



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudos em *Bifurcaria bifurcata*: aquacultura,
atividade antioxidante e antifúngica

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).

Raquel Gameiro da Silva

2014

Agradecimentos

Foram inúmeras as pessoas que ao longo deste trabalho me ensinaram, ajudaram e apoiaram. Por isso, quero começar por agradecer ao Professor Doutor Leonel Pereira por ter-me aceite enquanto aluna, todas opiniões, bem como todas as oportunidades que me disponibilizou.

Agradeço à Doutora Helena Abreu (ALGApplus) por todo o apoio, receptividade e oportunidade de estágio na sua empresa. Foi muito gratificante não só ter a noção do mundo do trabalho e suas dificuldades, assim como desenvolver outras aprendizagens exteriormente ao mundo da ciência. Quero também agradecer a todos os elementos presentes nesta empresa por toda a paciência, opiniões e todo o tempo e espaço que disponibilizaram para a realização deste trabalho.

À Doutora Susana Cardoso pelo tempo, apreciações e auxílio que me prestou na realização deste trabalho, assim como todo o espaço e material que disponibilizou. Aos colegas que tive oportunidade de conhecer na ESAC, o muito obrigado pela ajuda, simpatia e convívio que forneceram durante a excussão do trabalho laboratorial.

Agradeço também à professora Doutora Teresa Batista pela disponibilidade, juízos e sugestões para aprendizagem de novas técnicas bem como de novos conceitos. Assim como agradeço ao Dr. Gustavo pela ajuda na realização do trabalho experimental, receptividade e suas opiniões.

À professora Doutora Maria José Gonçalves Pinho o muito obrigado pelos ensinamentos prestados ao longo do trabalho no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, conselhos, disponibilidade, bem como a paciência que teve.

Também quero agradecer ao Sr. José Brazão por todo o material que obteve assim como aquele que disponibilizou, bem como toda a ajuda e lições que transmitiu pela sua longa experiência de vida. Assim como agradeço ao Loïc Carvalho pela ajuda na realização do trabalho experimental, disponibilidade e suas opiniões.

Aos meus amigos que me acompanham neste percurso de vida, muito obrigado por todo o apoio, palavras, convívio e sorrisos que me proporcionaram. Todas as palavras são poucas para vos descrever a gratidão e orgulho de vocês. Apesar do futuro ser uma incógnita, levo-vos sempre comigo. Ainda assim, tenho de deixar um especial

obrigado à Catarina Lopes e à Joana Pereira, companheiras neste desafio. Por tudo o que aprendi com vocês, pela ajuda, pela boa disposição, disponibilidade, pelas aventuras, persistência e sobretudo por me aturarem.

Por fim, porque os últimos são sempre os primeiros, quero agradecer do fundo do coração à minha família, sobretudo pais e irmão. Sem vocês esta aventura não seria possível. Pelo incentivo em continuar, por estarem sempre lá nos momentos difíceis, pelos ensinamentos, educação e sobretudo gosto pelo mar. A vocês vos dedico este percurso de vida, na esperança de um dia poder recompensar-vos por tudo o que fizeram por mim.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	III
ÍNDICE GERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 - MACROALGAS CASTANHAS (CLASSE PHAEOPHYCEAE)	6
1.1.1- Compostos bioativos	7
Terpenos	7
Polissacarídeos.....	8
Compostos fenólicos.....	8
1.1.2- Atividades biológicas	9
Atividade antioxidante.....	9
Atividade antifúngica.....	10
1.2 - BIFURCARIA BIFURCATA: CARACTERIZAÇÃO	11
Ciclo de vida.....	12
Compostos e atividade	13
1.3 - AQUACULTURA	15
1.4 - OBJETIVOS.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 - LOCAL DE COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS MACROALGAS	20
2.2 - AQUACULTURA.....	21
2.2.1- Aquicultura em laboratório.....	21
2.2.2- Aquicultura exterior	23
2.2.2.1 - Percentagem de peso seco.....	24
2.2.2.2 - Cálculos dos parâmetros de crescimento	25
2.2.2.3 - Análise estatística.....	25
2.3 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	25
2.3.1- Liofilização e trituração	25
2.3.2- Pesagem e extração	26
2.3.2.1 - Extração com <i>n</i>-hexano	26
2.3.2.2 - Extração com metanol	27
2.3.2.3 - Extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos	28

2.4 - AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	30
2.4.1- <i>Quantificação Total de Polifenóis – Teste Folin-Ciocalteu</i>	30
2.4.2- <i>Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH</i>	31
2.5 - ENSAIOS ANTIFÚNGICOS	32
2.5.1- <i>Preparação dos extratos e diluições</i>	32
2.5.2- <i>Estirpes de fungos</i>	33
2.5.3- <i>Meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e soro fisiológico</i>	34
2.5.4- <i>Preparação do inóculo</i>	34
2.5.5- <i>Realização do ensaio</i>	34
2.6 - DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	36
2.6.1- <i>Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)</i>	36
2.6.2- <i>Cromatografia em camada fina (TLC)</i>	37
3. RESULTADOS	40
3.1 - AQUACULTURA	40
3.1.1- <i>Aquacultura em laboratório</i>	40
3.1.2- <i>Porcentagem de peso seco</i>	40
3.1.3- <i>Aquacultura no exterior</i>	41
3.1.3.1 - <i>Parâmetros Ambientais</i>	41
3.1.3.2 - <i>RGR e produtividade</i>	43
3.2 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS	46
3.3 - AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	47
3.3.1- <i>Quantificação da quantidade total de polifenóis</i>	48
3.3.2- <i>Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos</i>	49
3.4 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	51
3.5 – DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	52
3.5.1- <i>HPLC</i>	52
3.5.2- <i>TLC</i>	57
4. DISCUSSÃO	60
4.1 - AQUACULTURA	60
4.2 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS	63
4.3 - AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	64
4.4 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	66
4.5 - ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA	68
5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema universal do padrão de zonação estabelecido por Stephenson & Stephenson (1949) (segundo Raffaelli & Hawkins, 1996).....	4
Figura 2 - Percentagem de metabolitos secundários descritos para cada filo de macroalgas (segundo Muñoz <i>et al.</i> , 2013).....	6
Figura 3 - Esquema representativo de alguns dos compostos bioativos presentes nas algas castanhas, assim como algumas atividades biológicas demonstradas com interesse cosmético (segundo Wijesinghe & Jeon, 2011).	9
Figura 4 - Espécie em estudo: <i>Bifurcaria bifurcata</i> R.Ross.....	11
Figura 5 - Estado reprodutivo em <i>B.bifurcata</i> com ostíolos proeminentes.....	13
Figura 6 - Distribuição dos metabolitos algais pelos vários géneros da ordem Fucales (segundo Muñoz, 2013).	14
Figura 7 - Esquema representativo de sistemas de IMTA	16
Figura 8 - Local de amostragem de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	20
Figura 9 - Representação esquemática do sistema de IMTA da ALGApplus & Materaqua.	21
Figura 10 - Aquacultura em laboratório.	22
Figura 11 - Processo de aquacultura.	24
Figura 12 - Processo de trituração.....	26
Figura 13 - Processo de extração com <i>n</i> -Hexano.....	27
Figura 14 - Processo de extração com metanol.....	28
Figura 15 - Processo de extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos	29
Figura 16 - Método de <i>Folin-Ciocalteu</i>	30
Figura 17 - Método de DPPH [*]	32
Figura 18 - Preparação dos extratos para o ensaio antifúngico.....	33
Figura 19 - Esquema da composição do controlo negativo do extrato.	35
Figura 20 - Ensaio antifúngico - composição do ensaio para cada fungo.....	35
Figura 21 - Ensaio antifúngico.....	36
Figura 22 – Técnica de HPLC.....	37
Figura 23 - Técnica de TLC.	38
Figura 24 - Aquacultura em sistema laboratorial de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	40
Figura 25 - Observação do clareamento dos ápices, em relação ao talo, resultante do crescimento vegetativo de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	41
Figura 26 - Exemplo da variação diária (média de 1 semana) dos fatores ambientais nas duas sazonalidades.....	42
Figura 27 - Média da taxa de crescimento relativo (RGR) semanal.	44

Figura 28 - Taxa de crescimento relativo e produtividade (média \pm erro padrão) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> cultivada sob diferentes densidades (cima) e sazonalidade (baixo).	45
Figura 29 - Conteúdo de polifenóis totais nos extratos de metanólicos e aquosos das amostras selvagem e de aquacultura de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	48
Figura 30 - Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos pelo método DPPH [*] , em % de inibição versus concentração de extrato no meio de reação (mg/mL).....	49
Figura 31 – Resultados observáveis na atividade antifúngica.....	52
Figura 32 – HPLC do extrato metanólico de <i>Bifurcaria bifurcata</i> da amostra de aquacultura..	53
Figura 33 - HPLC do extrato metanólico de <i>Bifurcaria bifurcata</i> da amostra selvagem.....	54
Figura 34 - HPLC do extrato aquoso de <i>Bifurcaria bifurcata</i> da amostra aquacultura.	55
Figura 35 - HPLC do extrato aquoso de <i>Bifurcaria bifurcata</i> da amostra selvagem.	56
Figura 36 – Perfil cromatográfico, por TLC.	58

Índice de tabelas

Tabela I - Desenho experimental da aquacultura exterior.....	23
Tabela II – Percentagem de peso seco para <i>Bifurcaria bifurcata</i> (média ± SD, n=4).	40
Tabela III - Fatores ambientais monitorizados para cada período experimental (média ± erro padrão).....	42
Tabela IV - Análise de variância (ANOVA) para testar o efeito da densidade de cultivo (DC) e sazonalidade (Sazo) sobre a taxa de crescimento relativo (RGR) e produtividade (prod).....	46
Tabela V – Rendimentos dos extratos algais e polissacarídeos de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	47
Tabela VI - Conteúdo fenólico total dos extratos algais de <i>Bifurcaria bifurcata</i> (média ± SD; n=4) expresso em µg EAG/mg de extrato.....	48
Tabela VII - Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos de <i>Bifurcaria bifurcata</i> pelo método DPPH*, expressa em IC ₅₀ (mg/mL) (média ± SD; n=3).	50
Tabela VIII - Atividade antifúngica (MIC e MLC) do extrato metanólico de <i>Bifurcaria bifurcata</i> contra estirpes de dermatófitos.	51
Tabela IX – Valores dos tempos de retenção e comprimentos de onda máximo para cada pico obtido nos cromatogramas.	57

Abreviaturas

CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EAG – Equivalentes de ácido gálico

HCl – Ácido clorídrico

HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução

IMTA - Aquacultura Multi-Trófica Integrada

mb – milibar

MIC – Concentração mínima inibitória

MLC – Concentração mínima letal

MOPS – Ácido 3-N-morfolino-propanosulfúrico

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – nanómetros

Prod – Produtividade

R_f – Fator de retenção

RGR – Taxa de crescimento relativo

ROS - Espécies reativas de oxigénio

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

Saz – Sazonalidade

SD – Desvio padrão

SDA - Sabouraud Dextrose Agar

TLC – Cromatografia de camada fina

UV – Ultravioleta

λ_{máx} – Comprimento de onda máximo

Resumo

O meio marinho é um espaço repleto de diversidade, tanto em organismos como em potenciais recursos naturais. Por isso tem sido um dos focos na investigação científica. Nesta área de conhecimento as algas são, atualmente, um dos temas em voga. Apesar de já serem utilizadas por vários países em tempos remotos, na Europa começam a dar agora passos fundamentais.

De vários estudos realizados as algas evidenciam ser uma fonte de vários compostos e metabolitos secundários, com possíveis aplicações e reveladores de atividades biológica. As primeiras investigações resultaram de aplicações no sector alimentar, desde o seu consumo direto até aos aditivos naturais. Posteriormente a sua exploração resultou na descoberta de compostos com aplicações farmacêutica e cosmética. De forma complementar revelaram-se uma ferramenta para a biorremediação, que juntamente com a aquacultura originaram-se sistemas de IMTA (Aquacultura Multi-Trófica Integrada). Verifica-se assim que a biotecnologia das algas assegura um futuro promissor.

O nosso país, rodeado de uma extensa zona costeira, apresenta uma variada flora algal. Tal facto permite a aplicação biotecnológica e o enaltecimento de recursos naturais. No entanto ainda precisa de ser explorado.

Neste trabalho foi avaliado o potencial de cultivo e biotecnológico de *Bifurcaria bifurcata* presente na costa portuguesa. Os seus compostos bioativos foram extraídos com recurso a solventes orgânicos e água. Desses, apenas os extratos metanólicos e os aquosos foram utilizados em todos os ensaios experimentais.

A atividade antioxidante foi determinada através da quantificação total de polifenóis pelo método de *Folin-Ciocalteu* e através da avaliação da capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH^{*}). A capacidade antifúngica foi avaliada através do método de macrodiluição em caldo contra sete estirpes de dermatófitos patogénicos. Por fim, tentou-se quantificar e identificar alguns compostos que compõem cada extrato, através da aplicação de técnicas de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e cromatografia de camada fina (TLC). Os resultados obtidos foram sobretudo de carácter comparativo entre amostras selvagens e de aquacultura.

Com base nos resultados, podemos concluir que *B. bifurcata* é uma alga passível de cultivo em sistemas de aquacultura multi-trófica integrada (IMTA), apesar de requerer alguns cuidados particulares. A nível biotecnológico, demonstrou possuir alto

conteúdo de compostos fenólicos, resultado concordante com a sua capacidade antioxidante. Na atividade antifúngica, esta espécie é capaz de inibir grande parte dos dermatófitos testados. Por fim, relativamente aos resultados em HPLC verificou-se que cada extrato possui uma composição, no entanto não se verificaram diferenças qualitativas entre as amostras. Quanto à aplicação do TLC às amostras, confirmou a presença de compostos fenólicos, entre os quais florotaninos.

Palavras-chaves: *Bifurcaria bifurcata*, IMTA, Antioxidantes, Antifúngicos, Cromatografia

Abstract

The marine environment is a space full of diversity, either in organisms as in potential natural resources. Therefore, it has been a center of attention in the scientific investigation. In this area of knowledge, algae are one of the themes currently in vogue. Despite already been used by various countries in ancient times, in Europe they now begin to take fundamental steps.

From various studies performed, algae demonstrate to be a source of several compounds and secondary metabolites with potential applications and revelators of biological activity. The first investigations in this area resulted from applications in the food sector, from its direct consumption to the natural additives. Thereafter its exploration resulted in the discovery of compounds with pharmaceutical and cosmetic applications. Complementarily they proved to be a tool for bioremediation that, together with aquaculture originated the IMTA systems (Integrated Multi-Trophic Aquaculture). Thus, it appears that algae biotechnology ensures a promising future.

Our country, surrounded by an extensive coastal area, presents a varied algal flora. This allows the biotechnological application and enhancement of natural resources. Nevertheless, it still needs to be explored.

In this present study, the cultivation and biotechnological potentials of *Bifurcaria bifurcata* present in the Portuguese coast were evaluated. Its bioactive compounds were extracted using organic solvents and water. Of these, only the methanol and aqueous extracts were used in all experimental assays.

The antioxidant activity was determined through the total quantification of polyphenols using the method of Folin-Ciocalteu and through the evaluation of the capacity of reduction of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH). The antifungal capacity was evaluated through the broth macrodilution methods against seven strains of pathogenic dermatophytes. Finally, there was an attempt to quantify and identify some compounds that constitute each extract through the application of techniques of high-performance liquid chromatography (HPLC) and thin-layer chromatography (TLC). Results are mainly of comparative nature between wild and from aquaculture samples.

Based in the results, we can conclude that *B. bifurcata* is seaweed liable of cultivation in integrated multi-trophic aquaculture systems (IMTA), although it requires some particular care. At a biotechnological level, it demonstrated to have a high content of phenolic compounds, which is a concordant result with its antioxidant capacity. In

the antifungal activity, this species is capable of inhibit most of the tested dermatophytes. Finally, regarding the HPLC results, it has been found that each extract have one composition however there were no qualitative differences between samples. In relation to the application of the TLC to the samples, it confirmed the presence of phenolic compounds, including phlorotannins.

Keywords: *Bifurcaria bifurcata*, IMTA, antioxidants, antifungals, chromatography



1. Introdução

1. Introdução

Quando é pronunciada a palavra azul, rapidamente associamos ao céu e ao mar. Ao retornar alguns anos atrás, lembramo-nos da constatação que o planeta onde vivemos apresenta uma coloração predominantemente azul. Tais observações juntamente com imagens obtidas do espaço confirmaram esta preponderante cor, levando à classificação de “Planeta Azul”. Estima-se que a Terra seja rodeada por 70% de oceanos com 3800 metros de profundidade média. O oceano é um espaço tridimensional, constituído de uma enorme diversidade marinha desde pequenos organismos microscópicos, até grandes animais e diversas plantas. Local onde surgiu a vida, há cerca de 3,8 milhões de anos atrás, este não só nos proporciona uma contemplação como local de lazer, como também uma grande variedade de bens e serviços essenciais à nossa vida. Por outro lado, este tem constituído uma fonte e incentivo para estudos por parte da comunidade científica, com o objetivo de compreender o início da vida neste planeta e sua biodiversidade (Saá, 2002).

Durante muitos anos, devido a dificuldades económicas, as pessoas que habitavam nas costas europeias utilizaram o mar como meio de subsistência e de comércio. Mudaram assim a visão em relação ao mar, um recurso que poderia vir a complementar os recursos terrestres (Campbell & Nicholls, 1994).

A observação do meio marinho, biodiversidade e grandeza, levou os cientistas a iniciar o estudo da vida marinha. Primeiro começaram com os animais, e agora mais recentemente com microrganismos (alguns deles presentes em ambientes impróprios à vida humana – os extremófilos), e as plantas (algas), entre outros. Devido à grande diversidade marinha, houve a necessidade de criar vários ramos desta ciência. Aquela que se dedica ao estudo das algas é designada Ficologia (ou Algologia). Esta palavra deriva do grego *phycos*, que significa “algas” (Lee, 2008).

O termo alga é muito amplo. De forma geral, as algas são organismos eucariotas, autotróficos, providos de clorofila *a*, não possuem tecidos e órgãos especializados (corpo um talo), podendo ser encontrados na água ou em locais húmidos. Estas são produtoras primárias, produzindo alimento para os restantes seres vivos. Através de vários compostos (luz solar, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas) num processo de fotossíntese, produzem oxigénio e compostos orgânicos. Por isso, desempenham um papel ecológico fundamental não só nas cadeias alimentares de todos os ecossistemas aquáticos, como também representam uma proporção significativa da biodiversidade do

mundo. As algas são habitualmente divididas em microalgas e macroalgas. Esta segregação artificial, sem valor taxonómico, facilita o seu estudo (Pereira, 2010; Wijesinghe & Jeon, 2011).

As macroalgas são, maioritariamente, aquelas que nós encontramos no meio marinho, apesar de haver algumas espécies de água doce. São algas macroscópicas (visíveis a olho nu), encontradas durante a maré-baixa ou à deriva no mar quando ocorrem fenómenos de grande agitação marinha. São organismos eucarióticos que exibem uma grande diversidade de cores, formas e tamanhos. Estas são comumente classificadas em três grupos principais com base na sua pigmentação: filo Chlorophyta (algas verdes), filo Heterokontophyta ou Ochrophyta (classe Phaeophyceae – algas castanhas) e filo Rhodophyta (algas vermelhas) (Pereira, 2009; O’Sullivan, 2010; Kılınc, 2013).

A utilização das algas é relativamente recente nas comunidades europeias, no entanto, em países asiáticos o seu consumo como alimento já remonta a tempos antigos. Hoje em dia, estas são utilizadas como matéria-prima em muitos produtos alimentares ou farmacêuticos, por intermédio da inclusão de certos compostos bioativos. Pelo menos 145 espécies de macroalgas são usados no mundo inteiro como alimento, sobretudo no Japão e países ocidentais (Polat & Ozogul, 2013; Fleurence *et al.*, 2012).

Portugal continental é um país pequeno, localizado a sudoeste da Península Ibérica, de forma quase quadrilátera. Verifica-se um grande contacto com os oceanos, permitindo assim a aplicação dos diversos ramos da Biologia Marinha no estudo da diversidade deste ecossistema. Apresenta um litoral com cerca de 845 km de extensão, composto por areais e costas rochosas. De estudos realizados em espécies algais marinhas (Ardré - 1970; 1971) foram identificados e descritas 246 espécies de Rhodophyta, 98 Phaeophyceae e 60 Chlorophyta. Podemos assim dizer que a costa portuguesa possui uma grande diversidade de macroalgas, mas em quantidades reduzidas comparadas com outros países (Pereira, 2005, 2008).

O desenvolvimento de tal diversidade de espécies algais é possível devido ao clima peculiar do território português, como também da diversa influência das diferentes massas de água que banham a costa portuguesa. A zona Norte é influenciada sobretudo por correntes do oceano Atlântico, tendo sobretudo uma flora algal típica de climas frios. Já o Sul, influenciado por correntes do oceano Mediterrânico, comporta algas típicas de climas mais quentes. A zona Centro, por sofrer influência de ambas as zonas, possui uma grande diversidade de algas. Através de observações e estudos, tem

sido descrito um gradiente de algas ao longo da costa portuguesa: à medida que nos deslocamos para Norte ocorre um incremento de espécies de algas castanhas e um decréscimo de espécies de algas vermelhas. No entanto, devido às alterações climáticas e consequente aquecimento das águas, estes limites de algas tem-se alterado. Espécies características de águas quentes têm-se deslocado para Norte. Se ao longo dos anos este fenómeno continuar, possivelmente na costa portuguesa as espécies de algas típicas de climas frios irão desaparecer (Pereira, 2005, 2008).

As macroalgas são sobretudo observáveis na costa rochosa, por construir um substrato apropriado para a sua fixação. Como se torna difícil de descrever toda a diversidade das espécies ao longo da costa, optou-se por dividi-la em três zonas: zona infralitoral, mediolitoral e supralitoral (figura 1).

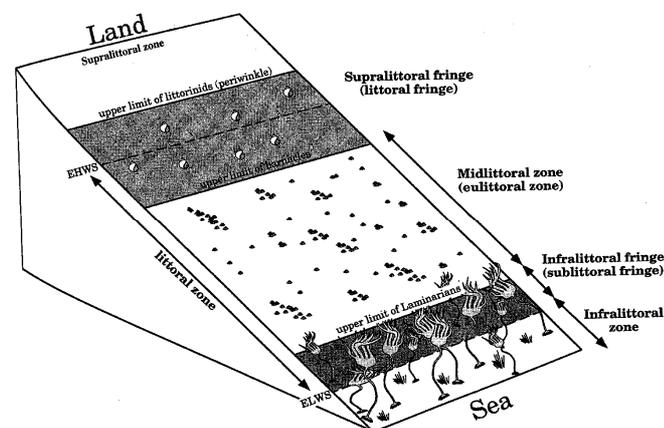


Figura 1 - Esquema universal do padrão de zonação estabelecido por Stephenson & Stephenson (1949) (segundo Raffaelli & Hawkins, 1996).

A zona supralitoral localiza-se na parte superior mais perto do areal, sendo representada pela sua exposição durante as marés-baixa. É caracterizada por organismos que possuem mecanismos de resistência à dessecação. A zona mediolitoral encontra-se entre os limites máximo e mínimo, atingidos pelas ondas e marés, na preia-mar e na baixa-mar. Aqui podemos encontrar poças-de-maré permanentemente repletas de água, onde as condições existentes são semelhantes às existentes no infralitoral. Constitui o sítio preferível para a colheita das algas, por ser um local de fácil acesso. A zona infralitoral, permanentemente submersa, estende-se do limite mínimo da zona mediolitoral até à profundidade compatível com a existência de algas. Por ter as condições mais estáveis, esta contém uma maior biodiversidade. A colheita de algas nesta requer a utilização de equipamento de mergulho. Deste modo, esta divisão da

costa não só permitiu conhecer as principais espécies que caracterizam cada zona, como também ajuda na localização das mesmas quando se pretende colher (Almeida, 2007; Saá, 2002).

O meio marinho é reservatório de variados compostos bioativos. As características do meio como salinidade, temperatura, pressão e incidência luminosa conferem particularidades nestes compostos, tornando-os com potencial para ser aplicados em alimentação, conservação e fortificação (Freitas *et al*, 2012). Neste intuito, ao longo dos anos, o estudo da vida marinha levou sobretudo à descoberta novos compostos biológicos que tem impulsionado diversas áreas da biotecnologia. Em cerca de 220 000 substâncias naturais registadas, apenas 10% são de origem marinha. Isto pode ser explicado por os organismos marinhos serem menos estudados, principalmente por alguma debilidade no conhecimento e dificuldades na colheita das amostras (Ainane, 2011).

Mas, atualmente existe um foco nas algas, em que dada a sua abundância têm sido alvo de vários estudos reveladores de um grande potencial, sobretudo por parte da diversidade de metabolitos secundários. Além de seu valor nutritivo (fibras proteínas, conteúdo mineral), estas ainda não demonstraram riscos de alergia e toxicidade. Isto levou, que nas últimas três décadas, a descoberta de metabolitos com atividades biológicas a partir de macroalgas aumenta-se significativamente (Fleurence *et al.*, 2012).

A biologia marinha experimental, sobretudo na parte de macroalgas, é ainda uma ciência recente, mas o desenvolvimento de novas tecnologias asseguram-lhe um futuro promissor. Como é impossível o estudo de toda a diversidade marinha, uma pequena descoberta por parte de um cientista torna-se um grande avanço nesta ciência. Por vezes é necessário começar o estudo no específico para conseguir compreender o geral. Por este motivo, este trabalho debruça-se sobre uma espécie de macroalga castanha, a *Bifurcaria bifurcata* (Fucales, Phaeophyceae).

1.1 - Macroalgas castanhas (classe Phaeophyceae)

As macroalgas castanhas pertencem à classe Phaeophyceae. São quase exclusivamente marinhas, variando muito no que diz respeito à sua forma, podendo ir desde simples filamentos até formas grandes e complexas. Desempenham um papel importante em ambientes marinhos, tanto como alimento, como para os habitats que estas formam. A nível taxonómico inclui mais de 250 géneros e acima de 1500 espécies, possuindo por isso uma grande diversidade (Wijesinghe & Jeon, 2011; Graham & Wilcox, 2000).

A cor acastanha é resultado da dominância dos pigmentos xantofila e fucoxantina, que disfarçam os outros pigmentos como a clorofila *a* e *c*, β -caroteno e outras xantofilas. A parede celular contém essencialmente três componentes: celulose, ácido algínico, e polissacarídeos sulfatados (El Gamal, 2010; Graham & Wilcox, 2000).

Apresentam dimensões que podem ir desde tamanhos microscópicos até formas de grandes dimensões. Crescem sobretudo na faixa mediolitoral e supralitoral em costas temperadas ou frias, podendo formar grandes florestas subaquáticas (Lee, 2008).

A classe Phaeophyceae tem sofrido muitas alterações em termos de classificação. Ainda assim, esta comporta cerca 14 ordens. No entanto, são as ordens Laminariales, Fucales e Dictyotales que têm sido mais pesquisadas a nível fitoquímico (Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

As algas castanhas têm demonstrado nos últimos tempos, deter a capacidade de produzir uma grande variedade de metabolitos secundários (cerca de 44% entre todos os filós – figura 2) com diferentes tipos de esqueleto e funcionalidades. A estes metabolitos encontram-se associados grandes potenciais biológicos (Ortalo-Magné *et al.*, 2005).

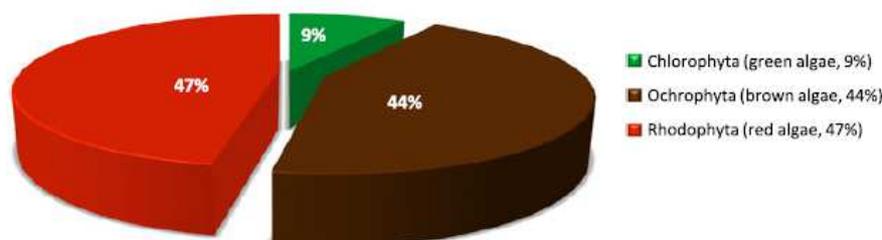


Figura 2 - Percentagem de metabolitos secundários descritos para cada filo de macroalgas (segundo Muñoz *et al.*, 2013).

1.1.1 - Compostos bioativos

As macroalgas castanhas, por ocuparem particularmente a zona mediolitoral das zonas costeiras e serem organismos sésseis, adquiriram na sua evolução mecanismos de sobrevivência sobre uma constante flutuação das condições no habitat. Estas flutuações levam à formação de radicais livres e outros agentes oxidante fortes, que poderiam levar à morte. Para ultrapassar tal dificuldade as algas sintetizam compostos bioativos, em que a sua exploração pode ser útil como ingredientes funcionais para aplicações de saúde, tanto humana e animal (figura 3). Atualmente, os estudos tem incidido na descoberta e caracterização destes compostos. Têm sido utilizados sobretudo processos de extração com solventes, obtendo-se misturas complexas dos principais compostos que compõem as algas em estudo. Este é um processo não seletivo, porém tem sido descrito que os extratos de algas castanhas contêm uma mistura de polissacarídeos, compostos fenólicos, ácidos gordos polinsaturados, proteínas, peptídeos, pigmentos, vitaminas e terpenos. No entanto, aqueles que tem sido extensamente investigados e explorados incluem diterpenos, polissacarídeos sulfatados e florotaninos (Oliveira *et al.*, 2012; Balboa *et al.*, 2013).

Terpenos

Os terpenos são uma classe de metabolitos secundários lipofílicos produzidos por diferentes tipos de organismos, como plantas e algas. São constituídos por unidades de isopreno, que podem adquirir as formas de hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos ou carotenóides (C₄₀). Apresentam também uma enorme diversidade estrutural, incluindo compostos acíclicos, monocíclicos e policíclicos. Devido à sua importância numerosos estudos foram realizados ao longo das últimas quatro décadas (Eisenreich *et al.*, 2004; Balboa *et al.*, 2013).

No caso das macroalgas, tem sido relatado sobretudo a presença de diterpenos. Géneros como *Bifurcaria* e *Sargassum* são alguns exemplos onde já ocorreu o seu isolamento. Pensa-se que a sua produção tenha particularmente a função de proteção contra a herbívoros. Atividade antioxidante e ação antiviral são algumas das atividades já reportadas (Balboa *et al.*, 2013; Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

Polissacarídeos

As algas contêm muitos polissacarídeos diferentes. A estrutura química e designação são diferentes dependendo da posição taxonómica e estrutura celular da alga em questão. Os polissacarídeos são polímeros naturais, compostos por hidratos de carbono (monossacarídeos) ligados entre si por ligações glicosídeas. Estes estão presentes principalmente nas paredes celulares e a sua composição altera-se de acordo com a estação, idade, espécie e localização geográfica. Possuem como características comerciais as propriedades de estabilizantes, espessantes e emulsionantes. Por isso, são empregadas em alimentos, rações, bebidas, etc. Nas algas castanhas, os polissacarídeos mais abundantes são a laminarana, fucoidana e ácido algínico. O seu conteúdo geralmente varia entre 40% a 80% do peso seco. (Chojnacka *et al.*, 2012; Holdt & Kraan, 2011; Zvyagintseva *et al.*, 2003).

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são constituídos por um grupo hidroxilo (-OH) ligado a um grupo hidrocarboneto aromático. Tradicionalmente estes são extraídos recorrendo a etanol ou metanol como solventes. Existem vários tipos, no entanto é referido que as algas castanhas contêm maiores quantidades de florotaninos (Kadam *et al.*, 2013).

Os florotaninos são derivados de tanino, constituídos por compostos fenólicos baseados em floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno) e sintetizados pela via do acetato-malonato. Estão envolvidos em funções de defesa e construção da parede celular, assim como na proteção em contextos de stresse e herbívoros. Atividades antimicrobianas, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena entre outras têm sido relatadas, dependente do método de extração (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Balboa *et al.*, 2013; Kadam *et al.*, 2013).

Muitos outros compostos podem ser encontrados na constituição das algas castanhas, dependendo do estudo efetuado e dos métodos de extração aplicados. Neste trabalho, dá-se mais ênfase aos que tem sido abundantemente citado em estudos recentes. Ainda assim, a identificação de todos os compostos que compõem os extratos, é um processo complexo. No entanto são estes compostos que levam à presença de atividades biológicas. É de referir que muitos dos compostos presentes nas algas já são aplicados no sector alimentar em alimentos do nosso dia-a-dia (Pereira, 2011).

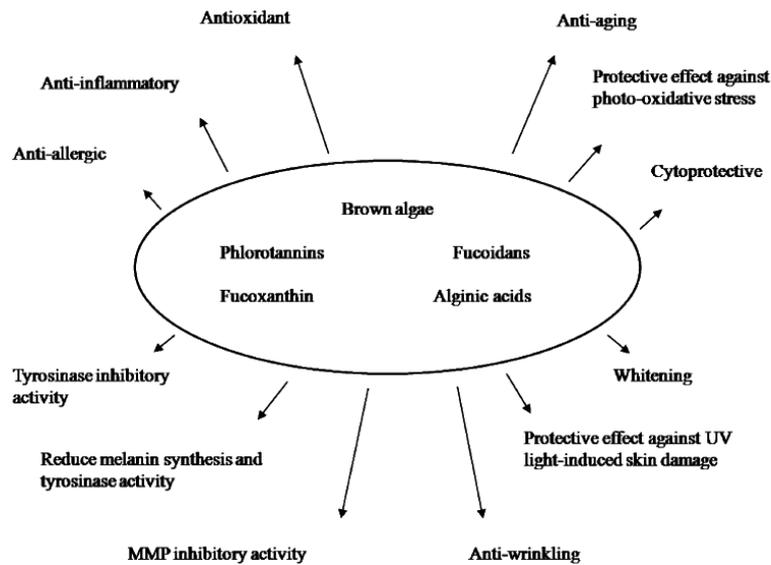


Figura 3 - Esquema representativo de alguns dos compostos bioativos presentes nas algas castanhas, assim como algumas atividades biológicas demonstradas com interesse cosmético (segundo Wijesinghe & Jeon, 2011).

1.1.2 - Atividades biológicas

As algas produzem diversos compostos químicos que funcionam como sistemas de defesa, facilitando a sua sobrevivência em ambientes extremamente competitivos. A investigação sobre produtos naturais químicos e defesas química das algas durante os últimos 40 anos resultou no isolamento de mais de 15.000 novos compostos, muitos dos quais têm mostrado deter propriedades bioativas (Kelman *et al.*, 2012). Dentro das diversas atividades biológicas manifestadas pelas algas, serão enfatizadas as atividades antioxidante e antifúngica, por constituir a componente de estudo deste trabalho.

Atividade antioxidante

A oxidação é um processo metabólico normal, uma consequência inevitável na produção de energia, bem como da diversidade de condições adversas que podem surgir no ambiente marinho (D’Orazio *et al.*, 2012). Este processo é ultrapassado por muitos dos organismos marinhos pela produção de moléculas bioativas, normalmente através do seu metabolismo secundário. Por este motivo, estes compostos denominam-se de antioxidantes. Em termos mais simples, um antioxidante pode ser considerado como um agente ou composto que atrasa, impede ou elimina os danos oxidativos (Cornish & Garbary, 2010).

Para sobreviver em ambientes marinhos, muitas vezes agressivos, macroalgas precisam enfrentar diferentes condições ambientais, tais como a variabilidade da salinidade, a competição por espaço e nutrientes, radiação solar e variações de marés (Tierney *et al.*, 2010). Estas variações levam à produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), que em grandes quantidades podem levar ao dano celular e/ou morte. Para ultrapassar tal dificuldade, as algas produzem compostos antioxidantes. São referidos na literatura compostos como polifenóis, ficocianinas, várias enzimas, carotenoides, catequinas e ácido ascórbico (Cornish & Garbary, 2010).

Atualmente tem havido um aumento de agentes promotores de stresse oxidativo, resultando na maior procura de compostos antioxidantes eficientes. As macroalgas têm sido um objeto de estudo neste campo, através procura de compostos naturais. Existem vários testes que podem ser utilizados no estudo de atividade antioxidante, dos quais se destacam redução do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power), redução do β -caroteno, entre outros.

Atividade antifúngica

As infecções fúngicas são um termo muito pronunciado atualmente, não só pelo aumento na sua incidência assim como pela sua gravidade.

Os fungos são organismos que coabitam conosco todos os dias. Pertencem ao reino Fungi e são organismos eucariotas que se alimentam por absorção. A nível celular contêm uma membrana nuclear e uma parede celular contendo quitina (Purves *et al.*, 2003).

Muitos destes fungos ao se instalarem no corpo humano podem provocar doenças. Zonas como a pele, cabelo, unhas, e tecidos subcutâneos estão entre as infecções mais comuns. Neste caso, estes fungos tomam o nome de dermatófitos (Bokhari, 2009).

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos filamentosos que degradam queratina. Espécies dos géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* são responsáveis pelas infecções comuns na pele. As principais espécies patogénicas são o *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* (Filo Ascomycota). As infecções causadas por estes fungos são sobretudo micoses. Existem diversos fármacos utilizados para o tratamento destas, nomeadamente azóis, alilaminas,

e derivados de morfolina. Estes atacam sobretudo a membrana citosólica dos fungos, através da inibição dos seus constituintes. Ambos os fármacos apresentam efeitos colaterais e o seu uso continuado pode desenvolver resistência a estes agentes (Zuzarte *et al.*, 2011; Sagar & Vidyasagar, 2013).

A maior resistência dos fungos, toxicidade dos medicamentos e aumento de infeções tem impulsionado o estudo para novos produtos, nomeadamente os naturais. Os elementos naturais de várias plantas estão a ser utilizados, e numerosos estudos têm relatado a presença de compostos bioativos em extratos de algas capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos. Para o estudo da atividade antifúngica existem vários ensaios, no entanto os mais utilizados são o método de macrodiluição em caldo e difusão em disco (Pinto *et al.*, 2013; Manivannan *et al.*, 2011).

1.2 - *Bifurcaria bifurcata*: Caracterização

Bifurcaria bifurcata (figura 4) é uma macroalga castanha, onde presentemente alguma investigação, a nível fitoquímico e biotecnológico, tem incidido sobre esta. É taxonomicamente posicionada como pertencente ao império Eukaryota, reino Chromista, filo Heterokontophyta, classe Phaeophyceae, ordem Fucales, família Sargassaceae. Tem como sinónimos *Fucus rotundatus*, *Fucus tuberculatus*, *Fucus bifurcatus*, *Bifurcaria tuberculata*, *Pycnophycus tuberculatus*, *Pycnophycus sysymbrioides*, *Ascophylla tuberculatum*, e *Bifurcaria tuberculata* var. *sysymbrioides*, os quais já não são aceites atualmente (Guiry & Guiry, 2014).



Figura 4 - Espécie em estudo: *Bifurcaria bifurcata* R.Ross¹.

A *B. bifurcata* é uma alga marinha, em que as suas frondes (parte ereta de uma macroalga) encontram-se aderidas às rochas por intermédio de um pequeno disco. Possui um tamanho mediano (30 a 50 cm), formando tufo de coloração castanho-

¹<http://centros.edu.xunta.es/iesasfontinhas/DEPARTAMENTOS/DEPARTAMENTOS/CIENCIAS/>, accedido a 5/07/2014

amarelados. Exibe uma forma cilíndrica, contendo ramos dicotomicamente ramificados. Por vezes, um dos segmentos é maior do que outro, devido ao crescimento irregular. As extremidades dos ramos transformam-se, durante a primavera, em recetáculos onde se encontram encerrados os concetáculos hermafroditas (Pereira, 2009; Julien, 2008).

É uma alga limpa, por se encontrar livre de epífitas. Forma populações densas quando em habitat natural, de coloração castanha-amarelada. Quando seca apresenta uma tonalidade escura, devido à perda de pigmentação resultante do processo de desidratação. Esta espécie é perene, sendo muito abundante na costa portuguesa, sobretudo no litoral Norte e Centro. A nível da distribuição mundial é uma espécie encontrada na costa Atlântica, a partir de Marrocos (limite sul), até à Irlanda do Norte-ocidental (limite norte). Devido à sua ampla distribuição podemos constatar que é uma espécie resistente, devido às várias condições climáticas que consegue suportar (El Hattab *et al.*, 2008; Marie Skewes, 2008).

Em termos do habitat, a *B. bifurcata* pode ser encontrada na zona supralitoral em locais semi-expostos e na zona mediolitoral nas poças de maré (Pereira, 2009; Campbell & Nicholls, 1994).

Ciclo de vida

O ciclo de vida da *B. bifurcata* pensa-se que seja idêntico à maioria das algas castanhas da ordem Fucales, tendo como espécie representativa o *Fucus*. Por isso esta possui uma reprodução sexuada oogâmica e ciclo de vida diplonte (meiose gamética) sem alternância de gerações (Braune, 2011; Lee, 2008; Graham & Wilcox, 2000). A época reprodutiva surge de abril a outubro e o período de crescimento de setembro a novembro (Menéndez Valderrey, 2004).

Na primavera as extremidades das frondes desta espécie apresentam uma coloração mais escura, com umas estruturas rugosas e inchadas denominadas recetáculos. Nestes recetáculos encontram-se cavidades especiais, os concetáculos. Para esta espécie, pensa-se que os concetáculos sejam hermafroditas, isto é, contêm tanto os gametângios masculinos como os gametângios femininos. Quando o concetáculo se encontra maduro, possui uma abertura (ostíolo – círculos escuros nos ápices) por onde são libertados os gâmetas. O ostíolo em *B. bifurcata* é bem proeminente, sendo verificado a olho nu (pontos escuros) (figura 5) (Thomas, 2002).

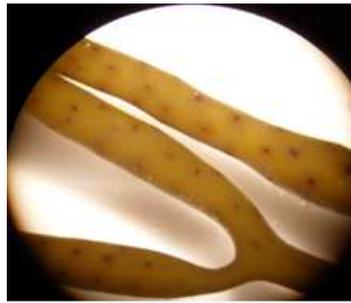


Figura 5 - Estado reprodutivo em *B.bifurcata* com ostíolos proeminentes (pontos escuros). Visualização à lupa.

Após a libertação dos gâmetas para o exterior dá-se a fecundação. Ocorre assim o desenvolvimento de um novo indivíduo, primeiramente com fixação ao substrato seguido do crescimento apical com formação de um talo parenquimatoso (Graham & Wilcox, 2000).

Todo este processo do ciclo de vida é controlado e dependente de fatores externos. Para a sua sobrevivência e crescimento os níveis de salinidade, temperatura, luz e nutrientes disponíveis tem de ser ideais. Mudanças nestes fatores podem provocar mudanças em todas as características da alga (Ainane, 2011). No entanto, os níveis de tolerância a fatores limitantes de crescimento ainda não foram referenciados em nenhuma literatura. Ainda assim, estes são fatores importantes uma vez que permitem otimizar o processo de cultivo.

Compostos e atividade

A família Sargassaceae tem despertado curiosidade nos últimos anos, resultando no isolamento e determinação da estrutura de mais de 130 compostos. Investigações químicas anteriores demonstraram que *B. bifurcata* é capaz de biossintetizar um grande número de metabolitos secundários com diferentes tipos de esqueleto e funcionalidades. Diterpenos acíclicos são aqueles que existem em maiores quantidades, estando a ser identificados pela comunidade científica. Geranilgeraniol e geranilgeraniol derivado de diterpenóides tais como eleganolone (13-oxogeranilgeraniol) e eleganediol (13-hidroxi-geranilgeraniol) são metabolitos comuns encontrados nos vários estudos (Abboud *et al.*, 2009; Daoudi *et al.*, 2001). Obtidos sobretudo a partir de extratos lipídicos, estes apresentam diversificadas composições químicas variando tanto geograficamente como sazonalmente. Outros estudos dedicados à identificação de polissacarídeos e esteróis presentes nesta espécie, através de técnicas Espectroscopia

FTIR, revelaram a presença de alginato e fucosterol (Culioli *et al.*, 2002; Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011; Bouzidi *et al.*, 2008).

Todos os estudos realizados utilizam como base a preparação de extratos. De forma geral, para esta alga, tem sido reportado a presença pigmentos (carotenos, clorofilas e xantofilas), ácidos gordos, compostos polares (florotaninos), esteróis e diterpenos (Abboud *et al.*, 2009).

Apesar de todos os estudos na identificação dos metabolitos, para o género *Bifurcaria* foram descritos apenas 8% (figura 6). Nesta ordem (Fuciales), incide um maior conhecimento de metabolitos nos géneros *Sargassum* e *Cystoseira* com 36 e 28%, respetivamente (Muñoz *et al.*, 2013).

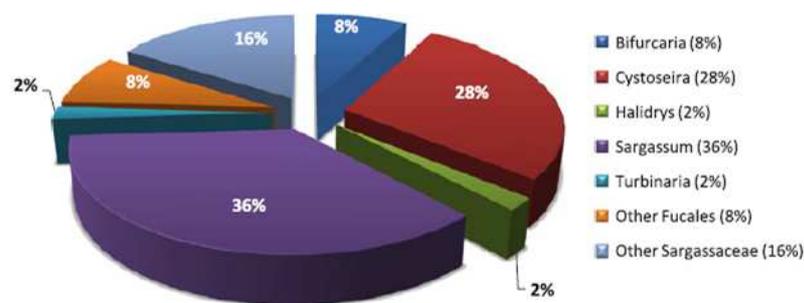


Figura 6 - Distribuição dos metabolitos algais pelos vários géneros da ordem Fuciales (segundo Muñoz, 2013).

No que diz respeito ao seu interesse económico, ainda poucos estudos têm sido feitos nesta espécie. Existem apenas várias experiências para avaliação da sua atividade biológica, revelando um potencial anti-proliferativo, antioxidante, anti-tumoral, inibição na corrosão do ferro, anti-incrustante e eficaz na remoção de metais tóxicos (Cd (II), Zn (II) e Pb (II)). É ainda de referir que esta tem sido usada industrialmente e em hidro-menteiras. No entanto, no sector alimentar esta espécie ainda não é usada regularmente (Pérez *et al.*, 2005).

Estas propriedades podem ser explicadas por esta macroalga se encontrar muitas vezes nas zonas entre marés. Consequentemente, para sobreviver, tem de produzir sistemas de defesa que resultam numa enorme diversidade de compostos e metabolitos secundários. Outro facto a verificar é que esta espécie é uma alga muito limpa, isto é, sem epífitas. Este é um facto curioso uma vez que esta espécie é sésil e vive em condições propícia à prática de herbívoros por outros organismos (competição). Por estes motivos *B. bifurcata* ao longo do tempo tem adquirido cada vez mais interesse e

despertado a atenção de cientistas, uma vez que possivelmente a vasta gama de compostos e atividades podem ter um grande interesse nas diversas áreas da biotecnologia.

1.3 - Aquacultura

À medida que a população humana continua a crescer, é necessário garantir uma maior disponibilidade de alimentos provenientes de ambientes aquáticos. Apesar de constituir parte de uma alimentação saudável, estes recursos necessitam de ter um período de crescimento para atingirem as condições exigidas para a recolha e para posterior utilização pelos consumidores. Para combater essa escassez e evitar a exaustão dos recursos marinhos tem vindo a ser implementado o conceito de Aquacultura (Klinger & Naylor, 2012).

De forma simples, a Aquacultura “consiste na criação ou cultura de organismos aquáticos, aplicando técnicas concebidas para aumentar, para além das capacidades naturais do meio, a produção dos referidos organismos”². Existem vários tipos de aquacultura, no entanto a produção atual foca-se maioritariamente em sistemas intensivos ou semi-intensivos monoespecíficos. Com uma taxa de crescimento média de 6,9% por ano, é o sector de produção de crescimento mais rápido de alimentos do mundo. No entanto, a rápida expansão e intensificação da aquacultura originou problemas ambientais (Abreu *et al.*, 2011; Troell *et al.*, 2009).

O aumento do sistema de cultivo de espécies aquáticas gerou altas concentrações de resíduos orgânicos, que devido à inexistência de métodos eficazes de eliminação, podem causar uma variedade de efeitos nefastos como eutrofização, esgotamento do oxigénio, mudanças na biodiversidade dos ecossistemas costeiros e a poluição das águas costeiras. Tais efeitos levaram a feedbacks negativos por parte da opinião pública, levando a preconceitos e rejeição destes produtos, o que conduziu, durante os últimos 10 a 15 anos, a uma procura de técnicas ecológicas. Uma aquacultura sustentável que seja ecologicamente eficiente, ambientalmente benigna, produto diversificado, rentável e socialmente benéfica (Skriptsova & Miroshnikova, 2011; Abreu *et al.*, 2011).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência das algas em sistemas de remoção de nutrientes (biofiltros), reduzindo assim o impacto ambiental. Um método ambientalmente aceitável e menos dispendioso no processamento dos desperdícios

² www.dgrm.min-agricultura.pt/, acessado a 29/07/2014

provenientes da aquicultura. A este método biológico é dado o nome de Aquicultura Multi-Trófica Integrada (IMTA) (Nobre *et al.*, 2010; Barrington *et al.*, 2010) (figura 7).

O conceito de IMTA envolve interligação de vários níveis tróficos de uma cadeia alimentar. É um processo natural, em que os remanescentes (resíduo, nutrientes e outros subprodutos) de níveis tróficos superiores são utilizados, como meio de subsistência, por organismos de níveis tróficos inferiores. Esta prática é baseada no princípio da conservação da massa (Lavoisier – 1789), através de uma expressão adaptada: " the solution to nutrification is not dilution, but extraction and conversion through diversification" (Chopin *et al.*,2012).

Normalmente, as espécies de maior valor (animais) dos sistemas de aquicultura são diariamente alimentadas por rações, resultando na produção de matéria orgânica (desperdícios) e excreção de amónia e dióxido de carbono (excrementos). A introdução de macroalgas nestes sistemas resulta num processo de biorremedição dos nutrientes inorgânicos dissolvidos, nomeadamente azoto (amónia e/ou nitratos), fosfatos e dióxido de carbono. Ocorre assim a produção de oxigénio, bem como biomassa das várias espécies algais. Além das algas, devem existir organismos filtradores ou detritívoros para utilização da matéria orgânica como alimento (Wang *et al.*, 2012; Chávez-Crooker & Obreque-Contreras, 2010).

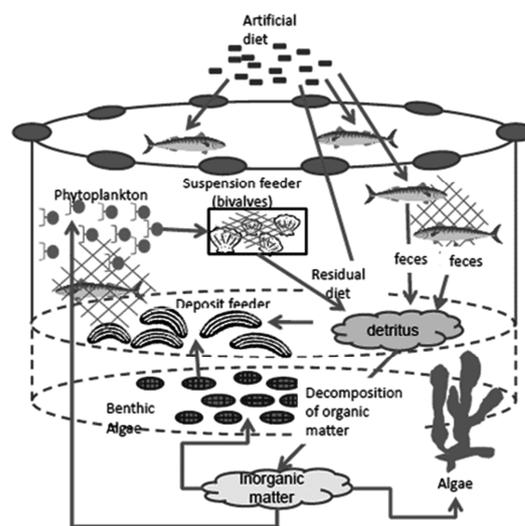


Figura 7 - Esquema representativo de um sistema de IMTA³.

Este é um processo que requer vários ensaios para estudar as condições existentes (habitat, espécie em cultivo, nutrientes libertados, entre outros), de modo a proceder à seleção da espécie algal adequada. Esta escolha deve ter em conta o valor

³ <https://www.jircas.affrc.go.jp/>, acedido a 21/07/2014

económico, bem como a capacidade de remediação. Porém esta prática já é utilizada por alguns países nomeadamente Canadá, Chile, China, Israel e África do Sul, e mais recentemente Portugal e Espanha (Kang *et al.*, 2008; Sousa Pinto & Abreu, 2011).

Uma série de estudos têm sido realizados para investigar o potencial de biorremediação de várias espécies de algas, como a *Ulva* spp., *Gracilaria* spp., *Codium fragile*, entre outros. Tais estudos envolvem a integração destas espécies com várias espécies de aquacultura, assim como diferentes depósitos (tanques, reservatórios, e mar). Mais recentemente, os sistemas de IMTA tem sido aplicado em espécies das grandes algas castanhas, conhecidas como “kelp”, nomeadamente em *Saccharina* e *Alaria*, sobretudo no Canadá (Guerrero & Cremades, 2012; Barrington *et al.*, 2009).

O IMTA é um tema recente e abrangente que pode ter muitas variações diferentes, dependentes das condições locais. Parâmetros como a temperatura e luminosidade são referidos como os mais influentes nestes sistemas. A temperatura é um fator importante uma vez que afeta a velocidade de um grande número de reações metabólicas, ao passo a luz funciona como fonte de energia para a realização da fotossíntese. Por isso é que cada espécie está adaptada a diversas gamas destes fatores. Quanto aos outros fatores, salinidade e pH, por não sofrerem grandes oscilações a sua influência nas algas é mínima (Rodríguez-Prieto *et al.*, 2013; Lobban & Harrison, 1994).

Verifica-se assim que este sistema tem apresentando resultados que podem levar ao seu sucesso. Este não só pode promover a sustentabilidade dos recursos marinhos, como também implementar as algas na alimentação, sobretudo dos povos europeus.

A aquacultura de algas é um tema atual em Portugal. Apesar dos preconceitos por estas e grande ligação com a gastronomia nacional, é um conceito que começa a progredir. Para a espécie *B. bifurcata* não existem referências sobre condições ideais de crescimento, nem casos de estudos do seu cultivo. No entanto, o facto de ser uma alga nativa da costa portuguesa, sempre livre de epífitas em sistemas naturais, com relevante potencial biotecnológico descrito na literatura e com capacidade de propagação vegetativa, torna esta espécie com potencial para cultivo em Portugal.

Neste trabalho, a espécie *B. bifurcata* foi avaliada quanto ao seu potencial de cultivo em sistemas de IMTA. As razões para a escolha deste sistema foram a disponibilidade permanente de nutrientes essenciais para o crescimento, bem como por

ser utilizado pela empresa ALGApplus. Com este sistema espera-se que haja aumento de produtividade e possibilidade de produção todo o ano desta espécie algal.

1.4 - Objetivos

As macroalgas têm-se revelado importantes produtoras de compostos bioativos com as mais variadas atividades funcionais. Sendo um recurso abundante na costa portuguesa, mas pouco investigado, a sua exploração e valorização é um factor influente. Neste contexto, este trabalho foi focado no estudo de *Bifurcaria bifurcata*, com o intuito de compreender um pouco mais sobre os seus compostos biativos e poder biotecnológico. Assim os objetivos fundamentais são:

- a) Avaliar o potencial de cultivo em sistemas de IMTA, tanto em condições laboratoriais como em condições exteriores;
- b) Avaliar a capacidade antioxidante e antifúngica de extratos brutos;
- c) Avaliar a eventual presença e natureza química de compostos fenólicos dos extratos brutos por técnicas cromatográficas.



2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1 - Local de colheita e preparação das macroalgas

O material de estudo foi recolhido na Praia da Aguda (figura 8a). Esta é uma praia situada na freguesia de Arcozelo, concelho de Vila Nova de Gaia, distrito do Porto. As colheitas foram realizadas em dois períodos distintos: o primeiro foi realizado a 8 de Outubro de 2013, ao passo que o segundo ocorreu a 19 de Abril de 2014. No local realizou-se a colheita das algas cortando as frondes acima do suporte de fixação com o auxílio de uma faca, bem como uma primeira limpeza do material e armazenamento para o transporte (figura 8b, c). Foi definido este método de colheita de forma a garantir a regeneração da biomassa no local de colheita e, porque o sistema de cultivo planeado se baseia em crescimento vegetativo. A biomassa recolhida foi aplicada nas experiências de aquacultura e parte foi congelada para garantir uma amostra inicial do material (amostra selvagem dos resultados referidos à frente).

As razões que levaram à escolha desta praia estão relacionadas, por um lado com a sua proximidade geográfica a Ílhavo (local onde se realizou a aquacultura), assim como a presença de grandes quantidades da macroalga em estudo. Este facto foi aliado ao conhecimento da costa portuguesa. Como referido anteriormente, à medida que nos deslocamos para Norte ocorre uma maior predominância de costa rochosa e um crescente aumento de macroalgas castanhas.



Figura 8 - Local de amostragem de *Bifurcaria bifurcata*: a) localização geográfica; b) Praia da Aguda; b) colheita; c) armazenamento para o transporte.

A praia da Aguda é conhecida pela sua pesca "artesanal", baseada em métodos tradicionais, transmitidos de geração em geração. Fica situada entre duas praias: a praia da Granja e a praia de Miramar. Esta é constituída por uma grande zona de costa rochosa, de pouca inclinação mas sujeita a uma forte ondulação. Uma das características

apontadas a esta praia é a abundância de recursos naturais do mar constituindo assim um local atrativo (Pereira, 2005).

2.2 - Aquacultura

As experiências de aquacultura foram realizadas em laboratório e no exterior no sistema de tanques da empresa ALGAplus em Ílhavo. O objetivo destes trabalhos foi o de testar o potencial de cultivo de *Bifurcaria bifurcata*, nomeadamente em sistemas de IMTA sob as condições naturais que possuímos em Portugal.

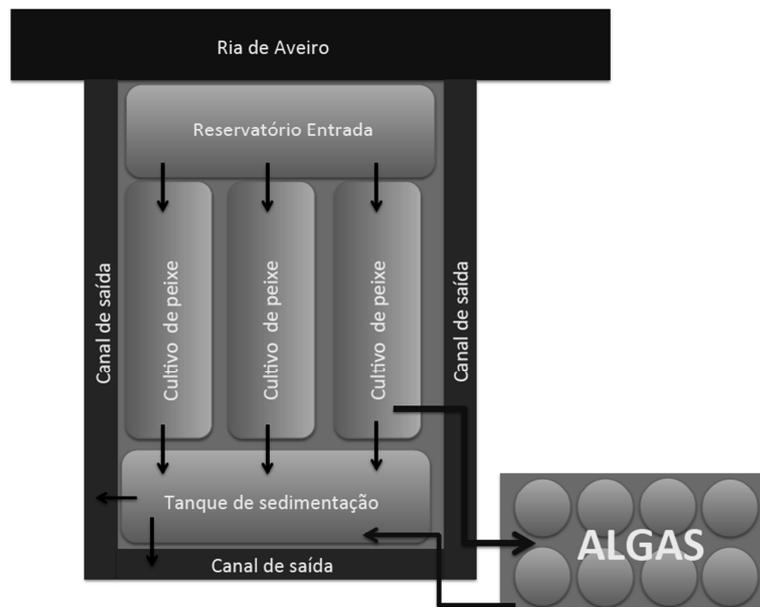


Figura 9 - Representação esquemática do sistema de IMTA da ALGAplus & Materaqua.

A ALGAplus pratica um cultivo em IMTA num sistema aberto na ria de Aveiro, combinando um sistema de piscicultura semi-intensiva em lagoas, com a cultura de algas em tanques (figura 9). A água proveniente da aquacultura de peixes, enriquecida em nutrientes, é fornecida de uma forma contínua aos tanques contendo algas. Deste modo, proporciona-se a produção de biomassa sob as variações naturais de temperatura e luminosidade. Regularmente ocorre um controlo da densidade das algas, bem como a manutenção dos tanques.

2.2.1 - Aquacultura em laboratório

Esta experiência teve como objetivo avaliar as condições básicas de cultivo de *B. bifurcata*. Para isso, as variáveis de luz, temperatura e fotoperíodo foram controladas e

selecionadas de acordo com valores de referência, de forma a fornecer condições não limitantes para o crescimento. Assim cada matraz estava sujeito a uma intensidade luminosa média de $100 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 12:12 (horas de luz: horas de escuridão) e temperatura de $15 \text{ }^\circ\text{C}$ (Lobban & Harrison, 1994). Como se trata de uma experiência laboratorial todas as condições de assepsia são importantes, para evitar contaminações e consequente morte das algas. Para isso todo o trabalho foi desenvolvido numa câmara de fluxo, como também o material devidamente limpo e autoclavado.

O processo em sistemas laboratoriais inicia-se com a preparação de todo o material. Para isso procedeu-se à filtração da água (redução dos resíduos), proveniente da aquacultura dos peixes, bem como a sua autoclavagem e de todo o restante material (varetas, matrizes, proveta, entre outros). Após a autoclavagem, a água foi para a câmara de cultura para ocorrer uma aclimação. Seguidamente executou-se a montagem do sistema de arejamento. Este é constituído por bombas de ar e tubos, ligados por junções, que fazem chegar o ar aos matrizes. Foi também preparado o meio de cultura F/2 disponível comercialmente com o objetivo de garantir a presença de todos os nutrientes.

Um dos procedimentos mais importante é a preparação das algas. Este consiste no corte dos ápices, uma primeira lavagem em água autoclavada, imersão na solução de betadine a 10% (método de desinfeção da superfície das algas) e por fim nova lavagem com água autoclavada. Posteriormente, os ápices são secos e pesados (4 g/L) (figura 10a, b, c). A experiência é constituída por quatro matrizes de 1 litro com $0,5 \text{ mL}$ de meio F/2, uma densidade de 4 g/L e um sistema de arejamento (proporciona o movimento). Como conclusão deste processo, o material algal é colocado dentro dos matrizes, vedados com parafilme, colocado uma vareta para o arejamento e mantidos na câmara de cultura (figura 10d). No final de cada semana, procedia-se à pesagem de cada matraz.



Figura 10 - Aquacultura em laboratório: **a)** corte dos ápices; **b)** limpeza da superfície da alga; **c)** pesagem; **d)** Sistema de cultivo.

2.2.2 - Aquacultura exterior

Esta experiência consiste em utilizar o sistema de cultivo em IMTA, num sistema aberto, utilizado pela ALGAplus. Nenhuma das variáveis (salinidade, temperatura, fotoperíodo) são manipuladas e ocorre o aproveitamento da água enriquecida com nutrientes, proveniente do sistema de cultivo de peixe.

Primeiramente ocorreu a eliminação de fatores indesejáveis (maturidade e tamanho) que impedem o crescimento. Para isso, procedeu-se à seleção das algas com ápices em estado não reprodutivo (sem os ostíolos proeminentes), bem como o corte para possuir um tamanho mediano (figura 11a). Este é um facto importante uma vez que a *B. bifurcata* é muito densa, detendo uma grande facilidade de deposição no fundo. Seguidamente, as algas são centrifugadas manualmente (cerca de 50 rotações), para remoção do excesso de água, e pesadas (figura 11b).

Os pesos foram definidos pela colocação de pequenas quantidades de algas nos tanques e visualização do seu comportamento em termos de movimento proporcionado pelo sistema de arejamento. Deste modo, foram realizadas três experiências independentes, sendo que a 1 e 2 foram consecutivas e utilizaram a mesma biomassa (tabela I).

Tabela I - Desenho experimental da aquacultura exterior.

	Experiência 1	Experiência 2	Experiência 3
Peso (g)	300	150	150
Densidade de Cultivo (g/L)	20	10	10
Meses	Outubro / Novembro	Novembro / Dezembro	Maio / Junho
Duração da experiência (semanas)	4	5	4
Número de réplicas	4	4	3
Parâmetros monitorizados	Luz, Temperatura da água, pH e Salinidade		
Parâmetros medidos	Taxa de Crescimento relativo (RGR) e Produtividade		

O que distingue as duas últimas experiências é o período de realização, isto, é a primeira foi realizada no outono/inverno, ao passo que a segunda foi na primavera. Com isto pretende-se comparar as experiências, de modo a tentar perceber algum efeito das épocas de cultivo na produção desta espécie. Outro facto a frisar é que o material algal utilizado na experiência 2 foi proveniente da experiência 1, ao passo que o das outras duas experiências foi oriundo de material colhido na praia da Aguda. Antes de se iniciar

a experiência 2, a biomassa foi misturada de forma a minimizar a possível variabilidade existente entre tanques.

Após a pesagem, as algas foram colocadas nos respectivos tanques. O sistema consiste em tanques de formato cônico com capacidade para 15 litros e uma área de 0,0881 m². Possui também um sistema de arejamento que proporciona movimento (figura 11c). Por razões logísticas e de forma a repetir o procedimento aplicado no laboratório, as algas foram mantidas num sistema de *batch-culture*, com três mudanças de meio semanais. Estabeleceram-se três a quatro réplicas (tabela I), com medições diárias dos parâmetros de temperatura, salinidade, pH e luz. No final de cada semana, procedia-se à pesagem de cada tanque para assim determinar o seu crescimento e produtividade. Se houvesse um crescimento semanal o excesso de biomassa era retirado e congelado, mantendo sempre a densidade de cultivo definida inicialmente (figura 11d).

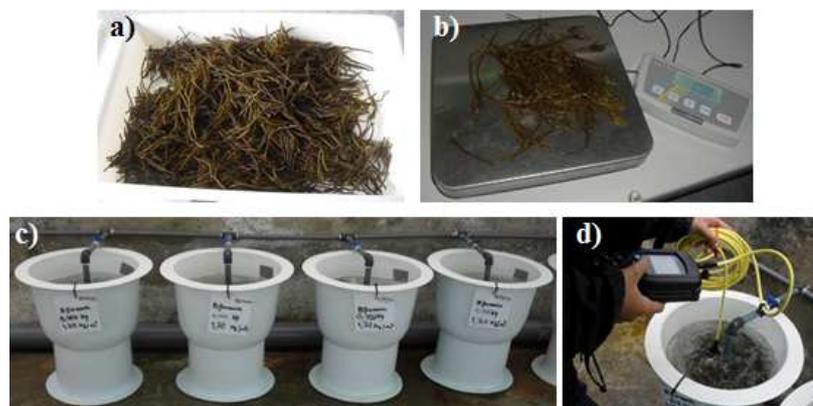


Figura 11 - Processo de aquacultura: **a)** escolha do material; **b)** pesagem; **c)** sistema de cultura; **d)** medições diárias de parâmetros físico-químicos.

A duração de cada experiência foi de quatro semanas. No final, a biomassa obtida nas réplicas foi congelada, constituindo a amostra de aquacultura.

2.2.2.1 - Percentagem de peso seco

A determinação da percentagem de peso seco é um fator importante, uma vez que nos dá a informação da percentagem de água que compõem esta espécie. Para obter este parâmetro, foram realizadas quatro réplicas com um peso aproximado de 10 g de alga fresca. Estas foram colocadas na estufa a 45 °C, durante 3 dias. Decorrido esse tempo, eram retiradas e pesadas.

2.2.2.2 - Cálculos dos parâmetros de crescimento

Os parâmetros avaliados nesta experiência foram o crescimento e produtividade. O RGR (taxa de crescimento relativo) das algas em tanque foi determinado pela fórmula: **RGR (%/dia)** = (LN (Peso final) – LN (Peso inicial)) /dias * 100. Para o caso da produtividade esta foi obtida através da equação: **Produtividade (g (dw) m⁻² dia⁻¹)** = (Peso final-Peso inicial) * % peso seco /área cultivo, em que dw é o peso seco.

2.2.2.3 - Análise estatística

De forma a eliminar a não independência dos dados provocada pelas medições consecutivas em cada réplica (Underwood, 1997), os valores médios de RGR e produtividade foram calculados para cada período experimental (4 semanas) e utilizados para análise estatística.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para analisar a influência da densidade de cultivo (DC) e da sazonalidade (Saz) sobre o RGR e a produtividade de *B. bifurcata*. O teste de Cochran's foi aplicado aos dados, para testar a heterogeneidade das amostras. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* STATISTICA 10.

2.3 - Obtenção dos extratos

Uma forma de avaliar o potencial do material biológico é transformá-los em extratos. Os extratos são uma mistura complexa de compostos, obtidos através da extração sequencial com solventes. Existem vários tipos de solvente que podem ser utilizados, dependendo dos compostos e estudo que se pretendem obter.

2.3.1 - Liofilização e trituração

As macroalgas congeladas, tanto selvagem como de aquacultura, foram liofilizadas. A liofilização é uma técnica de secagem, que retira humidade contida nas amostras, através do congelamento da parte líquida e posterior sublimação do gelo (figura 12a). Seguidamente foram trituradas num móido, ficando com um diâmetro inferior a 0,5 mm (figura 12b, c). As amostras obtidas foram armazenadas em recipientes de vidro, devidamente identificados e protegidos da luz (figura 12d). Estão assim reunidas as condições para iniciar o processo de extração dos compostos.



Figura 12 - Processo de trituração: **a)** aspeto da alga após liofilização; **b)** trituração; **c)** aspeto da alga triturada; **d)** armazenamento.

2.3.2 - Pesagem e extração

De cada amostra moída, selvagem e aquacultura, foram pesadas 8 gramas. Estas foram colocadas num gobelé, para realização do processo sequencial de extração com solventes de diferentes polaridades: hexano, metanol e água. Todo o processo de extração foi realizado de forma a rentabilizar ao máximo todo o material, assim como solventes utilizados. É ainda de referir que todo o processo de extração foi aplicado igualmente às duas amostras em estudo.

2.3.2.1 - Extração com *n*-hexano

O *n*-hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) é um hidrocarboneto alcano. A sua adição vai provocar a extração sobretudo de compostos apolares tais como ésteres, éteres, hidrocarbonetos de terpenóides, esteróis, ácidos gordos, entre outros (Pinteus, 2011).

O processo inicia-se com a adição de *n*-hexano na porção de 1:20 (160 mL) ao gobelé contendo a alga triturada. Seguidamente, o gobelé é colocado numa placa de agitação durante 20 minutos, de modo a proporcionar a mistura e posterior extração dos compostos (figura 13a). Decorrido esse tempo, a amostra é filtrada a vácuo utilizando filtros de sílica em funil com porosidade G3 acoplados num balão kitasato. Ou seja, o conteúdo do gobelé é vertido para o filtro, em que sob a ação do vácuo, a parte líquida (solvente) passa para o kitasato e a sólida (amostra triturada) fica retida no filtro (figura 13b). O conteúdo do *kitasato* é transferido para um balão, devidamente identificado, e armazenado. A amostra retida no filtro, que devido ao vácuo fica seca, é facilmente recuperada novamente para o gobelé. Este processo é repetido até obter-se uma cor translúcida do solvente, isto é, na primeira adição obtém-se uma coloração verde forte mas com a adição sucessiva esta vai ficando esverdeada/amarela. Isto significa que o solvente já não consegue extrair mais compostos. A cor verde deve-se sobretudo à

presença de clorofilas, o que torna os pigmentos um bom indicador dos processos de extração.

Por fim, todo o volume da solução de *n*-hexano, que foi guardado ao longo do processo, é concentrado (figura 13c). A concentração é feita num evaporador rotativo, que sob vácuo e com ajuda do banho-maria a 40 °C, o solvente é evaporado da amostra e recuperado noutra balão. Isto permite reduzir a quantidade de solvente do nosso extrato, ficando com uma maior fração de compostos extraídos (figura 13d). A solução obtida é identificada e conservada num *falcon* a 4 °C, constituindo assim o nosso extrato de *n*-hexano (figura 13e).

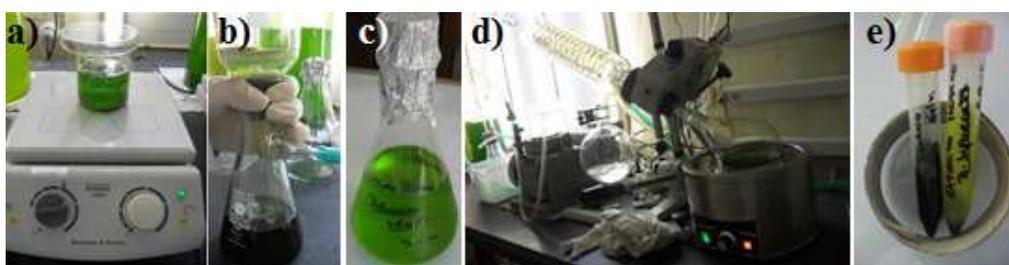


Figura 13 - Processo de extração com *n*-Hexano: a) agitação; b) filtração; c) solução obtida; d) evaporação do solvente; e) solução final.

2.3.2.2 - Extração com metanol

O metanol (CH₃OH), ou álcool metílico é um dos principais compostos do grupo orgânico dos álcoois. Na sua utilização, extraem-se os compostos como glicosídeos, taninos, alguns alcaloides, entre outros (Pinteus, 2011).

Utilizando a amostra recuperada da extração anterior, realiza-se o mesmo processo descrito anteriormente mas adicionando o solvente metanol. Isto é adiciona-se 160 mL de metanol ao gobelé contendo a amostra seca, agitação, filtração e armazenamento num balão identificado (figura 14a, b, c, d). Após realizar todas as extrações, até obter a cor translúcida do solvente, o volume resultante é também concentrado num evaporado rotativo, até obter cerca de 1/4 do volume inicial (figura 14e).

Devido à toxicidade do metanol e para que possa ser testado, procede-se à suspensão do extrato em água destilada. Este processo é realizado no evaporador rotativo, e consiste apenas na adição de água destilada na porção 1:1 ao volume obtido. Como o metanol é mais volátil este é o primeiro a evaporar, seguido da água. Normalmente, este processo é repetido cerca de duas vezes de forma a garantir que todo

o metanol é evaporado e retirado do extrato. No final, obtém-se o extrato metanólico suspenso em água que é identificado, colocado num balão e armazenado a 4 °C (figura 14f).

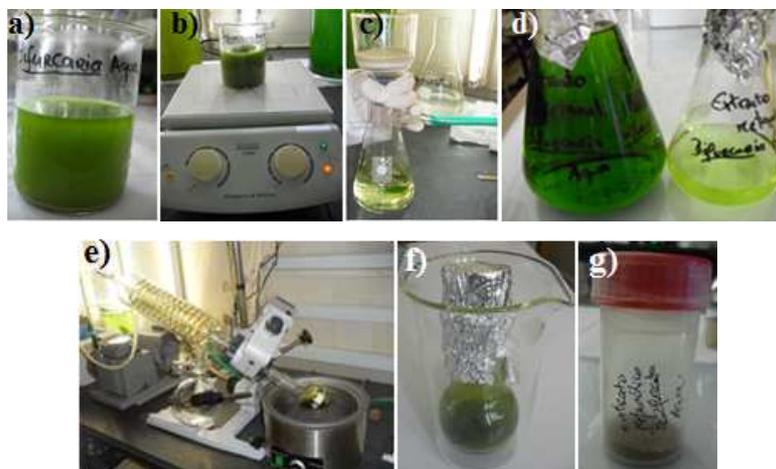


Figura 14 - Processo de extração com metanol: **a)** trituração com metanol; **b)** agitação; **c)** filtração; **d)** solução obtida; **e)** evaporação do solvente; **f)** solução final; **g)** extrato metanólico após liofilização.

2.3.2.3 - Extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos

A água é uma substância química composta de hidrogénio e oxigénio. É um solvente utilizado sobretudo para a extração de polissacarídeos e compostos polares das amostras.

Para esta extração são colocados 800 mL de água destilada (porção 1:100) num balão. Este é levado à placa de aquecimento para atingir os 100 °C. Após atingir esta temperatura, é colocada a amostra seca utilizada nas extrações anteriores, e deixa-se durante 2 horas a ferver (figura 15a). Após este tempo, com a solução ligeiramente quente, procede-se à filtração a vácuo no mesmo processo referido nas extrações anteriores (figura 15b, c). A amostra seca retida no filtro constitui a parte residual. A parte líquida, retida no *kitasato*, é concentrada no evaporador rotativo até obter cerca de 1/4 do volume (figura 15d). Segue-se a medição do volume da solução após a concentração e a adição de etanol a 96% na porção 1:1. Com a adição do etanol, verifica-se a formação de duas fases: uma suspensão de cor acastanhada (polissacarídeos) e a parte líquida (etanol e solução aquosa) (figura 15e). Com auxílio de uma espátula retira-se os polissacarídeos para um gobelé. A estes é adicionado etanol a 96%, até ficarem imersos, e conservam-se durante 24 horas a 4 °C. Após esse período,

o etanol é descartado e os polissacarídeos são colocados numa caixa de *Petri* a secar ao ar livre (figura 15f). Quanto à parte líquida primeiramente é filtrada sob vácuo com os mesmos filtros, de modo a aproveitar os polissacarídeos que tenham ficado na solução. Seguidamente a solução líquida (solução aquosa + etanol) é levada ao evaporador rotativo de forma a evaporar todo o etanol adicionado, assim como concentrar num volume reduzido o nosso extrato. No final do processo, obtemos o sobrenadante do extrato aquoso que é identificado, colocado num *falcon* e armazenado a 4 °C (figura 15g).



Figura 15 - Processo de extração aquosa e precipitação dos polissacarídeos: **a)** fervura; **b)** filtração; **c)** solução obtida; **d)** evaporação do solvente; **e)** precipitação dos polissacarídeos; **f)** secagem dos polissacarídeos; **g)** solução aquosa; **h)** extrato aquoso liofilizado.

Os extratos que estão suspensos em água (extrato metanólico e sobrenadante do extrato aquoso) são liofilizados, pesados e armazenados em recipientes de plástico. Para uma melhor conservação, estes são vedados com *parafilme* e mantidos num exsiccador para evitar a sua reidratação (figura 14g, 15g). Posteriormente procede-se à sua utilização para os ensaios. Quanto ao extrato *n*-hexano, devido às suas propriedades, apenas é calculado o seu rendimento na extração. Num total, cada amostra (selvagem e aquacultura) é composta por três extratos.

2.4 - Avaliação do teor de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante dos extratos

Antes da realização das metodologias, ocorreu a pesagem dos extratos e sua dissolução. Neste foram testados os extratos metanólicos e aquosos, tanto da amostra de aquacultura como da selvagem. Para os extratos aquosos foram utilizadas 4 mg/mL e para os extratos metanólicos 5 mg/mL. Estes valores foram estabelecidos após a tentativa com diferentes concentrações. Seguidamente, os extratos foram dissolvidos nos solventes respectivos, isto é, os aquosos em 1 mL de água destilada e os metanólicos em 1 mL de metanol. Estes são agitados e colocados nos ultrassons para que ocorra toda a dissolução, de modo a não influenciar os resultados.

2.4.1 - Quantificação Total de Polifenóis – Teste Folin-Ciocalteu

A Quantidade Total de Polifenóis foi avaliada através do método de *Folin-Ciocalteu*. Este método consiste, em adicionar num tubo 20 µl da amostra, 1580 µl de água destilada e 100 µl de reagente Folin (FlukaBiochemika, Sigma Aldrich). Após 2 minutos, adicionou-se 300µl de carbonato de sódio, Na₂CO₃ a 20% (m/v). A reação deve ser devidamente agitada, sendo depois incubada em banho-maria a 40 °C durante 30 minutos (figura 16a,b). Decorrida essa duração, mede-se a absorvância a um comprimento de onda de 765 nm num espectrofotómetro (DrLange, XION,500) (figura 16c, d). É de referir que este método é sempre executado em duplicado para todas as amostras, bem como se deve realizar um branco, isto é, um tubo que contem todos os componentes exceto a amostra. Este é utilizado para calibração do espectrofotómetro. O ácido gálico foi usado como padrão para a curva de calibração.



Figura 16 - Método de *Folin-Ciocalteu*: **a)** reagentes adicionados; **b)** banho-maria; **c)** cores obtidas pela reação; **d)** leitura da absorvância no espectrofotómetro.

2.4.2 - Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH[•]

A atividade sequestradora de radicais livres foi avaliada através do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH[•]) e determinada pela adaptação do método Pereira *et al.* (2013), com algumas modificações.

Primeiramente começa-se por preparar o reagente DPPH[•]. Para cada ensaio são pesados 3 mg do reagente e adicionado 100 mL de metanol. Devido à sua fácil degradação em contacto com a luz, este deve ser armazenado num local escuro e protegido ao máximo.

O método consiste na utilização de seis diluições: 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 e 0.25 mg/mL. Assim a cada tubo foi adicionado 0 µL (branco), 10 µL, 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL e 100 µL de extrato, respetivamente. Seguidamente completa-se os tubos para um volume total de 100µL com água destilada. Assim para o primeiro tudo era adicionado 100 µL, o segundo 90 µL e assim sucessivamente. Posteriormente é adicionado a todos os tubos 1,9 mL do reagente de DPPH[•], completando assim um volume total de 2mL (figura 17a). Após a adição de todos os componentes, estes são agitados no *vórtex* de modo a homogeneizar toda a reação e mantidos num lugar escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. Decorrido esse período, procede-se à leitura da absorvância num espectrofotómetro (DrLange, XION,500, Alemanha). Esta leitura é feita para um comprimento de onda de 517 nm e o aparelho é calibrado com metanol. Todo o ensaio é realizado em duplicado e a leitura com o mínimo de luz possível para os resultados não serem afetados pela degradação do DPPH[•] (figura 17b). O controlo foi efetuado com a adição de todos os reagentes, exceto o extrato.

Registados os resultados, determinou-se a percentagem de inibição para cada concentração através da fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_c - Abs_E}{Abs_c} \times 100$$

Abs_c: Absorvância do controlo

Abs_E: Absorvância do extrato após 30 min no escuro

Com os resultados da percentagem de inibição, realiza-se a média para cada diluição. Posteriormente traça-se a reta de calibração que permite a obtenção da equação. Esta equação é aplicada no cálculo do IC₅₀ através da fórmula:

$$IC_{50} = ((50 - y) / x),$$

em que x e y são valores retirados das respectivas retas. Os resultados foram expressos em % inibição versus concentração extrato e no valor de IC_{50} (mg/ml), que é definido como a concentração de extrato capaz de inibir 50 % do radical DPPH[•].

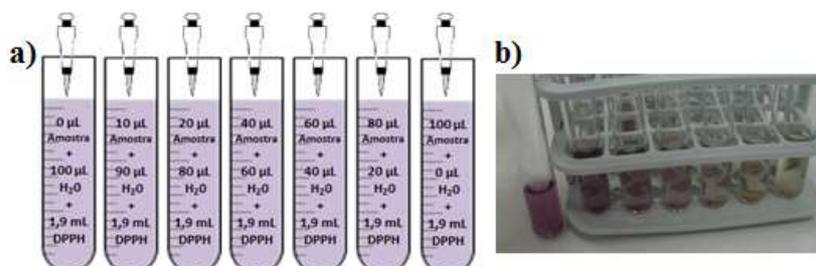


Figura 17 - Método de DPPH[•]: a) reagentes adicionados; b) cores obtidas pela reação.

2.5 - Ensaios antifúngicos

A atividade antifúngica dos extratos obtidos a partir de *B. bifurcata* foi avaliada através do método de macrodiluição, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standard Institute* referente ao protocolo M38-A2 (CLSI, 2008) para fungos filamentosos. Este ensaio compreende a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC). A primeira concentração refere-se às concentrações mínimas de extrato de alga em meio de cultura que inibem o crescimento fungos, enquanto na segunda é a concentração mínima que mata. Todo o ensaio deve ser realizado com o máximo de esterilidade possível para evitar contaminações.

2.5.1 - Preparação dos extratos e diluições

Os extratos utilizados para este ensaio foram os metanólicos e aquosos, tanto da amostra de aquacultura como da selvagem, que sofreram posteriormente um processo de liofilização. Para todos os extratos utilizou-se uma concentração de 8 mg/mL (figura 18a). Os extratos metanólicos foram dissolvidos em etanol a 40% (etanol absoluto mais água desionizada estéril nas proporções corretas), ao passo que os extratos aquosos foram dissolvidos em água esterilizada (desionizada). Após a adição dos solventes, estes foram agitados no *vórtex* e colocados nos ultrassons de modo a uniformizar bem os extratos (figura 18b).

Para cada extrato foram preparadas cinco diluições diferentes (8 mg/mL, 4, 2, 1 e 0.5 mg/mL). Estas são preparadas a partir do extrato 8 mg/mL. Neste processo é muito importante a agitação no *vórtex*, de modo a homogeneizar bem as amostras. No final, como só se vai retirar 100 µL de cada diluição num volume final de 1mL para cada tubo de ensaio, fica-se com concentrações de 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 e 0.05 mg/mL.



Figura 18 - Preparação dos extratos para o ensaio antifúngico: **a)** pesagem; **b)** diluição do extrato no solvente.

2.5.2 - Estirpes de fungos

A atividade antifúngica dos extratos obtidos a partir da macroalga *B. bifurcata* foi testada contra sete estirpes de fungos filamentosos (dermatófitos): três estirpes clínicas de dermatófitos isolados de unhas e pele (*Epidermophyton floccosum* FF9, *Trichophyton mentagrophytes* FF7, e *Microsporum canis* FF1) e quatro estirpes tipo da CECT - Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (*Trichophyton rubrum* CECT 2794, *Microsporum gypseum* CECT 2908, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* CECT 2958, e *Trichophyton verrucosum* CECT 2992). Os fungos isolados foram identificados por métodos *standard* de microbiologia e armazenados num meio de *Sabouraud Dextrose Broth* com glicerol a -70 °C. Antes do ensaio de suscetibilidade antifúngica, cada isolado de fungo foi inoculado em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) para garantir características de crescimento ótimo e pureza.

2.5.3 - Meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e soro fisiológico

O meio de cultura utilizado para estes ensaios é o RPMI 1640 (Biochrom) (sem bicarbonato, com glutamina e indicador de pH). É um meio muito utilizado neste tipo de ensaio devido aos seus constituintes serem sintéticos, bem como não antagonizarem os agentes antifúngicos a testar. Este meio é utilizado numa concentração de 10,4 g/L e tamponizado com MOPS (ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico) na concentração final de 0,165 mol/L. Estes componentes são diluídos em água destilada e o pH deve ser ajustado a 7 com NaOH 1M. Seguidamente este é esterilizado por filtração. Deste meio é importante retirar duas pequenas amostras para despiste de possíveis contaminações. Por fim, é conservado a 4 °C num recipiente bem selado. Após 48 horas este pode ser utilizado, verificando sempre se as amostras possuem alguma contaminação. É imprescindível que o meio esteja à temperatura ambiente no momento da utilização.

O soro fisiológico a 0,9% serve para proceder à inoculação dos fungos. Procedese apenas à junção de 0,9 g de cloreto de sódio em 100mL de água destilada. Depois este é agitado para proceder à sua dissolução e distribuído 10mL por cada tubo de ensaio. Por fim, procede-se à sua autoclavagem.

2.5.4 - Preparação do inóculo

Para as suspensões celulares foram usadas culturas recentes de cada estirpe, repicadas para *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Estas foram recolhidas através da adição de soro fisiológico, pérolas de vidro e agitação no *vórtex*, com o intuito de libertar os esporos e fragmentar o micélio. Depois, com ajuda de uma pipeta, o conteúdo do fungo foi transferido para um tubo, devidamente identificado, com soro fisiológico. Por fim, o inóculo foi acertado a 1 unidade de *MacFarland* através da comparação com um padrão de turvação. Para cada fungo, o inóculo é diluído 500 vezes em RPMI.

2.5.5 - Realização do ensaio

Cada ensaio comporta um controlo negativo do extrato. Este tem como objetivo verificar se o extrato que estamos a testar possui alguma contaminação que poderia influenciar toda a experiência. Este é composto por cinco tubos, correspondente ao número de diluições utilizadas. A cada um dos tubos é adicionado 100 µL da diluição correspondente e 900 µL de meio RPMI não inoculado (figura 19).



Figura 19 - Esquema da composição do controlo negativo do extrato.

Para cada fungo, foram preparados em duplicado um controlo negativo (despiste de contaminação do meio RPMI não inoculado), um controlo positivo (verificação do crescimento do fungo) e as diferentes diluições dos extratos (0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05 mg/mL).

Assim no controlo negativo é adicionada 900 µL de meio RPMI não inoculado. O controlo positivo é composto por 100 µL de etanol a 40% e 900 µL de meio RPMI inoculado com o fungo respetivo. Aos 100 µL das diferentes diluições é adicionado 900 µL de meio RPMI inoculado com o fungo a testar (figura 20). O ensaio para cada fungo é realizado em duplicado e em condições assépticas.

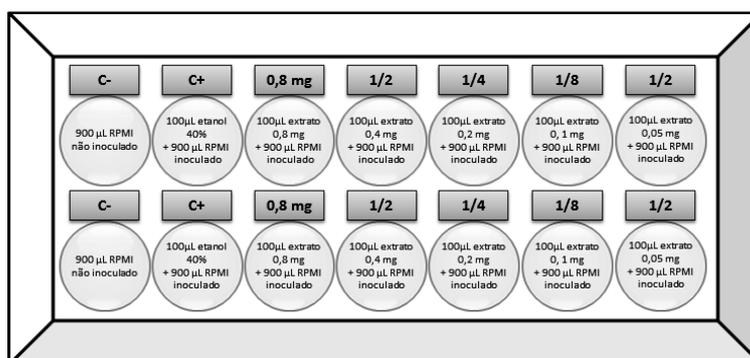


Figura 20 - Ensaio antifúngico - composição do ensaio para cada fungo.

Após a realização de todo o ensaio, os tubos são agitados, cobertos com papel de alumínio e incubados numa estufa a 30 °C durante 7 dias (figura 21a).

Decorrido esse período, procede-se à leitura dos MIC através da observação visual da inibição ou crescimento do fungo por comparação com os tubos controlo para cada estripe. Aqueles tubos onde se observa a inibição do crescimento prosseguem para determinação do MLC. Para isso, são retirados de cada tubo com resultado negativo 20 µL e plaqueado em caixa de *Petri* com SDA. Cada caixa de *Petri* corresponde a um fungo, sendo identificada com o nome do fungo, tipo de extrato e data. No entanto, se

houver mais do que uma concentração negativa para o mesmo fungo, ocorre a divisão equivalente da caixa na mesma quantidade de resultados negativos (figura 21b, c).

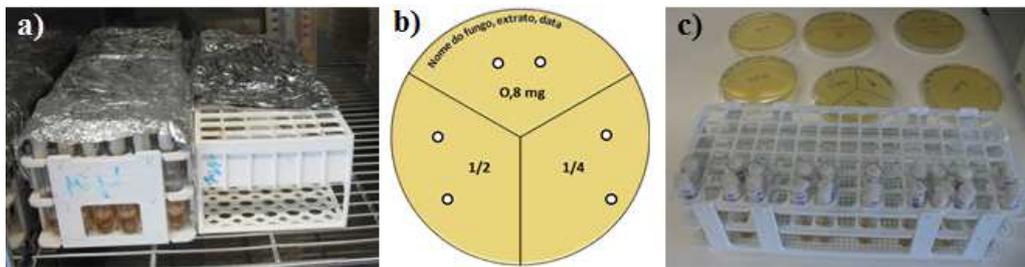


Figura 21 - Ensaio antifúngico: **a)** incubação; **b)** esquema de identificação das caixas com *Sabouraud Dextrose Agar*; **c)** passagem dos extratos para determinação dos MLC.

As caixas de *Petri* são incubadas na estufa a 30°C durante 7 dias. Após esse tempo, procede-se à leitura dos resultados observando a presença ou ausência de colônia de fungos nas mesmas.

Para avaliar a sensibilidade das estirpes fúngicas testadas, foi usado como antifúngico de referência, o fluconazol (Pfizer).

É de referir que todos os ensaios foram repetidos até à obtenção de três resultados concordantes.

2.6 – Detecção de Compostos Fenólicos

2.6.1 - Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Neste trabalho a análise realizou-se num aparelho cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) GILSON, equipado com duas bombas modelo 305 e 306; misturador modelo 811B; módulo manométrico modelo 805 e um injetor automático GILSON 234, acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA) GILSON, modelo 170 e a uma estação de controle e tratamento de dados Unipoint System (*Unipoint*® 2.10) constituído por uma interface 506 C/Interface system module da GILSON. Utilizou-se uma coluna de fase reversa, RP18, *Spherisorb Waters*® ODS-2 (4,6× 250 mm e com 5 µm de diâmetro de partículas). Trata-se de uma fase estacionária com características apolares o que leva os compostos mais polares a eluírem da coluna mais rapidamente. A fase móvel consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% e metanol, em gradiente descontínuo e a um fluxo de 1 mL/min. O metanol foi usado num gradiente de concentração de 5-15% nos primeiros 10 minutos, 15-30% dos 10 aos 30 minutos, 30-50% dos 30 aos 50

minutos, 50-100% dos 50 aos 60 minutos, seguindo-se uma eluição isocrática durante 10 minutos.

Os perfis cromatográficos foram registados a 280 e 320 nm.

Os liofilizados das amostras foram solubilizados em metanol a 5%, e as soluções resultantes foram microfiltradas através de um filtro de 0,45 μm de poro, desgaseificadas e, por fim, injetadas (100 μL) (figura 22a, b, c, d).

No final, a composição dos extratos algais foi analisada pela interpretação dos resultados dos cromatogramas, nomeadamente através do tempo de retenção dos diversos compostos detetados, perfil espectral no ultravioleta/visível e máximos de absorção, e pelas áreas dos picos.

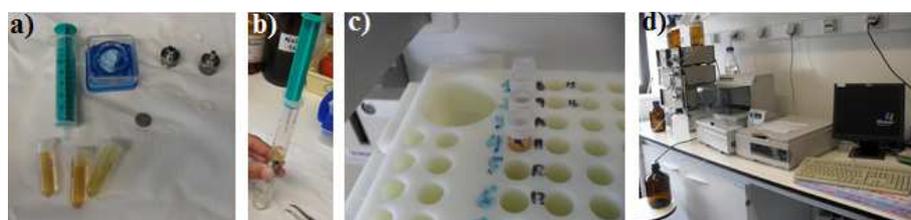


Figura 22 - HPLC: **a)** solução dos extratos para a microfiltração; **b)** microfiltração; **c)** colocação das soluções no amostrador automático; **d)** sistema de HPLC.

2.6.2 - Cromatografia em camada fina (TLC)

As condições técnicas para a realização da TLC foram de acordo com método Shibata *et al.* (2006), com algumas modificações. Recorreu-se a placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck), e a uma fase móvel constituída por uma mistura de clorofórmio – metanol - água - ácido acético (65:25:4:3, v/v).

Os liofilizados das amostras foram solubilizados em metanol nas concentrações de 3 mg/mL, tendo-se usado o floroglucinol, como padrão, na concentração de 1 mg/mL (figura 23a). Foram aplicados 20 μL de cada amostra, a 1 cm da base da placa. Deixou-se correr o eluente numa câmara saturada do mesmo, ao abrigo da luz, e a uma altura de 7.8 cm (figura 23b, c). Retirou-se a placa da câmara e deixou-se evaporar o eluente.

Observaram-se as placas à luz visível e, seguidamente submeteram-se as placas a ação dos reagentes de revelação, observando-se os resultados à luz visível e ultravioleta. Enquanto para uma placa, a deteção foi realizada com o reagente de *Folin-Ciocalteu* (Merck), noutra placa a deteção foi efetuada com vanilina-HCl (primeiramente pulverizada com vanilina a 1% em etanol absoluto e posteriormente

com HCl 5M) (figura 23d). Observaram-se as placas à luz visível e, de seguida, com o auxílio de luz ultravioleta a 366 nm. Este é o comprimento de onda ideal para evidenciar a fluorescência dos fenóis dado que causa a excitação dos mesmos.



Figura 23 - Técnica de TLC: **a)** solubilização das amostras e padrão; **b)** aplicação das amostras; **c)** desenvolvimento cromatográfico numa câmara saturada pelo eluente; **d)** pulverização das placas com os reveladores.



3. Resultados

3. Resultados

3.1 - Aquacultura

3.1.1 - Aquacultura em laboratório

Neste trabalho, a nível da experiência de aquacultura em laboratório os resultados não foram positivos, não se alcançando o crescimento. Nas duas tentativas realizadas, as algas ao longo das semanas iam reduzindo o peso até chegar a um aspeto decomposto (figura 24a, b e c).

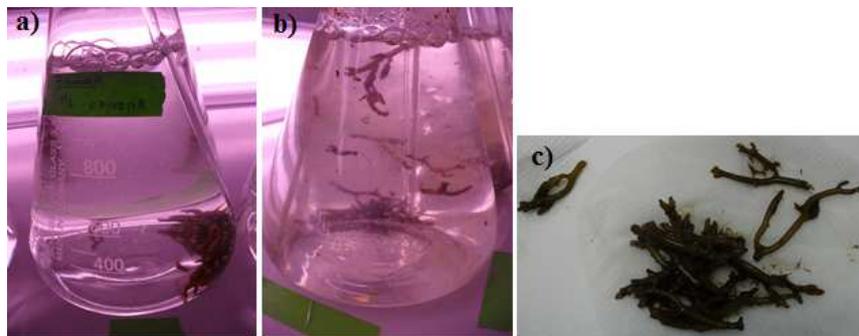


Figura 24 - Aquacultura em sistema laboratorial de *Bifurcaria bifurcata*:
 a) deposição no fundo; b) e c) decomposição devido à falta de movimento.

3.1.2 - Percentagem de peso seco

O cálculo da percentagem de peso seco é um parâmetro importante, uma vez que nos vai dar uma noção da percentagem de água para esta espécie. Este é calculado através:

$$\% \text{ peso seco} = \text{Peso seco (g)} / \text{Peso fresco (g)}$$

Os resultados obtidos encontram-se demonstrados na tabela (II).

Tabela II – Percentagem de peso seco para *Bifurcaria bifurcata*
 (média \pm SD, n = 4).

Réplicas (n)	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4
Peso fresco (g)	11,5	10,5	10	11
Peso seco (g)	1,66	1,58	1,43	1,86
% peso seco	0,14	0,15	0,14	0,17
Média % peso seco	0,15 \pm 0,01			
% água	0,85 \pm 0,01			

Verifica-se assim que esta espécie algal na sua composição apresenta uma grande quantidade de água (85%). Este dado além de nos dar informação sobre a espécie em questão, foi utilizado no cálculo da taxa de crescimento (RGR).

3.1.3 - Aquacultura no exterior

Para a experiência de aquacultura no exterior, os resultados foram mais positivos. A utilização de tanques de formato cónico permitiu a movimentação desta espécie no sistema, evitando a sua deposição no fundo. Verificou-se assim o seu crescimento ao longo das semanas, refletido pela coloração clara dos ápices (figura 25).



Figura 25 - Observação do clareamento dos ápices, em relação ao talo, resultante do crescimento vegetativo de *Bifurcaria bifurcata*.

3.1.3.1 - Parâmetros Ambientais

Para as experiências de aquacultura exterior, os estudos foram desenvolvidos sobretudo em duas estações (outono/inverno e primavera), bem como diferentes densidades de cultivo. Com isto pretende-se tentar entender qual o período mais favorável para o crescimento desta espécie, assim como verificar a influência da densidade sobre o crescimento.

Na estação de outono/inverno verificaram-se oscilações semanais de temperatura entre os 8°C e os 20°C. Em relação à luz, apesar de ocorrer sempre um corte em relação à que existia naturalmente devido à presença de uma cobertura de proteção, oscilou ente valores inferiores a 10 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ até valores próximos de 1000 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. No caso da estação primaveril, os valores registados foram acima aos das primeiras estações. A temperatura oscilou entre os 14°C e os 21°C e verificou-se uma maior incidência luminosa (entre 500 ate acima de 2000 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e por um maior período de tempo.

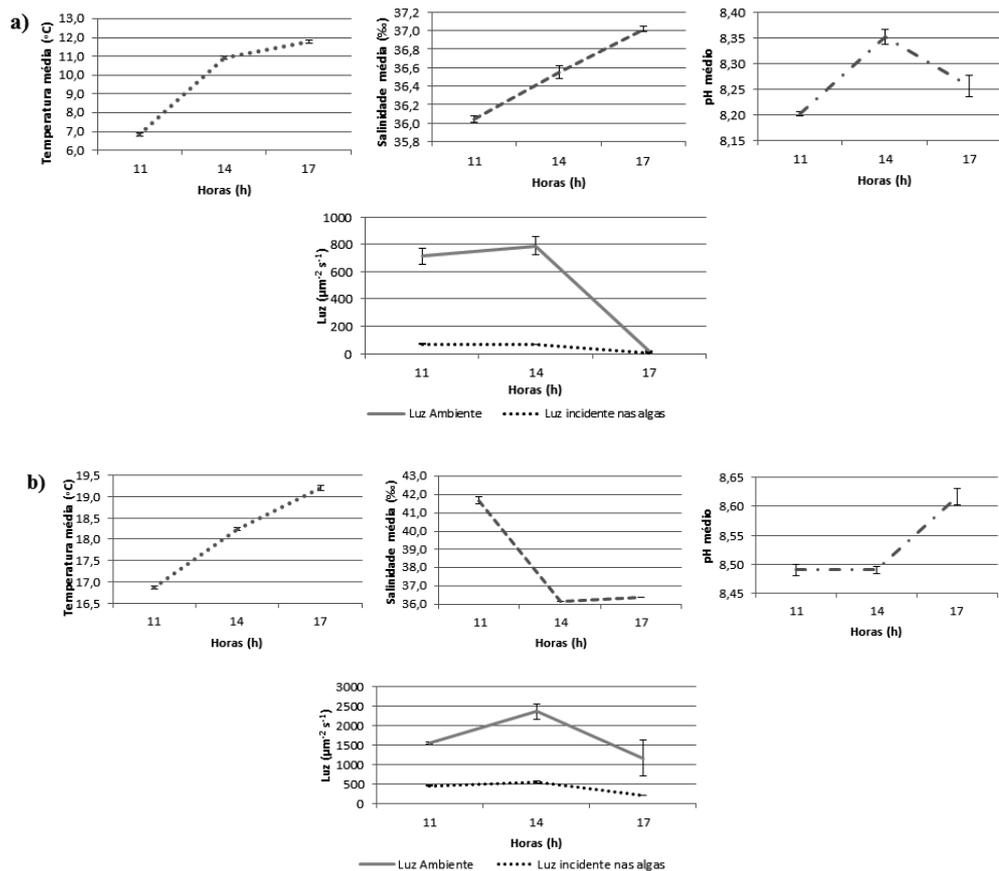


Figura 26 - Exemplo da variação diária (média de 1 semana) dos fatores ambientais nas duas sazonalidades: **a)** período de inverno (2^a experiência, 3^a semana); **b)** período primaveril (3^a experiência, 3^a semana).

Através da figura 26 é possível observar as diferenças de sazonalidade, tanto a nível de resultados, bem com na representação gráfica dos fatores ambientais. Valores de temperatura extrema foram registados em Dezembro (7 °C). É de frisar que todos os fatores monitorizados eram influenciados pelas condições meteorológicas que se fazia sentir a cada dia. No entanto todos eles têm em comum uma variação ao longo do dia.

As médias para cada período experimental dos parâmetros monitorizado encontram-se expostas na tabela III.

Tabela III - Fatores ambientais monitorizados para cada período experimental (média ± erro padrão).

	Temperatura (°C)	Salinidade (‰)	pH	Luz (µmol ⁻² s ⁻¹)
Experiência 1	16,60 ± 0,98	32,25 ± 1,72	8,32 ± 0,03	54,12 ± 6,00
Experiência 2	11,65 ± 0,44	37,09 ± 0,46	8,30 ± 0,01	46,32 ± 2,67
Experiência 3	18,08 ± 0,55	38,00 ± 0,31	8,54 ± 0,04	360,03 ± 20,55

Através da tabela III podemos verificar que fatores como a temperatura e a luz foram os que refletiram maiores diferenças entre as três experiências. Esta variação retrata sobretudo a diferenças de sazonalidade, como esperado para a zona norte, existente entre cada experiência. As temperaturas médias oscilaram entre os $11,65 \pm 0,44$ °C e os $18,08 \pm 0,55$ °C.

Quanto à quantidade de luz média que chegava à superfície dos tanques, esta é semelhante nas duas primeiras experiências, registando um valor máximo no período primaveril ($360 \pm 20,55$ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De facto, foi notória a diferença de precipitação bem como de fotoperíodo entre o período outono/inverno e o primaveril, refletido nas médias obtidas de intensidade luminosa (luz).

Em relação aos outros parâmetros (salinidade e pH), entre cada experiência não se verificaram diferenças muito discrepantes. Porém foi na experiência 3 que se obtiveram valores máximos de ambos os parâmetros.

3.1.3.2 - RGR e produtividade

Além dos parâmetros monitorizados, ocorreu a medição da taxa de crescimento relativo (RGR) e produtividade. De facto, *B. bifurcata* foi capaz de crescer no sistema IMTA, ao longo do decorrer das diferentes experiências e sob as condições monitorizadas referidas anteriormente. Ainda assim, foi verificado que esta espécie necessita de um período de aclimação (primeira semana) onde era verificado um pequeno decréscimo de peso (experiência 2 e 3).

A nível do RGR a variação semanal encontra-se representada na figura 27, onde é possível observar que ambas as experiências tiveram uma variação semanal. Foi na experiência 3 que se obteve o maior crescimento médio ($1,9 \pm 0,43$ % dia^{-1}). Situação inversa verificou-se na experiência 1, com a obtenção do menor RGR médio ($0,25 \pm 0,24$ % dia^{-1}). De facto, nesta experiência é observável uma grande variabilidade dos dados na primeira semana, bem como um decréscimo brusco de crescimento da segunda para a terceira semana. Este acontecimento é explicado pela aclimação da alga e entrada de água doce no sistema de cultivo. Por fim, a experiência 2 teve um RGR médio ($0,42 \pm 0,033$ % dia^{-1}) semelhante à experiência 1, no entanto verifica-se que após a primeira semana ocorre um crescimento linear.

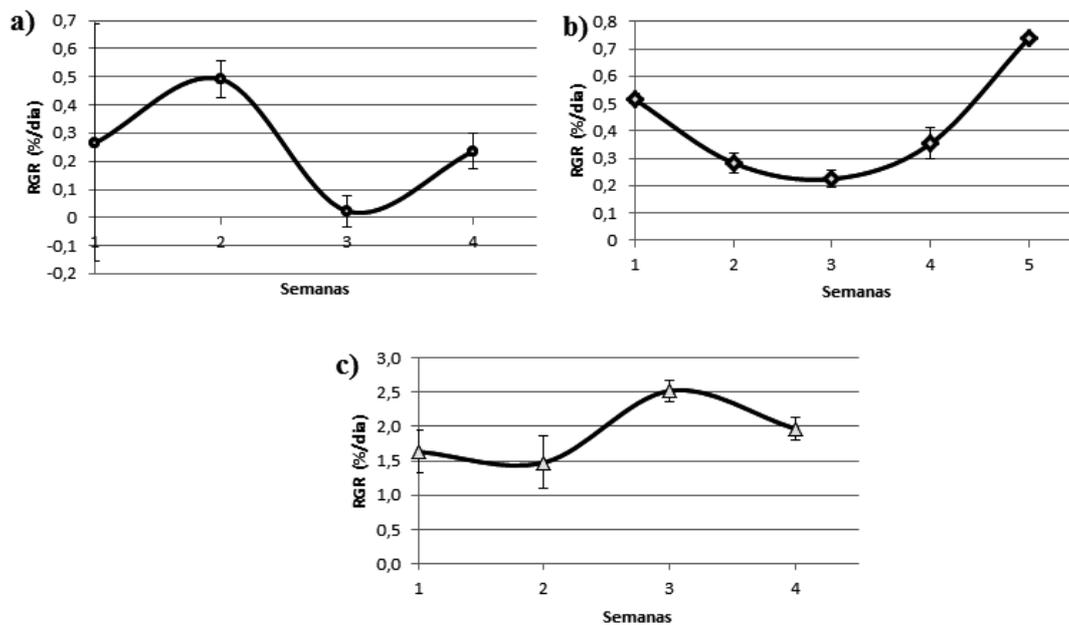


Figura 27 - Média da taxa de crescimento relativo (RGR) semanal nas diferentes experiências: **a)** experiência 1; **b)** experiência 2; **c)** experiência 3.

A nível da produtividade, esta foi concordante com os resultados do RGR e obtendo-se também uma variação semanal. Foi na experiência 3 que se obteve uma maior produtividade média ($33,26 \pm 7,26$ %/dia), no entanto foi a experiência 2 que registou uma menor produtividade média ($0,423 \pm 0,033$ g (dw) m⁻² dia⁻¹). Esta situação pode ser explicada pelas diferentes densidades que compõem as duas primeiras experiências.

Um estudo complementar às experiências realizadas é o estudo da influência de fontes de variação, que compõem cada experiência, sobre o RGR e produtividade. Através do desenho experimental (tabela I) conseguimos identificar duas fontes de variação: a densidade de cultivo e a sazonalidade. A primeira variação (DC) é composta pela experiência 1 e 2, visto que ambas foram realizadas consecutivamente e tem densidades diferentes. No caso da segunda variação, esta é composta pela experiência 2 e 3, uma vez que foram realizadas em estações do ano diferentes (outono/inverno e primavera, respetivamente) mas sob as mesmas condições de cultivo. A confrontação dos parâmetros medidos com as fontes de variação está representada na figura 28.

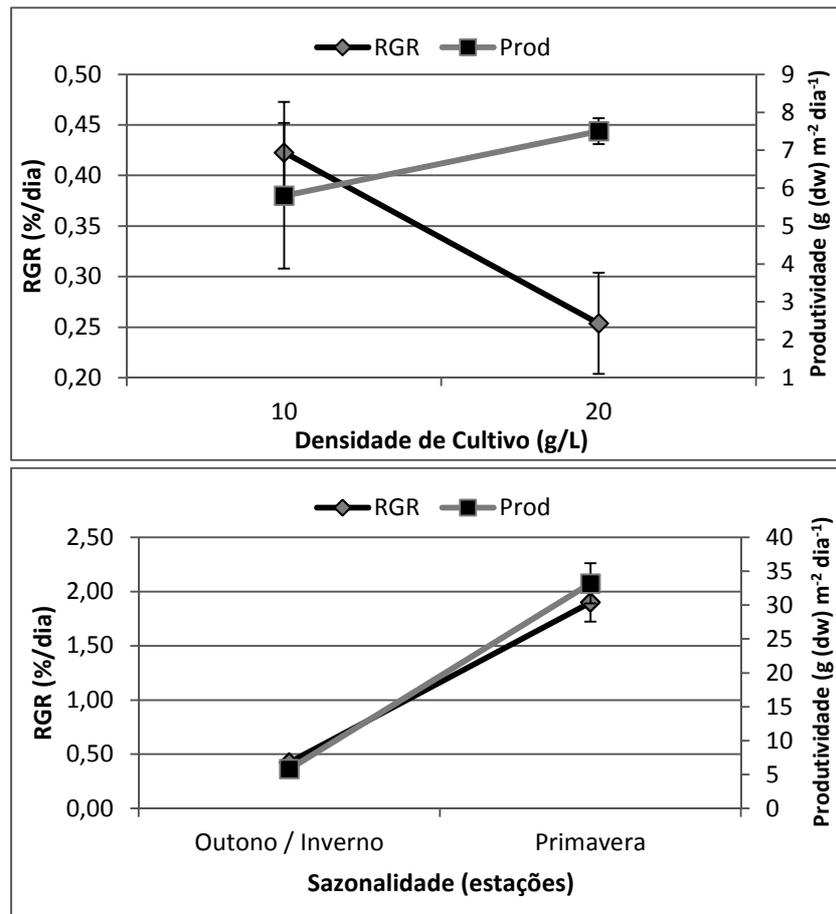


Figura 28 - Taxa de crescimento relativo e produtividade (média \pm erro padrão) de *Bifurcaria bifurcata* cultivada sob diferentes densidades (cima) e sazonalidade (baixo).

Pela análise da figura 28 é possível verificar que ambas as fontes de variação influenciam os parâmetros medidos. A nível da densidade de cultivo verificou-se um aumento do RGR, mas uma diminuição da produtividade, com o aumento da produtividade. Neste gráfico é notável o intersecção dos parâmetros medidos. Com isto, permite-nos dizer que a densidade ótima se encontra, possivelmente, mais perto da densidade de 10 g/L. A nível da sazonalidade verifica-se apenas um aumento de ambos os parâmetros medidos da estação de outono/inverno para a primavera.

Apesar de se verificar que as fontes de variação influenciam os parâmetros medidos, é necessário verificar se essas diferenças são estaticamente significativas (ANOVA). Os resultados encontram-se expostos na tabela IV.

Tabela IV - Análise de variância (ANOVA) para testar o efeito da densidade de cultivo (DC) e sazonalidade (Sazo) sobre a taxa de crescimento relativo (RGR) e produtividade (prod).

Df – graus de liberdade; MS - Mean squared; F- teste estatístico F; p - significância do teste

Fontes de Variação	RGR				Prod			
	df	MS	F	P	df	MS	F	P
DC	1	0,045	7,90	0,031	1	0,060	4,15	0,088
Teste Cochran's	C= 0,81;				C= 0,91			
Transformação	Não				Log10			
Sazo	1	0,966	249,86	0,000004	1	1,34	325,86	0,000002
Teste Cochran's	C= 0,66				C=0,68			
Transformação	Log10				Log10			

Antes de aplicar a análise estatística é necessário averiguar os requisitos de homogeneidade dos dados. Para isso foi utilizado o Teste Cochran's, em que a sua significância aponta para uma heterogeneidade dos dados. Uma forma de contornar a obtenção de uma distribuição heterogênea é a transformação dos dados, requisito necessário para alguns dados neste estudo. Através da tabela IV é possível verificar que na densidade de cultivo existem diferenças estatisticamente significativas no RGR, ao passo que a sazonalidade tem diferenças significativas tanto no RGR como na produtividade ($p < 0,05$). Podemos assim dizer que a densidade de cultivo e a sazonalidade são importantes para o cultivo desta espécie algal.

3.2 - Rendimento dos extratos

O rendimento é um cálculo efetuado que permite ter uma ideia da quantidade de produto obtido pela extração com solventes. Neste caso é baseado no peso obtido após a liofilização dos extratos e calculado através da fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{peso do extrato (g)} / \text{peso da amostra para extração (g)}) * 100$$

É de relembrar que cada amostra, selvagem e aquosa, passou por extrações com hexano, metanol e água, e precipitação dos polissacarídeos. Os extratos metanólicos e aquosos por serem suspensos em água foram liofilizados, e conseqüentemente pesados. Os polissacarídeos também foram pesados, uma vez que foram secos. Já os extratos de hexano devido às suas características não foram liofilizados. Assim para obter o peso, estes foram ressuspensos em pequenas quantidades de hexano e transferidos para

recipientes desidratados e tarados. Seguidamente, os extratos foram secos com fluxo de azoto e numa estufa sob vácuo ($T=35^{\circ}\text{C}$ e $P= 200\text{mb}$). O processo é repetido até obter peso constante. No entanto é de referir que para a espécie *B. bifurcata*, apesar do peso constante obtido, este extrato não assumiu uma consistência seca possivelmente devido a grande quantidade de compostos lipofílicos. Os resultados estão representados na tabela V.

Tabela V – Rendimentos dos extratos algais e polissacarídeos de *Bifurcaria bifurcata*.

	Amostras	Peso da amostra (g)	Peso do extrato (g)	Rendimento (%)
Extrato Hexano	Aquacultura	8	0,351	4,387
	Selvagem	8	0,361	4,514
Extrato Metanólico	Aquacultura	8	1,533	19,168
	Selvagem	8	1,334	16,671
Extrato Aquoso	Aquacultura	8	0,864	10,805
	Selvagem	8	1,125	14,067
Polissacarídeos	Aquacultura	8	1,880	23,500
	Selvagem	8	2,10	26,250

Através da tabela V podemos verificar que existe alguma discrepância das amostras no rendimento dos extratos. É nos polissacarídeos que se verifica rendimentos mais altos, enquanto os extrato de hexano possuem menor rendimento. A nível do extrato de hexano, entre as amostras não se verifica grandes diferenças no rendimento. Em relação aos outros extratos verifica-se diferenças entre as amostras, apesar destas não serem muito divergente.

Num primeiro impacto, observa-se que os rendimentos obtidos são baixos. No entanto é de relembrar que foram apenas utilizadas 8 g de alga moída, com o objetivo de obter quantidades suficientes para realização dos ensaios. Apesar de todos os cuidados para obter o máximo de rentabilidade, ao longo do processo ocorre sempre pequenas perdas de material.

3.3 - Avaliação do teor de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante dos extratos

3.3.1 - Quantificação da quantidade total de polifenóis

A quantificação total de polifenóis dos extratos metanólicos e aquosos, das amostras de aquacultura e selvagem, foi realizada através do método de *Folin-Ciocalteu*, e os resultados expressos em microgramas de equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato ($\mu\text{g EAG/mg}$), encontram-se representados na Tabela VI.

Tabela VI - Conteúdo fenólico total dos extratos algais de *Bifurcaria bifurcata* (média \pm SD; n=4) expresso em $\mu\text{g EAG/mg}$ de extrato.

Extrato	Amostra	Fenóis totais ($\mu\text{g EAG/mg}$)
Metanólico	Aquacultura	77,90 \pm 3,00
	Selvagem	52,99 \pm 2,02
Aquoso	Aquacultura	86,73 \pm 2,28
	Selvagem	95,27 \pm 2,61

Em relação aos extratos obtidos com metanol, verificou-se que a quantidade de fenóis totais era mais elevada na amostra proveniente da aquacultura (77,90 \pm 2,99 $\mu\text{g EAG/mg}$). Já no extrato aquosos é o contrário, isto é, o extrato aquoso da amostra de alga selvagem possui uma maior quantidade de polifenóis (95,27 \pm 2,61 $\mu\text{g EAG/mg}$) em relação ao da amostra da alga de aquacultura (86,73 \pm 2,28 $\mu\text{g EAG/mg}$). No total, a quantidade de compostos fenólicos extraídos pelos dois solventes (metanol e água) foi de 148,70 $\mu\text{g EAG/mg}$ para a amostra selvagem, e de 164,6 $\mu\text{g EAG/mg}$ para a amostra de aquacultura (figura 29).

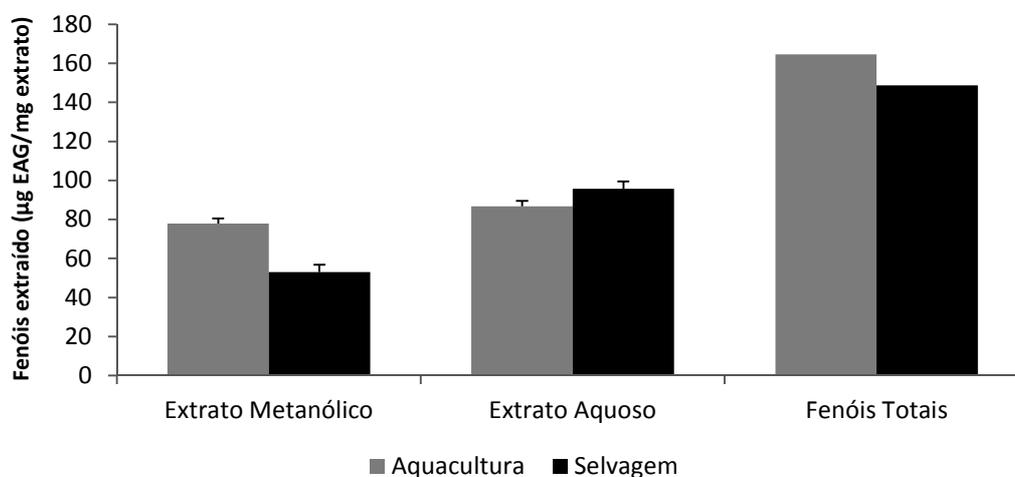


Figura 29 - Conteúdo de polifenóis totais nos extratos de metanólicos e aquosos das amostras selvagem e de aquacultura de *Bifurcaria bifurcata*.

3.3.2 - Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos

A capacidade antioxidante da alga em estudo foi avaliada através do método DDPH[•]. O radical DDPH[•] é um radical relativamente estável e o ensaio é baseado na medição da capacidade de eliminação dos antioxidantes. As suas características permitem o seu uso em ensaios *in vitro* e como modelo de aproximação ao que acontece aos radicais livres no organismo humano. Este radical apresenta uma coloração violeta na sua forma radicalar, porém à medida que vai sendo reduzido passa para uma coloração amarelada. Este pode ser facilmente detetado por espectroscopia devido à sua intensa absorção na região visível.

A capacidade dos extratos da alga *B. bifurcata*, tanto da amostra de aquacultura como da selvagem, em inibir os radicais DPPH[•] encontra-se representada na figura 30.

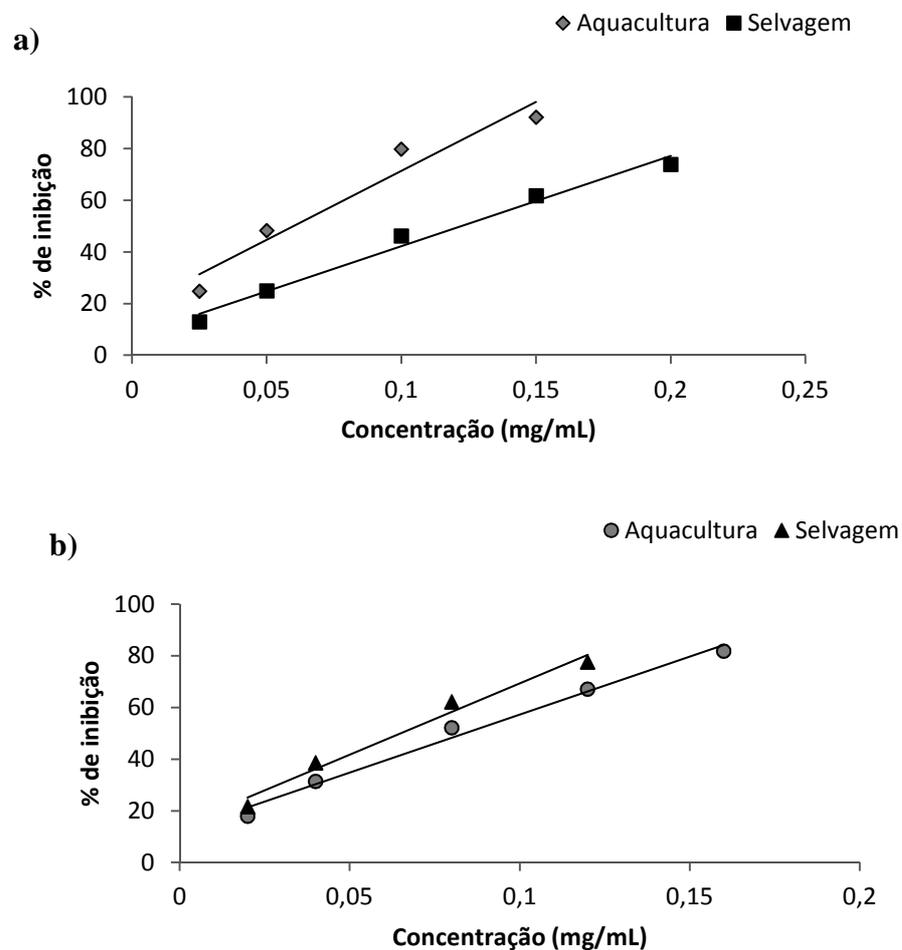


Figura 30 - Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos pelo método DPPH[•], em % de inibição versus concentração de extrato no meio de reação (mg/mL) (média de 4 ensaios realizados em duplicado): **a)** extrato metanólico; **b)** extrato aquoso.

Dos resultados apresentados na figura 30 é possível verificar que o extrato mais promissor em termos de atividade captadora de radicais DPPH^{*} é dependente da amostra, bem como que um aumento da concentração provoca um aumento da percentagem de sequestro dos radicais. De facto, para a amostra de aquacultura foi o extrato de metanólico o que apresentou maior eficácia na capacidade de sequestro do radical, enquanto na amostra selvagem foi o extrato aquoso. Ainda assim para estes dois extratos foi possível obter uma inibição de aproximadamente 80% do radical no meio de reação, para uma concentração de extrato de aproximadamente 0,125 mg/ml. De acordo com estes resultados, o valor de IC₅₀ (que é definido como a concentração de extrato capaz de inibir 50% do radical DPPH^{*}) dos extratos referidos é de aproximadamente 0,06 mg/mL (tabela VII). Este é um valor relativamente mais elevado em relação ao do ácido ascórbico (IC₅₀ de 0,006 ± 0,001 mg/mL), que é considerado um antioxidante comercial forte e que foi utilizado como padrão.

Os resultados apresentados na figura 30 mostram ainda que os outros extratos (extrato aquoso e metanólico da amostra de aquacultura e selvagem, respetivamente) demonstraram possuir capacidade redutora significativa do radical DPPH^{*}. Apesar de serem necessárias maiores concentrações, estas não são muito discrepantes em relação às referidas anteriormente.

De forma geral, é possível verificar que foi o extrato aquoso que revelou um menor IC₅₀, em comparação com o extrato metanólico. Podemos assim dizer que são os componentes do extrato aquosos que possuem uma maior capacidade antioxidante, no caso da espécie *B. bifurcata*.

Tabela VII - Atividade antioxidante quantificada nos vários extratos de *Bifurcaria bifurcata* pelo método DPPH^{*}, expressa em IC₅₀ (mg/mL) (média ± SD; n=3).

Extrato	Amostras	DPPH - IC ₅₀ (mg/mL)
Metanólico	<u>Aquacultura</u>	0,057 ± 0,007
	<u>Selvagem</u>	0,115 ± 0,004
Aquoso	<u>Aquacultura</u>	0,080 ± 0,004
	<u>Selvagem</u>	0,060 ± 0,006

• IC₅₀ – concentração do extrato que inibe 50% da solução de DPPH

Todos os resultados foram obtidos a partir de 3 experiências independentes

3.4 Atividade antifúngica

Para o ensaio da atividade antifúngica foram testados os extratos metanólicos e aquosos de ambas as amostras. Apenas os extratos metanólicos, tanto da amostra selvagem como de aquacultura, demonstraram atividade antifúngica para os fungos em estudo. Após a realização de pelo menos três ensaios independentes, obtiveram-se os MIC e MLC (tabela VIII).

Tabela VIII - Atividade antifúngica (MIC e MLC) do extrato metanólico de *Bifurcaria bifurcata* contra estirpes de dermatófitos.

Estirpes	Extrato Metanólico				Fluconazol ^(a)	
	Aquacultura		Selvagem		MIC	MLC
	MIC	MLC	MIC	MLC		
<i>T. mentagrophytes</i> FF7	800	≥ 800	800	> 800	16-32	32-64
<i>Microsporum canis</i> FF1	400	800	800	> 800	128	128
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	800	≥ 800	800	> 800	16	64
<i>M. gypseum</i> CECT 2905	800	> 800	> 800	> 800	128	>128
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	400	400	800	800	16	16
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECT 2958	> 800	> 800	> 800	> 800	128	≥128
<i>T. verrucosum</i> CECT 2992	> 800	> 800	> 800	> 800	>128	>128

* MIC e MLC foram determinados pelo método de macrodiluição e estão expressos em µg/ml (m/v).

(a) Fluconazol é um antifúngico de síntese química

Todos os resultados foram obtidos a partir de 3 experiências independentes realizadas em duplicado

Através da tabela VIII podemos verificar que não existem grandes diferenças entre as amostras. Ainda assim, a amostra de aquacultura demonstrou maior atividade para os fungos *M. canis* e *E. floccosum*, com MICs 400 µg/mL (figura 31a).

As estirpes menos sensíveis foram *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* e *T. verrucosum*, com MICs > 800 µg/mL (figura 31b, c).

Em relação aos MLC, o extrato apresentou uma ação fungicida para *E. floccosum* e *M. canis* com valores de MLC de 400 a 800 µg/mL, respetivamente.

De forma geral, podemos verificar que o extrato metanólico de *B. bifurcata* inibe o crescimento da maioria dos fungos testados para concentrações de 0,8 mg/mL, mas não se torna letal para estes.

Apesar do fluconazol servir apenas como teste de viabilidade dos fungos, verificamos que este apresenta valores de maior atividade em relação ao extrato da espécie testada. Isto pode ser explicado pelo fluconazol ser apenas um composto obtido de forma química e o extrato ser uma mistura de compostos. Por isso, apesar dos grandes valores obtidos, isto não os inviabiliza.

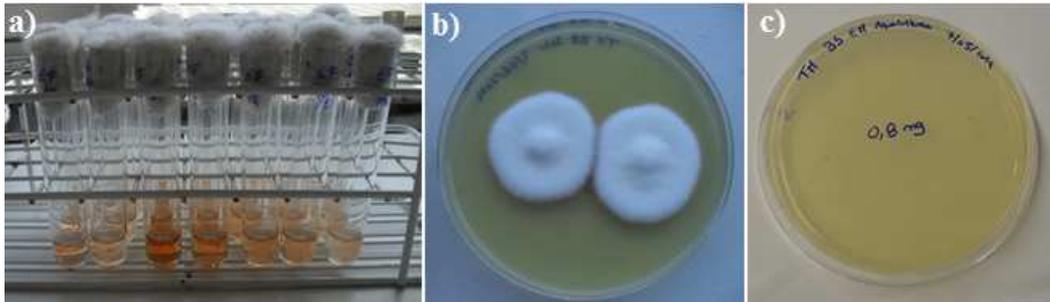


Figura 31 – Resultados observáveis na atividade antifúngica: **a)** MIC. Primeiramente o controlo negativo, controlo positivos e diluições do 0,8 para 0,05 mg/mL (da esquerda para direita). As primeiras diluições são negativas e as restantes positivas. Além da observação de crescimento dos fungos nas restantes diluições é visível a coloração do meio semelhante ao controlo positivo; **b)** e **c)** MLC superior a 0,8 e igual 0,8 mg/mL, respetivamente.

3.5 – Detecção de compostos fenólicos

3.5.1 - HPLC

O HPLC é um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. É um processo de separação para compostos presentes em misturas complexas, tal como extratos de algas. Nesta breve abordagem, pretendeu-se aquilatar a eventual presença e natureza química de compostos fenólicos em extratos metanólicos e aquosos, sequencialmente obtidos a partir das duas amostras objeto de estudo. Os resultados obtidos são demonstrados nas figuras 32 a 35.

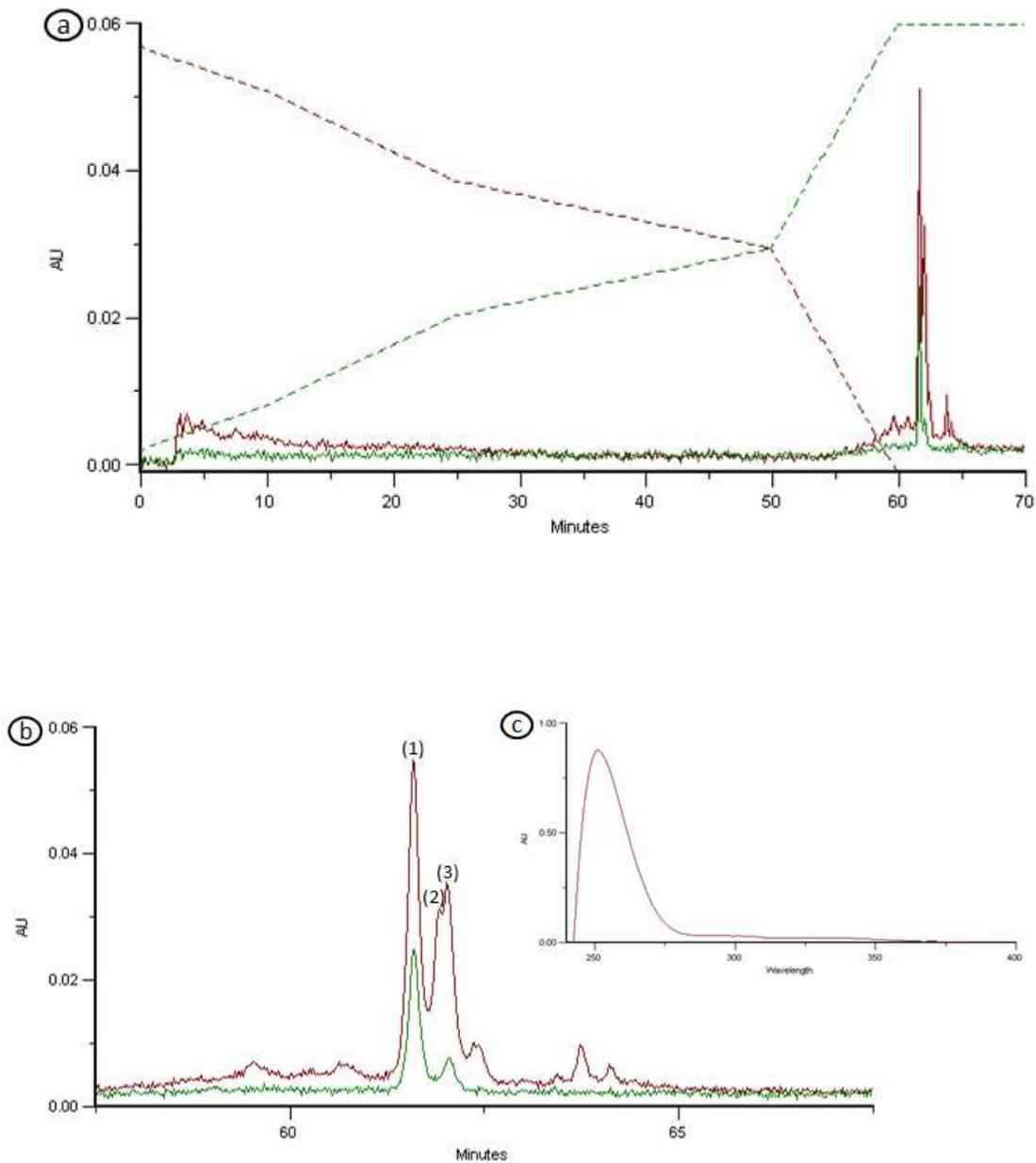


Figura 32 – HPLC do extrato metanólico de *Bifurcaria bifurcata* da amostra de aquacultura: **a)** cromatograma integral. A linha a vermelho representa o registo a 280 nm e a verde a 320 nm. As linhas a tracejado representam o perfil do gradiente que foi utilizado, sendo a linha vermelha representativa da % de água acidificada e a verde do metanol; **b)** ampliação da zona do cromatograma onde foram detetados sinais eventualmente correspondentes a compostos fenólicos; **c)** Perfil espectral no UV representativo dos compostos detetados no cromatograma. (pico 1: $\lambda_{\text{máx}}= 250$ nm; pico 2: $\lambda_{\text{máx}}= 260$ nm; pico 3: $\lambda_{\text{máx}}= 256$ nm).

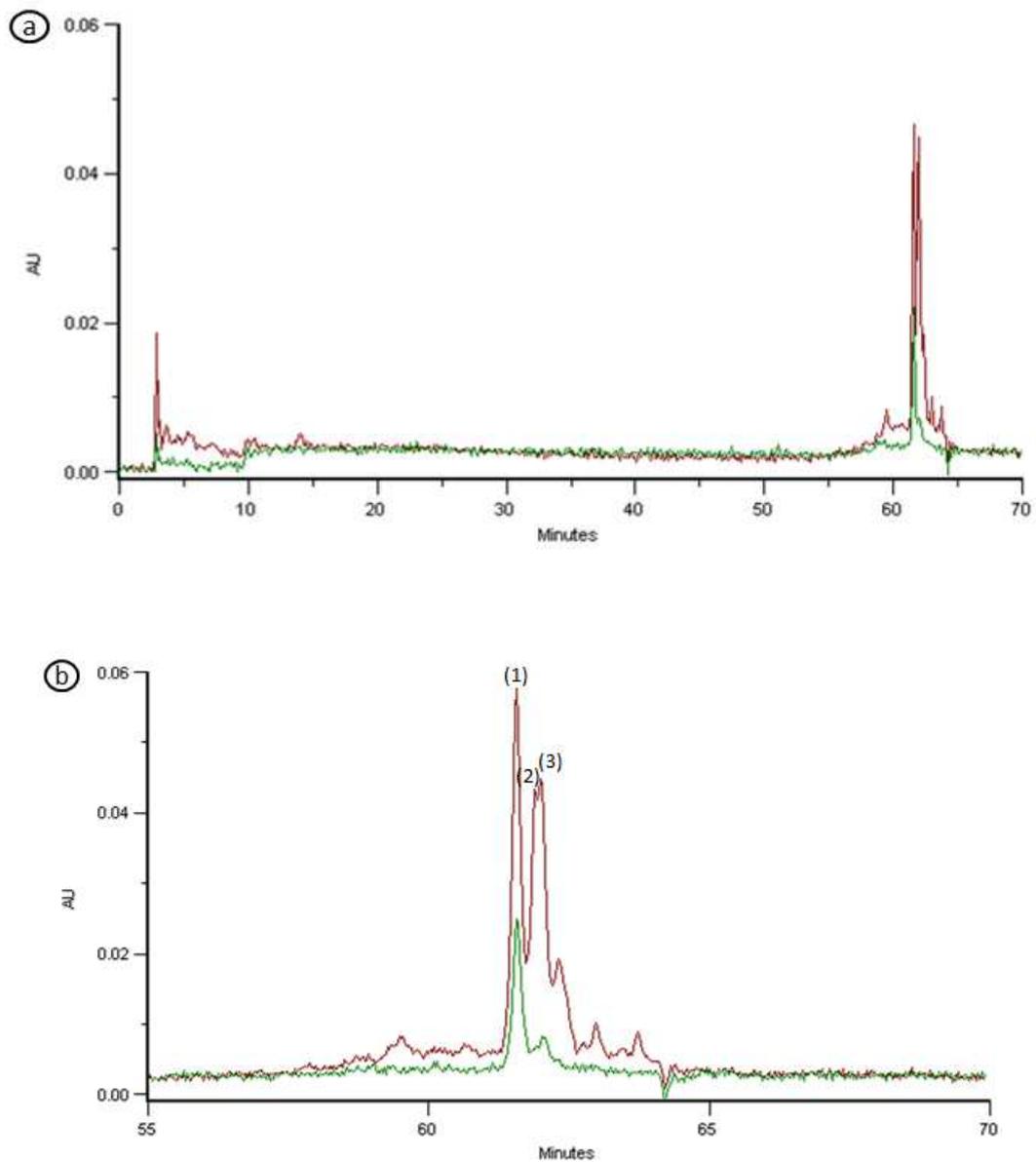


Figura 33 - HPLC do extrato metanólico de *Bifurcaria bifurcata* da amostra selvagem: **a)** cromatograma integral; **b)** ampliação na zona dos picos.

No caso do extrato metanólico, a alga *B. bifurcata* de aquacultura e selvagem possuem um perfil cromatográfico semelhante em termos qualitativos, ou seja, presença de compostos com os mesmos tempos de retenção e iguais espectros de absorção (tabela IX). No entanto em termos quantitativos verificam-se diferenças, detectando-se maiores concentrações de compostos fenólicos na amostra de aquacultura (figura 32 e 33).

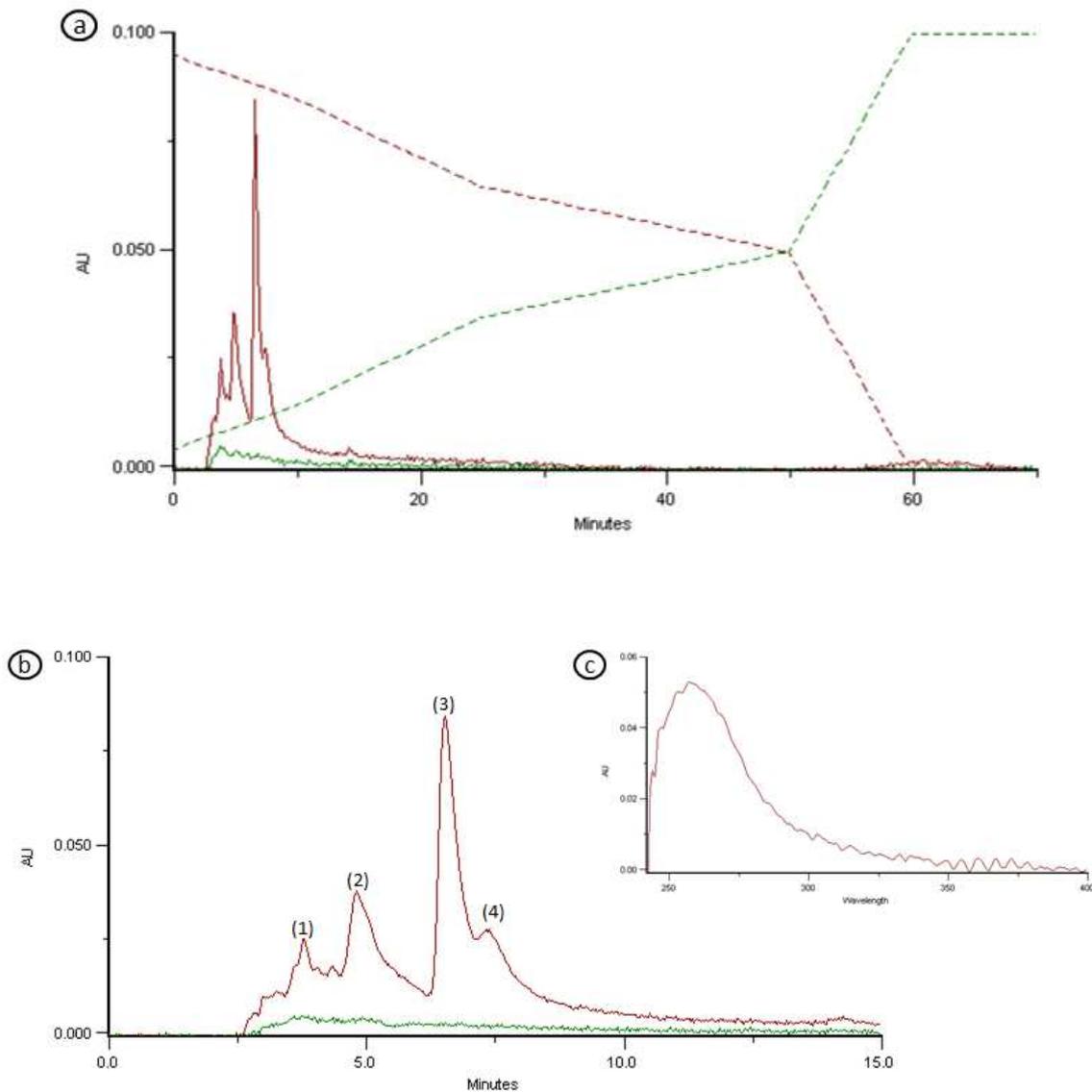


Figura 34 - HPLC do extrato aquoso de *Bifurcaria bifurcata* da amostra aquacultura: **a)** cromatograma integral. A linha a vermelho representa o registo a 280 nm e a verde a 320 nm. As linhas a tracejado representam o perfil do gradiente que foi utilizado, sendo a linha vermelha representativa da % de água acidificada e a verde do metanol; **b)** ampliação da zona do cromatograma onde foram detetados sinais eventualmente correspondentes a compostos feólicos; **c)** Perfil espectral no UV representativo dos compostos detetados no cromatograma (pico 1: $\lambda_{\text{máx}}= 258$ nm; pico 2: $\lambda_{\text{máx}}= 280$ nm; pico 3: $\lambda_{\text{máx}}= 270$ nm; pico 4: $\lambda_{\text{máx}}= 269$ nm).

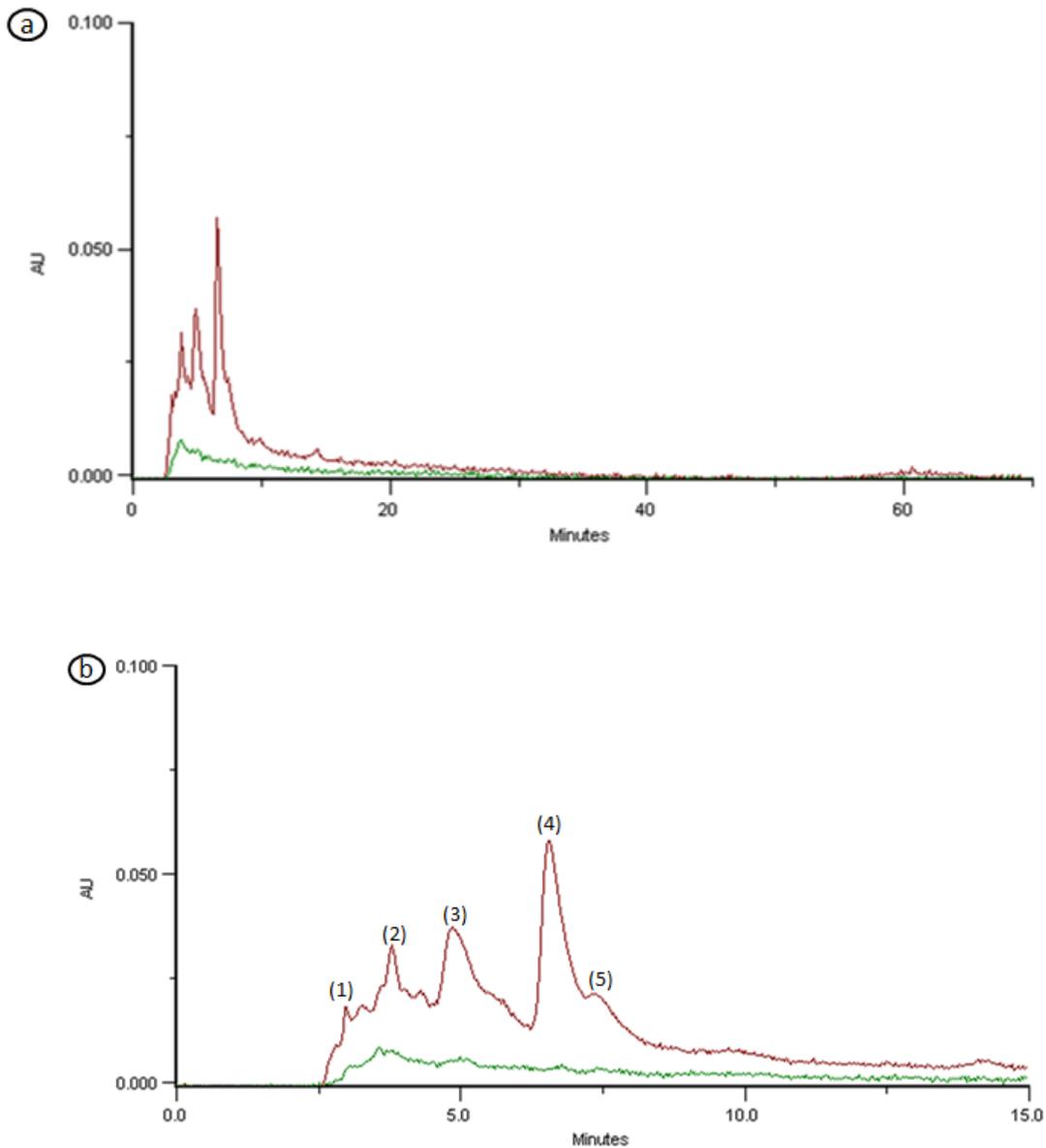


Figura 35 - HPLC do extrato aquoso de *Bifurcaria bifurcata* da amostra selvagem: **a)** cromatograma integral; **b)** ampliação na zona dos picos.

Como podemos verificar através das figuras 35 e 36, o extrato aquoso das duas amostras de *B. bifurcata* não possuem diferenças qualitativas em termos de cromatograma. As duas amostras exibem picos idênticos com características espectrais e tempos de retenção semelhantes, apesar de na amostra selvagem existir mais um pico (tabela IX). No entanto, é de realçar a existência de diferenças quantitativas, possuindo, a amostra de aquacultura, uma maior quantidade de compostos fenólicos.

Tabela IX – Valores dos tempos de retenção e comprimentos de onda máximo para cada pico obtido nos cromatogramas.

Extrato	Amostra	Pico	Rt (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
<u>Metanólico</u>	<u>Aquacultura</u>	1	61,389	250
		2	61,92	260
		3	62,01	256
	<u>Selvagem</u>	1	61,56	251
		2	61,89	260
		3	62,0	258
<u>Aquosos</u>	<u>Aquacultura</u>	1	3,77	258
		2	4,81	244; 246; 280
		3	6,52	244; 246; 270
		4	7,40	244; 247; 270
	<u>Selvagem</u>	1	2,97	264
		2	3,78	245; 258
		3	4,85	246; 281
		4	6,55	247; 270
		5	7,35	247; 270

De forma geral podemos verificar que em 3 mg/mL de ambos os extratos das duas amostras, existem pequenas quantidades de compostos fenólicos. Por este motivo visualiza-se em alguns cromatogramas a existência de ruído. Ainda assim, é de realçar diferenças quantitativas e qualitativas dos extratos em estudo. A nível quantitativo foi o extrato aquoso que evidenciou uma maior quantidade de compostos fenólicos. Já em termos qualitativos, pode-se concluir que, para a alga selvagem e de aquacultura, a natureza do solvente extrativo foi determinante na composição fenólica dos respetivos extratos. Assim, o metanol extraiu compostos de eluição mais tardia, o que permite inferir da sua menor polaridade relativamente aos que foram extraídos pela água, que apresentam tempos de retenção muito baixos.

3.5.2 - TLC

Para uma análise preliminar e complementar à técnica de HPLC, recorreu-se à cromatografia de camada fina (TLC). Através da medição das distâncias de migração de cada composto foi possível obter o fator de retenção (R_f). O cálculo do R_f é efetuado através da fórmula:

$$R_f = \text{distância de migração do composto (cm)} / \text{distância percorrida pelo eluente* (cm)}$$

* desde do ponto de aplicação das amostras à linha de frente do eluente

Neste estudo foram testados os extratos metanólicos e aquosos, de ambas as amostras, bem como o floroglucinol. A figura 36 ilustra os cromatogramas obtidos, após desenvolvimento das placas e revelação dos compostos separados.

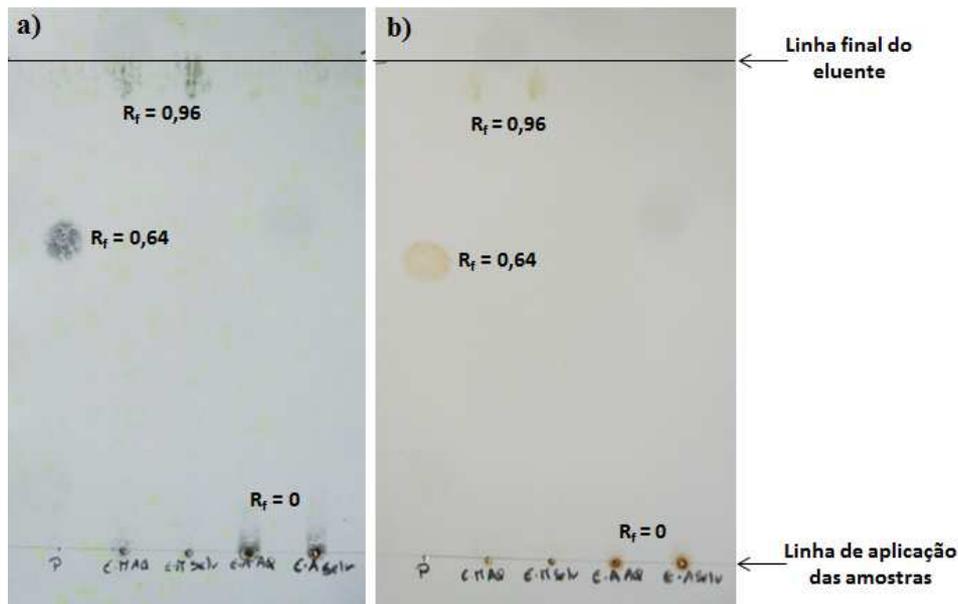


Figura 36 – Perfil cromatográfico, por TLC: **a)** placa revelada com o reagente de Folin-Ciocalteu; **b)** placa revelada com vanilina-HCl.

Abreviaturas: P – floroglucinol; E.M AQ – Extrato Metanólico Aquacultura; E.M Selv – Extrato Metanólico Selvagem; E.A AQ- Extrato Aquoso Aquacultura; E.A Selv – Extrato Aquoso Selvagem.

Observando os resultados foi também possível verificar diferenças cromatográficas entre as duas placas. Na primeira placa (figura 36a) foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu como revelador, com objetivo de verificar a natureza fenólica dos compostos presentes nos extratos. Para todas as amostras ocorreu o aparecimento de manchas azuis-esverdeadas, o que comprova a sua natureza fenólica.

Na segunda placa (figura 36b) a detecção foi realizada com vanilina-HCl, com o intuito de verificar a presença de florotaninos. Os florotaninos são oligômeros do floroglucinol, perfeitamente destrincháveis dos taninos condensados e hidrolisáveis. A sua detecção pode ser realizada, como a do floroglucinol, através da ocorrência de uma cor laranja-avermelhado. A nível das amostras, apenas os extratos aquosos revelaram a presença de florotaninos. Nos extratos metanólicos, é visível o aparecimento de duas manchas de cor esverdeada. Estes não são florotaninos. No entanto, são constituintes menos polares do que os detetados nos extratos aquosos, o que está de acordo com o comportamento verificado por HPLC.



4. Discussão

4. Discussão

4.1 - Aquacultura

A nível da experiência laboratorial não se obteve o crescimento de *B. bifurcata*, ocorrendo a sua degradação e coloração negra. Estes resultados devem-se provavelmente ao facto da *B. bifurcata* ser uma alga pesada, mais densa do que outras já testadas. Isto faz com que esta se deposite no fundo dos matrizes, não ocorrendo o fornecimento de nutrientes nem exposição à luminosidade. Portanto, é de referir, que para esta espécie o cultivo em matrizes não é o mais adequado, sendo por isso necessário adaptar o material à espécie da alga em estudo. É de realçar também a importância do arejamento para a taxa de crescimento desta espécie, uma vez que é através deste que há uma intensificação da exposição e absorção de luz e nutrientes.

Outro factor, que poderá ter levado ao insucesso da experiência, foi a utilização de betadine (cujo o princípio ativo é a iodopovidona) como desinfetante. Weinberger *et al.* (1997) realizou um estudo com a alga vermelha *Gracilaria conferta* o qual analisa diferentes componentes como métodos de esterilização. Neste é referido que os antibióticos e os desinfetantes normalmente utilizados podem ter três efeitos diferentes nas algas: danificar diretamente a alga; proteger a alga através da eliminação ou inativação de bactérias; danificar indiretamente a alga pela eliminação das bactérias protetoras. Apesar de serem espécies diferentes, esta condição pode ser comparável. De facto, verificou-se que *B. bifurcata* liberta substâncias para a água, que provocam a coloração amarelada da água e que possivelmente funcionam como sistema de defesa. A utilização deste método de esterilização poderá ter interferido com este mecanismo de defesa, e assim ter ocorrido uma danificação indireta na alga.

Outra experiência, realizada por Correa *et al.* (1999), testou a resposta de cicatrização e regeneração da espécie *Gigartina skottsbergii*. Este procedeu à excisão de fragmentos das frondes da *G. skottsbergii* e concluiu que a resposta à cicatrização dos fragmentos das frondes da alga é significativamente influenciada pela temperatura, luz e meio. Na experiência realizada por estes autores, ficou claro que, para os cortes do talo, uma combinação adequada de intensidade luminosa, temperatura e tipo de meio de cultura ($5 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $15 \text{ }^\circ\text{C}$, água do mar sem adição de qualquer meio nutritivo) podem melhorar as taxas de cicatrização até valores de 100%. Considerando os resultados de Correa *et al.* (1999), apesar de serem de espécies diferentes, outra das

prováveis explicações para a degradação da *B. bifurcata* poderá ser uma combinação inadequada dos vários fatores, o que impossibilitou a regeneração dos ápices. De facto uns dias após o corte dos ápices, verificava-se o aparecimento de uma coloração negra no local da excisão.

Deste modo, podemos inferir que a espécie em estudo não é fácil de cultivar por propagação vegetativa e que existem muitos fatores que podem ter contribuído para o insucesso desta experiência. No entanto a otimização do processo de cultivo, bem como a descoberta das condições ideais para o seu crescimento, poderão ser aspetos importantes a ter em conta.

Apesar dos resultados obtidos a nível laboratorial, *B. bifurcata* é uma alga passível de cultivar em sistemas de IMTA, comprovado pela experiência de aquacultura exterior. Contudo é necessário que o formato dos tanques se adeque, isto é, que evite a sua deposição no fundo.

Neste trabalho foi aplicado um cultivo por propagação vegetativa. Verificou-se que ambas as épocas são propensas para o cultivo desta espécie algal, porém foi no período primaveril que se obteve um maior crescimento e produtividade em sistemas de IMTA. O que entra em concordância com a literatura publicada, onde é realçado que a temperatura, o fotoperíodo e número de horas de luz por dia são fatores que tem influência sobre a taxa de crescimento (Pereira, 2006). Ainda assim, é de referir que na época primaveril, além do maior crescimento e da coloração mais clara do material algal, ocorreu também um maior desenvolvimento de estruturas reprodutivas, em relação à época de outono/inverno. Este aspeto entra em conformidade com o período reprodutivo (abril a outubro) referido no ciclo de vida, podendo significar que maiores temperaturas e luminosidade levam à maturação reprodutiva.

A nível das referências bibliográficas sobre o cultivo de *B. bifurcata* não existe nenhum do nosso conhecimento, neste momento. No entanto, outras espécies como, por exemplo a *Gracilaria vermiculophylla*, já foram testadas em experiências de aquacultura em tanques. Para esta obtiveram-se taxas de crescimento, para uma densidade de 3 Kg/m², que rondam os 2% no período de Novembro – Dezembro e de 6 - 4% de Maio a Junho. A nível da produtividade ocorreu uma variação de 75 a 225 g m⁻² dia⁻¹ para os períodos referidos anteriormente (Abreu *et al.*, 2011). Comparando com esta espécie, apesar de serem espécies distintas, verifica-se que a *B. bifurcata* tem um crescimento e uma produtividade menor.

É de referir também que nos dois períodos experimentais, apesar de não avaliado, a quantidade de nutrientes é distinta. No inverno devido ao metabolismo reduzido dos peixes estes eram menos alimentados, o que provocará uma diminuição do teor de nutrientes na água proveniente do sistema de aquacultura de peixes. Já no período primaveril com o aumento densidade e alimentação dos peixes, ocorrerá um aumento da carga nutricional. Segundo Abreu *et al.*, (2011) existe um padrão de variação sazonal do teor de nutrientes na ria de Aveiro. Tudo isto e juntando o facto da variação de nutrientes também existente na água do mar, poderá ser uma condicionante que influencia o desenvolvimento desta espécie. Possivelmente, na experiência 3 por existir melhores fatores ambientais e uma maior carga nutricional tenha resultado num melhor crescimento e produtividade.

Outro facto a verificar é que a *B. bifurcata*, quando em cultivo nos tanques, libertava substâncias que provocavam uma tonalidade amarelada à água. Estas substâncias possivelmente funcionam como método de proteção, podendo ser um fator justificativo da falta de epífitas aderidas à sua superfície. Por isso uma análise química à água proveniente da aquacultura desta espécie seria um requisito de interesse e a ter em conta.

Tendo em conta os resultados descritos e de todos os fatores envolvidos, há que ter em consideração que se trata de uma alga que é fixa por uma base discoide e com um aspeto rasteiro. Portanto, a utilização de ápices livres de qualquer fixação em contínuo movimento na água (presença de arejamento) poderá ter contribuído para as taxas de crescimento irregulares que se verificaram. Por isso, para esta espécie será necessário a realização de mais tentativas de cultivo antes de excluir a sua utilização em sistemas de IMTA. Ainda assim, é de salientar a importância da manutenção desta espécie algal na área natural, uma vez que se verifica uma relativa abundância ao longo da costa portuguesa, bem como em outros países. Deste modo não se invalida a sua futura utilização, tanto para estudos como para uma possível utilização comercial.

4.2 - Rendimento dos extratos

Os extratos são componentes essenciais para estudos em investigação científica. São obtidos através da adição de solventes, sendo selecionados de acordo com os compostos e estudos que se pretende realizar. Todo o processo de extração bem como o solvente são fatores que têm influência sobre o rendimento, havendo sempre pequenas perdas de material.

Neste trabalho pode-se verificar a obtenção de rendimentos entre os 4% e os 26%. O extrato que obteve o maior rendimento, excluindo os polissacarídeos, foi o metanólico em comparação com os extratos de hexano e aquoso de ambas as amostras. Em termos das amostras verificamos que a amostra selvagem teve um maior rendimento em relação à de aquacultura (tabela V).

Quando comparamos com os valores da literatura verifica-se também existe algumas diferenças de rendimentos. A nível da espécie *B. bifurcata* existe apenas um estudo que refere o rendimento dos extratos. Nesse estudo foi utilizado 0,5 g de alga moída passando por extrações orgânicas (metanol, água e acetona) e aquosas (água). Deste modo, obtiveram um rendimento de 64,71% para o extrato orgânico e 44,61% para o extrato aquoso (Jiménez-Escrig *et al.*, 2012). Noutro estudo, em que são avaliadas várias algas, utilizam 5 g de alga moída e como solventes a água e o etanol. Para as algas castanhas, inclusive da ordem Fucales, o rendimento para o extrato aquoso variou de 51,3% a 15,7%, ao passo que para o etanol encontra-se entre 21,8% a 6,4% (Sabeena Farvin & Jacobsen, 2013).

Nas duas bibliografias publicadas são referidas diferenças de rendimento entre diferentes espécies de algas, assim como nos solventes utilizados. Normalmente são as extrações aquosas ou com acetona onde se verificam maiores rendimentos, em contraste com as extrações com metanol. Estas disparidades são explicadas com as diferenças de polaridades dos solventes, onde existe um aumento do rendimento com aumento do índice de polaridade (Wang *et al.*, 2009; Sabeena Farvin & Jacobsen, 2013).

Com isto, verifica-se que os resultados a nível do rendimento neste trabalho não são concordantes com os estudos referidos. Ainda assim não os inviabiliza, pois diferença a nível do processo e condições de extração, assim como o local de colheita das algas poderá influenciar os resultados.

4.3 - Avaliação do teor de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante dos extratos

Atualmente o termo antioxidante tem sido muito mencionado, com especial foco nos que são derivados de produtos naturais. Os compostos antioxidantes são considerados como a solução na luta contra várias doenças, assim como no processo de envelhecimento. Um grande número de compostos antioxidantes tem sido identificados e isolados a partir de várias algas, os quais se destacam os compostos fenólicos para as algas castanhas. Estes são considerados grandes reveladores de potenciais antioxidantes (Zubia et al., 2009).

Neste trabalho verificou-se que existem grandes quantidades de compostos fenólicos nos dois extratos testados. Para o extrato metanólico foi a amostra de aquacultura ($77,90 \pm 3,00 \mu\text{g EAG/mg}$) que revelou maior quantidade destes compostos, e no extrato aquoso foi a amostra selvagem ($95,27 \pm 2,61 \mu\text{g EAG/mg}$) (tabela VI). De forma geral, a amostra de aquacultura era a mais enriquecida em fenóis totais ($164,6 \mu\text{g EAG/mg}$).

A nível da bibliografia publicada, para esta espécie de algas, existem três estudos onde é demonstrado o conteúdo de fenóis pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Segundo Jiménez-Escrig *et al* (2012), a *B. bifurcata* possui alto conteúdo de polifenóis, em comparação com outras algas. Obtiveram para o extrato orgânico (extraído com metanol e água) cerca de 2,4 g/100 g e para o extrato aquoso cerca de 2,3 g/100 g. No estudo realizado por Zubia *et al* (2009), em que avaliaram o conteúdo de fenólico total de extratos brutos de algas castanhas, para a espécie em estudo neste trabalho obtiveram o valor de 0,96% de peso seco. Por fim, um estudo da influência dos diferentes tipos de condicionamento sobre os compostos fenólicos, realizado por Lann & Stiger-Pouvreau (2008). Neste verificaram que para *B. bifurcata* a luz tem influência sobre os compostos fenólicos, assim como obtiveram maior conteúdo fenólico para extratos que foram utilizados frescos e congelados (cerca de 4,47% peso seco). A maior perda do conteúdo fenólico foi obtida por extratos secos na estufa.

De acordo com estudos anteriores o conteúdo de fenóis varia entre diferentes espécies de algas e depende de várias variáveis como o habitat, estação de colheita e condições ambientais (luz, temperatura e salinidade). Ainda assim, este trabalho está de acordo com estudos anteriores em Phaeophyceae, onde é relatado que a ordem Fucales possui um maior conteúdo de polifenóis das algas castanhas (Zubia *et al.*, 2009).

O extrato aquoso foi mais eficaz do que o extrato metanólico para os compostos fenólicos, nas amostras testadas. Este facto entra em concordância com estudos precedentes onde é referido que extrações aquosas ou misturas aquosas de metanol, etanol ou acetona são mais eficientes para a extração de polifenóis (Wang *et al.*, 2009; Koivikko *et al.*, 2005). Verificamos assim que os resultados obtidos neste trabalho estão enquadrados dentro dos valores alcançados por outros estudos, apesar de algumas diferenças no método aplicado.

Um estudo complementar à determinação dos compostos fenólicos, é a determinação da atividade antioxidante através do anti-radical DPPH[•]. Apesar do DPPH[•] ser um radical sem importância fisiológica, é utilizado na avaliação *in vitro* da capacidade anti-radicalar de várias amostras. É um teste de fácil execução, rápido e com boa estabilidade e, por estes motivos, tem sido usado amplamente para análise de atividades antioxidantes.

Neste trabalho, a nível do extrato metanólico foi a amostra de aquacultura que teve um menor IC₅₀, ao passo que no extrato aquoso foi a amostra selvagem (0,057 ± 0,007 mg/mL e 0,060 ± 0,006 mg/mL, respetivamente) (tabela VII). É de referir que o extrato aquoso no processo de extração apresentava uma coloração acastanhada/alaranjada, podendo ser resultado da presença de fucoxantina. Sendo de referenciar que, normalmente, a fucoxantina é extraída com recurso a sequências de solventes como metanol, água, hexano, entre outros (Fung *et al.*, 2013). Isto pode-nos levar a crer que este composto seja um dos responsáveis pela atividade antioxidante. Os resultados foram obtidos por realização de retas estatisticamente estáveis, em que se verifica que o aumento da concentração do extrato provoca um aumento da capacidade antioxidante.

No estudo de Zubia *et al* (2009), *B. bifurcata* foi uma das mais ativas com um IC₅₀ de 0,56 mg/mL. No caso do estudo de Lann & Stiger-Pouvreau (2008), mais uma vez foram os extratos frescos e congelados que revelaram maior atividade antioxidante (IC₅₀ cerca de 8 mg/mL). Num estudo mais recente realizado por Carvalho (2013), sob as mesmas condições realizadas neste trabalho, obteve IC₅₀ 388 µg/mL e 23 µg/mL para o extrato metanólico e aquoso, respetivamente.

Observa-se assim que os valores obtidos, apesar de inferiores em relação aos dois primeiros estudos referidos, alguns são similares sob as mesmas condições de extração. Existe também correlação positiva com os compostos fenólicos, isto é, os

extratos com maiores conteúdos fenólicos revelaram uma maior capacidade antioxidante. Devido às diferenças nos métodos de extração, metodologia e unidades usadas nos vários estudos sobre atividade antioxidante de algas relatados na literatura, torna a comparação direta dos resultados mais complicada e por vezes impossível.

Tendo em conta que a espécie em estudo é uma macroalga castanha e que a estas tem sido associada alta atividade antioxidante devido a compostos como polifenóis (sobretudo florotaninos) e fucoxantina, são componentes que provavelmente estarão presentes no extrato aquoso.

4.4 - Atividade antifúngica

O uso indiscriminado e prolongador de fármacos antimicrobianos conduziram ao aparecimento de fungos patogénicos resistentes. Isto levou a uma maior procura de compostos naturais antimicrobianos, através de testes *in vitro*. Apesar destes testes de suscetibilidade não serem rotineiramente utilizados, são importantes na verificação da resistência, para escolhas dos tratamentos e para a pesquisa de substâncias alternativas para serem utilizados como medicamentos (Guedes *et al.*, 2012).

A atividade antifúngica pode ser influenciada por variáveis como habitat, período de colheita, estado reprodutivo da alga, métodos experimentais, entre outros. Existem vários solventes que são utilizados para determinação da atividade antifúngica das algas, no entanto ainda é dúbio qual o mais eficaz para utilizar nas extrações. Ainda assim, dos diferentes estudos é de realçar a presença de uma vasta gama de compostos naturais que poderão ser aplicados na saúde humana (Manivannan *et al.*, 2011).

Neste trabalho, a atividade antifúngica foi testada pelo método de macrodiluição em caldo com determinação de MIC e MLC. Verificou-se que a nível das amostras, aquacultura e selvagem, não existiam grandes diferenças de atividade. De forma geral, foi apenas o extrato metanólico que mostrou atividade contra os dermatófitos. Estes na sua maioria foram inibidos pelo extrato de *B. bifurcata*, sendo *M. canis* FF1 e o *E. floccosum* FF9 as estirpes mais sensíveis com concentrações letais de 800 e 400 µg/mL, respetivamente (tabela VIII).

A nível de bibliografia publicada sobre atividade antifúngica de *B. bifurcata*, através do método de macrodiluição em caldo e contra as mesmas estirpes de fungos, existe apenas um trabalho realizado recentemente por Carvalho (2013). Neste estudo, sobre as mesmas condições das referidas neste trabalho, também só o extrato

metanólico revela ação. As espécies mais susceptíveis foram *E. floccosum* (MIC de 100 – 200 µg/mL; MLC de 200 µg/mL), *T. rubrum* (MIC de 200 µg/mL; MLC de ≥400 µg/mL), *M. canis* (MIC de 400 µg/mL; MLC de ≥400 µg/mL) e por fim *T. mentagrophytes* (MIC de 100 µg/mL; MLC de > 800 µg/mL). Os restantes fungos cresceram ou apenas sofreram inibição na concentração de 800 µg/mL. Comparando os resultados, verificamos que a espécie testada neste trabalho possui menor atividade antifúngica em relação aos resultados da publicação referida anteriormente. Ainda assim, existe uma concordância das estirpes com maior e menor resistência ao extrato, apesar das diferentes concentrações. No entanto, é de referir que as espécies foram recolhidas em locais geográficos e épocas diferentes, bem como podem ter sido submetidas a condições distintas durante a realização experimental. Um parâmetro importante na realização deste ensaio é a dissolução dos extratos, que para esta espécie nem sempre foi obtida a homogeneidade, o que pode influenciar os resultados. Tudo isto pode revelar diferenças a níveis de constituição e compostos, que por conseguinte levam a distintos potenciais. De forma global, verifica-se que a espécie *B. bifurcata* possui atividade antifúngica reduzida para as concentrações testadas, levando a querer ser necessário maiores concentrações para revelar potencial contra dermatófitos.

Outro estudo, realizado por Lopes *et al* (2013), utilizou extratos ricos em florotaninos de várias macroalgas castanhas (ordem Fucales) para testar a atividade antifúngica. Neste foi utilizado uma concentração de 62,5 mg/mL, o qual o valor mínimo MIC e MLC apresentado é 3.9 e 7.8 mg/mL, respetivamente. Comparando com este estudo, apesar de espécies diferentes mas da mesma ordem, *B. bifurcata* possui um efeito antifúngico muito superior, suportando assim a ideia que para a maioria destes fungos são necessárias concentrações maiores às testadas nestes trabalho.

É de realçar que para este ensaio foram utilizadas as concentrações de 800 µg/mL por ser uma concentração referência na qual os compostos são considerados de interesse a nível farmacológico. Ainda assim não inviabiliza o potencial desta alga para os estudos antifúngicos uma vez que foram testados extratos, isto é uma mistura complexa de compostos. Por serem uma mistura de compostos provavelmente poderá existir efeitos sinérgicos o que vai reduzir o real valor de cada composto. Desta forma, verificamos que *B. bifurcata* é realmente uma alga com potencial biotecnológico e que fracionamento, bem como identificação dos compostos que compõem esta alga é um passo importante para a compreensão das atividades manifestadas.

4.5 - Análise quantitativa e qualitativa

A aplicação de métodos de HPLC e TLC permitem a separação de compostos individualmente. Estes têm sido atualmente muito utilizados na deteção e quantificação de compostos fenólicos de macroalgas, sendo muitas vezes complementado com a aplicação de outras técnicas.

Neste trabalho verificamos que os extratos possuem composições diferentes a nível de compostos, revelando picos em zonas distintas do cromatograma. Os extratos aquosos são constituídos sobretudo por compostos de eluição mais tardia, ao passo que os metanólicos apresentam tempos de retenção muito baixos. Nestes também ocorreram diferenças quantitativas, onde as algas provenientes da aquacultura revelaram uma maior quantidade de fenóis. Em relação às amostras não se verificaram diferenças qualitativas, mas visualizaram-se diferenças quantitativas. Este método só por si não permitiu inferir mais informação sobre a composição fenólica. Por isso foi realizado um TLC, utilizando dois reveladores diferentes e o floroglucinol. Neste foi notória a presença de compostos fenólicos em todas as amostras, mas apenas nos extratos aquosos se revelou a presença de florotaninos. Para o extrato metanólico apenas evidenciou a presença de compostos fenólicos, o que nos leva a crer que grande parte da atividade demonstrada se deve possivelmente à presença de diterpenos (usualmente extraído com metanol como solvente) (Le Lann *et al.*, 2014).

Em relação a publicações sobre HPLC e TLC em extratos brutos *B. bifurcata* não existe nenhum relato. Para esta espécie apenas existe um estudo em TLC, mas para identificação dos diterpenos que esta produz (Le Lann *et al.*, 2014). No entanto para o caso do HPLC, existem apenas várias alusões à sua utilização em algas castanhas. O foco tem sido a identificação, separação e quantificação dos florotaninos, dada a sua abundância nestas algas assim como o potencial biológico que tem demonstrado. Porém apesar da extensa pesquisa, ainda não existe um método de HPLC adequado para algas castanhas. Este facto é explicado pela complexidade de separar compostos individuais, a partir de uma mistura polimérica que ocorre naturalmente (Koivikko *et al.*, 2008). Uma espécie em que tem sido abundantemente aplicada a técnica de HPLC para estudo a nível de florotaninos (composto fenólico) é o *Fucus vesiculosus*. Utiliza-se sobretudo uma sequência de solventes, a fim de isolar ao máximo o composto em estudo. Devido às diferenças nas extrações e técnicas utilizadas a comparação entre estes torna-se dificultada. No entanto, é referida a dificuldades do estudo destes compostos devido à

sua complexidade e falta de padrões comerciais, assim como a necessidade de complementaridade com outras técnicas (Koivikko *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).

De um modo geral dá para perceber que as técnicas de HPLC e TLC são eficazes na separação de compostos fenólicos e que as diferentes extrações vão ter influência na composição final em *B. bifurcata*. Assim estas técnicas tornam-se um complemento em todo o estudo, confirmando-se a presença de compostos fenólicos para esta espécie algal.



5. Conclusão e perspetivas futuras

5. Conclusão e perspectivas futuras

As macroalgas são organismos de uma enorme grandiosidade, diversidade e complexidade. O facto de viverem em sistemas com diversas interações torna-as uma enorme fonte de compostos biológicos e químicos. Com este trabalho revelou-se que a costa portuguesa tem potenciais fontes de compostos ativos, apesar de ainda estarem nos seus primórdios de investigação. Todas as dificuldades e os poucos conhecimentos sobre *Bifurcaria bifurcata* tornou este trabalho um verdadeiro desafio. Cada passo dado no processo experimental, desde da colheita até ao final de cada ensaio, tem o seu valor podendo influenciar posteriormente os resultados obtidos. Contudo o protocolo foi desenvolvido com o máximo de rentabilidade e reaproveitamento, de forma a obter o maior rendimento possível.

Este trabalho permite ter uma pequena ideia do potencial que *Bifurcaria bifurcata* detém. Comprovou-se o seu elevado conteúdo fenólico presente nas algas castanhas, bem como a presença de atividade antioxidante e antifúngica. Para a primeira atividade foi o extrato aquoso que deteve maior capacidade. Complementado com as técnicas cromatográficas, permite-nos inferir que este potencial resulta da presença de compostos mais polares, dos quais se destacaram os florotaninos. No caso do extrato metanólico evidenciou a presença de compostos com eluições mais apolares e de fenólicos, exibindo assim alguma capacidade antifúngica. De forma geral, verificaram-se diferenças entre os extratos, mas não entre as amostras.

A nível da aquacultura, esta espécie é passível de cultivar. No entanto, apesar de todos os cuidados, foram obtidos valores baixos de crescimento e produtividade em relação a outras algas já testadas.

Posto isto tudo, uma questão se levanta: Será economicamente rentável o cultivo da espécie *B. bifurcata*? É de salientar a sua abundância ao longo da costa portuguesa e noutros países, bem como a inexistência de diferenças entre as duas amostras para as atividades testadas. Sendo uma espécie com tanto potencial, uma das possíveis soluções não passará pela sua manutenção nas zonas costeiras?

Apesar disso, comprovou-se assim o potencial desta alga, justificado pelos diversos estudos que têm sido realizados. Todavia a diversidade de métodos passíveis de serem utilizados, a grande variabilidade entre fatores externos e as diferentes espécies de algas torna muitas vezes as confrontações difíceis e/ou impossíveis. Porém o isolamento de cada composto pode resultar em possíveis aplicações farmacêuticas e

nutracêuticas. A área das macroalgas é de uma enorme complexidade, na qual pequenos estudos têm sempre um contributo para a descoberta deste “mundo”, mesmo que os resultados não sejam os esperados. Por isso muitas vezes é afirmado o seu futuro promissor, pois é das dificuldades que se constrói o incentivo e a ciência.

No seguimento deste trabalho seria interessante realizar todo o processo para as amostras de aquacultura e selvagem referente à estação primaveril, a fim de verificar se existem diferenças. Continuar na realização de investigação para identificação de compostos e fracionamento das amostras, assim como experiências de atividades que estas podem revelar. Por fim, repetir novamente a cultura desta espécie num sistema laboratorial e crescimento exterior sob um sistema contínuo, bem como a realização análises químicas da água aplicada e retirada da aquacultura desta espécie.



6. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

Abboud, Y., Abourriche, A., Ainane, T., Charrouf, M., Bennamara, A., Tanane, O., & Hammouti, B. (2009). Corrosion inhibition of carbon steel in acidic media by *Bifurcaria bifurcata* extract. *Chemical Engineering Communications*, 196 (7): 788-800.

Abreu, M. H., Pereira, R., Buschmann, A. H., Sousa-Pinto, I., & Yarish, C. (2011). Nitrogen uptake responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss under combined and single addition of nitrate and ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407 (2): 190-199.

Abreu, M. H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A. H., & Sousa-Pinto, I. (2011). IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture*, 312 (1): 77-87.

Abreu, M.H., Pereira, R., Mata, L., Nobre, A., Sousa Pinto, I. (2011). IMTA em Portugal. Macroalgas en la Acuicultura Multitrófica Integrada Peninsular: Valorización de su Biomasa. In: Vázquez Ferreiro, U, Incera Filgueira, M, Fernández Otero, R, Maroto Leal, J. (Eds.); Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR; Vigo; Spain; pp. 53-68.

Ainane, T. (2011). Valorisation de la biomasse algale du Maroc: Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata* (Doctoral dissertation, Faculté des Sciences Ben M'sik Université Hassan II Casablanca).

Almeida, A. R. G. S. D. (2007). Estudo da flora algológica do intertidal da Praia da Vigia. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/1643/2/Guia%20de%20Campo.pdf>, acessado a 5/01/2014.

Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., & Domínguez, H. (2013). *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food chemistry*, 138 (2): 1764-1785.

Barrington, K., Chopin, T., & Robinson, S. (2009). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. Integrated mariculture: a global review. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 529: 7-46.

- Barrington, K., Ridler, N., Chopin, T., Robinson, S., & Robinson, B. (2010). Social aspects of the sustainability of integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture International*, 18 (2): 201-211.
- Bokhari, F. M. (2009). Antifungal activity of some medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 7 (1): 51-57.
- Bouzidi, N., Daghbouche, Y., El Hattab, M., Aliche, Z., Culioli, G., Piovetti, L., Garrigues S., & de la Guardia, M. (2008). Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytica chimica acta*, 616 (2): 185-189.
- Braune, W. (2011). Seaweeds: a colour guide to common benthic green, brown and red algae of the world's oceans. Ruggell: ARG Gantner. pp. 14-16.
- Campbell, A & Nicholls, J. (1994). Fauna e Flora do litoral de Portugal e Europa. FAPAS. (pp. 4, 40).
- Carvalho, L. G. D. (2013). Avaliação do potencial biotecnológico de micro e macroalgas da flora portuguesa. Universidade de Coimbra
- Chávez-Crooker, P., e Obreque-Contreras, J. (2010). Bioremediation of aquaculture wastes. *Current opinion in biotechnology*, 21 (3): 313-317.
- Chojnacka, K., Saeid, A., Witkowska, Z., & Tuhy, L. (2012). Biologically active compounds in seaweed extracts—the prospects for the application. In *The Open Conference Proceedings Journal* (Vol. 3, No. supplement 1, p. M4).
- Chopin, T., Cooper, J. A., Reid, G., Cross, S., & Moore, C. (2012). Open-water integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 4 (4): 209-220.
- Cornish, M. L., & Garbary, D. J. (2010). Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. *Algae*, 25 (4): 155-171.
- Correa, J. A., Beltrán, J., Buschmann, A. H., & Westermeier, R. (1999). Healing and regeneration responses in *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales): optimization of vegetative propagation for cultivation. *Journal of applied phycology*, 11 (3): 315-327.

Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Richou, M., Valls, R., & Piovetti, L. (2002). Seasonal variations in the chemical composition of *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae). *Biochemical systematics and ecology*, 30 (1): 61-64.

D'Orazio, N., Gemello, E., Gammone, M. A., de Girolamo, M., Ficoneri, C., & Riccioni, G. (2012). Fucoxantin: A treasure from the sea. *Marine drugs*, 10 (3): 604-616.

Daoudi, M., Bakkas, S., Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Piovetti, L., & Guiry, M. D. (2001). Acyclic diterpenes and sterols from the genera *Bifurcaria* and *Bifurcariopsis* (Cystoseiraceae, Phaeophyceae). *Biochemical systematics and ecology*, 29 (9): 973-978.

Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., & Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61 (12): 1401-1426.

El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18 (1): 1-25.

El Hattab, M., Ben Mesaoud, M., Daoudi, M., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Valls, R., & Piovetti, L. (2008). Trihydroxylated linear diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Fucales, Phaeophyta). *Biochemical Systematics and Ecology*, 36 (5): 484-489.

Fleurence, J., Morançais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., Garcia-Bueno, N., & Jaouen, P. (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends in Food Science & Technology*, 27 (1): 57-61.

Freitas, A. C., Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A., Gomes, A. M., & Duarte, A. C. (2012). Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnology advances*, 30 (6): 1506-1515.

Fung, A., Hamid, N., & Lu, J. (2013). Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food chemistry*, 136 (2): 1055-1062.

- Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2011). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 25 (6): 1514-1520.
- Graham, L. E. & Wilcox, L. W. (2000) Algae. Upper Saddle River: Prentice Hall. Cap. 15. pp. 310, 311, 316-321, 338, 339.
- Guedes, E. A. C., dos Santos Araújo, M. A., Souza, A. K. P., de Souza, L. I. O., de Barros, L. D., de Albuquerque Maranhão, F. C., & Sant'Ana, A. E. G. (2012). Antifungal activities of different extracts of marine macroalgae against dermatophytes and *Candida* species. *Mycopathologia*, 174 (3): 223-232.
- Guerrero, S., & Cremades, J. (2012). Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA): A sustainable, pioneering alternative for marine cultures in Galicia. pp. 9, 33.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2014). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>, acedido a 25/01/2014.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (6): 315-326.
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23 (3): 543-597.
- Jiménez-Escrig, A., Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2012). Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. *Journal of Applied Phycology*, 24 (5): 1123-1132.
- Julien, J.-C., (2008). Description de *Bifurcaria bifurcata*. Disponível em: <http://www.mer-littoral.org/62/bifurcaria-bifurcata.php>, acedido a 2/07/2014.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2013). Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (20): 4667-4675.
- Kang, Y. H., Shin, J. A., Kim, M. S., & Chung, I. K. (2008). A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multi-trophic

- aquaculture (IMTA) during the summer. *Journal of Applied Phycology*, 20 (2): 183-190.
- Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R., & Wright, A. D. (2012). Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Marine drugs*, 10 (2): 403-416.
- Kılınc, B., Cirik, S., Turan, G., Tekogul, H., & Koru, E. (2013). Seaweeds for Food and Industrial Applications. *Food Industry*, 978-953.
- Klinger, D., & Naylor, R. (2012). Searching for solutions in aquaculture: charting a sustainable course. *Annual Review of Environment and Resources*, 37: 247-276.
- Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen V (2005) Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *J Chem Ecol* 31: 195–212
- Koivikko, R., Eränen, J. K., Loponen, J., & Jormalainen, V. (2008). Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification. *Journal of chemical ecology*, 34 (1): 57-64.
- Koivikko, R., Loponen, J., Pihlaja, K., & Jormalainen, V. (2007). High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus Vesiculosus*. *Phytochemical Analysis*, 18 (4): 326-332.
- Le Lann, K., Jegou, C., & Stiger-Pouvreau, V. (2008). Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycological research*, 56 (4): 238-245.
- Le Lann, K., Rumin, J., Cérantola, S., Culioli, G., & Stiger-Pouvreau, V. (2014). Spatiotemporal variations of diterpene production in the brown macroalga *Bifurcaria bifurcata* from the western coasts of Brittany (France). *Journal of Applied Phycology*, 26 (2): 1207-1214.
- Lee, R. E. (2008). *Phycology*. Cambridge University Press. pp. 3; Cap. 21. pp. 427, 464.
- Lobban, C. S., & Harrison, P. J. (1994). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. pp. 123, 213.

Lopes, G., Pinto, E., Andrade, P. B., & Valentão, P. (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): e72203.

Manivannan, K., Anantharaman, P., & Balasubramanian, T. (2011). Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1 (2): 114-120.

Manivannan, K., Anantharaman, P., & Balasubramanian, T. (2011). Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1 (2): 114-120.

Marie Skewes (2008). *Bifurcaria bifurcata*: A brown seaweed. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. Disponível em <http://www.marlin.ac.uk/speciesinformation.php?speciesID=2760>, acessado a 29/06/2014.

Menéndez Valderrey, Juan Luis. “*Bifurcaria bifurcata* Ross”. Asturnatura.com. Num. 3, 22/12/2004. Disponível em <http://www.asturnatura.com/especie/bifurcaria-bifurcata.html> acessado a 2/07/2014.

Muñoz, J., Culioli, G., & Köck, M. (2013). Linear diterpenes from the marine brown alga *Bifurcaria bifurcata*: a chemical perspective. *Phytochemistry Reviews*, 12 (3): 407-424.

Nobre, A. M., Robertson-Andersson, D., Neori, A., & Sankar, K. (2010). Ecological-economic assessment of aquaculture options: Comparison between abalone monoculture and integrated multi-trophic aquaculture of abalone and seaweeds. *Aquaculture*, 306 (1): 116-126.

O’Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H., & Gardiner, G. E. (2010). Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine drugs*, 8 (7): 2038-2064.

Oliveira, A. L. L. D., Felício, R. D., & Debonsi, H. M. (2012). Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22 (4): 906-920.

- Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Valls, R., Pucci, B., & Piovetti, L. (2005). Polar acyclic diterpenoids from *Bifurcaria bifurcata* (Fucales, Phaeophyta). *Phytochemistry*, 66 (19): 2316-2323.
- Pereira, L. (2005). Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa: aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos. Universidade de Coimbra. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/10017>, acessado a 25/12/2013.
- Pereira, L. (2008). As algas marinhas e respectivas utilidades. Monografias.com. Disponível em: <http://br.monografias.com/trabalhos913/algas-marinhas-utilidades/algas-marinhas-utilidades.pdf>, acessado a 25/01/2014.
- Pereira, L. (2009). Guia ilustrado das macroalgas: conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa. *Imprensa da Universidade de Coimbra*. pp. 45.
- Pereira, L. (2010). Littoral of Viana do Castelo – ALGAE. Publicação do Município de Viana do Castelo. pp. 10. Disponível em http://www.cmia-viana-castelo.pt/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=285&Itemid=92, acessado a 13/01/2014.
- Pereira, L. (2011). A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*, 15-47.
- Pereira, O. R., Macias, R. I., Perez, M. J., Marin, J. J., & Cardoso, S. M. (2013). Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album*, *L.* and *Thymus citriodorus* on liver cells. *Journal of Functional Foods*, 5 (3):1170-1179.
- Pérez, A. I., Ortega, I. M., & Alfonso, R. P. (2005). Curso, recolectora de algas comerciais. *Santiago de Compostela: Conselleria de Pesca e Asuntos Marítimos*. pp. 20.
- Pinteus, S. (2011). Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioativos com elevado potencial biotecnológico.
- Pinto, E., Hrimpeng, K., Lopes, G., Vaz, S., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2013). Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against

- Candida, Cryptococcus, Aspergillus and dermatophyte species. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 32 (10): 1311-1320.
- Polat, S., & Ozogul, Y. (2013). Seasonal proximate and fatty acid variations of some seaweeds from the northeastern Mediterranean coast. *Oceanologia*, 55 (2).
- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H. & Heller H.C. (2003). Life: The Science of Biology: Volume IV: Development. W. H. Freeman. Cap. 31. pp. 603, 604.
- Raffaelli, D. & Hawkins, S. (1996). Intertidal Ecology, 1ª Edição, Chapman and Hall, London. Cap. 2. pp. 37.
- Rodríguez-Prieto, C.; Ballesteros, E.; Boisset, F. & Afonso-Carrillo, J. (2013). *Guía de las macroalgas y fanerógamas marinas del Mediterráneo occidental*. Ediciones OMEGA. pp. 88, 89.
- Saá, C.F. (2002). Algas do Atlântico, Alimento e Saúde. Propriedades, receitas e descrição. Algamar, Redondela – Pontevedra. pp. 19.
- Sabeena Farvin, K. H., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food chemistry*, 138 (2): 1670-1681.
- Sagar, K., & Vidyasagar, G. M. (2013). Anti-dermatophytic activity of some traditionally used medicinal plants of North Karnataka Region.
- Shibata, T., Hama, Y., Miyasaki, T., Ito, M., & Nakamura, T. (2006). Extracellular secretion of phenolic substances from living brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 787-794.
- Skriptsova, A. V., & Miroshnikova, N. V. (2011). Laboratory experiment to determine the potential of two macroalgae from the Russian Far-East as biofilters for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Bioresource technology*, 102 (3): 3149-3154.
- Sousa Pinto, I & Abreu, MH. (2011). IMTA: o que é? Macroalgas en la Acuicultura Multitrófica Integrada Peninsular: Valorización de su Biomasa. In: Vázquez Ferreiro, U, Incera Filgueira, M, Fernández Otero, R, Maroto Leal, J. (Eds.); Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR; Vigo; Spain; pp. 54-77.

Stephenson, T. A., & Stephenson, A. (1949). The universal features of zonation between tide-marks on rocky coasts. *The Journal of Ecology*, 289-305.

Thomas, D.N. (2002). Seaweeds. Natural History Museum of London, Life Series. pp. 23, 24.

Tierney, M. S., Croft, A. K., & Hayes, M. (2010). A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. *Botanica marina*, 53 (5): 387-408.

Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A. H., & Fang, J. G. (2009). Ecological engineering in aquaculture—Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 297 (1): 1-9.

Underwood, A. J. (1997). Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press.

Wang T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G (2009) Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem* 116: 240–248

Wang, T., Jónsdóttir, R., Liu, H., Gu, L., Kristinsson, H. G., Raghavan, S., & Ólafsdóttir, G. (2012). Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (23): 5874-5883.

Wang, X., Olsen, L. M., Reitan, K. I., & Olsen, Y. (2012). Discharge of nutrient wastes from salmon farms: environmental effects, and potential for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 2 (3): 267-283.

Weinberger, F., Hoppe, H. G., & Friedlander, M. (1997). Bacterial induction and inhibition of a fast necrotic response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of applied phycology*, 9 (3): 277-285.

Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. J. (2011). "Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review." *Phytochemistry Reviews* 10 (3): 431-443.

Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Lann KL, Stiger-Pouvreau V, Fauchon M, Deslandes E (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem* 116: 693–701

Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Canhoto, J., & Salgueiro, L. (2011). Antidermatophytic activity of essential oils. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. A. Méndez-Vilas (Ed.). *Microbiology Book Series*, nº3, 2, 1167-1178.

Zvyagintseva, T. N., Shevchenko, N. M., Chizhov, A. O., Krupnova, T. N., Sundukova, E. V., & Isakov, V. V. (2003). Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 294 (1): 1-13.