparativa dos valores de rendimento obtidos nas extrações mostrou que estes sofreram variações de apreciáveis, dependendo do tipo de secagem da amostra

e da zona (Tabela 7), neste caso estas variações vão analisadas posteriormente. O extrato em *n*-hexano não foi utilizado, pois o método mais conhecido de conseguir fazer ensaios bioativos com este extrato é necessário recorrer ao reagente DMSO, pois o DMSO é o solvente mais conhecido para a solubilização de moléculas apolares, sem posuir um grande poder de interferência em ensaios bioquímicos, aquilo que ocorre com o *n*-hexano. Mas este reagente não existia no laboratório.

Tabela 7 - Rendimento médio da extração sequencial, por cada fase extrativa em *Fucus ceranoides* (média, n=3).

Amostras	Extrato metanólico	Extrato Aquoso	Polissacarídeos	Total
A	10,36%	5,00%	14,22%	30%
B	4,40%	6,87%	5,78%	17%
LA	3,35%	6,92%	16,25%	27%
LB	3,69%	3,39%	7,51%	15%

3.3.1.1. Rendimento do extrato metanólico

Ao longo do processo extrativo com metanol, foram-se notando algumas diferenças na coloração dos extratos obtidos das amostras. Provavelmente por uma alteração nos dos compostos presentes na alga em resultado do processo de secagem. Este aspeto será discutido mais adiante.

A figura 10 mostra o rendimento extrativo com metanol obtido para as diferentes amostras. É visível no gráfico que a amostra A (alga seca ao sol, zona A) ($10.36\% \pm 0.41$) tem o maior rendimento nesta parte da extração sequencial do que a amostra liofilizada da mesma zona ($LA = 3,35\% \pm 0,73$), sendo evidente a influência do tipo de secagem.

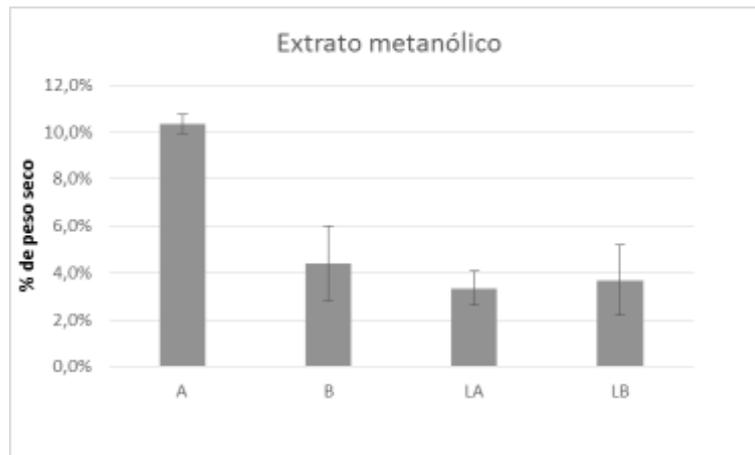


Figura 10 - Rendimento extrativo da extração com metanol (média \pm sd.; n=3).

A segunda amostra contendo maior rendimento é a amostra B (alga seca ao sol, zona B) (4.4% \pm 1.59), confirmando o mesmo comportamento da amostra A em que o rendimento extrativo com metanol das amostras secas ao sol é superior às amostras liofilizadas, o que pode dever-se a uma oxidação dos compostos mais sensíveis (discutido posteriormente). Os valores do rendimento das amostras liofilizadas muito idênticos (LA e LB) (LB= 3.69% \pm 1.51) demonstram igualmente que no rendimento a possível diferença neste método será mesmo o tipo de secagem. A salinidade é outro fator que parece influenciar o rendimento extrativo uma vez que se observam diferenças significativas entre os rendimentos das amostras colhidas em zonas diferentes.

3.3.1.2. Rendimento do extrato aquoso

Durante o processo para obtenção do extrato aquoso, foi possível observar diferenças na cor dos extratos obtidos em cada zona (Figura 2; b) o que sugere diferenças na composição quantitativa ou qualitativa das amostras.

A amostra LA (6.92% \pm 1.21) foi a que apresentou maior rendimento, opondo-se à LB (3.39% \pm 0.87), sendo que as amostras secas ao sol apresentaram valores de rendimento intermédios (Figura 11).

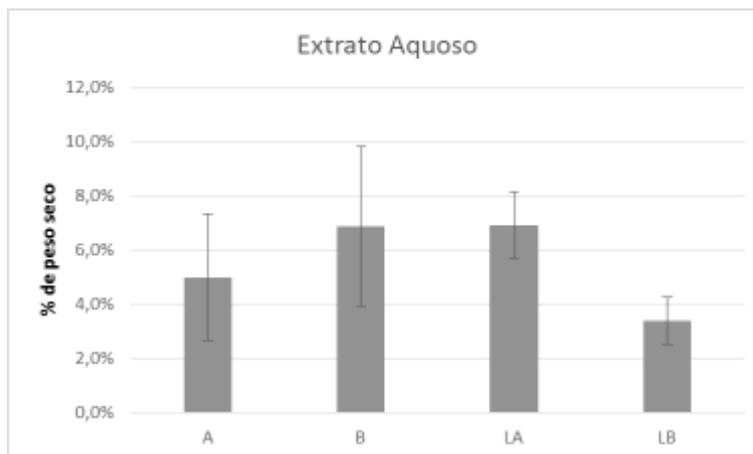


Figura 11 - Rendimento extrativo da extração aquosa (média \pm sd.; n=3).

Neste caso, salienta-se que o desvio padrão é mais elevado do que o que ocorreu na parte do processo com metanol. Sendo que a justificação será a mesma do que a dada anteriormente, somando que esta parte será mais técnica do que a anterior.

3.3.1.3. Rendimento em polissacarídeos

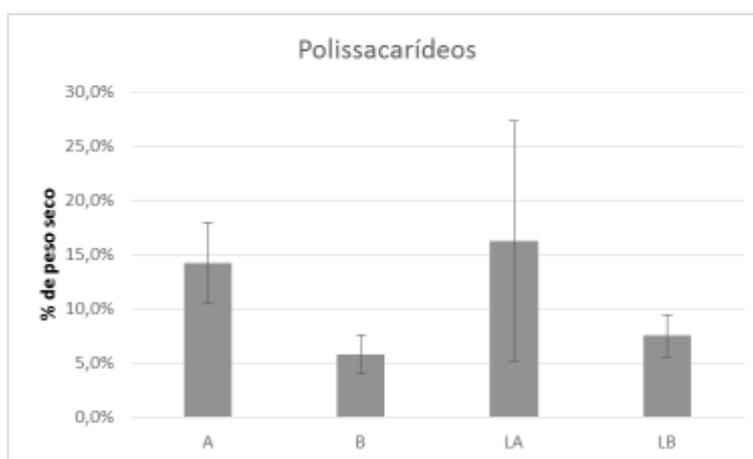


Figura 12 - Rendimento extrativo da precipitação de polissacarídeos (média \pm sd.; n=3).

As amostras provenientes da zona A, de ambiente de maior salinidade, apresentaram um maior rendimento na extração de polissacarídeos (A e LA) (14,22% \pm 3,78; 16,25% \pm 11,06). Este facto pode ser explicado pela maior agitação marítima nesta zona, obrigando o *F. ceranoides* a desenvolver um mecanismo para se proteger da agressão mecânica neste nicho ecológico. Neste caso, os polissacarídeos, sobretudo o ácido algínico será o composto mais importante na proteção mecânica da alga, que é o principal polissacarídeo do género *Fucus*.

Na zona B, sendo uma zona de menor agitação e conseqüentemente de menor desgaste mecânico/físico, o *F. ceranoides* não possui uma grande concentração de polissacarídeos, neste caso também pode ser por outros motivos, como por exemplo, um aumento na síntese de metabolitos secundários para proteção contra herbivoria ou contra os raios ultra-violetas (Forslund, 2012).

3.3.1.4. Rendimento extrativo total

Apesar do método extrativo não ser específico para uma subclasse de compostos permite, no geral, ter uma noção do rendimento médio de cada amostra.

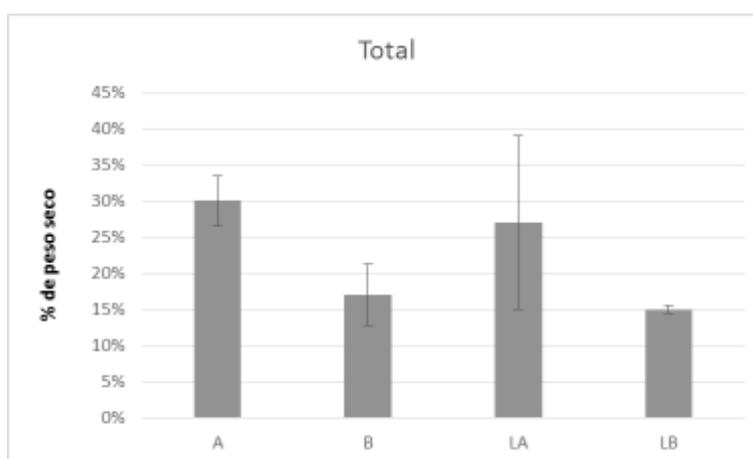


Figura 13 - Gráfico do rendimento extrativo total (média \pm sd.; n=3).

O método extrativo demonstra que as amostras provenientes da zona marinha (zona A) evidenciaram um maior rendimento (A= 30% \pm 3.44; LA= 27% \pm 11.94) comparativamente com a zona menos salina (zona B; B= 17% \pm 4.20; LB= 15% \pm 0.559).

Em suma, observam-se diferenças devido à salinidade mas também devido ao processo de secagem.

3.4. Otimização do método de quantificação de fenóis totais- Método de Folin-Ciocalteu

3.4.1. Otimização do método de Folin- Ciocalteu

Este método foi otimizado para a quantificação de compostos fenólicos no *F. ceranoides*, com base nos métodos anteriormente referenciados na introdução. Neste capítulo, serão apresentados os dados/resultados obtidos durante o estudo e otimização dos seguintes parâmetros do método: solventes, concentração dos reagentes, luz e temperatura de reação, tempo de reação, controle, comprimento de onda da medição e calibração.

3.4.1.1. Solventes utilizados e concentração dos reagentes na mistura reacional

Inicialmente, foi necessário ter em conta a solubilidade das amostras nos solventes normalmente utilizados neste método, como por exemplo, acetona a 70%, metanol ou água destilada (Koivikko, 2005; Tierney, 2013).

Os extratos do *F. ceranoides* em metanol (a 100%) correm o risco de precipitar em soluções com um alto teor em água. Por outro lado os reagentes deste método: Folin-Ciocalteu e o carbonato de sódio têm a tendência a precipitar em soluções com elevada percentagem de metanol.

No que respeita às concentrações dos reagentes, foi seguido sobretudo o método proposto por Tierney (2013), complementado por Zubia (2009) e Koivikko (2008) para encontrar uma proporção ideal entre os principais reagentes. Tierney (2013) utilizou 700 µl de carbonato de sódio (20%) para 1 mL de mistura reacional o que origina uma precipitação apreciável após a adição do metanol, obrigando a realizar uma centrifugação. Por sua vez, Zubia (2009) utilizou uma mistura reacional com menos carbonato e portanto mais tolerante à adição de metanol: 2:1:4:13 (amostra: reagente de Folin Ciocalteu; carbonato de sódio a 20%: água destilada). Por outro lado, o trabalho de Koivikko sugere que a absorvência obtida pelo método é diretamente proporcional à concentração do carbonato de sódio. Assim, combinando estes dois fatores (solubilidade em metanol e absorvência) optou-se pela concentração final de

2:1:5:2 (amostra: reagente de Folin Ciocalteu; carbonato de sódio a 20%: água destilada).

Neste caso, tornou-se o ensaio mais sensível necessitando de uma menor quantidade de amostra para se poder fazer o ensaio.

Foi também analisada uma ordem específica na adição de água MilliQ e do metanol (com e sem amostras), em que o objetivo final era evitar a precipitação dos reagentes e da amostra, facto prejudicial ao ensaio.

Após uma análise visual da reação, comprovou-se que a concentração e a ordem da adição testada eram adequadas uma vez que não se formava um precipitado que invalidasse o ensaio. As condições de análise otimizadas estão descritas no material e métodos.

3.4.1.2. Luz e temperatura de reação

Na escolha da temperatura que deveria ser utilizada, optou-se por se escolher a temperatura ambiente, num local escuro, opção seguida pela maioria dos investigadores. Pois sendo este um ensaio baseado na formação de um cromóforo, que é sensível à luz e evitando temperaturas elevadas que poderiam originar degradação dos compostos.

3.4.1.3. Controlo

Como o espectrofotómetro é de duplo feixe, o controlo foi a solução final de reagentes sem a amostra, pois como a solução possuía uma pequena percentagem de metanol, que reage com os outros reagentes, foi preferido este tipo de controlo pois anula a reação provocada pelo metanol durante a leitura da absorvência. E assim, o valor final refere-se somente à atividade da amostra, sendo o valor da reação do metanol automaticamente desprezado.

3.4.1.4. Tempo de reação

Para determinar o tempo de reação e a estabilidade do cromóforo, foi necessário obter uma curva da cinética de reação (Abs vs Tempo) do padrão (Figura 14 a) e de uma

amostra (imagem 14b), verificou-se que a absorvência aumenta, mas estabilizando por volta dos 45 minutos, tendo sido este o tempo de reação escolhido para o método, de notar que nos dois gráficos o t_0 é 10 minutos após a adição dos reagentes.

Neste caso, optou-se fazer as medições ao fim de 45 minutos, tal como proposto por Koivikko (2005).

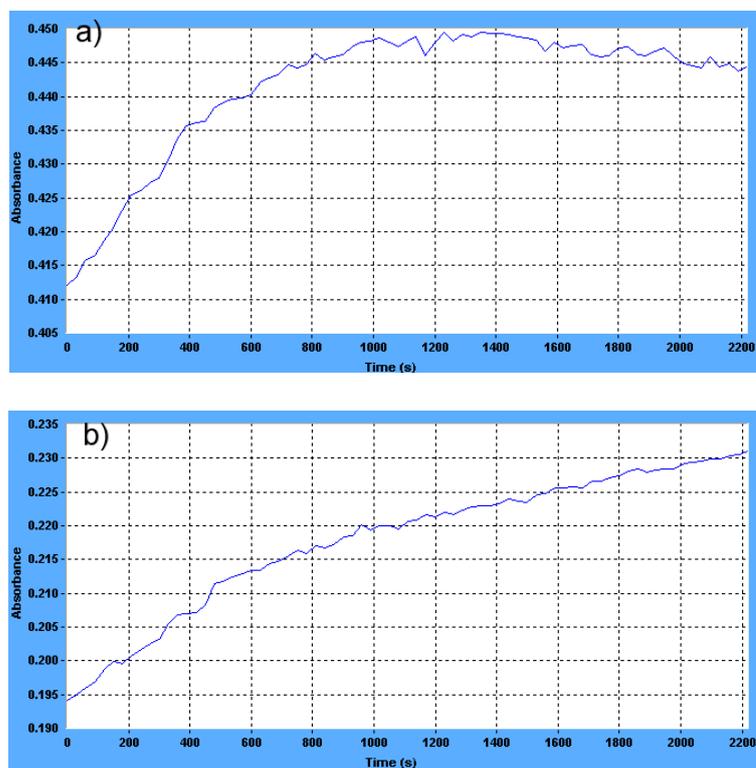


Figura 14 - Gráfico da cinética da reação de Folin Ciocalteu com floroglucinol (10µg/ml) (a) e com amostra LB (50 µg/ml) (b).

3.4.1.5. Comprimento de onda de medição

Na literatura existe uma grande variedade nos comprimentos de onda utilizados na medição, encontrando-se entre os 700 nm e os 765 nm. Por não haver unanimidade, foi necessário determiná-lo experimentalmente (Figura 15).

Para selecionar o comprimento de onda de medição obteve-se um espectro de absorção entre 390 e 790 nm do cromóforo resultante da reação de Folin Ciocalteu de uma amostra do padrão. Observou-se um máximo de absorção a cerca de 750 nm tendo sido este o comprimento de onda escolhido para a medição.

Este comprimento de onda tem sido usado por alguns autores como Lordan (2013) e Lim (2002).

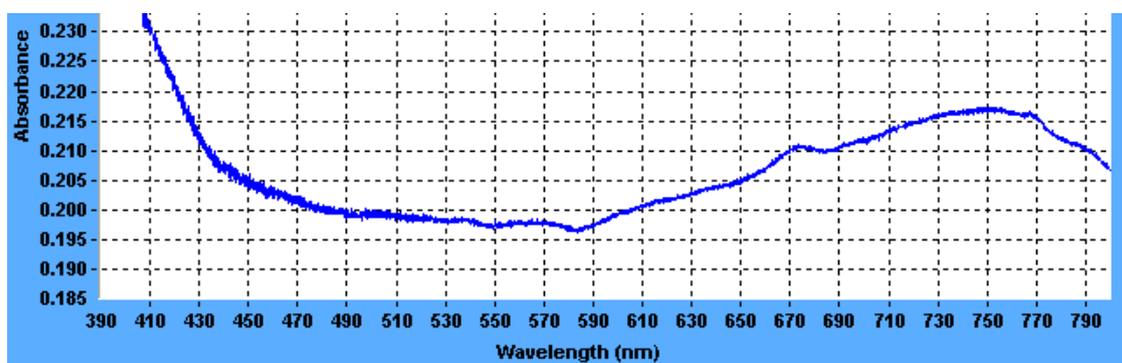


Figura 15 - Espectro de absorção do cromóforo resultante da reação de F. Ciocalteu com um padrão de floroglucinol.

3.4.1.6. Calibração do método

Na calibração do método de Folin Ciocalteu têm sido utilizado principalmente: o ácido gálico (Chew, 2008) e o floroglucinol (Koivikko, 2008). O primeiro tem sido principalmente utilizado para a quantificação de fenóis totais em plantas, embora alguns autores também o utilizem em algas. O floroglucinol é a molécula base dos florotaninos, composto fenólico mais abundante nas algas castanhas, encontrando-se também na forma livre. Muitos autores optam por utilizá-lo na determinação de fenóis totais em algas devido a sua maior semelhança estrutural (Koivikko, 2008; Tierney, 2013). Pela mesma razão optou-se pela sua utilização para calibrar o método.

A reta de calibração foi feita, nas condições otimizadas com 10 concentrações diferentes do floroglucinol (5 a 40 $\mu\text{g/ml}$).

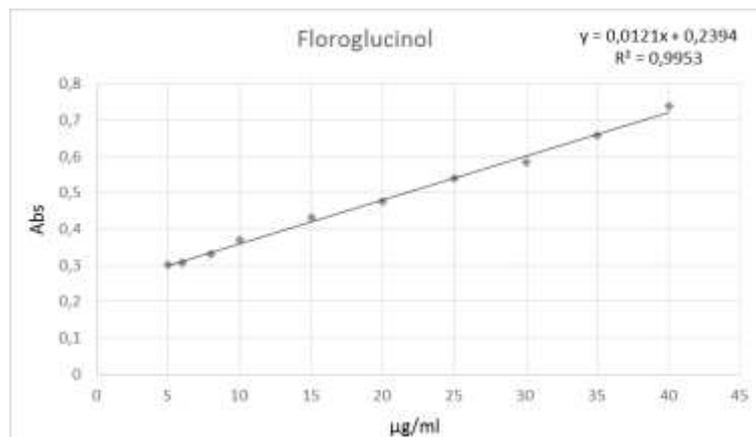


Figura 16 - Recta de calibração do padrão utilizado no método de fenóis totais – método de Folin-Ciocalteu, com a equação da reta e o R^2 .

3.4.2. Método de Folin-Ciocalteu – análise das amostras

Após otimização do método e da obtenção da reta de calibração, procedeu-se à determinação do conteúdo fenólico total nas amostras. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Conteúdo fenólico total dos extratos testados de *Fucus ceranoides* (média \pm SD; n=3).

Amostras	Extrato metanólico		Extrato Aquoso	
	PGE $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato liofilizado	mg de floroglucinol/g de alga seca	PGE $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato liofilizado	mg de floroglucinol/g de alga seca
A	25,73 \pm 0,83	0,267 \pm 0,009	12,89 \pm 0,91	0,064 \pm 0.005
B	13,36 \pm 1,27	0,059 \pm 0.006	12,38 \pm 0,35	0,085 \pm 0.002
LA	19,37 \pm 0,27	0,065 \pm 0.001	42,38 \pm 0,37	0,293 \pm 0.003
LB	49,48 \pm 3,94	0,183 \pm 0,015	31,59 \pm 2,88	0,107 \pm 0.010

- PGE: Unidades equivalentes de floroglucinol

Em relação aos extratos aquosos, é notória a influência do processo de secagem nas duas amostras uma vez que as amostras liofilizadas foram aquelas que apresentaram maior conteúdo em compostos fenólicos: LA ($42,38 \pm 0,37$) e LB ($31,59 \pm 2,88$) enquanto para as amostras secas ao sol se obtiveram valores muito inferiores: A ($12,89 \pm 0,91$) e B ($12,38 \pm 0,35$).

No caso dos extratos metanólicos, embora a amostra da alga liofilizada da zona B (LB= $49,48 \pm 3,94$) apresente maior conteúdo em fenóis que a mesma amostra seca ao sol da zona B ($13,36 \pm 1,27$) não se observa o mesmo efeito em relação à amostra A. Neste caso o extrato metanólico obtido da alga seca ao sol (A= $25,73 \pm 0,83$) apresenta maior conteúdo em fenóis que o extrato obtido da amostra liofilizada (LA= $19,37 \pm 0,27$).

Os resultados mostram que parece haver uma degradação de alguns compostos fenólicos durante a secagem ao sol, embora no caso do extrato metanólico da amostra A, o teor de fenólicos na amostra seca ao sol é superior à amostra liofilizada da mesma zona.

Conclui-se assim que para além das condições ambientais, o processo de secagem tem uma influência crucial no teor de compostos fenólicos extraídos.

3.5. Espectros UV e V

Para analisar a composição dos extratos, foram obtidos espectros na zona do UV e V.

O extrato metanólico liofilizado foi retomado em acetona a 70%, a fracção solúvel contendo a maior parte dos pigmentos e florotaninos solúveis (Fracção de acetona 70%), foi separada da fracção insolúvel tendo esta sido solubilizada em metanol (Fracção metanólica) (Koivikko, 2008).

A análise dos comprimentos de onda dos máximos e das inflexões de cada amostra do extrato metanólico e respetivas fracções e extrato aquoso permitiu e identificar os principais constituintes nas amostras: pigmentos e florotaninos, bem como o efeito dos processos de secagem na composição das amostras.

Tabela 9 - Máximos de absorvência obtidos durante a análise espectrofotométrica das amostras.

Extrato	Fração	Amostra	Ultravioleta (nm)	Visível (nm)
Metanólico	Acetona 70%	Met A	214	665; 410; 444sh
		Met B	216	665; 408
		Met LA	225	664; 434; 417
		Met LB	232	664; 435; 415
	Metanol	Floroglucinol	210; 268	-
		Met A	209; 254	665; 406
		Met B	208.4; 265	665; 407
		Met LA	210; 269	665; 412
		Met LB	211; 271	665; 409
	Aquoso	-	Floroglucinol	239; 267
Aq A			206; 267sh	-
Aq B			210; 261sh	-
Aq LA			228; 271sh	-
Aq LB			228; 274sh	-

Observam-se diferenças significativas na composição dos extratos metanólicos, sendo igualmente visível a influência do processo de secagem, em especial na composição da fração de acetona 70% do extrato metanólico.

Na zona do visível, é notório, pela intensidade das bandas de absorção características (Wright, 1987) que o pigmento carotenoide principal, a fucoxantina (máximo de absorção a 435 nm), está presente em maior quantidade nas amostras liofilizadas do que nas secas ao sol, no entanto, a amostra A apresenta uma inflexão naquela zona de absorvência, indicando a presença de fucoxantina. A clorofila a e c serão responsáveis pelos outros dois máximos observados na zona do visível (664/5 e 407/410/415/417 nm), variando a intensidade conforme a concentração de cada uma das clorofilas.

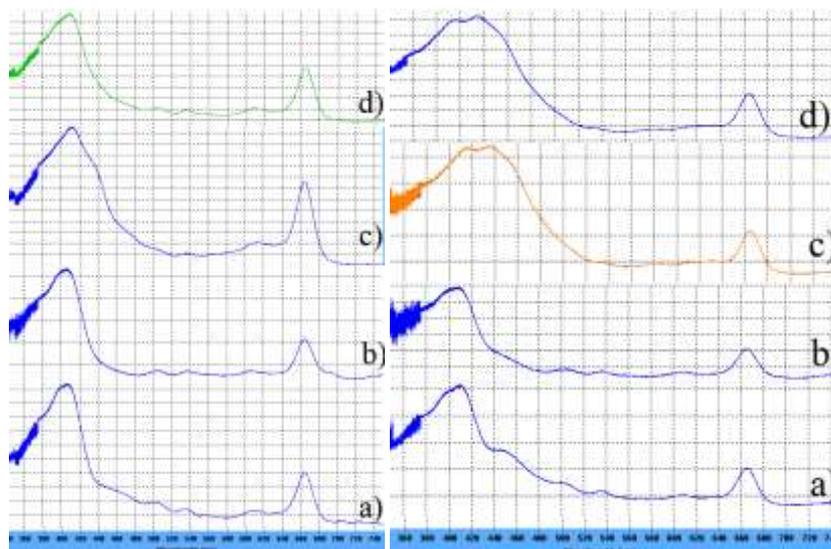


Figura 17 - Espectros da zona visível da subfracção de acetona (esquerda) e da fracção metanólica (direita) do extrato metanólico: a) Amostra A; b) Amostra B; c) Amostra LA; d) Amostra LB.

Na fracção metanólica, na zona do visível detetaram-se apenas bandas características das clorofilas, pois somente existe um máximo por volta dos 400 nm, e este varia entre as amostras analisadas, havendo ligeiras diferenças entre as amostras liofilizadas e não liofilizadas. A análise dos espectros UV permitiu detetar a presença de bandas características de compostos fenólicos, nomeadamente floroglucinol, cujo máximo característico a 210 nm está presente em todas as amostras, no entanto verificam-se diferenças entre as amostras secas ao sol e liofilizadas na zona situada entre os 254 nm e os 271 nm sugerindo a ocorrência de alterações (degradação ou oxidação) de compostos fenólicos durante o processo de secagem ao Sol.

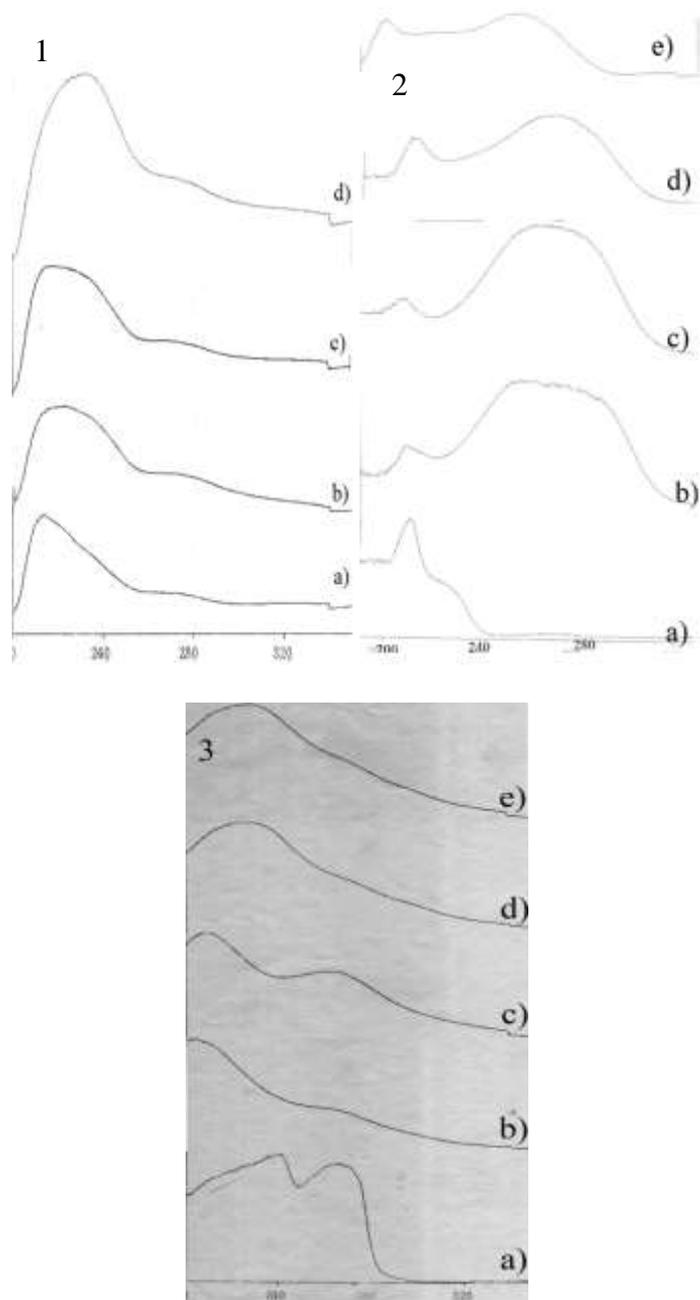


Figura 18 - Espectros UV das amostras do extratos metanólicos e aquosos: acetona(1) :
a) Amostra A; b) Amostra B; c) Amostra LA; d) Amostra LB ; metanol (2): a) floroglucinol;
b) Amostra A ; c) Amostra B; d) Amostra LA; e) Amostra LB; Aquosa (3): a) floroglucinol;
b) Amostra A ; c) Amostra B; d) Amostra LA; e) Amostra LB.

No extrato aquoso, a inflexão observada em todas as amostras por volta dos 270 nm, poderá indicar a presença de floroglucinol e florotaninos. Para além de outros constituintes não identificados, cujos máximos variam com o processo de secagem. Na

zona do visível não foi detetada qualquer absorção o que confirma a inexistência de pigmentos neste extrato.

3.6. Análise por FTIR-ATR

A análise por FTIR-ATR permite identificar os tipos de ligações químicas que os compostos têm no entanto pelo facto de se tratar de misturas complexas as informações recolhidas são apenas indicativas da composição. Neste caso, optou-se por fazer uma análise aos compostos existentes nas amostras liofilizadas pois as amostras secas ao sol revelam um número mais elevado de picos (Anexo 2), confirmando-se que possa existir uma possível degradação dos compostos nas amostras A e B.

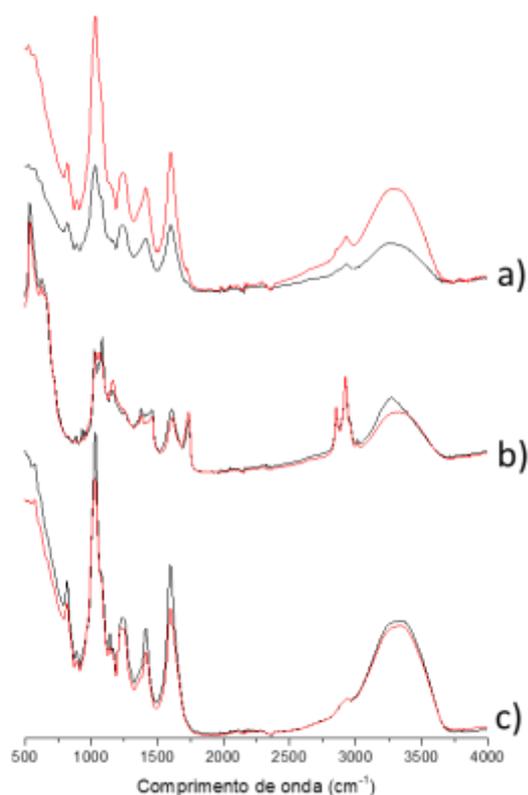


Figura 19 - espectros obtidos por FTIR-ATR: a) espectros do extratos aquosos; b) espetros dos extratos metanólicos; c) espectros dos polissacarídeos. Amostra LA a preto e a amostra LB a vermelho.

A primeira informação que se pode extrair da figura 19, é que não se observam grandes diferenças na localização dos picos entre amostras de algas sujeitas a ambientes com diferentes salinidades. É possível, no entanto, observar uma maior intensidade nas bandas correspondentes a alguns tipos de ligação numas amostras do que noutras, por exemplo, LA no extrato dos polissacarídeos e LB no extrato aquoso. No extrato metanólico existem algumas variações pouco perceptíveis, não permitindo tirar conclusões sobre o seu significado, pois não existe muito conhecimento sobre os compostos específicos que este extrato poderá ter.

Não foi possível fazer identificação de bandas de absorção a valores acima dos 3000 cm^{-1} pois as ligações O-H também são detetadas nessa zona tornando impossível a determinação mais concreta de alguns compostos, nomeadamente compostos fenólicos.

Seguidamente far-se-á uma análise mais detalhada dos espectros obtidos para cada extrato.

3.6.1. Análise por FTIR do extrato metanólico

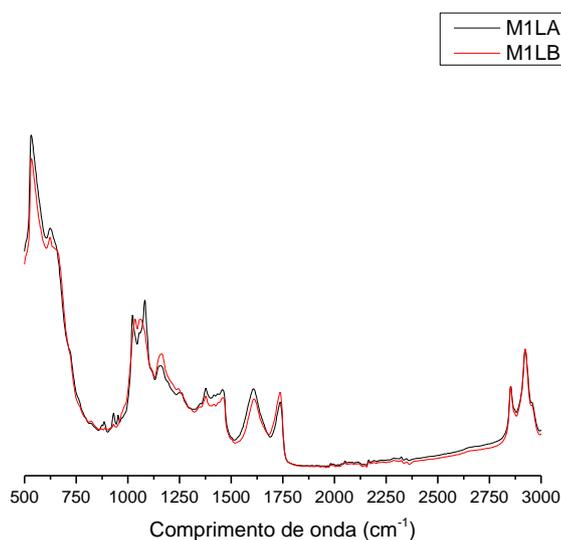


Figura 20 - Pormenor dos espectros FTIR-ATR do extrato metanólico das amostras liofilizadas.

No extrato metanólico, é possível identificar algumas ligações da fucoxantina indicadas por Yip (2014), os picos característicos estão nos mesmos valores que esse autor referiu, não sendo possível analisar o pico mais característico correspondente à

ponte alénica, pois mesmo numa amostra pura de fucoxantina é um pico que apresenta baixa intensidade. Os picos presentes nas amostras que podem pertencer à fucoxantina são o 1377, 1458, 1736 (LB), 1738 (LA), 2852 (LB), 2854 (LA) e o 2924. Também neste extrato existe ligações do tipo S=O na amostra LA (1248) e na amostra LB (1244).

Neste caso não se observam diferenças entre as amostras sujeitas a diferentes salinidades.

3.6.2. Análise por FTIR do extrato aquoso e dos polissacarídeos

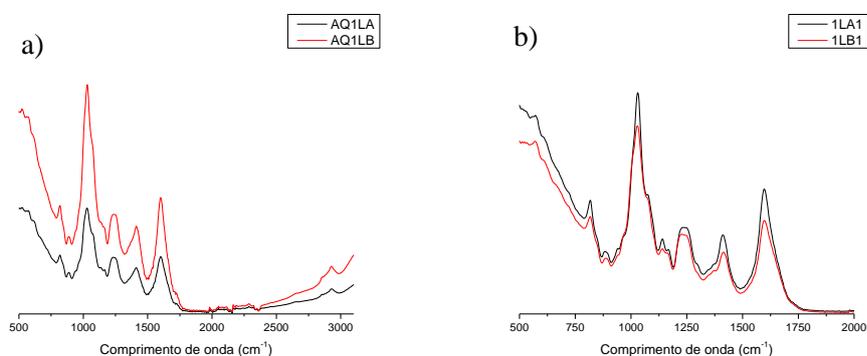


Figura 21 - Pormenor dos espectros FTIR-ATR dos extratos: a) aquosos; b) polissacarídeos.

Análise dos espectros foi baseada na informação no artigo de Pereira (2013).

Neste caso, ambos os espectros apresentam picos referentes ao ácido algínico (LA:1029; LB:1028), neste caso o ácido algínico terá mais unidades de ácido galurónico do que de ácido manurónico.

A fucoídano também estará presente pelos picos 1227 (LB) e 1232 (LA), característicos dos grupos éster de sulfato, e também existem grupos sulfatados que é demonstrado pelo pico nos 818 cm^{-1} (Ruperez, 2002).

3.7. Cromatografia em camada fina (TLC)

Para uma análise rápida da composição dos extratos metanólicos, fez-se uma cromatografia de camada fina orientada para a pesquisa de pigmentos (Figura 22a) e outra para a pesquisa de florotanicos (Figura 22b).

A identificação dos constituintes pode ser muitas vezes obtida através do cálculo do fator de retenção (Rf), feito da seguinte forma:

$R_f = \text{distância de migração do composto (cm)} / \text{distância percorrida pelo eluente}$
(neste caso, 10 cm).

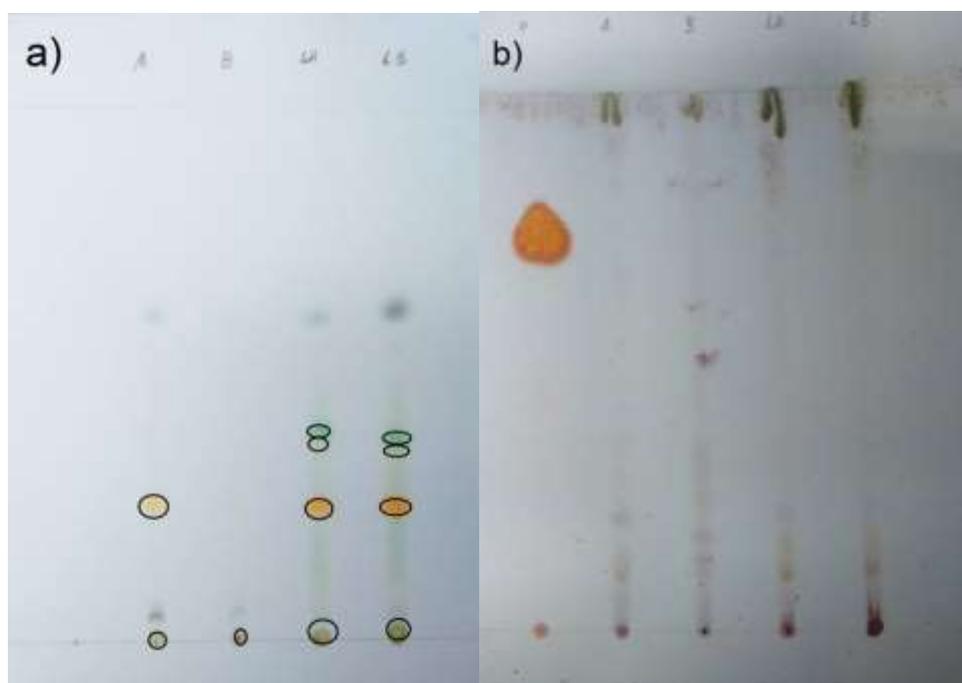


Figura 22 - Perfil cromatográfico, por TLC: A) Placa para determinação de pigmentos; B) placa revelada com Vanilina-ácido sulfúrico, para determinação de florotanicos.

A posterior análise da TLC dos pigmentos foi feita com base nos artigos de Mikami (2013), Jeffrey (1972) e Jeffrey (1975).

Na TLC dos pigmentos (Figura 22a), notam-se imediatamente os três principais pigmentos:

- Clorofila a ($R_f=0.38$), o pigmento com maior R_f , existe em mais quantidade nas amostras liofilizadas, não tendo sido detetado nas amostras secas ao sol o que sugere que, a secagem ao sol possa degradar este pigmento nas amostras;

- Fucoxantina ($R_f=0.25$), o pigmento carotenoide, na TLC existe em maior quantidade nas amostras liofilizadas ($LB > LA$), tendo sido detetada na amostra A e na amostra B não existe qualquer indício de ter. Neste caso, com uma análise do que já foi referido, existe a possibilidade de uma maior concentração de polissacarídeos poder ter um efeito de modo protetor, protegendo melhor alguns compostos;

- Clorofila c ($R_f=0.05$) é o composto com o R_f mais pequeno neste género, neste caso está mais saliente na amostra A, e não tanto nas amostras liofilizadas. Neste caso, todas as amostras tem este pigmento, na respetiva TLC.

Neste caso mais uma vez é o processo de secagem que tem mais influência na composição química de cada amostra.

Em todas as amostras foi possível visualizar manchas de β -caroteno que eluíam na frente do solvente mas cuja concentração foi demasiado baixa para se conseguir detetar no final da eluição. Outra nota de salientar, a existência de outro pigmento de cor amarela-alaranjado não identificado, logo abaixo da clorofila a nas amostras liofilizadas ($R_f=0.37$). Neste caso era necessário recorrer a ensaios mais específicos para obter a identificação concreta do pigmento.

Para a pesquisa de florotaninos por TLC aplicaram-se os extratos juntamente com um padrão de floroglucinol.

A revelação com o revelador vanilina/ácido sulfúrico evidenciou manchas de cor avermelhada características de florotaninos, que não migraram do ponto de aplicação ou que apresentaram valores de R_f muito baixos. Este comportamento sugere que se trata de compostos muito polares, ficando fortemente retidos pela sílica ou de elevado peso molecular.

3.8. Atividade antioxidante com DPPH

O ensaio antioxidante com DPPH é baseado na capacidade de neutralização do radical livre DPPH sendo muito utilizado como o principal teste antioxidante para algas,

servindo como referência nos ensaios preliminares antes de se aprofundar o estudo bioquímico e farmacêutico nas algas pretendidas. Embora o DPPH seja um radical sintético, este ensaio é considerado como modelo aproximado á reação dos radicais livres no organismo humano.

Trata-se de um ensaio colorimétrico em que uma amostra com elevado poder antioxidante provocará uma alteração da coloração do DPPH de violeta para amarelo aguado que pode ser medida num espectrofotómetro a 517 nm.

Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Atividade antioxidante nos vários extratos pelo método DPPH, sendo o IC50 expresso em µg/ml. (média ± SD; n=3).

Amostras	Extrato metanólico (IC50 µg/ml)	Extrato Aquoso (IC50 µg/ml)
A	135,13 ±0,99	198,73 ±1,42
B	158,29 ±0,96	497,59 ±2,87
LA	121,89 ±1,52	303,60 ±0,99
LB	50,39 ±0,47	42,58 ±0,15

A amostra com maior atividade antioxidante é amostra LB, com valores próximos em ambos os extratos metanólico e aquoso (50.4µg/ml ±0.47; 42.58µg/ml ±0.15), coincidindo com os resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos cuja concentração também foi mais expressiva na amostra LB.

De entre as amostras da zona A, nos liofilizados, o extrato metanólico foi aquele que apresentou maior actividade, enquanto, no caso das amostras secas ao sol, o extrato aquoso foi o mais ativo. Este facto, sugere que outros compostos poderão ser mais importantes na atividade antioxidante da espécie do que os compostos fenólicos, neste caso será muito provável que seja a fucoxantina.

Comparando estes resultados com os que foram obtidos por Carvalho (2013) na *F. spiralis* (extrato metanólico: 113 µg/ml, extrato aquoso: 53 µg/ml) comprova-se que a amostra LB do *F. ceranoides* tem um poder antioxidante superior ao *F. spiralis*.

A figura 23 permite visualizar melhor as diferenças entre as amostras, tendo as amostras metanólicas maior atividade antioxidante que as amostras aquosas, com exceção da amostra LB que é a que apresenta maior atividade.

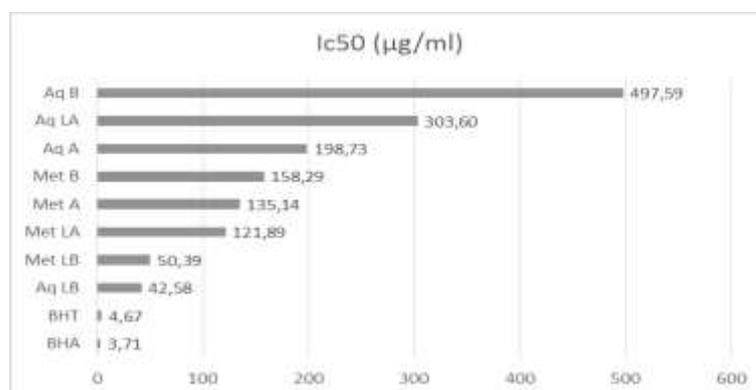


Figura 23 - Atividade antioxidante nos vários extratos pelo método DPPH, com padrões de BHA e BHT, sendo o Ic50 expresso µg/ml. (média, n=3).

As amostras da zona B demonstram uma grande variação com o tipo de secagem utilizada enquanto as amostras da zona A são equiparáveis.

Os resultados obtidos na amostra liofilizada da zona B são idênticos aos obtidos por Zubia (2009) num extrato bruto, neste caso os padrões (BHA e BHT) servem de referência, pois os métodos divergem em algumas técnicas na metodologia adotada por cada um.

3.8.1. Relação entre a atividade antioxidante (DPPH) e o conteúdo fenólico total

A atividade antioxidante está ligada ao conteúdo fenólico da alga, embora esta relação seja mais evidente nuns extratos do que noutros. Zubia (2009) comparou a atividade redutora de vários extratos obtidos com diferentes solventes e diferentes concentrações de fenóis totais.

Nesse trabalho, utilizou-se como referência a atividade redutora, e comparou-se com a percentagem de fenóis totais em cada extrato, analisando a eventual correlação positiva entre estes dois parâmetros. As conclusões foram que solução diluída de

metanol é o melhor solvente para retirar os compostos fenólicos da alga e consequentemente possuía melhor atividade redutora. Enquanto o extratos aquosos e em metanol a 100% apresentavam valores mais baixos, e dentro destes, o melhor extrato era o extrato aquoso.

No caso dos extratos metanólicos (Figura 24a), parece existir uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante pelo método do DPPH. Ao contrário do que se observou nos extratos aquosos (Figura 24b), em que não foi encontrada qualquer relação entre os mesmos parâmetros. Comparando com os resultados obtidos por Zubia (2009), existe uma concentração idêntica de compostos fenólicos nas amostras LB do que nas que este autor analisou. No extrato metanólico, a concentração de fenóis ultrapassa os 2,05% obtidos por este autor, nas amostras A (2,57%) e na amostra LB (4,95%). No extrato aquoso, as amostras têm todas concentrações abaixo, LA (4,24%) e LB (3,16%), das obtidas por este autor (6,42%).

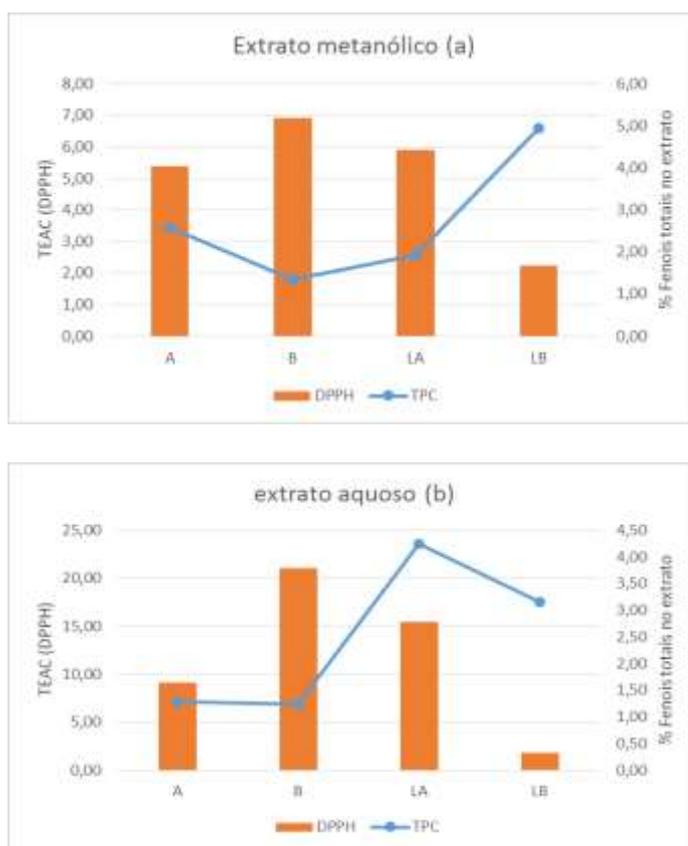


Figura 24 - Relação da atividade antioxidante (método de DPPH) e o conteúdo fenólico total, DPPH é expresso pelo valor TEAC e o conteúdo fenólico em mg de PGE/mg (%) de extrato (média, n=3).

3.9. Ensaio antioxidante com ABTS

Este ensaio é baseado na capacidade de redutora da amostra do catião radical ABTS.

Este ensaio, é colorimétrico e as amostras com atividade reagem com o ABTS convertendo a solução de cor esverdeada a uma cor azul clara, quase transparente, sendo neste caso, a reacção é quase imediata na transição de cor do ensaio. Neste caso, este método teve como base de escolha, ser em meio aquoso e de ser possível analisar a atividade antioxidante dos polissacarídeos (Rodriguez-Jasso, 2014).

Nos extratos metanólicos, o tipo de secagem utilizado parece ser o fator mais importante na atividade antioxidante uma vez que as amostras liofilizadas possuem uma atividade superior do que as amostras secas ao sol (Tabela 11). Como anteriormente referido poderá sugerir compostos que se degradam durante a secagem ao sol.

Tabela 11 - Atividade antioxidante nos vários extratos pelo método de ABTS sendo os resultados expressos em TEAC. (média \pm SD; n=3).

Amostras	Extrato metanólico (TEAC)	Extrato Aquoso (TEAC)	Polissacarídeos (TEAC)
A	14,43	2,68	10,21
B	16,82	3,86	9,74
LA	4,18	4,14	6,93
LB	2,42	1,00	10,36

Nos extratos metanólicos, o tipo de secagem utilizado parece ser o fator mais importante na atividade antioxidante uma vez que as amostras liofilizadas possuem uma atividade superior do que as amostras secas ao sol. Como anteriormente referido poderá sugerir compostos que se degradam mais facilmente durante a secagem ao sol.

No extrato aquoso todas as amostras apresentam diferentes atividades não podendo estabelecer-se nenhuma relação estes valores e a salinidade ou o processo de secagem.

Nos polissacarídeos, a amostra LA apresentou uma atividade maior do que as três amostras restantes que apresentam valores muito idênticos. Neste caso, como o processo de extração não é específico, alguns compostos serão mais difíceis de separar dos polissacarídeos, podendo ainda estar presentes neste extrato.

A figura 25 que ilustra a atividade antioxidante da amostra (% de redução) numa concentração de 1,25mg demonstrando que para a amostra aquosa LB esta concentração reduz 50% do catião ABTS da amostra, e o seu extrato metanólico (LB) reduza cerca 30%. Nas outras amostras, este poder antioxidante já muito reduzido. De salientar que os polissacarídeos neste ensaio apresentam melhor atividade antioxidante do que os extratos metanólicos das amostras secas ao sol. Este ensaio parece ser o melhor para avaliar a atividade de extratos solubilizados em soluções aquosas. Neste caso, as fucoidanas podem ter um papel fundamental nesta reação pois o grupo sulfato no grupo O⁻² pode reagir com o ABTS, neste caso a estrutura química das fucoidanas vai ser essencial (Barahona, 2011 em Rodriguez-Jasso, 2014).

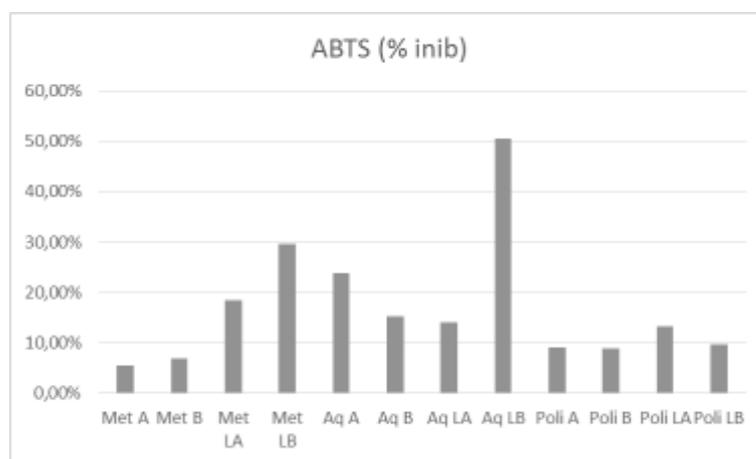


Figura 25 - Atividade antioxidante nos vários extratos pelo método de ABTS, sendo os resultados expressos em % de inibição numa concentração da amostra de 1.25mg/ml. (média, n=3).

3.9.1. Relação entre a atividade antioxidante (ABTS) e o conteúdo fenólico total

Como referido no tópico 3.6.2., é importante analisar a correlação entre o ABTS e a concentração de compostos fenólicos nos extratos metanólicos e aquosos. O facto de não existirem artigos de referência sobre este assunto, torna ainda mais importante essa análise.

Com se observa na figura 26, não existe correlação entre os parâmetros analisados, este ensaio parece não ser o mais indicado para os compostos fenólicos das algas, este parece ser mais sensível á concentração de pigmentos (fucoxantina) nas amostras metanólicas estando de acordo com o que já foi referenciado no artigo de Re (1999), que serviu de base à metodologia usada.

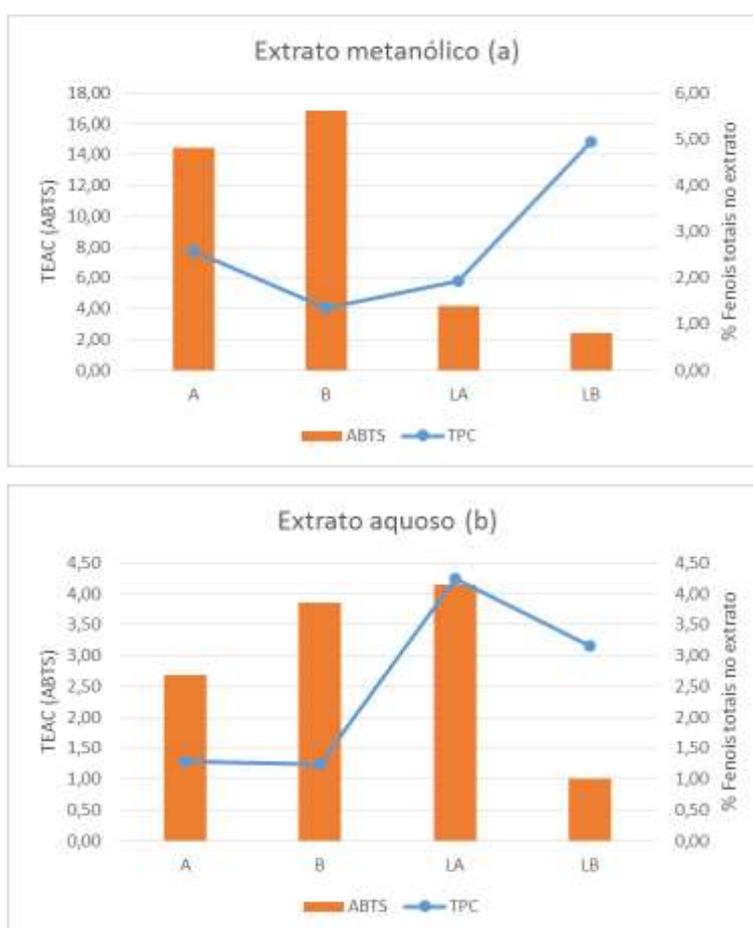


Figura 26 - Relação da atividade antioxidante (ensaio de ABTS) e o conteúdo fenólico total para o extrato metanólico (a) e o extrato aquoso (b). DPPH é expresso pelo valor TEAC e o conteúdo fenólico em mg de PGE/mg (%) de extrato (média, n=3).

3.9.2. Comparação entre os resultados obtidos pelo método do ABTS e pelo método do DPPH

Embora sejam dois testes antioxidantes com princípios diferentes, sendo difícil a sua comparação direta.

No entanto neste caso, comparando os resultados obtidos por ambos os ensaios, e não deixa de ser notório que as amostras LB são as que têm melhores resultados nos dois ensaios antioxidantes.

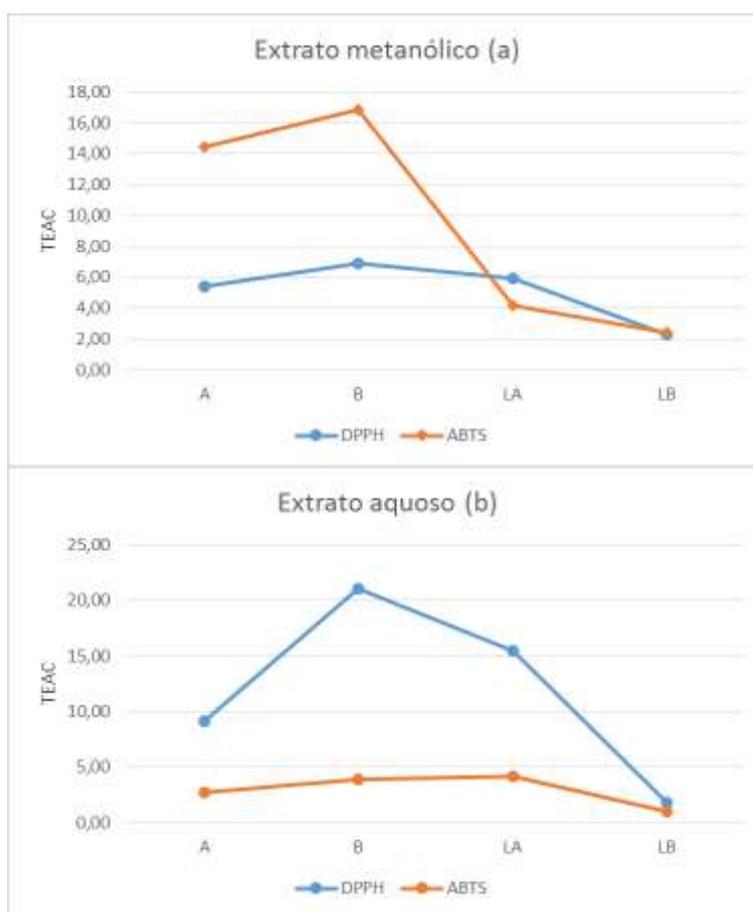


Figura 27 - Gráfico de comparação entre métodos antioxidantes testados: a) extrato metanólico; b) extrato aquoso. (média, n=3).

Numa comparação final (Gráfico 9), os dois ensaios realizados acabaram por demonstrar que a amostra LB é a amostra mais bioativa de todas as amostras testadas, e que nas amostras de ambiente salino diferem nos ensaios antioxidantes realizados. Neste caso, a amostra B é a amostra com menor atividade, o que contradiz os ensaios realizados, mas existe uma explicação que pode comprovar este efeito contraditório,

poderá ser devido à menor concentração de polissacarídeos ou de outro composto para proteger os compostos voláteis menos frágeis.

3.10. Discussão final

Estes resultados comprovam que num ambiente com salinidade menor, existe uma maior concentração de compostos bioativos, sobretudo de metabolitos secundários, embora na zona da salinidade mais alta não se observem tantas diferenças com o tipo de secagem.

O ponto de vista ecológico pode ajudar a interpretar a situação na zona mais salina. Pois na altura em que a alga foi colhida, a zona era dominada pelo *F. vesiculosus*, neste caso, o *F. ceranoides* além de ter que se proteger de danos mecânicos, terá que crescer mais rápido e por se reproduzir mais, devido ao sucesso em colonizar nas salinidades altas ser inferior às das outras espécies concorrentes nesse mesmo nicho (Back, 1992). A maior concentração de polissacarídeos pode responder a esta questão por inteiro, pois é o sistema de defesa primário da alga. E que exista em menor quantidade de metabolitos secundários pois o gasto energético da alga tem limites definidos.

Na zona menos salina, o tipo de secagem vai ter maior influência na composição, pois a amostra liofilizada é a mais ativa e a amostra seca ao sol a de menor atividade, isto poderá ser ou não ser provocado pela menor concentração de polissacarídeos, mas por outro lado, haver uma maior concentração de metabolitos secundários para a defesa ativa da alga contra predadores e outros (Forslund, 2012), que nesta área será o maior risco do que o de agressões mecânicas, e estes compostos estão dependentes das condições ambientais (Parys, 2007 em López-Hernández, 2014). E numa salinidade menor, a alga é menos eficaz no processo de fotossíntese (Back, 1992) e isto pode levar a um aumento de clorofila e de outros compostos (fucoxantina e outros) como acontece para a *Palmaria palmata*, pois no ambiente de menor salinidade foi provado que existe um aumento de clorofila a e de carotenoides na alga (Beauchamp, 2012).

Também de notar, que a clorofila c parece ser o pigmento mais resistente aos dois tipos de secagem, mesmo sem a “protecção”.

Neste caso, que já foi comprovado os efeitos da sazonalidade neste género (Kim, 2012). Por isso, estes resultados mostram apenas as características da alga no fim da época de Verão prevendo-se resultados diferentes noutras épocas do ano.

Estes resultados, embora de natureza preliminar permitirão selecionar as amostras e os extratos com interesse para estudos mais aprofundados.

4. Conclusão e perspectivas futuras

4. Conclusão e perspectivas futuras

Com este trabalho foi possível comprovar alguns fatores que influenciam os resultados dos ensaios. Para além de fatores relacionados com a alga e o seu processamento, também algumas variáveis dos ensaios poderão contribuir para os resultados obtidos.

Neste trabalho, também foi possível desenvolver uma nova variante do método de Folin-Ciocalteu para determinação de fenóis totais com o objetivo de o tornar mais sensível, permitindo a utilização de uma menor quantidade de amostra, reduzindo os custos e obter informação mais rapidamente sobre potencial farmacológico da alga em estudo antes de se optar por técnicas mais elaboradas. E também um aumento de ensaios com quantidade de amostra relativamente pequena.

Neste trabalho, comprova-se também que existem diferenças na bioatividade da alga devido à salinidade e também na concentração dos diversos compostos. Comprovou-se que as algas provenientes da zona menos salina contém maior teor de compostos fenólicos e pigmentos (fucoxantina) conferindo à alga uma maior atividade antioxidante. Mas na zona mais salina existe uma maior concentração de polissacarídeos. Isto permite selecionar a zona de recolha da alga com base no tipo de compostos que se quer estudar ou usar. Verificou-se de modo geral diferenças entre extratos e amostras.

No tipo de secagem usada, somente faltaria testar a secagem em estufa com circulação de ar ou de vácuo, pois só foi comparado o método tradicional (liofilização) e o modelo de secagem mais económico (secagem ao sol). Tendo sido comprovado que a secagem ao sol das algas é prejudicial para a atividade bioativa, devido à degradação de alguns compostos. No entanto, a secagem ao sol na zona de maior salinidade pode acabar por ser proveitosa para a extração específica de fucoxantina, evitando o gasto extra no que se refere à utilização de outros equipamentos para secar a alga (estufas/liofilizador).

Não existe atualmente interesse em cultivar a *F. ceranoides* em sistemas de aquacultura pois é uma alga muito adaptada para viver em ambientes extremos, e quase sempre abundante nas zonas em que se encontra, o maior problema é a competição interespecies. Com base neste princípio, esta alga poderia servir de organismo modelo para testar outras situações de aquacultura com a água ter um teor salino menor do que a

água do mar, por exemplo, esta alga poderia ser aplicada em sistema de aquacultura mais longe do mar.

Este trabalho justificaria a aplicação de outras metodologias complementares como a realização de análise de HPLC para florotaninos e a análise aprofundada dos resultados do FTIR-ATR. Tal não foi realizado durante a tese pois a questão do tempo de escrita foi determinante.

No seguimento deste trabalho seria deveras interessante realizar todo processo descrito na tese mas utilizando amostras colhidas no inverno (dezembro/janeiro) e na época de primavera/verão (maio/junho), para se verificar se existe diferenças. E continuar a investigação para a identificação de compostos e fracionamento das amostras, e assim determinar quais os compostos mais importantes para a bioatividade e resistência às diferenças de salinidade.

5. Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

Ale, M.T., Mikkelsen, J.D. & Meyer, A.S., 2011. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 9(10), pp.2106–2130.

Bäck, S., Collins, J.C. & Russell, G., 1992. Recruitment of the Baltic Flora: The *Fucus ceranoides* enigma. *Botanica Marina*, 35(1), pp.53–59.

Bahar, B. et al., 2012. Extracts of brown seaweeds can attenuate the bacterial lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in the porcine colon *ex vivo*. *Journal of Animal Science*, 90(SUPPL4), pp.46–48.

Beauchamp, E., 2012. Effects of UV radiation and salinity on the intertidal macroalgae *Palmaria palmata* and *Ulva lactuca*; effects on photosynthetic performance, growth and pigments. *The Plymouth Student Scientist*, 5(1), pp.3–22.

Béress, a et al., 1993. A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of natural products*, 56(4), pp.478–488.

Berteau, O. & Mulloy, B., 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 13(6), pp.29–40.

Billard, E., Daguin, C. & Pearson, G., 2005. Genetic isolation between three closely related taxa: *Fucus vesiculosus*, *F. spiralis*, and *F. ceranoides* (Phaeophyceae). *J. Phycol.*, 905, pp.900–905.

Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of free radical. *Nature*, 26, pp. 1199-2000.

Bove, M., Bladderwrack (*Fucus vesiculosus*). *Plant intelligence*, 2, p.10.

Brawley, S.H. & Johnson, L.E., 1992. Gametogenesis, gametes and zygotes: An ecological perspective on sexual reproduction in the algae. *British Phycological Journal*, 27(3), pp.233–252.

Cairrão, E. et al., 2009. Phenotypic variation of *Fucus ceranoides*, *F. spiralis* and *F. vesiculosus* in a temperate coast (nw portugal). *Botanical Studies*, 50(2), pp.205–215.

Carvalho, L. G. D., 2013. Avaliação do potencial biotecnológico de micro e macroalgas da flora portuguesa. Universidade de Coimbra. <http://hdl.handle.net/10316/24928>.

Chew, Y.L. et al., 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), pp.1067–1072.

Cordi, B. et al., 1997. Evaluation of chlorophyll fluorescence, in vivo spectrophotometric pigment absorption and ion leakage as biomarkers of UV-B exposure in marine macroalgae. *Marine Biology*, 130(1), pp.41–49.

Costa, G. et al., 2015. Flavan hetero-dimers in the **Cymbopogon citratus** infusion tannin fraction and their contribution to the antioxidant activity. *Food Funct.*, pp.932–937.

Coyer, J. et al., 2002. Hybridization of the marine seaweeds, *Fucus serratus* and *Fucus evanescens* (Heterokontophyta: Phaeophyceae) in a 100-year-old zone of secondary contact. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 269(1502), pp.1829–1834.

Cumashi, A. et al., 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17(5), pp.541–552.

Fernandes, T., 2010 Dinâmica da flora macroalgal no estuário do Mondego: Respostas das métricas de avaliação ecológica ao longo do gradiente de salinidade. Universidade de Coimbra.

Ferreres, F. et al., 2012. Phlorotannin extracts from Fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MS n: Approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. *Marine Drugs*, 10(12), pp.2766–2781.

Fitton, J.H., 2011. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Marine Drugs*, 9(10), pp.1731–1760.

Forslund, H., 2012. Herbivory, phenotypic variation, and reproductive barriers in fucoids, Stockholm University.

Goo, H.R., Choi, J.S. & Na, D.H., 2010. Quantitative determination of major phlorotannins in *Ecklonia stolonifera*. *Archives of Pharmacal Research*, 33(4), pp.539–544.

Heffernan, N. et al., 2014. Antioxidant activity and phenolic content of pressurised liquid and solid-liquid extracts from four Irish origin macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology*, pp.1–8.

Imbs, T.I. et al., 2013. Isolation of Fucoxanthin and Highly Unsaturated Monogalactosyldiacylglycerol from Brown Alga *Fucus evanescens* C Agardh and In Vitro Investigation of Their Antitumor Activity. *Marine Biotechnology*, 15(5), pp.606–612.

Jeffrey, S.W., 1972. Preparation and some properties of crystalline chlorophyll c_1 , c_2 from marine algae. *Biochem. Biophys. Acta*. 279, pp. 15-33.

Jeffrey, S.W. and Humphrey, G., 1975. New spectrophotometric for determining chlorophylls a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167, pp. 191-194.

Khfaji, A.K. & Norton, T. A., 1979. The effects of salinity on the distribution of *Fucus ceranoides*. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 8(5), pp.433–439.

Kim, H.-S. et al., 2015. Injectable hydrogels derived from phosphorylated alginic acid calcium complexes. *Materials Science and Engineering: C*, 51, pp.139–147.

Kim, K., 2012. Seasonal variation of seaweed components and novel biological function of fucoidan extracted from brown algae in Quebec. University of Laval.

Klemperer, H.G., 1957. The accumulation of iodide by *Fucus ceranoides*. *The Biochemical journal*, 67(3), pp.381–390.

- Koivikko, R. et al., 2005. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*, 31(1), pp.195–212.
- Koivikko, R., 2008. Brown algal phlorotannins. Improving and applying Chemical Methods. University of Turku
- Kubanek, J. et al., 2004. Ambiguous role of phlorotannins as chemical defenses in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series*, 277(2), pp.79–93.
- Kwak, J.Y., 2014. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Marine Drugs*, 12(2), pp.851–870.
- Lee, K.Y. & Mooney, D.J., 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), pp.106–126.
- Li, B. et al., 2008. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*, 13(8), pp.1671–1695.
- Lim, S.N. et al., 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), pp.3862–3866.
- Lopes, G. et al., 2012. Can phlorotannins purified extracts constitute a novel pharmacological alternative for microbial infections with associated inflammatory conditions?. *PLoS ONE*, 7(2).
- Lopes, G. et al., 2013. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. *PLoS ONE*, 8(8).
- Lopes, G. et al., 2014. Anti-inflammatory potential of monogalactosyl diacylglycerols and a monoacylglycerol from the edible brown seaweed *Fucus spiralis* Linnaeus. *Marine Drugs*, 12(3), pp.1406–1418.

- López-Hernández, J., Qirós, A., 2014. Evaluation of bioactive compounds in seaweeds: A review. *Seaweeds - Agricultural Uses, Biological and Antioxidant Agents*, ed. Pomin, V.H., pp. 99-114. ISBN:978-1-63117-575-6 Nova Science Publishers, New York.
- Lordan, S. et al., 2013. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, 141(3), pp.2170–2176.
- Isaza Martínez, J.H. & Torres Castañeda, H.G., 2013. Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *Journal of Chromatographic Science*, 51(8), pp.825–838.
- Mikami, K. & Hosokawa, M., 2013. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), pp.13763–13781.
- Min, S.K. et al., 2012. An antithrombotic fucoidan, unlike heparin, does not prolong bleeding time in a murine arterial thrombosis model: A comparative study of *Undaria pinnatifida* sporophylls and *Fucus vesiculosus*. *Phytotherapy Research*, 26(5), pp.752–757.
- Miyashita, K. et al., 2011. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), pp.1166–1174.
- Neiva, J. et al., 2010. Surfing the wave on a borrowed board: Range expansion and spread of introgressed organellar genomes in the seaweed *Fucus ceranoides* L. *Molecular Ecology*, 19(21), pp.4812–4822.
- Neiva, J., Pearson, G. A., et al., 2012. Drifting fronds and drifting alleles: Range dynamics, local dispersal and habitat isolation shape the population structure of the estuarine seaweed *Fucus ceranoides*. *Journal of Biogeography*, 39(6), pp.1167–1178.
- Nishiguchi, T. et al., 2014. Revaluation of bactericidal, cytotoxic, and macrophage-stimulating activities of commercially available *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Algae*, 29(3), pp.237–247.

Peng, J. et al., 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine Drugs*, 9(10), pp.1806–1828.

Pereira, L. et al., 2009. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids*, 23(7), pp.1903–1909.

Pereira, L., Gheda, S.F. & Ribeiro-claro, P.J. a, 2013. Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food, Pharmaceutical, and Cosmetic Industries. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013(vi), pp.1–7.

Pielesz, A., Machnicka, A. & Sarna, E., 2011. Antibacterial Activity and Scanning Electron Microscopy (Sem) Examination of Alginate-Based Films and Wound Dressings. *Ecological Chemistry and Engineering S-Chemia I Inzynieria Ekologiczna S*, 18(2), pp.197–210.

Pielesz, A., Machnicka, A., 2014. Antibacterial activity and cellulose acetate electrophoresis in monitoring collagen hydrogels modified with saccharides. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8(6), pp.175–184.

Rajauria, G. & Abu-Ghannam, N., 2013. Isolation and partial characterization of bioactive fucoxanthin from *himanthalia elongata* brown seaweed: A TLC-based approach. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2013.

Re, R. et al., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), pp.1231–1237.

Rocha De Souza, M.C. et al., 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 19(2), pp.153–160.

Rodriguez-Jasso, R.M. et al., 2011. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), pp.1137–1144.

- Rodríguez-Jasso, R.M. et al., 2013a. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. *Chemical Papers*, 68(2), pp.203–209.
- Rodríguez-Jasso, R.M. et al., 2013b. Extraction of sulfated polysaccharides by autohydrolysis of brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), pp.31–39.
- Rupérez, P., Ahrazem, O. & Leal, a J., 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), pp.840–845.
- Samee, H. et al., 2009. Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(2), pp.147–153.
- Sandsdalen, E. et al., 2003. The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(8), pp.777–782.
- Serrão, E. a. et al., 1999. Reproductive success of *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) in the Baltic Sea. *Journal of Phycology*, 35(2), pp.254–269.
- Sharma, O.P. & Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), pp.1202–1205.
- Silberfeld, T., Rousseau, F. & Reviers, B. De, 2014. An Updated Classification of Brown Algae (Ochrophyta, Phaeophyceae). *Cryptogamie, Algologie*, 35(2), pp.117–156.
- Silva, T.H. et al., 2012. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. *Biomatter*, 2(4), pp.278–289.
- Singh, I. P., & Bharate, S. B., 2006. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports*, 23, pp. 558–591.
- Singh, I.P. et al., 2010. Phloroglucinol compounds of natural origin: synthetic aspects. *Natural product reports*, 27(3), pp.393–416.

Shibata, T. et al., 2004. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 16(4), pp.291–296.

Tierney, M.S. et al., 2013. Antioxidant Activity of the Brown Macroalgae *Fucus spiralis* Linnaeus harvested from the West Coast of Ireland. *Current Research Journal of Biological Sciences* , 5(3), pp.81–90.

Varma, R., Turner, A. & Brown, M.T., 2011. Bioaccumulation of metals by *Fucus ceranoides* in estuaries of South West England. *Marine Pollution Bulletin*, 62(11), pp.2557–2562.

Vázquez-Freire, M.J., Lamela, M. & Calleja, J.M., 1996. Hypolipidaemic Activity of a Polysaccharide Extract from *Fucus vesiculosus* L. *Phytotherapy Research*, 10(8), pp.647–650.

Xia, S. et al., 2013. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs*, 11(7), pp.2667–2681.

Wang, T. et al., 2012. Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), pp.5874–5883.

Waterman PG and Mole S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications: Oxford, Great Britain.

Wright, S. & Jeffrey, S., 1987. Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC. *Marine Ecology Progress Series*, 38, pp.259–266.

Yip, W.H., LIM, S. J., Wan, A.W.M., Maskat, M. Y. and Said, M., 2014. Characterisation and Stability of Pigments Extracted from *Sargassum binderi* Obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malaysiana*, 43(9), pp.1345–1354.

Zubia, M. et al., 2009. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116(3), pp.693–701.

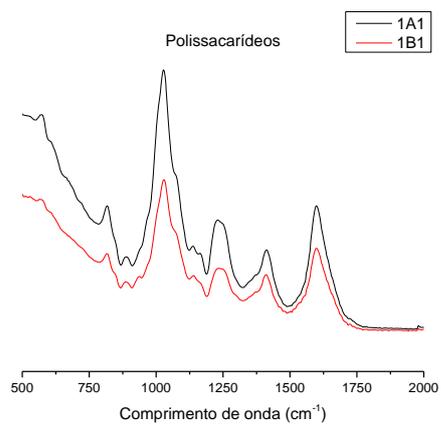
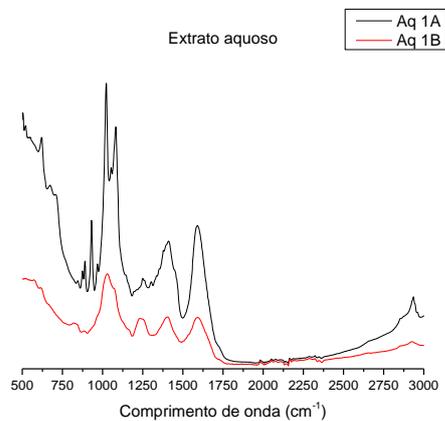
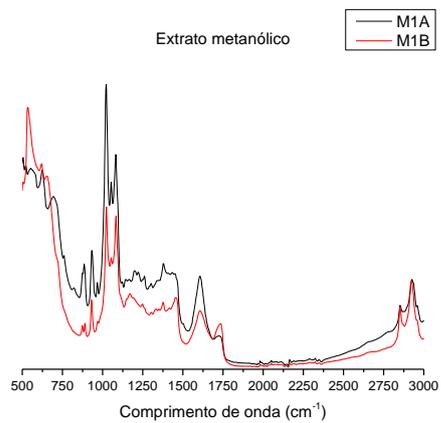
6. Anexos

6. Anexos

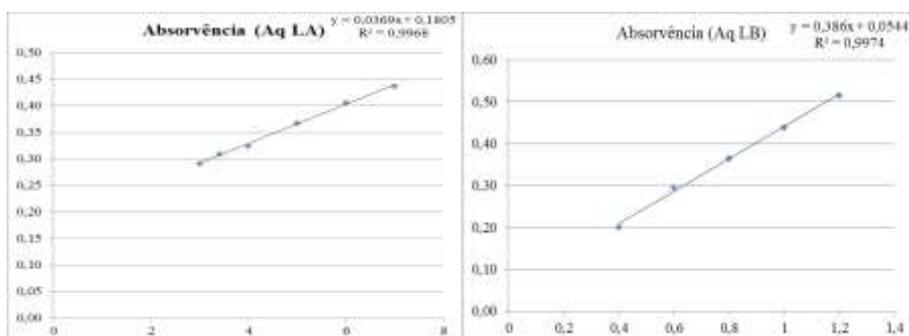
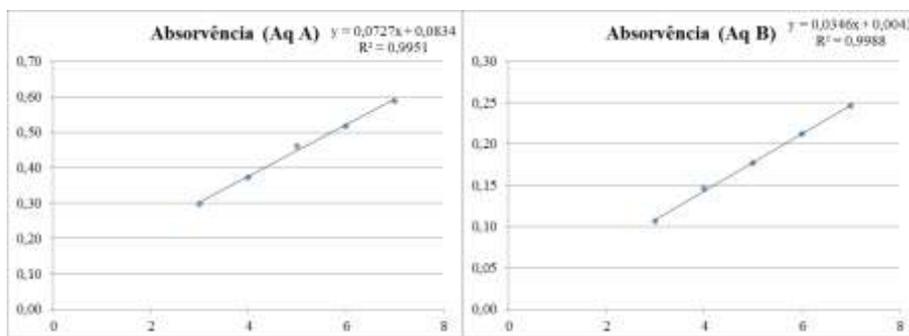
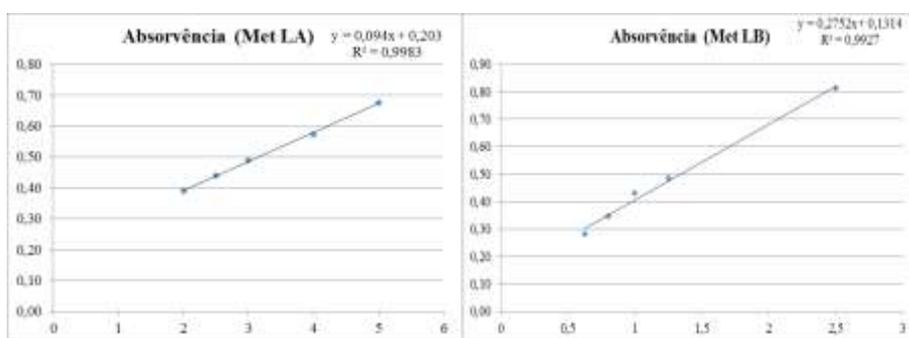
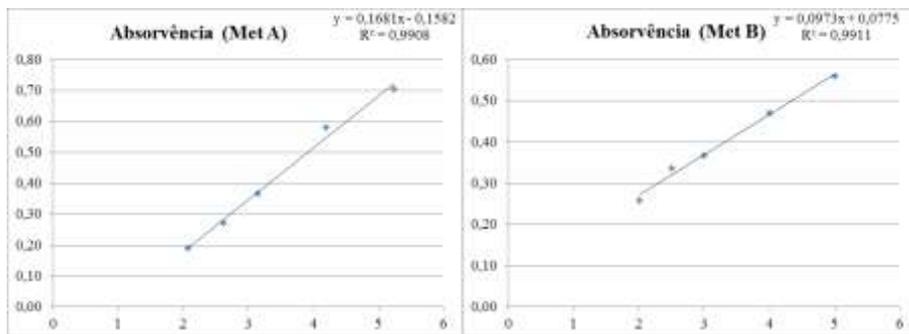
Anexo 1 - Dados do método de Quantificação de fenóis totais – Método de Folin-Ciocalteu.

Amostra	Concentração da amostra (mg/ml)	Média de absorvência	Desvio padrão	Coefficiente de variação	mg/mg (%) de extrato	erro (mg/mg) %
Met A	1	0,55	0,018	3,23	2,573	0,083
Met B	2.5	0,64	0,061	9,54	1,336	0,127
Met LA	1	0,47	0.007	1,39	1,937	0,027
Met LB	1	0,84	0,068	7,96	4,948	0,394
Aq A	4	0,86	0.061	7,04	1,289	0,091
Aq B	4	0,84	0,023	2,80	1,238	0,035
Aq LA	1	0,75	0,007	0,86	4,238	0,367
Aq LB	1	0,62	0,057	9,109	3,159	0,288

Anexo 2 - Espectros FTIR das amostras secas ao sol.



Anexo 3 - Retas de absorvência para obtenção do IC50 do ensaio antioxidante DPPH (média, n=3).



Anexo 4 - Retas de absorvência para obtenção do TEAC do ensaio antioxidante do ensaio antioxidante ABTS.

