



Nídia Sofia Silva André

# Estudos na Macroalga Carragenófita *Gigartina pistillata* da Costa Portuguesa: Análise do Colóide Produzido por FTIR-ATR e Determinação da Atividade Antioxidante

Dissertação de Mestrado em Biologia, orientada pelo Professor Doutor Leonel Pereira e pelo Professor Doutor Artur Figueirinha e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Estudos na Macroalga Carragenófita *Gigartina pistillata* da Costa Portuguesa: Análise do Coloide Produzido por FTIR-ATR e Determinação da Atividade Antioxidante.**

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

**Nídia Sofia Silva André**

Departamento de Ciências da Vida

Universidade de Coimbra

2016

Imagem capa: *Gigartina pistillata*, Nidia André

## **Agradecimentos**

Ao longo destes dois anos, foram inúmeras as pessoas que me apoiaram e ajudaram neste caminho. Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Professor Doutor Leonel Pereira por me ter aceitado enquanto aluna, por me ter permitido realizar este trabalho, por todas as oportunidades e ajudas.

Ao Professor Doutor Artur Figueirinha muito obrigada por toda a atenção, ajuda e paciência prestada. Agradeço também à Professora Doutora Teresa Batista pelas opiniões e ajuda sempre que necessitei.

Ao Mestre João Cotas, com quem passei a maioria do tempo na parte experimental, agradeço a amizade e ajuda crucial ao longo deste ano.

Agradeço à Marta Santos e à Patrícia Matos do laboratório de farmacognosia e à Ana Carvalho pela ajuda, conselhos e paciência. Agradeço também ao Tiago Morais do laboratório de macroalgas pela ajuda na colheita de algas.

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

Aos meus amigos, muito obrigada por todo o apoio, palavras, convívio e sorrisos que me ocasionaram. Deixo um especial obrigado à Mariana Valente, João Tabanez, Ana Correia e Mariana Rodrigues por toda a paciência e amizade.

Ao José Luís pelo companheirismo, paciência, palavras de força e pela sua presença constante.

Por fim, dedico este trabalho aos meus pais, por terem tornado tudo isto possível, pelo incentivo infinito, por nunca me deixarem desanimar nos momentos difíceis, por todos os ensinamentos e conselhos e por partilharem comigo todas as minhas vitórias, sem eles esta conquista jamais seria possível.

## Índice geral

Agradecimentos.....	3
Índice geral.....	4
Índice de figuras.....	6
Índice de tabelas.....	8
Abreviaturas.....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	12
Parte I .....	15
<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Macroalgas vermelhas - Rhodophyta.....</b>	<b>19</b>
2.1. Composição química.....	20
2.1.1. Carragenana.....	21
2.1.2. Pigmentos.....	23
2.1.2.1. Carotenoides.....	23
a) $\beta$ -caroteno.....	24
b) Luteína.....	24
c) Zeaxantina.....	25
2.1.2.2. Clorofilas.....	25
2.1.2.3. Ficobiliproteínas.....	26
2.2. Utilizações.....	27
<b>3. Gigartinales.....</b>	<b>27</b>
3.1. <i>Gigartina pistillata</i> .....	28
3.1.1. Ciclo de vida.....	29
<b>4. Espectroscopia vibracional (FTIR-ATR).....</b>	<b>30</b>
<b>5. Atividade antioxidante.....</b>	<b>31</b>
Parte II.....	33
<b>1. Objetivos.....</b>	<b>33</b>
<b>2. Material e métodos .....</b>	<b>35</b>
2.1. Amostragem e preparação das amostras.....	35
2.2. Métodos de extração.....	36
2.2.1. Extração alcalina a quente: polissacarídeos.....	37
2.2.2. Extração sequencial: extrato metanólico.....	39

2.3. Espectroscopia vibracional (FTIR-ATR): metodologia .....	40
2.4. Determinação da atividade antioxidante .....	41
2.4.1. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: polissacarídeos.....	41
2.4.2. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: extrato metanólico.....	43
2.4.3. FRAP (Ferric reducing ability of plasma) .....	44
2.4.4. Cromatografia de camada fina (TLC).....	45
<b>3. Resultados.....</b>	<b>48</b>
3.1. Rendimento dos extratos.....	48
3.2. Espectroscopia vibracional (FTIR-ATR).....	51
3.3. Determinação da atividade antioxidante.....	54
3.3.1. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: polissacarídeos.....	54
3.3.2. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: extrato metanólico.....	54
3.3.3. FRAP (Ferric reducing ability of plasma).....	55
3.3.4. Cromatografia de camada fina (TLC).....	56
<b>4. Discussão.....</b>	<b>59</b>
4.1. Rendimento dos extratos.....	59
4.2. Espectroscopia vibracional (FTIR-ATR).....	61
4.3. Determinação da atividade antioxidante.....	63
4.3.1. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: polissacarídeos .....	63
4.3.2. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: extrato metanólico.....	65
4.3.3. FRAP (Ferric reducing ability of plasma).....	66
4.3.4. Cromatografia de camada fina (TLC).....	67
<b>5. Conclusão e perspectivas futuras.....</b>	<b>69</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>71</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Fórmula estrutural do $\beta$ –caroteno.....	24
<b>Figura 2</b> – Fórmula estrutural da luteína.....	25
<b>Figura 3</b> – Fórmula estrutural da zeaxantina.....	25
<b>Figura 4</b> – Fórmula estrutural da clorofila <i>a</i> .....	26
<b>Figura 5</b> – Fórmula estrutural da ficocianina.....	26
<b>Figura 6</b> – Fórmula estrutural da ficoeritrina.....	26
<b>Figura 7</b> – Ciclo de vida de <i>Gigartina pistillata</i> (adaptado do ciclo de vida de <i>Chondrus crispus</i> ).....	30
<b>Figura 8</b> – Local de amostragem de <i>Gigartina pistillata</i> . a) Localização geográfica da praia; b) Praia de Buarcos; c) Armazenamento da alga para o transporte; d) Separação segundo as diferentes fases do ciclo de vida.....	36
<b>Figura 9</b> – Processo de extração alcalina a quente. a) Hidratação da alga seca com água destilada; b) Alga com mistura de metanol e acetona; c) Banho-maria a 80 °C; d) Bomba de vácuo; e) Filtração com um funil BN3 e um tecido branco; f) Carragenana extraída embebida em álcool etílico absoluto; g) Extrato final seco.....	38
<b>Figura 10</b> – Extração sequencial com metanol; a) Colocação do metanol na alga seca; b) Agitação da solução; c) Extrato metanólico; d) Concentração da amostra no evaporador rotativo; e) Extrato no evaporador rotativo.....	40
<b>Figura 11</b> – Desenho de cada tudo de ensaio na atividade com DPPH. <b>BC</b> : Branco do controlo; <b>C</b> : Controlo; <b>BT</b> : Branco da amostra do tetrasporófito; <b>T</b> : Amostra do tetrasporófito; <b>BGF</b> : Branco da amostra com o gametófito feminino; <b>GF</b> : Amostra do gametófito feminino; <b>BTNF</b> : Branco da amostra do talo não frutificado; <b>TNF</b> : Amostra do talo não frutificado.....	41
<b>Figura 12</b> – Ensaio da atividade antioxidante, método DPPH: a) Pesagem da carragenana; b) Montagem do ensaio; c) DPPH; d) Cores obtidas na reação.....	42

<b>Figura 13</b> – Ensaio de FRAP: a) Extrato metanólico com precipitado; b) Precipitado solubilizado em metanol; c) Reagente FRAP; d) Reação com o reagente FRAP e uma amostra.....	44
<b>Figura 14</b> – Técnica de TLC; a) Câmara cromatográfica com eluente; b) Amostras do precipitado para ensaio; c) Placa de sílica com a amostra aplicada; d) Eluente a correr na placa de sílica dentro da câmara cromatográfica.....	45
<b>Figura 15</b> – Rendimento dos extratos do gametófito feminino em <i>Gigartina pistillata</i> (média $\pm$ sd; Total: (N=7); verão: (N=4); outono: (N=3)).....	49
<b>Figura 16</b> – Rendimento dos extratos do tetrasporófito em <i>Gigartina pistillata</i> (média $\pm$ sd; verão: (N=4); outono: (N=3)).....	49
<b>Figura 17</b> – Rendimento dos extratos do talo não frutificado em <i>Gigartina pistillata</i> (média $\pm$ sd; verão: (N=4); outono: (N=3)).....	50
<b>Figura 18</b> – Rendimento total dos extratos relativos às três fases do ciclo de vida de <i>Gigartina pistillata</i> (média $\pm$ sd; verão: (N=4); outono: (N=3)).....	51
<b>Figura 19</b> – Espectro FTIR-ATR de carragenana híbrida <i>kappa/iota</i> com percursos <i>mu</i> e <i>nu</i> , do gametófito feminino de <i>Gigartina pistillata</i> .....	52
<b>Figura 20</b> – Espectro FTIR-ATR de carragenana híbrida <i>kappa/iota</i> com percursos <i>mu</i> e <i>nu</i> , do talo não frutificado de <i>Gigartina pistillata</i> .....	53
<b>Figura 21</b> – Espectro FTIR-ATR de carragenana híbrida <i>xi/lambda</i> , maioritariamente <i>lambda</i> , do tetrasporófito de <i>Gigartina pistillata</i> .....	53
<b>Figura 22</b> – Absorvâncias obtidas pelos extratos metanólicos correspondentes à fase sobrenadante (0,33 g alga/ mL) das três amostras em estudo (média; N=2).....	55
<b>Figura 23</b> – Absorvâncias obtidas pelos extratos metanólicos correspondentes ao precipitado (0,16 g alga/ mL) das três amostras em estudo (média; N=2).....	56
<b>Figura 24</b> – Perfil cromatográfico por TLC: a) Placa sem revelador; b) Placa revelada com DPPH que mostra perfil antioxidante (preparado com 2 mg de DPPH para 20 mL de metanol).....	57

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Tipos de carragenana (adaptada de Amimi <i>et al.</i> , 2001).....	22
<b>Tabela 2</b> – Tabela de identificação de carragenanas através de espectroscopia de infravermelhos (adaptada de Pereira <i>et al.</i> , 2009).....	31
<b>Tabela 3</b> – Percentagem de redução dos polissacarídeos (0,71 mg polissacarídeo/ mL) correspondentes às três amostras em estudo (média ± SD; N=3); ND: Sem atividade.....	54
<b>Tabela 4</b> – Percentagem de redução dos extratos metanólicos (0,47 g alga/ mL) correspondentes às três amostras em estudo (média ± SD; N=3).....	55

## **Abreviaturas**

**B** – Boro

**Cu** – Cobre

**DMRI** – Degeneração macular relacionada à idade

**DPPH** – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

**Fe** – Ferro

**FRAP** – Ferric reducing ability of plasma

**FTIR-ATR** – Fourrier transfor infrared - attenuated total reflectance

**GF** – Gametófito feminino

**Mn** – Magnésio

**Mo** – Molibedênio

**Ni** – Níquel

**R<sub>f</sub>** – Fator de retenção

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio

**SD** – Desvio padrão

**Se** – Selênio

**Sr** – Estrôncio

**T** – Tetrasporófito

**TLC** – Cromatografia de camada fina

**TNF** – Talo não frutificado

**UV** – Ultravioleta

**Zn** – Zinco

## Resumo

O meio marinho é um espaço repleto de diversidade, rico em organismos e em recursos naturais, sendo um foco na área da investigação científica.

As algas, são um tema bastante atual no que toca à diversidade do ambiente marinho. Estas caracterizam-se como sendo organismos talófitos (não possuem raízes, caules ou folhas), eucariotas e autotróficos, possuem clorofila *a* como o seu principal pigmento, não possuem tecidos ou órgãos especializados e podem ser encontradas maioritariamente em água (locais húmidos).

As algas são divididas em microalgas e macroalgas, sendo que macroalgas são as algas macroscópicas e, portanto, visíveis a olho nu, e são divididas e classificadas de acordo com a sua pigmentação: algas verdes – filo Chlorophyta; algas castanhas – filo Heterokontophyta, classe Phaeophyceae; e algas vermelhas – filo Rhodophyta. Estes organismos já são utilizados há várias décadas em vários países, no entanto, na Europa, a sua utilização tem vindo a aumentar. A maioria das algas marinhas são algas vermelhas. A *Gigartina pistillata* é uma alga vermelha, pertencente ao filo Rhodophyta e à ordem Gigartinales.

Um dos polissacarídeos mais importantes provenientes do filo Rhodophyta é a carragenana, substância mucilagínosa que se encontra na parede das algas vermelhas e que é o componente principal da parede celular e da matéria intercelular destes organismos.

Neste presente estudo, a carragenana e compostos polares foram extraídos e identificados, com o intuito de avaliar a sua atividade antioxidante para uma futura implementação nas indústrias alimentar e farmacêutica.

A extração alcalina a quente com a finalidade de obter extratos de carragenana, para cada fase do ciclo de vida de *Gigartina pistillata*. Os extratos foram pesados e o seu rendimento foi calculado através da fórmula do rendimento. Seguidamente foi feita a extração sequencial a fim de extrair compostos polares, obtendo-se um extrato metanólico do qual foram obtidas duas subfrações: sobrenadante e precipitado.

Posteriormente foi analisada a composição química dos extratos de carragenana através de espectroscopia vibracional FTIR-ATR que permitiu identificar os seus principais grupos funcionais e desta forma distinguir os diferentes tipos de

carragenanas: carragenana híbrida *kappa/iota* com precursores biológicos *mu* e *nu* e carragenana híbrida *xi/lambda*.

Numa outra fase do trabalho foi avaliada a atividade antiradicalar através da avaliação da capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) dos polissacarídeos e do extrato metanólico. Verificou-se que os polissacarídeos não apresentaram qualquer atividade antiradicalar, com exceção da amostra do gametófito feminino (1,70%). Relativamente ao extrato metanólico apenas as amostras do gametófito feminino (7,35%) e talo não frutificado (1,65%) apresentaram atividade antiradicalar.

A atividade redutora foi determinada pelo método FRAP (Ferric reducing ability of plasma) nos polissacarídeos, sobrenadante e precipitado. As amostras do precipitado revelaram maior atividade comparativamente às amostras do sobrenadante, destacando-se a amostra do gametófito feminino. Os polissacarídeos não apresentaram qualquer atividade.

Por último, foram identificados alguns dos pigmentos que compõem o extrato metanólico (precipitado), e que parecem contribuir para a atividade redutora da alga, através da aplicação da técnica de cromatografia de camada fina (TLC).

**Palavras-chave:** Rhodophyta, *Gigartina pistillata*, carragenana, FTIR-ATR, antioxidantes

## Abstract

The marine environment is a space full of diversity, rich in organisms and natural resources and it is a focus of scientific research.

Algae are a very current theme regarding to the diversity of the marine environment. These eukaryotic and autotrophic organisms are characterized by the absence of roots, stems and leaves. Chlorophyll *a* is their main pigment and they have no specialized tissues or organs. Algae can be found mainly in water and they are divided into microalgae and macroalgae. Macroalgae are macroscopic, lying on the marine environment and they are divided and classified according to their pigmentation: green algae – phylum Chlorophyta; brown algae – phylum Heterokontophyta, Phaeophyceae class; and red algae – phylum Rhodophyta. These organisms have been used for several decades in several countries, however, in Europe its use has been increasing. Most algae are red algae. *Gigartina pistillata* is a red algae belonging to the Rhodophyta phylum and to the Gigartinales order.

One of the most important polysaccharides from the Rhodophyta phylum is the carrageenan, a mucilaginous substance found in the walls of red algae being a major component of the cell wall and intercellular substance of these organism.

In this study carrageenan and polar compounds were extracted and identified in order to evaluate antioxidant activity for future implementation in food and pharmaceutical industries.

The alkaline extraction was made in order to obtain carrageenan extracts, for each phase of the life cycle of *Gigartina pistillata*. The extracts were weighed and their yield was calculated by the performance formula. Then, the sequential extraction was made to extract polar compounds, which produced a methanolic extract which was fractionated in supernatant and precipitate.

Finally, the chemical composition of the extracts was analyzed through vibrational spectroscopy FTIR-ATR that identifies the types of chemical bonds of the compounds, getting different types of carrageenan: hybrid carrageenan *kappa/iota* with biological precursors *mu* and *nu* and hybrid carrageenan *lambda/xi*.

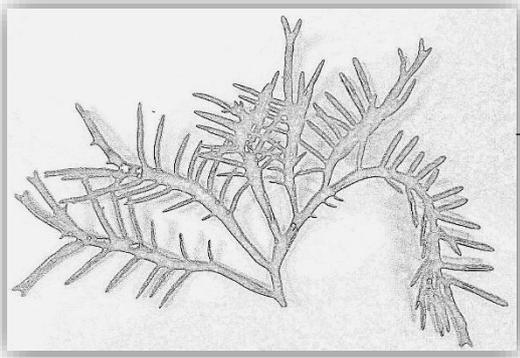
In another stage, anti-radical potential of polysaccharides and methanolic extracts was evaluated by assessing the ability of the radical reduction of 2,2-diphenyl-1-picryl-

hydrazyl (DPPH). It was found that polysaccharides showed no antiradical activity, except for the sample with the female gametophyte (1.70%). Regarding the methanol extract only the female gametophyte samples (7.35%) and stem not fruited (1.65%) showed antiradical activity.

The reducing activity was determined by the FRAP method (Ferric reducing ability of plasma) in the polysaccharides, supernatant and precipitate. Samples of the precipitate showed higher activity compared to supernatant samples, highlighting the sample of female gametophyte. The polysaccharides didn't show any activity.

Finally, some of the pigments that compose the methanolic extract (precipitate) were identified by thin layer chromatography (TLC) and appeared to contribute to the reducing activity of the algae.

**Keywords:** Rhodophyta, *Gigartina pistillata*, carrageenan, FTIR-ATR, antioxidants



---

## 1. Introdução

## 1. Introdução

A palavra azul é diversas vezes ligada ao céu e ao mar, relembrando o facto de o planeta Terra apresentar uma coloração maioritariamente azul.

Os oceanos exibem uma fonte viva de diversidade biológica, água, produção de biomassa, oxigénio, além de outros aspetos importantes para a saúde humana. A qualidade dos oceanos é assim fundamental para a manutenção do planeta (Moura *et al.*, 2011).

Devido a dificuldades económicas que surgiram durante anos, os habitantes das costas europeias viram no mar um meio de subsistência e comércio. Mudaram assim a visão em relação ao mar, um meio que poderia vir a suplementar os recursos terrestres (Campbell & Nicholls, 1994). No entanto, nos últimos tempos, têm sido claras as grandes alterações do ambiente marinho, causadas pelas atividades derivadas da ação humana, sendo que as respostas destas alterações levam a impactos nos processos ecológicos, pondo em risco de extinção várias espécies sensíveis (Moura *et al.*, 2011).

A costa portuguesa suporta extensões rochosas, muitas delas ricas em algas. Grande parte das zonas costeiras encontram-se muito expostas à ação do mar (Lewis, 1964) e as algas do patamar médio litoral localizam-se maioritariamente no horizonte inferior, demarcado pelo nível mínimo da maré baixa (Múrias, 1994; Pereira, 1996).

A observação do meio marinho, da sua grandeza e diversidade levou os cientistas a iniciar o estudo da vida marinha, começando com animais, passando por microrganismos, plantas (algas) entre outros. Houve, portanto, uma grande necessidade de criar vários ramos desta ciência. Aquela que se dedica aos estudos de algas designa-se por ficologia ou algologia, que deriva do grego *phycos*, que significa “algas” (Lee, 2008).

O conceito de alga é extremamente vasto. No geral, algas são organismos talófitos (não possuem raízes, caules ou folhas) eucariotas, autotróficos, que possuem clorofila *a* como o seu principal pigmento, não possuem tecidos ou órgãos especializados e podem ser encontradas maioritariamente em água (locais húmidos); porém, ocorrem também em vários outros locais, nomeadamente em altas montanhas cobertas de neve podendo assim sobreviver a temperaturas gélidas e raios UV, também se encontram em locais onde vivem junto a líquenes, em solos desérticos e até em fontes termais (Lee, 2008).

As algas são produtores primários na maioria dos habitats, produzindo matéria orgânica para os restantes seres vivos através de vários fatores como a luz solar, o dióxido de carbono e água, no processo de fotossíntese. Para além de constituírem a fonte básica de alimentos, estes organismos produzem também o oxigénio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores (Lee, 2008). Em suma, estes seres desempenham um papel ecológico fundamental, não só nas cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos, como também na exibição de uma porção significativa de biodiversidade mundial.

As algas são divididas em microalgas e macroalgas. Consideram-se macroalgas as algas que são macroscópicas, ou seja, que são visíveis a olho nu e que se encontram em meio marinho, apesar de existirem espécies de água doce. A diversidade destes organismos é extraordinária ostentando uma infinidade de formas, tamanhos e cores, conforme a sua estrutura, complexidade e adaptação ao meio. Os seus talos mostram diversas morfologias: laminares, tubulares, cilíndricos e até incrustantes (Pereira, 2010).

As macroalgas são divididas e classificadas de acordo com a sua pigmentação: filo Chlorophyta (algas verdes), filo Heterokontophyta ou Ochrophyta (classe Phaeophyceae – algas castanhas) e filo Rhodophyta (algas vermelhas) (Pereira, 2009).

A utilização de algas é relativamente recente na Europa, contudo, em países Asiáticos a sua utilização advém de tempos antigos, sendo que cerca de quatro milhões de toneladas de macroalgas são colhidas anualmente em todo o mundo, encontrando-se nos primeiros lugares como principais produtores, a China e o Japão, seguidos pelos Estados Unidos e Noruega (Dapper *et al.*, 2014). Estes organismos têm sido muito apreciados durante os últimos anos por serem uma fonte de compostos naturais, tendo, portanto, elevado potencial e interesse em diversas áreas. Aproximadamente 70% da biosfera é detentora de biomas marinhos, os quais contêm uma diversidade taxonómica e bioquímica sendo as macroalgas marinhas uma importante fonte de matérias-primas e de moléculas biologicamente ativas. A partir das algas marinhas são obtidos produtos indispensáveis à vida do homem, movimentando uma economia com valores que ultrapassam alguns milhões de dólares anuais. Muitos dos compostos que existem nas macroalgas marinhas são utilizados na indústria farmacêutica, cosmética, alimentar e agrícola (Dapper *et al.*, 2014).

Portugal continental é um país pequeno, que se localiza a sudoeste da Península Ibérica, possuindo uma extensa costa com cerca de 845 km de extensão, composta por areais e costas rochosas. Segundo Ardré (1970; 1971) foram identificadas e descritas 246 espécies de Rhodophyta, 98 Phaeophyceae e 60 Chlorophyta. A costa portuguesa é assim detentora de uma grande diversidade de macroalgas marinhas, exibindo um crescimento no número de algas vermelhas (número de espécies) e um decréscimo do número de algas castanhas (número de espécies), do Norte para Sul de Portugal (Palminha, 1951; Mesquita Rodrigues, 1963; Ardré, 1970).

Esta diversidade de algas deve-se ao clima do território português, e à influência que diferentes massas de água têm na costa. O oceano Atlântico banha o Norte, predominando uma flora de climas frios; já o Sul é banhado pelo Mediterrâneo, existindo assim uma maior quantidade de algas típicas de climas mais quentes. O centro, por sua vez, conta com a influência de ambas as zonas, possuindo assim uma grande diversidade de algas dos diferentes climas. Contudo, a temática das alterações climáticas e o consequente aquecimento das águas, tem vindo a aumentar, reduzindo assim o número de espécies de algas e alterando os padrões que antes existiam, como é o exemplo do deslocamento de espécies de climas mais quentes, para zonas características de climas mais frios. Uma drástica consequência deste fenómeno será o desaparecimento de algas típicas de zonas frias na costa portuguesa (Pereira, 2005, 2008).

A fim de classificar toda a diversidade de espécies de algas existentes ao longo da costa, esta divide-se em três zonas: zona supralitoral (localiza-se na parte superior mais perto do areal, onde fica exposta durante as marés baixas, e onde se encontram organismos com resistência à dessecação), a zona médio litoral (que se localiza nos limites máximo e mínimo, que são atingidos pelas ondas e marés, na preia-mar e baixa mar (o local de poças de marés é mais adequado à colheita de algas pelo fácil acesso) e por fim a zona infralitoral (encontra-se sempre submersa, possuindo condições muito estáveis o que gera uma enorme biodiversidade mas cuja colheita requer equipamentos de mergulho devido à profundidade). Esta divisão da costa permitiu caracterizar de uma melhor forma as espécies de cada zona, assim como facilitar a sua localização (Almeida, 2007; Saá, 2002).

O meio marinho é reservatório dos mais diversos compostos bioativos. As suas particularidades como a salinidade, temperatura, pressão e incidência luminosa conferem potencial a estes compostos para serem aplicados em alimentação para conservação e fortificação de alimentos devido aos seus detalhes particulares (Freitas *et al.*, 2012).

Deste modo, ao longo dos anos, o estudo da vida marinha proporcionou a descoberta de novos compostos bioativos que têm estimulado diversas áreas da biotecnologia. Em cerca de 220 000 substâncias naturais registadas, apenas 10% são de origem marinha. Isto pode ser explicado pelo fato de não haver um estudo intenso nos organismos marinhos, devido a alguma fragilidade existente relativamente ao seu conhecimento e a dificuldades na colheita de algumas amostras (Ainane, 2011). No entanto, atualmente, tem-se vindo a verificar um interesse crescente no estudo das algas, que devido à sua abundância têm sido alvo de vários trabalhos de investigação que comprovam o seu grande potencial, especialmente por parte da diversidade de metabolitos secundários. Além do seu valor nutritivo (fibras, proteínas, conteúdo mineral), as algas não mostraram até então riscos de alergia e toxicidade. Isto levou, a que nas últimas três décadas, a descoberta de metabolitos com atividades biológicas a partir de macroalgas aumentasse expressivamente (Fleurence *et al.*, 2012).

As algas constituem um alimento natural com elevado valor nutritivo e muito baixo em calorias. Possuem diversas proteínas com todos os aminoácidos essenciais, minerais, vitaminas, incluindo a vitamina B12 (ausente nos vegetais superiores), fibras e baixo conteúdo em gorduras (Pereira, 2007). Existem agentes terapêuticos naturais, isolados de algas, que contêm classes de compostos como terpenóides, ácido ribonucleico, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, entre outros (Fusetani, 2000) com várias atividades biológicas, desde antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, anti-maláricas, antitumorais, anti-inflamatórias entre outras (Mayer *et al.*, 2009).

Neste intuito, a indústria farmacêutica, cosmética e alimentar, focam cada vez mais os seus esforços na descoberta de novas substâncias naturais, que sejam cada vez mais eficientes e menos nocivas.

## 2. Macroalgas vermelhas: Rhodophyta

As algas vermelhas são provavelmente o grupo mais antigo de algas eucarióticas e os mais prováveis descendentes diretos de um cyanome (pigmentos de algas simbióticas) de Glaucophyta, tendo estas algas presumivelmente evoluído de um local anteriormente ocupado por cianobactérias que realizam fotossíntese juntamente com as algas verdes (Lee, 2008).

A maioria das algas marinhas são algas vermelhas, existindo mais algas vermelhas do que todas as outras algas marinhas associadas. As algas vermelhas ocorrem em todas as latitudes, contudo há uma mudança relativamente à sua abundância do equador para mares mais frios, existindo, portanto, poucas espécies nas regiões polares e subpolares onde predominam as algas verdes e castanhas; porém, em regiões tropicais e temperadas o número de algas vermelhas supera as restantes (Lee, 2008).

Neste filo existem cerca de 2500 a 6000 espécies, em aproximadamente 670 géneros, na sua grande maioria marinhas (Woelkerling, 1990).

O filo Rhodophyta é facilmente distinguido dos demais devido a várias características, tais como: ausência de células flageladas, presença de clorofila *a* e *d*, pigmentos acessórios chamados de ficobilinas (ficoeritrina e ficocianina), amido florídeo como produto de armazenamento, tilacoides que ocorrem individualmente nos plastídios sem retículo endoplasmático externo, ausência de parênquima e presença de conexões *pit* entre as células (Woelkerling, 1990; Grossman *et al.*, 1993; Gurgel and Lopez, 2007).

As algas vermelhas podem ser separadas em três componentes principais, um conjunto unicelular com reprodução por divisão celular binária, um outro multicelular onde um ramo carpogonial está ausente ou incipiente (Bangiophyceae) e por fim um conjunto multicelular com ramos carpogoniais bem desenvolvidos (Florideophyceae) (Heimann, 2012).

Da parede celular das algas vermelhas podem ser extraídos polissacarídeos que têm a propriedade de formar gel em solução aquosa. Devido às suas propriedades gelificantes, estabilizantes e emulsionantes, os ficocolóides passaram a ter grande aplicação na indústria alimentar, farmacêutica e biotecnológica.

O agar e a carragenana são os exemplos destes ficocolóides extraídos através da parede das algas deste filo. O agar é extraído de alguns géneros de algas vermelhas,

especialmente *Gelidium*, *Gracilaria* e *Gracilariopsis*. Cerca de 90% da produção de agar é usada na indústria alimentar como estabilizante e espessante em recheios de tortas, bolos, gelados, iogurtes entre outros. Os 10% restantes são para uso bacteriológico (na detecção de bactérias) e biotecnológico (agarose) sendo que o seu preço é mais elevado devido aos processos de purificação. Já a carragenana provém também de algas deste filo sendo a *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma denticulatum* algas muito comuns para este efeito. As principais aplicações da carragenana também estão relacionadas com a indústria alimentar na produção de achocolatados, queijos, gelatinas e produtos à base de carne (presunto, salsichas, etc.).

Como já referido anteriormente, no que toca a pigmentos, as algas vermelhas são caracterizadas pela presença de ficobilinas: a ficoeritrina, presente nas células e responsável pela coloração avermelhada destes organismos e a ficocianina. Possuem também clorofilas *a* e *d*, carotenoides como  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina (Pereira & Correia, 2015).

## 2.1. Composição química

As macroalgas vermelhas são muito afamadas pelo seu conteúdo em polissacarídeos e são as fontes mais ricas em polissacarídeos sulfatados. Estes compostos são recursos extremamente valiosos para a indústria alimentar pois são usados como aditivos pelas suas capacidades gelificantes e espessantes (*ex.* agar e carragenana) e podem ser encontrados segundo os seguintes códigos europeus: agar—E406, carragenana—E407, carragenana semi-refinada ou “alga *Eucheuma* processada”—E407A (Pereira *et al.*, 2013).

O agar é muito utilizado como suporte inerte para meios de cultura bacterianos. No entanto, possui outras aplicações enquanto agente gelificante na área alimentar. O agar pode ser encontrado numa grande diversidade de algas vermelhas, contudo, as mais relevantes a nível industrial são as algas do género *Gelidium*, *Pterocladia*, *Gelidiella*, e *Gracilaria* (Pereira *et al.*, 2003; Pereira, 2011; Pereira *et al.*, 2013).

Pode dizer-se que os polissacarídeos mais importantes que provêm do filo Rhodophyta são, portanto, o agar e a carragenana. Neste trabalho será dado ênfase à carragenana por constituir o seu principal objeto de estudo.

### 2.1.1. Carragenana

A carragenana é uma substância mucilaginosa que se encontra na parede das algas vermelhas da ordem Gigartinales, sendo o componente principal da parede celular e da matéria intercelular das algas desta ordem. O teor deste polissacarídeo varia consoante a estação do ano, a espécie, o meio e a idade da alga. O nome “carragenana” deriva da palavra “carrageen” que significa “alga” ou do nome “carraghen”, que dá nome a um distrito irlandês onde se apanha a alga vermelha *Chondrus crispus*.

Na década de 50, do século passado, teve lugar o início do fracionamento dos extratos brutos deste polissacarídeo (Smith *et al.*, 1955), permitindo caracterizar os diferentes tipos de carragenana; demarcou-se também nesta mesma altura a estrutura molecular das carragenanas (Oneill, 1955), nomeadamente a estrutura da 3,6-anidro-D-galactose presente na carragenana *kappa*, e a ligação entre os anéis de galactose e anidrogalactose.

Os polímeros deste polissacarídeo distinguem-se do agar pelo carácter iónico, devido ao teor em radicais  $\text{OSO}_3^-$ .

Em estado puro e seco a carragenana encontra-se sob a forma de um pó, sem cheiro e sem sabor. Na forma de gel ou solução apresenta-se transparente e quando adicionada a outras soluções não altera o seu sabor ou a cor original. Em solução, os polímeros da carragenana atuam como coloides hidrófilos aniónicos (Ribier & Godineau, 1984; Craigie, 1990). Estas poligalactanas sulfatadas exibem uma estrutura linear que se encontra formada por resíduos de galactose com alternância de ligações  $\alpha$  (1-3) e  $\beta$  (1-4) (Anderson *et al.*, 1965; Rinaudo, 2002).

As cadeias moleculares da carragenana são constituídas a partir dum monómero, a galactose, e contêm uma forte proporção de ésteres sulfato ( $\text{OSO}_3^-$ ), que conferem carga negativa ao composto. Em solução aquosa, é fixada uma molécula de água ao carbono 1 (C1), pela galactose formando uma estrutura instável, seguidamente dá-se a auto-ciclização em forma de piranose a fim de formar uma ponte de oxigénio entre o C1 e o C5. Este processo de ciclização ocorre sob a forma de  $\beta$ -D-galactose, sob a forma de  $\alpha$ -D-galactose, ou ainda sob a forma de 3,6 anidro- $\alpha$ -D-galactose, através de uma ponte de oxigénio entre o C3 e C6 da  $\alpha$ -D-galactose (Perez *et al.*, 1992).

A carragenana é uma galactana sulfatada, linear e solúvel em água. A sua constituição alterna entre unidades do tipo  $\beta$ -D-galactose (unidades G) e  $\alpha$ -D-galactose

(unidades D) ou 3,6-anidrogactose (unidades A) formando um dissacarídeo que se encontra na estrutura de cada carragenana.

As carragenanas mais comuns encontram-se identificadas através de uma letra do alfabeto grego (Craigie, 1990; Chopin *et al.*, 1999) (Tabela 1).

A nível comercial a carragenana *iota* ( $\iota$ ), *kappa* ( $\kappa$ ) e *lambda* ( $\lambda$ ) são as mais importantes e, segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e o código de letras, são representadas por carragenose 2,4'-dissulfato (G4S-DA2S), carragenose 4'-sulfato (G4S-DA) e carragenana 2,6,2'-trissulfato (G2S-D2S,6S), respetivamente.

A carragenana *lambda* é uma carragenana espessante/viscosificante, já por sua vez, as carragenanas *iota* e *kappa* são gelificantes (van de Velde *et al.*, 2002).

**Tabela 1-** Tipos de carragenana (adaptada de Amimi *et al.*, 2001).

Ligação (1-3)	Ligação (1-4)	Símbolo grego	
<b>G4S<sup>e</sup></b>	<b>DA</b>	$\kappa$ (kappa)	Família <i>kappa</i>
<b>G4S</b>	<b>DA2S</b>	$\iota$ (iota)	
<b>G4S</b>	<b>D6S</b>	$\mu$ (mu)	
<b>G4S</b>	<b>D2S,6S</b>	$\nu$ (nu)	
<b>G4S</b>	<b>D2S</b>	$\omicron$ (omicron)	
<b>G</b>	<b>DA</b>	$\beta$ (beta)	Família <i>beta</i>
<b>G</b>	<b>D6S</b>	$\gamma$ (gama)	
<b>G6S</b>	<b>DA</b>	$\omega$ (Omega)	
<b>G6S</b>	<b>D6S</b>	$\psi$ (psi)	
<b>G</b>	<b>D2S,6S</b>	$\delta$ (delta)	Família <i>lambda</i>
<b>G</b>	<b>DA2S</b>	$\alpha$ (alpha)	
<b>G2S</b>	<b>D2S,6S</b>	$\lambda$ (lambda)	
<b>G2S</b>	<b>DA2S</b>	$\theta$ (theta)	
<b>G2S</b>	<b>D2S</b>	$\xi$ (xi)	
<b>GP,2S</b>	<b>D2S</b>	$\pi$ (pi)	

Durante os últimos anos, o mercado mundial de carragenanas tem aumentado cerca de 3% ano, com um volume total de aproximadamente 310 milhões de euros em 2000 (McHugh, 2003).

Para além dos polissacarídeos, as algas vermelhas possuem igualmente pigmentos fotossintéticos na sua constituição.

### 2.1.2. Pigmentos

Os pigmentos fotossintéticos são substâncias capazes de absorver luz visível utilizada no processo fotossintético, sendo que as clorofilas (*a*, *b*, *c*, e *d*), os carotenoides (carotenos e xantofilas) e as ficobilinas (ficoeritrina e ficocianina) são os mais importantes.

As clorofilas são pigmentos fotossintéticos de cor verde que aparecem em todos os eucariontes fotossintéticos e cianobactérias. Relativamente aos carotenoides, os carotenos são alaranjados e encontram-se em todos os organismos fotossintéticos, com exceção das bactérias. Já as xantofilas, de cor amarela, encontram-se nas algas castanhas e nas diatomáceas.

A ficoeritrina, de cor avermelhada e a ficocianina, de cor azul, pertencem às ficobilinas e estão presentes nas algas vermelhas e nas cianobactérias.

Os pigmentos fotossintéticos apresentam estruturas diferentes, captando radiações de diferente comprimento de onda, o que fundamenta a coloração diferente entre eles. O padrão de absorção de cada tipo de pigmento é denominado por espectro de absorção. As radiações mais eficientes para o fenómeno fotossintético situam-se nas faixas do espectro luminoso vermelho-alaranjada e azul-violeta. A clorofila *a* funciona como pigmento fotossintético primário ou fundamental, sendo essencial para o processo fotossintético nos organismos em que se encontra. As clorofilas *b* e *c* e *d*, os carotenoides e as ficobilinas são pigmentos fotossintéticos acessórios ou auxiliares que não substituem o papel da clorofila *a*.

#### 2.1.2.1. Carotenoides

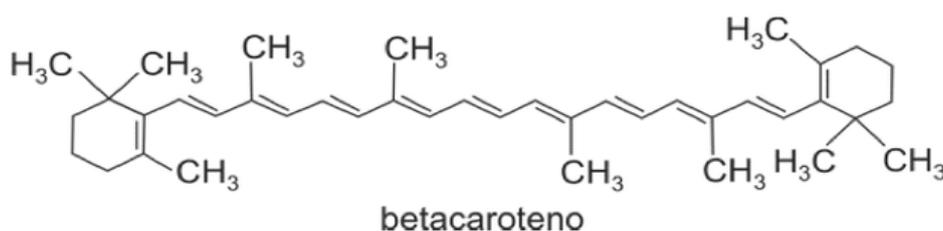
Os carotenoides são compostos altamente explorados pela indústria alimentar devido à sua cor e capacidade antioxidante como no caso do  $\beta$ -caroteno. Estudos recentes revelam que estes pigmentos possuem atividade antitumoral, induzem apoptose em células cancerosas e têm efeitos anti-inflamatórios (Dufossé *et al.*, 2005; D'Orazio *et al.*, 2012).

##### a) $\beta$ -caroteno

O  $\beta$ -caroteno (Figura 1) mais utilizado é o sintético, no entanto, os produtores e consumidores estão cada vez mais a exigir a versão biológica produzida naturalmente a

nível industrial por *Dunaliella salina* (Chlorophyta) (Spolaore *et al.*, 2006; Milledge, 2010).

No campo da saúde humana, o  $\beta$ -caroteno apresenta alguns benefícios: apresenta atividade provitamina A, consegue manter-se bioativo onde a vitamina C é mais limitada devido às baixas taxas de oxigênio presentes, modula a expressão gênica quando induzido por UVA e protege a pele e os olhos de foto-oxidação contraluz UV prevenindo algumas doenças como cataratas (Dufossé *et al.*, 2005).

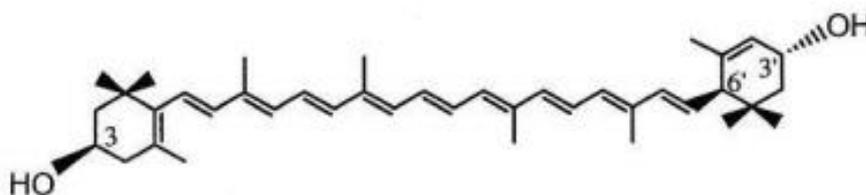


**Figura 1** – Fórmula estrutural do  $\beta$  -caroteno. (Fonte: <http://educacao.globo.com/provas/fuvest-2013/questoes/11.html>).

## b) Luteína

A luteína (Figura 2), carotenoide de pigmentação amarela, é um forte antioxidante que previne danos causados por radicais livres nos tecidos, protegendo as células dos danos oxidativos e, conseqüentemente, reduz o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas, uma vez que o stresse oxidativo e a atuação dos radicais livres são os maiores fatores associados à iniciação e propagação do desenvolvimento destas doenças. Segundo Dagnelie *et al.* a luteína protege os fotorreceptores da fóvea ao filtrar a luz azul prejudicial à mácula, reduzindo em 40% a incidência da luz que causa danos na retina. A perda da sensibilidade visual, ocorrida em pessoas com idade avançada e baixa densidade do pigmento macular nos tecidos oculares, pode ser a precursora de algumas doenças dos olhos, incluindo a degeneração macular relacionada à idade (DMRI). Dos principais benefícios associados à luteína, além das evidências na redução do risco de desenvolvimento da DMRI, destacam-se os efeitos benéficos na proteção contra a aterosclerose, as cataratas, o cancro e outras doenças. Estudos realizados com animais e humanos demonstram que a concentração de luteína no sangue e nos tecidos está estreitamente relacionada com o consumo de alimentos

ricos neste carotenoide, tais como frutas e hortaliças de folhas verdes (Stringheta *et al.*, 2006).

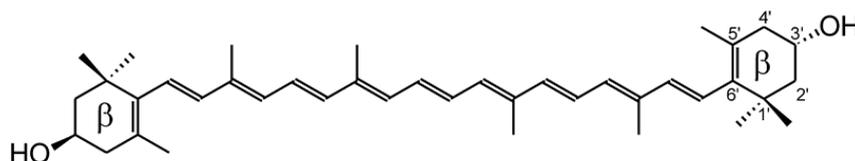


**Figura 2** – Fórmula estrutural da luteína. (Fonte: <http://apokura.blogspot.pt/2012/04/luteina-e-doenca-de-stargardt.html>).

### c) Zeaxantina

A zeaxantina (Figura 3) é uma xantofila com pigmentação laranja-avermelhada, encontrada em vegetais assim como em algas, nomeadamente vermelhas.

Esta xantofila parece apresentar proteção contra o cancro, e os possíveis mecanismos de proteção são mediados por sequestro de radicais livres, modulação do metabolismo do cancro, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular por via de retinoides, estimulação da comunicação entre as células e aumento da resposta imune. Estes carotenoides parecem também exercer uma ação protetora contra degeneração macular e cataratas (Ambrósio *et al.*, 2006).



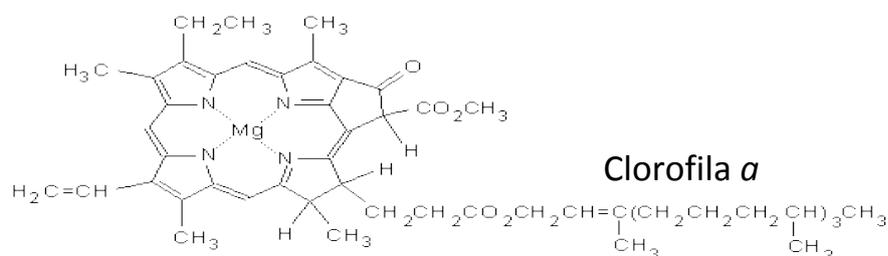
**Figura 3** – Fórmula estrutural da zeaxantina. (Fonte: <https://es.wikipedia.org/wiki/Meso-zeaxantina>).

#### 2.1.2.2. Clorofilas

Foi a partir da década de 1980 que as pesquisas sobre a atividade antioxidante e quimo preventiva da clorofila atingiram maior expressão. A clorofila apresenta atividade pró-oxidante em óleos e gorduras comestíveis (Gomes *et al.*, 2003). Ainda que as clorofilas façam parte da constituição das algas, estas também são facilmente encontradas nas plantas. Existem vários tipos de clorofilas (*a*, *b*, *c* e *d*) sendo que a clorofila *a* (Figura 4) funciona como pigmento fotossintético primário ou fundamental,

sendo essencial para o processo fotossintético nos organismos em que se encontra e as clorofilas *b* e *c* e *d*, são pigmentos fotossintéticos acessórios ou auxiliares.

As clorofilas são bastante apreciadas na indústria alimentar pois a sua utilização direta ou em mistura com outros pigmentos permite obtenção de colorações bastante apelativas.

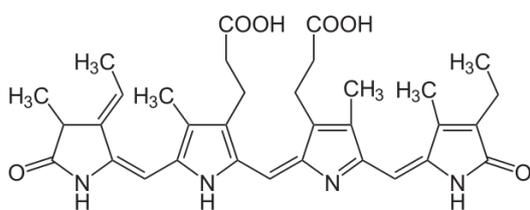


**Figura 4** – Fórmula estrutural da clorofila *a*. (Fonte: <http://www.infoescola.com/plantas/clorofila/>).

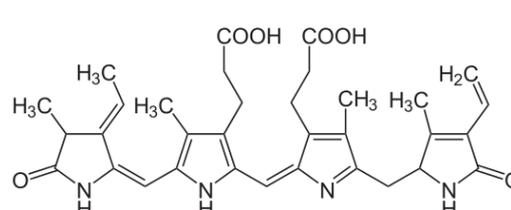
### 2.1.2.3. Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são pigmentos que conferem a cor azulada (ficocianina) (Figura 5) à maioria dos organismos do grupo das cianobactérias como o caso de *Arthrospira* sp. e a cor avermelhada (ficoeritrina) (Figura 6) às algas do grupo Rhodophyta como no caso de *Porphyridium* sp. (Spolaore *et al.*, 2006). Estes pigmentos naturais e biológicos são de extrema relevância no processamento alimentar (Milledge, 2010) sendo de significativo interesse a substituição de pigmentos sintéticos pelos naturais também na indústria cosmética e farmacêutica.

Além destas utilizações, algumas ficobiliproteínas têm características que as tornam excelentes ferramentas para investigação, pois apresentam fluorescência a comprimentos de onda conhecidos sendo aplicadas em estudos de imunologia enquanto marcadores para fins de investigação (Spolaore *et al.*, 2006).



**Figura 5** – Fórmula estrutural da ficocianina. (Fonte: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phycocyanobilin2.svg>).



**Figura 6** – Fórmula estrutural da ficoeritrina. (Fonte: <https://gl.wikipedia.org/wiki/Ficoeritrina>).

## **2.2. Utilizações**

As algas vermelhas são extremamente importantes para a economia, pois os polissacarídeos extraídos da parede celular podem ser usados como emulsionantes em tintas, cosméticos e produtos farmacêuticos bem como na alimentação como espessante do leite e de gelados e são até utilizados na cerveja.

Uma utilização particular é como gelificante em pudins, molhos instantâneos e cremes, não havendo assim necessidade de refrigeração (Lee, 2008). Têm também aplicações na área da medicina, por exemplo como inibidores da replicação do vírus de imunodeficiência humana (HIV) entre outras utilizações da carragenana (Spieler, 2002; Smit, 2004). Além disso, algumas destas algas são comercializadas e consumidas como vegetais.

Existem também as algas coralináceas (algas coralininas) que são igualmente algas vermelhas que precipitam nas suas paredes celulares o carbonato de cálcio e magnésio, sob a forma de cristais de calcite. Os fundos do mar resultam da acumulação de talos ramificados e livres, de algas coralininas pertencentes a géneros e espécies diferentes dependendo das regiões de ocorrência nos oceanos. Estas algas são essenciais ainda para a cimentação, indispensável para a formação e a sobrevivência dos recifes de coral. Como estas algas são constituídas basicamente por carbonato de cálcio e magnésio, e contêm ainda mais de 20 oligoelementos presentes em quantidades variáveis, como Fe, Mn, B, Ni, Cu, Zn, Mo, Se e Sr, tornam-se numa grande fonte de micronutrientes para as plantas e animais, que os assimilam facilmente (Dias, 2001).

Estimam-se cerca de 24 espécies usadas na medicina tradicional, 25 espécies na agricultura em rações e adubos e cerca de 12 espécies cultivadas em “agronomia marinha”. Estes dados são referentes aos anos 1994/95 (Zemke-White e Ohno, 1999).

## **3. Gigartinales**

Espécies da ordem Gigartinales apresentam um filamento feminino especializado, um ramo corpogonial.

O gâmeta feminino (carpogónio) apresenta tricogínio, que é uma protuberância responsável por receber os gâmetas masculinos (espermácio). Dentro do cistocarpo ocorre germinação do zigoto *in situ*, formando-se grupos de esporos (carpósporos) ou

uma geração parasita do gametófito feminino que produz carpósporo (carposporócito) (Gurgel & Lopez, 2007). O cistocarpo é composto pelo carposporófito juntamente com todo o tecido haploide estéril de proteção do gametófito feminino rodeando-o e interagindo com ele (pericarpo). Os carpósporos desenvolvem o tetrasporófito, que pode ser morfológicamente semelhante ou diferente, através do gametófito. Tetrasporófitos produzem tetrasporangia através de meiose que libertam tetrásporos onde cada um dá origem a um gametófito haploide masculino ou feminino (Gurgel & Lopez, 2007). A maioria das algas vermelhas apresenta uma alternância trifásica de gerações entre carposporófito, tetrasporófito e gametófito (as duas últimas podem ser isomórficas ou heteromórficas). Além disso, grandes variações no histórico de vida estão presentes entre os membros deste grupo que podem ser úteis para a caracterização taxonômica. Contudo, a reprodução sexuada pode estar ausente em alguns membros.

Segundo os sites especializados em macroalgas, *Algaebase*, (<http://algaebase.org/>) e MACOI (<http://macoi.ci.uc.pt/>) a alga *Gigartina pistillata* pode ser classificada taxonomicamente do seguinte modo:

**Reino:** Plantae

**Filo:** Rhodophyta

**Classe:** Florideophyceae

**Ordem:** Gigartinales

**Família:** Gigartinaceae

**Gênero:** *Gigartina*

**Espécie:** *Gigartina pistillata*

**Sinónimos:** *Fucus gigartinus* Linnaeus 1759 *Fucus oederi* Esper 1802 *Gelidium gigartinum* (Linnaeus) Lyngbye 1819 *Sphaerococcus gigartinus* var. *costatus* Suhr 1834.

### **3.1. *Gigartina pistillata***

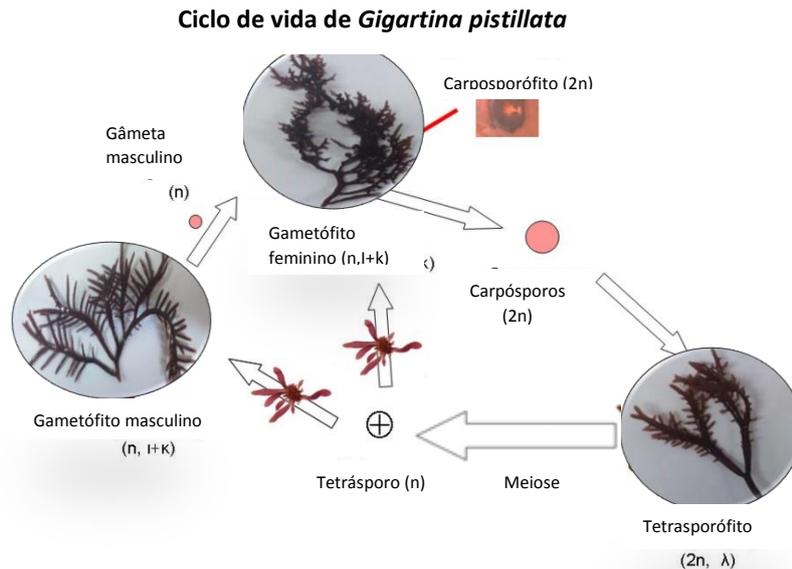
A *G. pistillata* pertence ao gênero *Gigartina* (Kim, 1976; Hommersand *et al.*, 1993) e apresenta uma consistência cartilaginosa/elástica, de coloração vermelha escura. O talo tem até 15 cm de comprimento, com várias ramificações dicotômicas num plano, a fronde é comprimida com ápices pontiagudos e fixa por um pequeno disco. No talo existe uma zona central com elementos estrelados e uma zona cortical de pequenas células densas, muito pigmentadas que formam ramos (Heimann, 2012).

Pode encontrar-se no litoral médio e inferior de costas semi-expostas e expostas sendo tolerante à cobertura com areia.

Os cistocarpos presentes no gametófito feminino ao início não se encontram projetados da superfície do talo, apenas na fase final do desenvolvimento, sendo usualmente sésseis e podendo ter pedúnculo numa posição terminal. Os tetrásporos são libertados e uma superfície fica exposta e é depois consertada pela proliferação de células subcorticais (Hommersand *et al.*, 1992; Pereira, 2004). Na fase do gametófito e tetrasporófito a região da medula é formada por células em forma de estrela e a delimitação do córtex e da medula não é bem definida. No final da diferenciação de tetrásporos, a quantidade de amido florídeo é mais reduzida, o que é indicativo de que este polissacarídeo é usado na síntese de componentes da estrutura da parede celular.

### **3.1.1. Ciclo de vida**

*G. pistillata* tem um ciclo de vida trifásico isomórfico (Hommersand *et al.*, 1992) e compreende três fases distintas: gametófitos haploides (masculino e feminino, separadamente) a fase diploide (carposporófito) e outra fase diploide (tetrasporófito) (Figura 7). A estrutura masculina, espermatângio produz espermácios ( $n$ ) que são imóveis, e são transportados pela água. A estrutura feminina, carpogónio, desenvolve um filamento chamado tricogínio (protuberância recetiva do gâmeta feminino para a transferência dos espermácios). Quando os espermácios (libertados na água) encontram o tricogínio que é então responsável por receber os gâmetas femininos, fundem-se. O núcleo masculino migra até à oosfera onde ocorre fecundação. O zigoto ( $2n$ ) desenvolve um carposporófito que produz os carpósporos ( $2n$ ) que, ao serem libertados, germinam. Assim, formam um tetrasporófito ( $2n$ ) que por meiose forma tetrásporos ( $n$ ) dentro de tetrasporângios. Os tetrásporos germinam, dando origem a gametófitos masculinos e femininos ( $n$ ), reiniciando o ciclo.



**Figura 7** – Ciclo de vida de *Gigartina pistillata* (adaptado do ciclo de vida de *Chondrus crispus* disponível em: ([https://pt.wikipedia.org/wiki/Chondrus\\_crispus#/media/File:Life\\_cycle\\_Chondrus.jpg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Chondrus_crispus#/media/File:Life_cycle_Chondrus.jpg)).

#### 4. Espectroscopia Vibracional (FTIR-ATR)

Diversas algas produzem hidrocolóides associados à sua parede celular, como já referido anteriormente. Algumas destas algas pertencentes ao filo Rhodophyta produzem galactanas, nomeadamente carragenana, um dos compostos mais usados na indústria alimentar. Este ficocolóide foi descoberto por Stanford, um farmacêutico britânico, no ano de 1862, que extraíra este composto a partir de *Chondrus crispus*. Inicialmente este ficocolóide era denominado por “*carrageenin*”, e mais tarde passou a denominar-se por “*carrageenan*”, obtendo assim o sufixo “-an” característico dos polissacarídeos. Existem três tipos principais de carragenana comercial, são eles *kappa*, *iota*- e *lambda*-, que possuem unidades idealizadas, no entanto, de um modo geral as algas não produzem estas unidades idealizadas nem carragenana pura, mas sim uma variedade de estruturas híbridas, existindo, portanto, outras unidades como *xi*, *theta*, *beta*, *mu* e *nu* (Pereira *et al.*, 2009).

A espectroscopia de infravermelhos (IR) fora, em tempos, a técnica vibracional mais utilizada para a determinação da composição química de ficocolóides, apresentando vantagens como o facto de serem apenas necessários poucos miligramas e o método ser considerado como não-agressivo e muito preciso. No entanto, apresentando limitações, estas foram ultrapassadas com o uso de novas outras técnicas,

nomeadamente a técnica de análise FTIR-ATR que se processa através de reflexão total atenuada, permitindo assim a determinação da composição de ficocolóides no estado sólido sem serem necessárias outras preparações (Pereira *et al.*, 2009). A identificação da carragenana é realizada com o auxílio de tabelas de identificação de carragenanas para a técnica de FTIR-ATR (Tabela 2).

**Tabela 2** – Tabela de identificação de carragenanas através de espectroscopia de infravermelhos (adaptada de Pereira *et al.*, 2009).

Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupos de ligação	Código de letras	Tipo de carragenana							
			Kappa (k)	Mu (μ)	Iota (ι)	Nu (ν)	Beta (β)	Theta (θ)	Lambda (λ)	Xi (ξ)
1240-1260	S=O ésteres sulfato		+	++	++	+++	-	++	+++	++
1070	C-O de 3,6-anidrogactose	DA	+	-	+	-	+	+	-	-
970-975	Galactose	G/D	+	s	+	s	+	+	-	-
930	C-O de 3,6-anidrogactose	DA	+	-	+	-	+	+	-	-
905	C-O-SO <sub>3</sub> no C2 de 3,6-anidrogactose	DA2S	-	-	+	-	-	+	-	-
890-900	β-D-galactose não sulfatada	G/D	-	-	-	-	+	-	-	-
867	C-O-SO <sub>3</sub> no C6 da galactose	G/D6S	-	+	-	+	-	-	+	-
845	C-O-SO <sub>3</sub> no C4 da galactose	G4S	+	+	+	+	-	-	-	-
825-830	C-O-SO <sub>3</sub> no C2 da galactose	G/D2S	-	-	-	+	-	+	+	n
815-820	C-O-SO <sub>3</sub> no C6 da galactose	G/D6S	-	+	-	+	-	-	+	-
805	C-O-SO <sub>3</sub> no C2 de 3,6-anidrogactose	DA2S	-	-	+	-	-	+	-	-

-, ausente; +, médio; ++, forte; +++, muito forte; s, inflexão; n, pico estreito

## 5. Atividade antioxidante

Em ambientes por vezes extremamente competitivos, as algas sintetizam vários compostos químicos que funcionam como sistemas de defesa, simplificando a sua sobrevivência nestes meios. Durante os últimos 40 anos, o estudo sobre produtos naturais químicos e defesas químicas das algas, originou o isolamento de mais de 15 000 novos compostos, muitos dos quais revelaram propriedades bioativas (Kelman *et al.*, 2012). Dentro das diversas atividades biológicas manifestadas pelas algas, será enfatizada a atividade antioxidante por integrar a componente de estudo deste trabalho.

A oxidação é um processo metabólico normal, uma consequência da produção de energia, e da variedade de condições adversas que podem surgir no ambiente marinho (D’Orazio *et al.*, 2012). Este processo é ultrapassado por muitos dos organismos marinhos através da produção de moléculas com bioatividade, por meio do seu

metabolismo secundário. Sendo assim, estes compostos que se designam por antioxidantes, são agentes ou compostos que atrasam, impedem ou eliminam os danos oxidativos (Cornish & Garbary, 2010).

Os ambientes marinhos são muitas vezes ambientes agressivos e as macroalgas enfrentam variadas condições ambientais como a variação de salinidade, a competição pelo espaço e nutrientes, radiação solar e variações das marés (Tierney *et al.*, 2010). Estes fatores levam então à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), que em grandes quantidades podem conduzir a danos celulares e/ou morte. A fim de transpor estas adversidades, as algas marinhas produzem os compostos antioxidantes que são referidos na literatura como é o caso dos polifenóis, ficocianinas, várias enzimas, carotenoides, catequinas e ácido ascórbico (Cornish and Garbary, 2010). O aumento do número de agentes promotores de stresse oxidativo tem vindo a aumentar, bem como consequentemente a procura de compostos antioxidantes eficientes. Assim, as macroalgas tornam-se num importante alvo de estudo no que toca à procura de compostos naturais bioativos.

Para a determinação da atividade antioxidante destacam-se vários testes, como é o caso da redução do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power), redução do  $\beta$ -caroteno, entre outros.

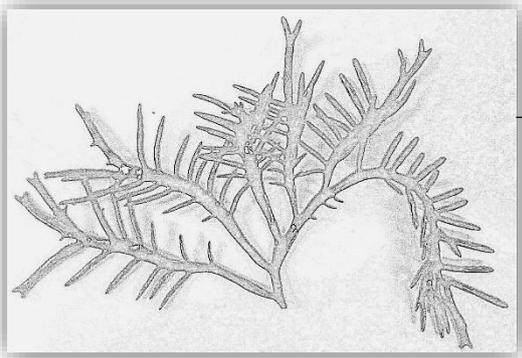
## PARTE II

### 1. Objetivos

As macroalgas são uma importante fonte produtora de compostos com as mais variadas atividades funcionais. Elas são abundantemente e facilmente encontradas na costa portuguesa, mas ainda pouco investigadas sendo que a sua exploração e valorização é um fator em crescimento.

Este trabalho foca-se no estudo da macroalga *Gigartina pistillata* com o intuito de extrair e identificar o tipo de carragenana, compreender um pouco mais sobre o seu potencial bioativo, assim como o potencial de outros compostos existentes nesta espécie e conseqüentemente avaliar o seu poder biotecnológico a nível industrial.

Assim sendo, os objetivos fundamentais deste trabalho são a extração de carragenana através do método de extração alcalina a quente, o cálculo do rendimento dos extratos (peso seco/peso do extrato final seco), identificação do tipo de carragenana, extração de compostos polares através da extração sequencial e testes bioativos (antioxidantes) dos polissacarídeos e dos extratos metanólicos.



---

## 2. Material e Métodos

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Amostragem e preparação das amostras**

O material de estudo foi recolhido na Praia de Buarcos (Figura 8b), localizada na costa oeste Atlântica central de Portugal, entre o cabo Mondego, um cabo natural, e o estuário do Mondego; mais especificamente na freguesia de Buarcos e São Julião pertencente ao concelho da Figueira da Foz, distrito de Coimbra. Esta praia possui um areal com 2,8 km de comprimento, limitado por infraestruturas urbanas e uma faixa litoral submergível que apresenta uma plataforma erosiva de afloramentos rochosos (Freire *et al.*, 2012).

As colheitas foram realizadas em três períodos distintos: o primeiro foi realizado a 27 de junho de 2015, o segundo ocorreu a 17 de julho de 2015 e o terceiro a 28 de setembro de 2015.

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 que foi transportado húmido, dentro de sacos, no interior de uma mala térmica (Figura 8c). Foi definido este método de colheita de forma a garantir a regeneração da biomassa no local de colheita. A biomassa recolhida foi posteriormente lavada em laboratório, foi dividida em diferentes grupos (tetrásporófito, talo não frutificado e gametófito feminino) (Figura 8d) e foi posteriormente congelada.

As razões que levaram à escolha deste local de colheita estão relacionadas, por um lado com a sua proximidade geográfica a Coimbra (local onde se encontra o laboratório), e por outro lado por existir grandes quantidades desta macroalga, e, como referido anteriormente, à medida que nos deslocamos para Sul ocorre uma maior predominância de macroalgas vermelhas.



**Figura 8** – Local de amostragem de *Gigartina pistillata*. a) Localização geográfica da praia; b) Praia de Buarcos; c) armazenamento da alga para o transporte; d) Separação segundo as diferentes fases do ciclo de vida. (Imagens por: Nídia André).

## 2.2. Métodos de extração

Algas carragenófitas da família Gigartinaceae podem ser encontradas distribuídas em grande escala na costa atlântica centro e norte de Portugal (Pereira, 2003). A carragenana é uma substância que se encontra na parede celular das algas da ordem Gigartinales e que pode formar gel quando combinada com variadas soluções. Tem diversas aplicações na indústria farmacêutica e alimentar, na cosmética entre outros (Pereira & Mesquita, 2003).

Este polissacarídeo é, portanto, extremamente importante em diversas áreas, sendo que atualmente existem inúmeros estudos para a descoberta e caracterização destes compostos. Assim, a carragenana é extraída a partir de algumas espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) (Pereira *et al.*, 2003) através de vários processos como é o caso da extração alcalina a quente, extração essa utilizada neste trabalho.

As amostras foram descongeladas e seguidamente foram secas numa estufa a 60 °C durante um período mínimo de 24 horas tendo sido posteriormente moídas. Após

este processo foi pesado aproximadamente 1 g de cada fase do ciclo de vida para posterior processo de extração alcalina a quente. Todo o processo de extração foi realizado de forma a rentabilizar ao máximo todo o material utilizado. É ainda de referir que todo o processo foi aplicado igualmente às três amostras em estudo e foi apenas usado material de duas das três datas de recolha, nomeadamente as de 17 de julho de 2015 e 28 de setembro de 2015. No entanto, só foram usadas nos ensaios de bioatividade as amostras de 28 de setembro de 2015 devido ao facto de as amostras de 17 de julho de 2015 não serem suficientes para a realização de todos os ensaios.

### **2.2.1. Extração alcalina a quente: polissacarídeos**

Depois de pesado 1 g de alga pertencente a cada geração, foi colocado num copo de 200 mL, juntamente com 150 mL de água destilada, durante cerca de 12 horas a 4 °C. De seguida, a alga foi colocada numa mistura de metanol com acetona (75 mL de metanol e 75 mL de acetona), durante 12 horas a 4 °C a fim de eliminar a fração organossolúvel (Figura 9b). Depois, foi decantada a parte líquida, a parte sólida foi seca e novamente hidratada com água destilada. Após este processo, o material foi colocado numa solução de NaOH (1M), em banho-maria, a 80 °C (Figura 9c) durante 3 horas para futura extração. Depois deste período, a mistura foi filtrada através de um funil *Buchner* N3, com um tecido branco, para um frasco, apoiado através de uma bomba de vácuo (Figura 9d). De seguida, o material do frasco foi novamente filtrado através de um funil de filtração com sílica ou funil de *gooch* de porosidade G3, com um tecido branco para o interior de um frasco (Figura 9e). A este frasco foram adicionados 200 mL de álcool etílico absoluto (etanol 100%) para se dar a precipitação da carragenana sob a forma de uma fibra esbranquiçada que foi retirada e comprimida, através de uma vareta de vidro, para o interior de um copo limpo. Juntou-se 100 mL de álcool etílico absoluto e colocou-se os copos em repouso durante 12/24 horas a 4 °C (Figura 9f). Depois deste tempo o álcool foi retirado e as carragenanas foram colocadas numa estufa a 60 °C durante um período de 24 horas para a secarem (Figura 9g) (Pereira e Mesquita, 2004).

Ulteriormente, foi calculado o rendimento (peso do extrato/peso da amostra para extração). Os espectros foram obtidos pelo grupo do professor Paulo J. A. Ribeiro-Claro, na Universidade de Aveiro, que possui o equipamento adequado para obter espectros FTIR-ATR (ver metodologia) (Pereira, 2013).



**Figura 9** – Processo de extração alcalina a quente. a) Hidratação da alga seca com água destilada; b) Alga com mistura de metanol e acetona; c) banho-maria a 80 °C; d) bomba de vácuo; e) filtração com um funil BN3 e um tecido branco; f) Carragenana extraída embebida em álcool etílico absoluto; g) Extrato final seco. (Imagens por: Nídia André).

### **2.2.2. Extração sequencial: extrato metanólico**

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

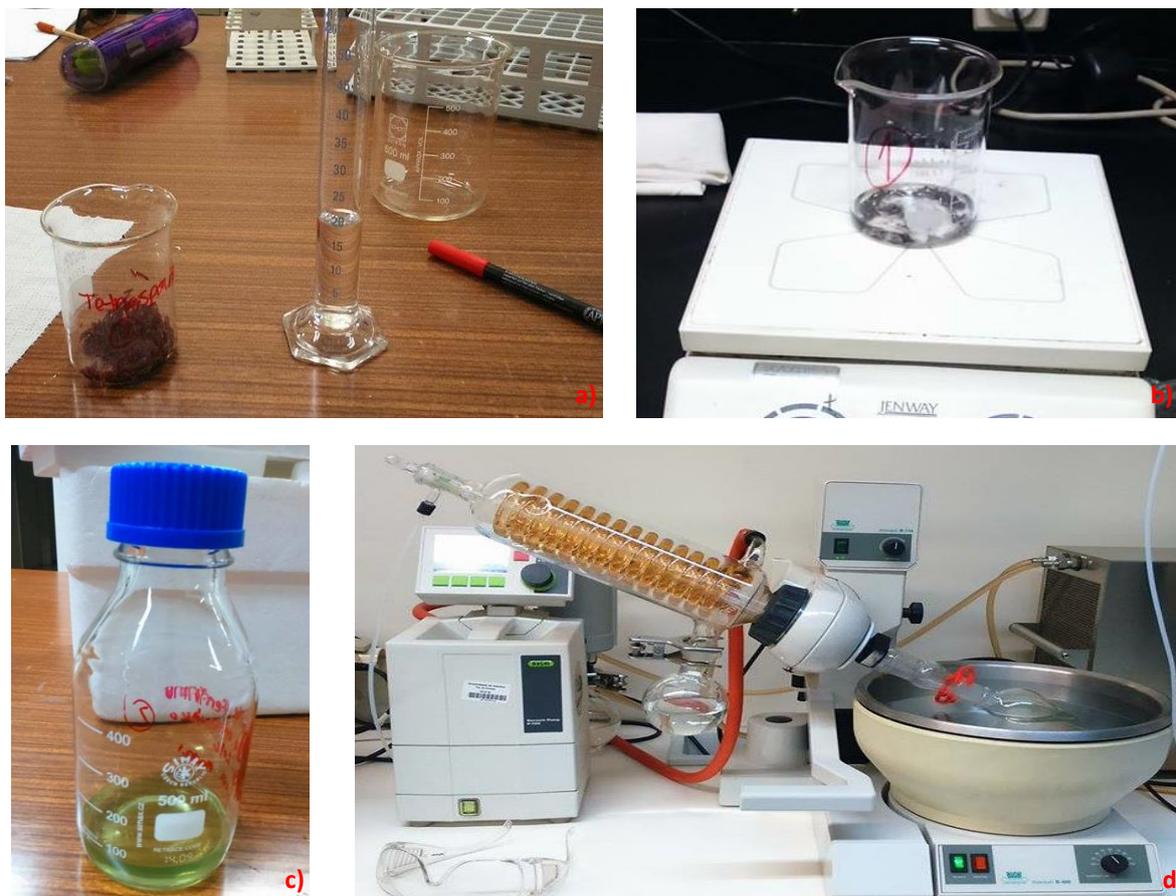
Usualmente são feitas três extrações diferentes neste método para extrair substâncias apolares, polares e polissacarídeos que originam quatro extratos diferentes. No entanto, neste trabalho foi apenas realizada uma das três extrações, a extração com metanol, a fim de extrair compostos polares, pelo facto de a primeira etapa não ser realizável uma vez que os compostos não eram extraídos e a terceira etapa por se tratar de extração de polissacarídeos, processo esse já realizado anteriormente com recurso a um método mais específico para esse fim.

Para a realização deste processo foi moído 1 g de alga seca e foram adicionados 20 mL de metanol, num gobelet (Figura 10a), o qual se manteve em agitação durante 20 minutos para se dar a extração dos compostos (Figura 10b). Decorrido esse tempo, filtrou-se, sob vácuo por tromba de água, usando funis de filtração com sílica de porosidade G3 acoplados em quitasatos. Sob vácuo, o conteúdo do gobelet foi vertido para o filtro e o solvente recuperado para o quitasato ficando a amostra inicial retida no filtro. O solvente recuperado foi depois transferido para um frasco reagente (Figura 10c) e reservado ao abrigo da luz. Este processo foi repetido até que a solução ficasse translúcida. Os pigmentos são bons indicadores do processo extrativo pelo que a coloração do extrato permite avaliar o esgotamento dos compostos na amostra e o respetivo final desta parte do processo extrativo.

Este processo foi realizado para amostras das três fases do ciclo de vida (gametófito feminino, tetrasporófito e talo não frutificado).

No final, todo o extrato metanólico que foi recolhido ao longo do processo, foi concentrado para volumes muito menores (máximo 3 mL) utilizando um evaporador rotativo a 40 °C (Figura 10d). Durante a sua concentração observou-se a formação de um precipitado que foi separado por centrifugação. O precipitado foi posteriormente ressolubilizado com metanol e juntamente com o sobrenadante foram armazenados a -

3 °C no frigorífico.



**Figura 10** – Extração sequencial com metanol; a) colocação do metanol na alga seca; b) agitação da solução; c) extrato metanólico; d) concentração da amostra no evaporador rotativo; e) extrato no evaporador rotativo. (Imagens por: Nídia André).

### 2.3. Espectroscopia vibracional (FTIR-ATR): metodologia

Antes do envio das amostras de *G. pistillata* para a análise FTIR-ATR, estas foram lavadas em água destilada de forma a eliminar o sal e os outros contaminantes da superfície dos talos. De seguida, e após uma separação em três grupos, nomeadamente em: tetrasporófito, talo não frutificado e gametófito feminino, com o auxílio de uma lupa binocular, foram secas a 60 °C numa estufa. Após este período de secagem, as algas secas foram moídas com o auxílio de um moinho de café a fim de uniformizar a amostra. Para este tipo de análise, através de FTIR-ATR, as amostras de alga moída não requerem qualquer tratamento adicional, sendo analisadas diretamente (Pereira, 2004).

Os espectros FTIR foram obtidos num espectrómetro IFS 55, que usou um sistema “Golden Gate single reflection diamond ATR”, sem necessidade de preparar

previamente as amostras. Os espectros são o resultado da média de duas contagens, com 128 “scans” cada, e uma resolução de 2 cm<sup>-1</sup> (Pereira, 2004).

## 2.4. Determinação da atividade antioxidante

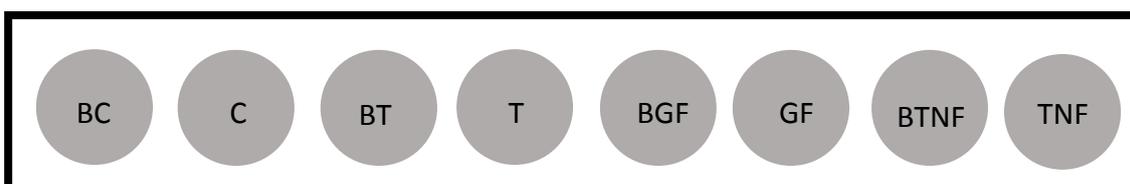
### 2.4.1. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: polissacarídeos

Após a obtenção das amostras de polissacarídeos, estes foram guardados ao abrigo da luz dentro de um exsiccador para a posterior realização do ensaio de atividade sequestradora de radicais livres pelo radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e determinada pela adaptação do método descrito por Abad *et al.*, (2013).

Para cada ensaio é feita inicialmente uma solução metanólica de DPPH (0,00195 g/50 mL) (Figura 12c). Devido à sua fácil degradação em contacto com a luz, este deve ser armazenado num local escuro e protegido ao máximo no decorrer de todo o ensaio.

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

A amostra foi preparada pesando-se 2,5 mg de polissacarídeo (Figura 12a) em 2,5 mL de metanol/água (1:1). O branco da amostra foi preparado adicionando 1 mL de metanol 2,5 mL de amostra num tubo de ensaio. Para o ensaio com a amostra adicionou-se, num tubo de ensaio, 2,5 mL de amostra e 1 mL da solução de DPPH obtendo-se uma concentração de 0,71 mg polissacarídeo/mL no meio reacional. Imediatamente à adição do DPPH nos tubos de ensaio, estes foram agitados no vórtex de modo a homogeneizar a solução e colocados ao abrigo da luz durante 30 minutos, antes de efetuar a leitura, num espectrofotómetro (Cintra 101), do valor da absorvância a 517 nm (Figura 12d). Cada concentração foi testada em duplicado.



**Figura 11** – Desenho de cada tudo de ensaio na atividade com DPPH. **BC**: branco do controlo; **C**: controlo; **BT**: branco da amostra do tetrasporófito; **T**: amostra do tetrasporófito; **BGF**: branco da amostra com o gametófito feminino; **GF**: amostra do gametófito feminino; **BTNF**: branco da amostra do talo não frutificado; **TNF**: amostra do talo não frutificado.

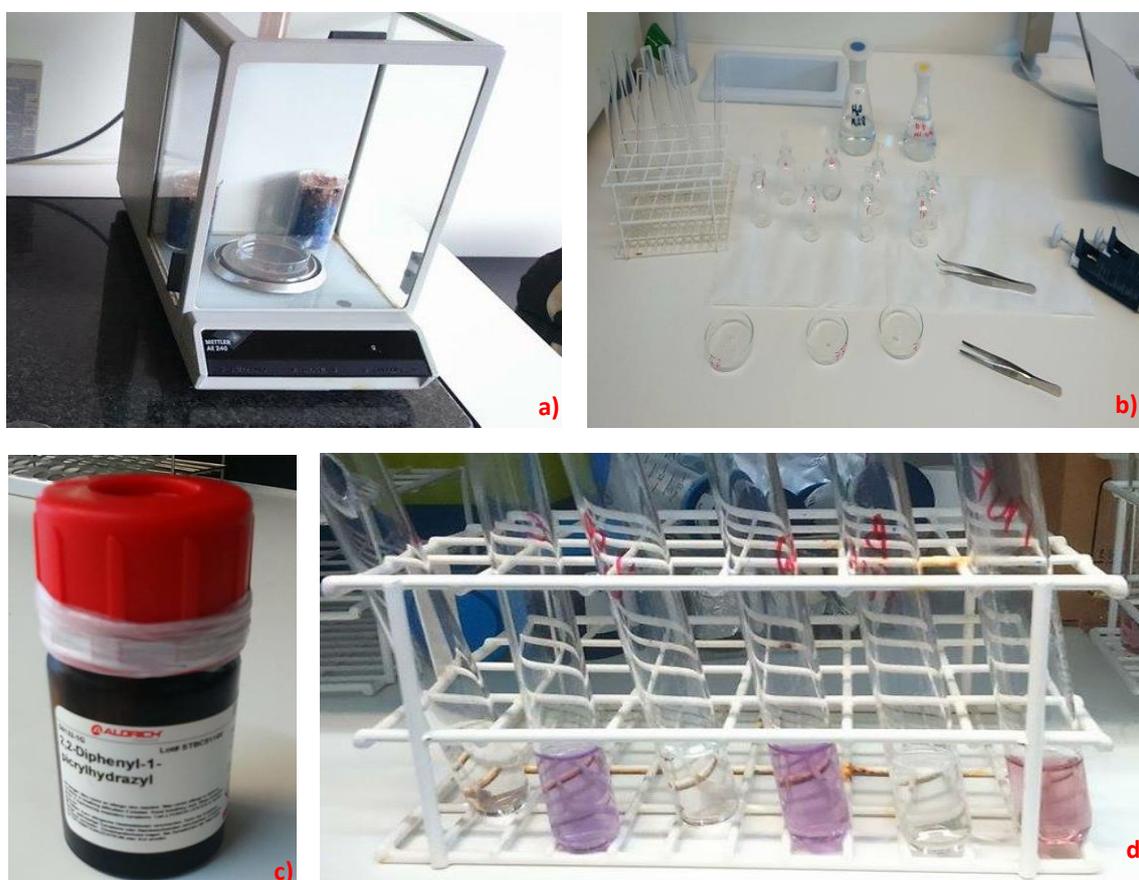
Registados os resultados, determinou-se a percentagem de inibição para cada concentração através da fórmula:

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

Abs<sub>c</sub>: Absorvância do controlo

Abs<sub>E</sub>: Absorvância do extrato após 30 min no escuro

Com os resultados da percentagem de inibição, realizou-se a média para cada ensaio.



**Figura 12** – Ensaio da atividade antioxidante, método DPPH: a) pesagem da carragenana; b) montagem do ensaio; c) DPPH; d) cores obtidas na reação. (Imagens por: Nídia André).

#### **2.4.2. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: extrato metanólico**

Após a obtenção dos extratos metanólicos, estes foram guardados ao abrigo da luz no frigorífico para posterior realização do ensaio de atividade sequestradora de radicais livres pelo radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e determinada pela adaptação do método descrito por Blois (1858).

Para cada ensaio é feita inicialmente uma solução de 0,00548 g de DPPH para 25 mL de metanol. Devido à sua fácil degradação em contacto com a luz, este deve ser armazenado num local escuro e protegido ao máximo no decorrer de todo o ensaio. E foi preparado o tampão acetato colocando 0,5 mL de ácido acético 0,2 M e 9,5 mL de acetato de sódio 0,2 M acertando o pH a 6.

O branco do controlo foi preparado adicionando 2 mL de metanol e 1 mL de tampão num tubo de ensaio; o controlo preparou-se adicionando 1 mL de tampão, 1,5 mL de metanol e 0,5 mL da solução de DPPH, previamente feita. O controlo foi avaliado precedentemente devendo apresentar valores de absorvância de 0,91 a 1,2 no comprimento de onda de 517 nm, para que o teste possa prosseguir. O branco da amostra foi preparado adicionando 1 mL de tampão, 1,9 mL de metanol e 0,1 mL de amostra num tubo de ensaio.

Para a amostra adicionou-se, num tubo de ensaio, 1 mL de tampão, 1,4 mL de metanol, 0,1 mL de amostra (0,47 g alga/ mL) e 0,5 mL da solução de DPPH previamente preparada. Imediatamente à adição do DPPH nos tubos de ensaio, estes são agitados no vórtex de modo a homogeneizar toda a reação, e colocados ao abrigo da luz durante 30 minutos, antes da leitura do valor da absorvância a 517 nm num espectrofotómetro (Cintra 101). Cada concentração foi testada em duplicado.

Os resultados foram registados e a percentagem de inibição foi calcula através da fórmula usada no ensaio de atividade com os polissacarídeos. O desenho do ensaio realizou-se da mesma forma que o ensaio dos polissacarídeos referido acima (Figura 11).

### 2.4.3. FRAP (Ferric reducing ability of plasma)

O método FRAP é um ensaio da capacidade antioxidante que usa *Trolox* como um padrão e depende da redução do complexo férrico tripiridiltriazina para o complexo ferroso tripiridiltriazina por um redutor a pH baixo (Kaushik *et al.*, 2012). É muitas vezes utilizado para medir a capacidade antioxidante de alimentos, bebidas e suplementos nutricionais.

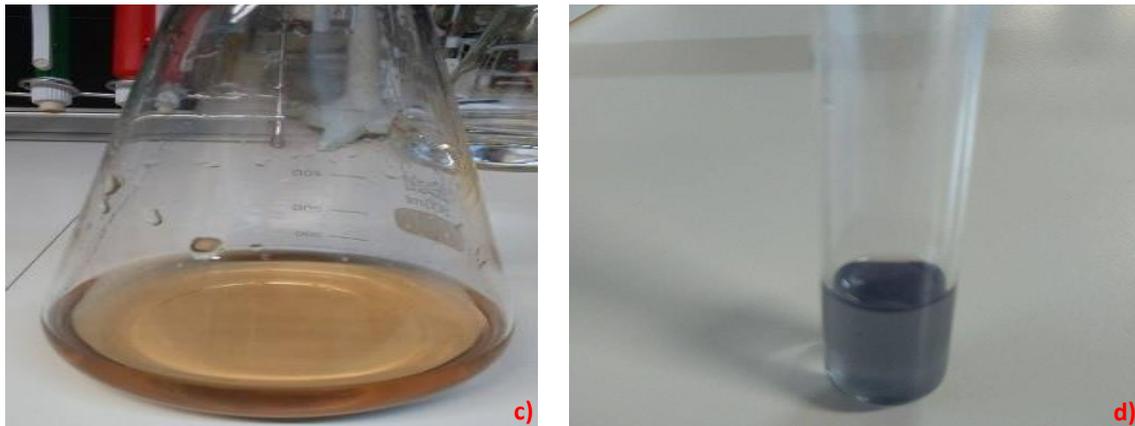
As condições técnicas para a realização deste método foram baseadas no método de (Benzie, 1996).

Neste ensaio, foram testados os polissacarídeos, o sobrenadante e o precipitado solubilizado em metanol (Figura 13b).

Inicialmente para preparar o reagente FRAP (Figura 13c) procedeu-se à realização de vários reagentes, primeiramente preparou-se o tampão acetato pesando 0,775 g de  $\text{NaAcO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , colocando em 8 mL de ácido acético glacial e perfazendo com 250 mL de água MiliQ. De seguida preparou-se o TPTZ pesando 0,0781 g colocando em 25 mL de HCL 40 mM. E, finalmente o  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  pesando 0,1351 g colocando em 25 mL de água MiliQ. No final juntar todos os reagentes numa proporção de (250:25:25) respetivamente.

Para o ensaio propriamente dito foram preparados tubos de ensaio com 3 mL do reagente e 100  $\mu\text{L}$  da respetiva amostra (sobrenadante: 0,33 g alga/ mL; precipitado: 0,16 g alga/ mL). Os tubos foram agitados no vórtex a fim de homogeneizar a solução. No final, foi medida a absorvância a 593 nm ao fim de 6 minutos de incubação (Figura 13d) e foram registados os resultados.

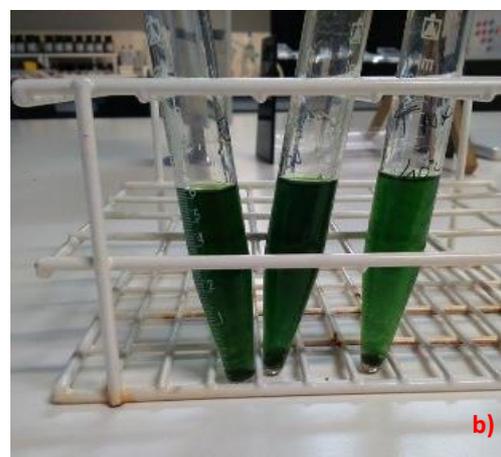


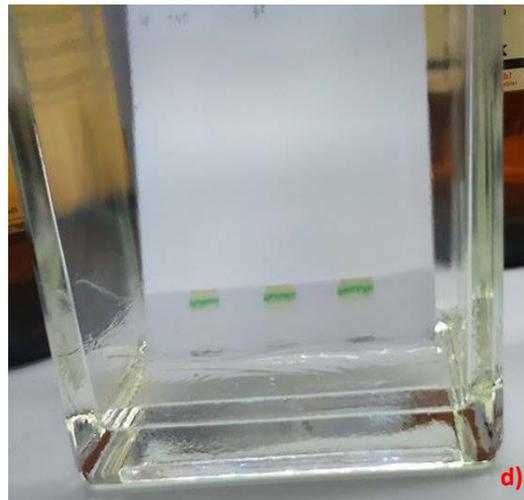
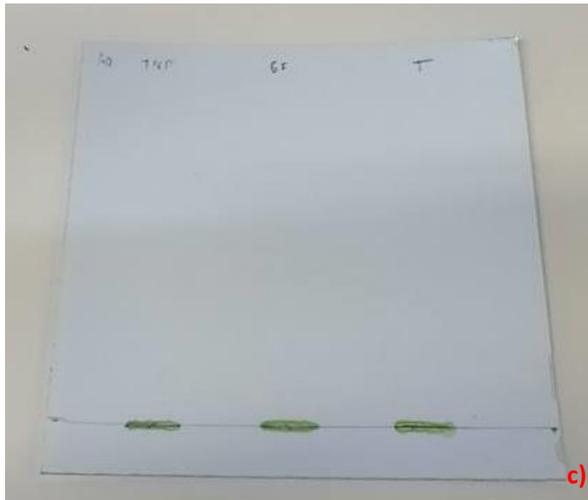


**Figura 13** – Ensaio de FRAP: a) extrato metanólico com precipitado; b) precipitado solubilizado em metanol; c) reagente FRAP; d) reação com o reagente FRAP e uma amostra. (Imagens por: Nídia André).

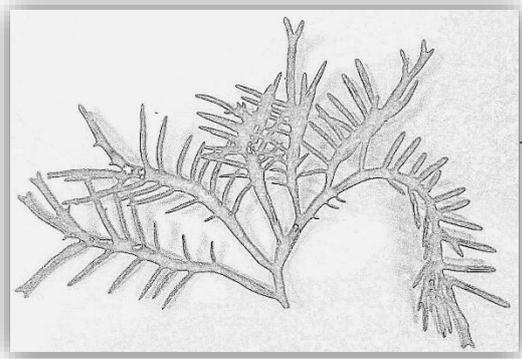
#### 2.4.4. Cromatografia em camada fina (TLC): pigmentos

As condições técnicas para a realização desta TLC foram baseadas no método de Mikami (2013). Recorreu-se a placas de sílica gel 60 F254 (Merck), sendo a fase móvel constituída por uma solução de éter de petróleo-acetona (7:3, v/v). A solução de petróleo-acetona foi colocada na câmara de cromatografia deixando-se saturar cerca de 30 minutos (Figura 14a). Nas placas, a cerca de 1 cm da base, foram aplicados 20 µl da solução (precipitado) (Figura 14b e 14c). A placa foi depois inserida na câmara permitindo que o eluente corresse até uma altura de cerca de 10 centímetros (Figura 14d). No final, a placa foi retirada e após a completa evaporação do solvente à temperatura ambiente, observou-se à luz visível. Seguidamente submeteram-se as placas à ação dos reagentes de revelação (solução metanólica de DPPH 2 mg/20 mL), observando-se os resultados à luz visível e ultravioleta.





**Figura 14** – Técnica de TLC; a) câmara cromatográfica com eluente; b) amostras do precipitado para ensaio; c) placa de sílica com a amostra aplicada; d) eluente a correr na placa de sílica dentro da câmara cromatográfica. (Imagens por: Nídia André).



---

### 3. Resultados

### 3. Resultados

#### 3.1. Rendimento dos extratos

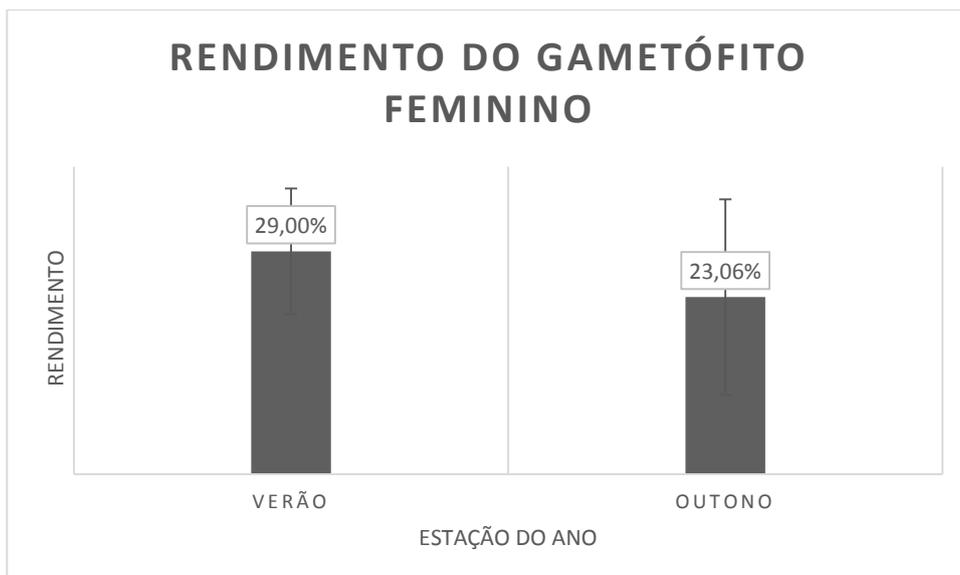
O rendimento é um cálculo efetuado que permite ter uma ideia da quantidade de produto obtido pela extração com solventes. Neste caso é baseado no peso obtido após a extração alcalina a quente, método usualmente utilizado para a extração de carragenana através de algas vermelhas, e calculado através da fórmula:

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

Assim, os valores de rendimento obtidos nas extrações serão discutidos por comparação entre as amostras. É ainda de relembrar que se tararam previamente os recipientes utilizados, a fim de se registar o peso dos extratos secos que foram pesados normalmente dentro de uma caixa de *Petri* numa balança. Foi apenas utilizado cerca de 1 g de alga moída, com o objetivo de obter quantidades suficientes para realização das extrações. Apesar de todos os cuidados para obter o máximo de rentabilidade, ao longo do processo ocorrem pequenas perdas de material o que pode interferir com as quantidades e rentabilidade dos extratos finais.

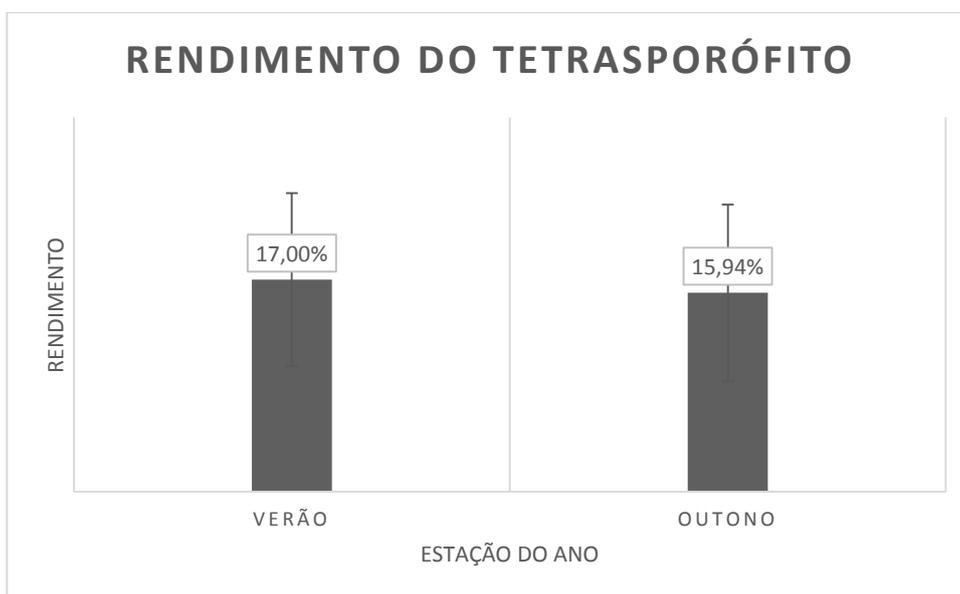
Os resultados obtidos referentes ao rendimento da carragenana estudada nesta pesquisa estão expressos nas figuras 15, 16, 17 e 18.

De um modo geral, a figura 15 mostra que a percentagem de rendimento do gametófito feminino é visivelmente superior no verão ( $29\% \pm 0,07$ ) relativamente ao outono.



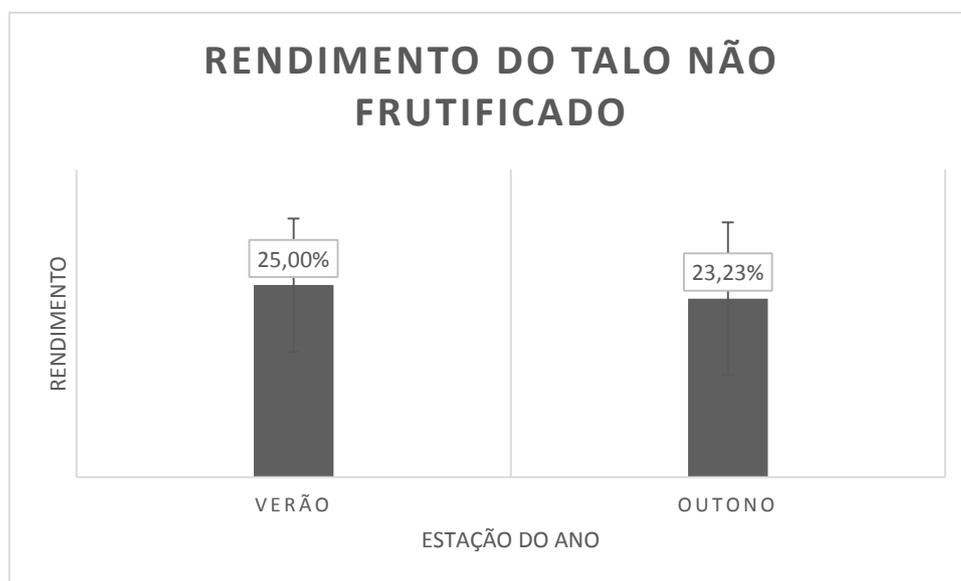
**Figura 15** – Rendimento dos extratos do gametófito feminino em *Gigartina pistillata* (média  $\pm$ sd; verão: (N=4); outono: (N=3)).

Relativamente ao gráfico da figura 16, este mostra que a percentagem de rendimento do tetrasporófito no verão ( $17\% \pm 0,07$ ) é superior à de outono.



**Figura 16** – Rendimento dos extratos do tetrasporófito em *Gigartina pistillata* (média  $\pm$ sd; verão: (N=4); outono: (N=3)).

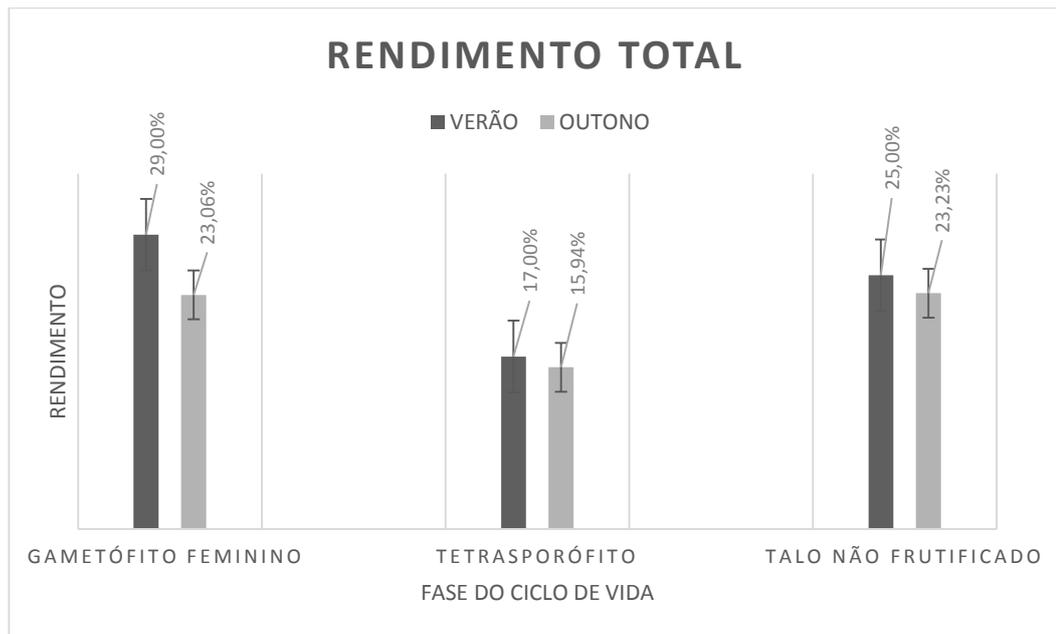
O mesmo se passa na figura 17 onde se observa que o rendimento do talo não frutificado é também superior no verão ( $25\% \pm 0,09$ ).



**Figura 17** – Rendimento dos extratos do talo não frutificado em *Gigartina pistillata* (média  $\pm$ sd; verão: (N=4); outono: (N=3)).

Os rendimentos totais obtidos (Figura 18) das três fases do ciclo de vida de *Gigartina pistillata* mostram que é no outono que o rendimento de carragenana é inferior quando comparado com os valores do verão, acontecendo para todas as fases do ciclo de vida.

De um modo geral, pode então verificar-se que os valores mais baixos de rendimento correspondem às amostras do tetrasporófito, enquanto os valores mais elevados de rendimento pertencem às amostras do gametófito feminino.



**Figura 18** – Rendimento total dos extratos relativos às três fases do ciclo de vida de *Gigartina pistillata* (média  $\pm$ sd; verão: (N=4); outono: (N=3)) onde: 1- Gametófito feminino, 2- Tetrasporófito e 3- Talo não frutificado.

### 3.2. Espectroscopia vibracional FTIR-ATR

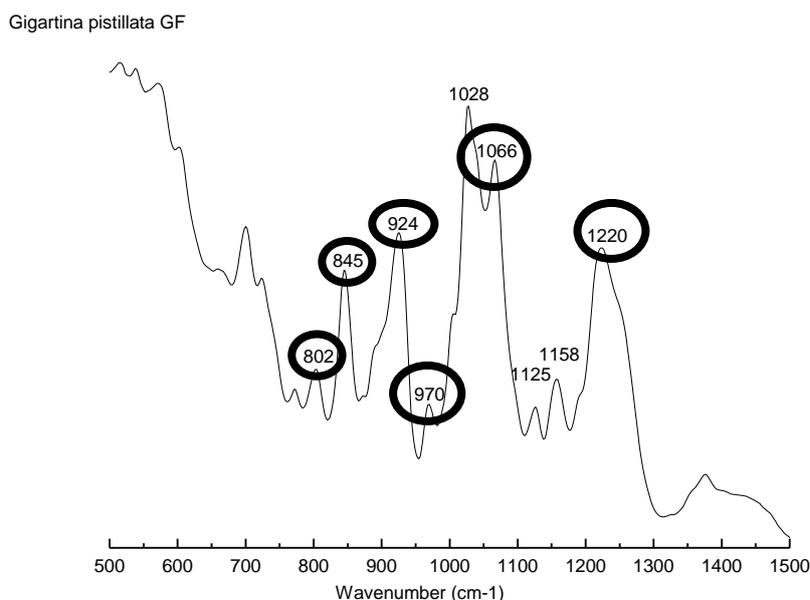
Para a análise através da espectroscopia vibracional FTIR-ATR foram enviados extratos de carragenana moídas, e o processamento e tratamento dos espectros brutos enviados para análise foram efetuados no programa Origin9 (OriginLab), de modo a definir de uma melhor maneira a zona dos espectros referente à análise dos coloides.

A resolução melhorada dos espectros FTIR-ATR proporciona mais informação do que a conseguida com a espectroscopia tradicional de infravermelho. A análise deteta as frações dominantes assim como os respetivos precursores. Além disso, o *software* dos espectrómetros de FTIR-ATR possibilita o processamento dos dados espectrais, em especial, a conversão para espectros de segunda-derivada, que proporciona mais informação sobretudo devido à melhor resolução apresentada em alguns comprimentos de onda (Matsuhira, 1996; Cáceres *et al.*, 1997; Chopin *et al.*, 1999).

Os espectros apresentam vários picos de absorção para os vários tipos de carragenana (Pereira, 2004).

Analisando o espectro da figura 19, que corresponde ao gametófito feminino de *G. pistillata*, no sentido crescente do número de onda pode observar-se que os picos apresentam intensidades com alguma discrepância entre si. Em termos de picos

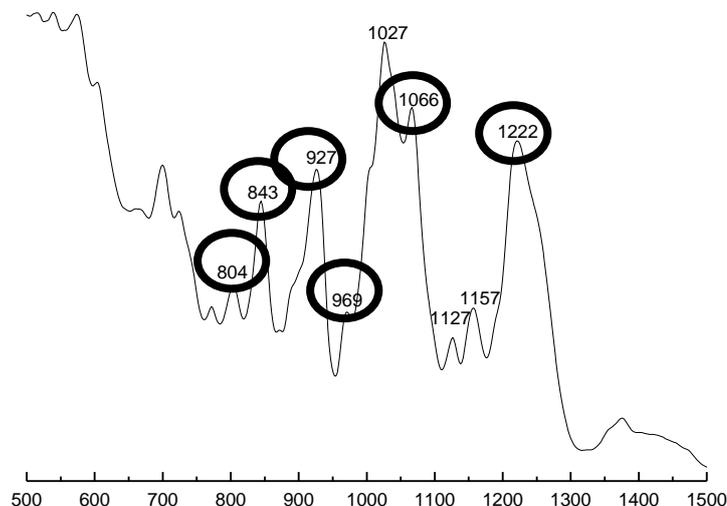
relevantes o primeiro a surgir é o pico de  $802\text{ cm}^{-1}$  com baixa intensidade e em forma de ombro, posteriormente seguem-se os picos  $845\text{ cm}^{-1}$  e  $924\text{ cm}^{-1}$  com intensidades muito próximas entre si, superiores às do primeiro pico sendo bandas estreitas e aguçadas; em quarto lugar surge o pico  $970\text{ cm}^{-1}$ , com a mais baixa intensidade de todas as bandas; a  $1066\text{ cm}^{-1}$  está presente o pico mais intenso do espectro, com aspeto muito estreito; e em último lugar aparece um pico muito largo, a  $1220\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 19** – Espectro FTIR-ATR de carragenana híbrida *kappa/iota* com percursos *mu* e *nu*, do gametófito feminino de *Gigartina pistillata*.

O espectro da figura 20, correspondente ao talo não frutificado de *G. pistillata*, apresenta vários picos, nomeadamente: o pico de  $804\text{ cm}^{-1}$  que é o primeiro pico no sentido crescente do comprimento de onda, que exibe uma baixa intensidade e tem forma de ombro; a seguir aparecem os picos  $843\text{ cm}^{-1}$  e  $927\text{ cm}^{-1}$ , estreitos e com intensidades muito próximas entre si. O pico  $969\text{ cm}^{-1}$  encontra-se a seguir com uma intensidade muito baixa. Por fim, aparecem os picos de  $1066\text{ cm}^{-1}$  e  $1222\text{ cm}^{-1}$  em que o primeiro é muito intenso e estreito e o segundo menos intenso e largo.

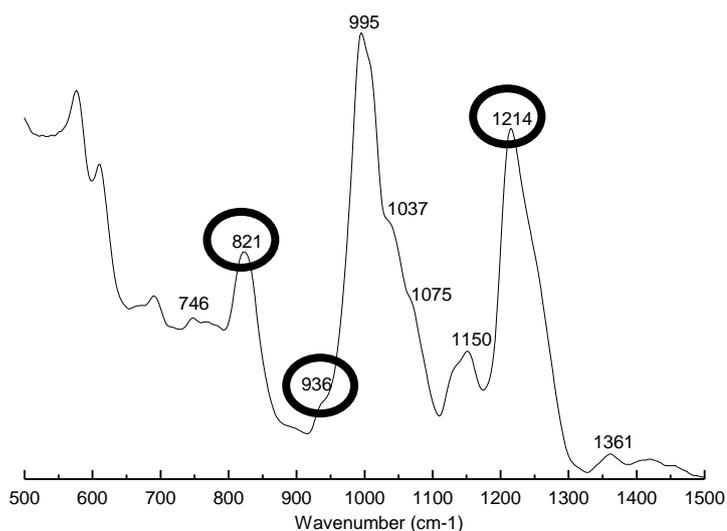
Gigartina pistillata Talos Não Frutificados



**Figura 20** – Espectro FTIR-ATR de carragenana híbrida *kappa/iota* com percursos *mu* e *nu*, do talo não frutificado de *Gigartina pistillata*.

Finalmente, a figura 21, correspondente ao tetrasporófito de *G. pistillata*, exhibe um espectro com três picos relevantes. O primeiro a  $821\text{ cm}^{-1}$ , muito largo com alguma intensidade. De seguida é exibido o pico de  $936\text{ cm}^{-1}$ , muito pouco acentuado, com curvatura praticamente nula e pouco intenso. E por fim aparece o pico de  $1214\text{ cm}^{-1}$ , muito intenso e estreito.

Gigartina pistillata Tetrasporófito



**Figura 21** – Espectro FTIR-ATR de carragenana híbrida *xi/lambda*, maioritariamente *lambda*, do tetrasporófito de *Gigartina pistillata*.

### 3.3. Determinação da atividade antioxidante

#### 3.3.1. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: polissacarídeos

A capacidade antioxidante dos polissacarídeos em estudo foi avaliada através do método do DDPH. O radical DDPH é um radical relativamente estável e o ensaio é baseado na medição da capacidade de neutralização do radical DPPH por parte dos antioxidantes presentes na amostra. As suas características permitem o seu uso em ensaios *in vitro* funcionando 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.

**Tabela 3** – Percentagem de redução dos polissacarídeos (0,71 mg polissacarídeo/mL) correspondentes às três amostras em estudo (média  $\pm$  SD; N=3); ND: Sem atividade.

	Percentagem de redução
Tetrasporófito	ND
Gametófito feminino	1,70 $\pm$ 0,03
Talo não frutificado	ND

De uma forma geral e através dos resultados apresentados na tabela 3, é possível verificar que o único extrato que apresentou atividade captadora de radicais DPPH foi o extrato do gametófito feminino, sendo, no entanto, uma atividade pouco significativa.

#### 3.3.2. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: extrato metanólico

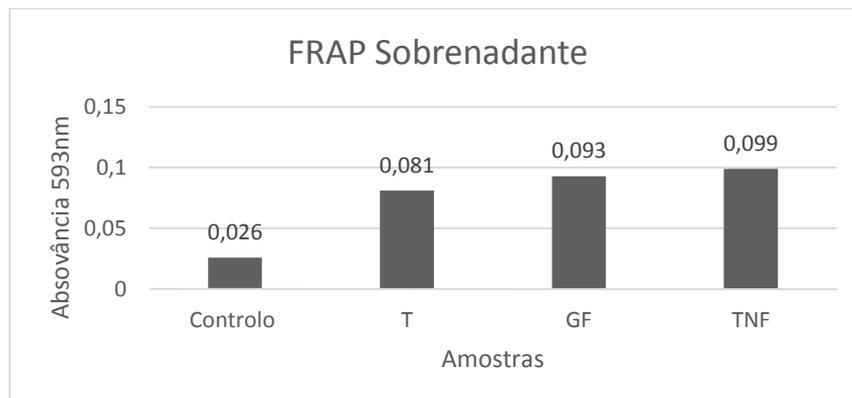
De uma forma geral e observando os resultados apresentados na tabela 4, é possível verificar que o extrato com mais atividade captadora de radicais DPPH é o extrato do gametófito feminino, seguido do extrato do talo não frutificado, sendo que o extrato do tetrasporófito não apresentou atividade antioxidante.

**Tabela 4** – Percentagem de redução dos extratos metanólicos (0,47 g alga/mL) correspondentes às três amostras em estudo (média  $\pm$  SD; N=3); ND: Sem atividade.

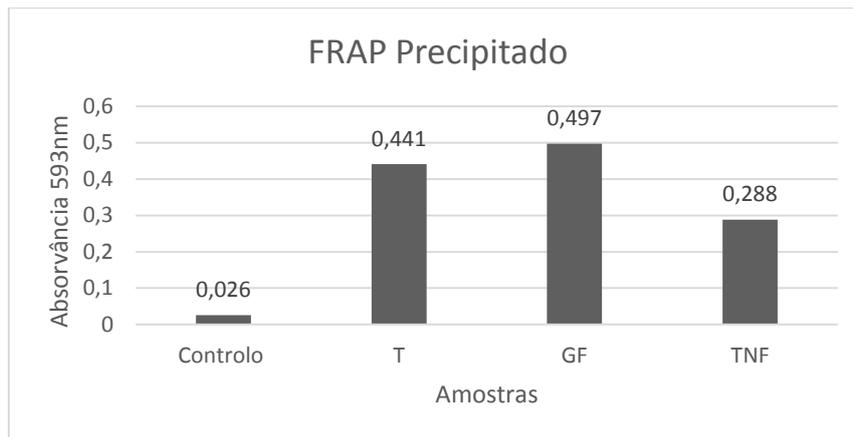
	Percentagem de redução
Tetrasporófito	ND
Gametófito feminino	7,35 $\pm$ 0,02
Talo não frutificado	1,65 $\pm$ 0,03

### 3.3.3. FRAP (Ferric reducing ability of plasma)

O método de FRAP é um ensaio da capacidade antioxidante colorimétrico e as amostras reagem com o FRAP convertendo a solução de cor alaranjada a uma cor azul. Neste método foi realizado um ensaio preliminar para avaliar o potencial redutor dos polissacarídeos, no entanto, esta amostra não apresentou qualquer atividade pelo que se optou por testar apenas o precipitado e o sobrenadante, obtidos a partir do extrato metanólico.



**Figura 22** – Absorvâncias obtidas pelos extratos metanólicos correspondentes à fase sobrenadante (0,33 g alga/mL) das três amostras em estudo (média; N=2). Onde: T – Tetrasporófito; GF – Gametófito feminino; TNF – Talo não frutificado.



**Figura 23** – Absorvâncias obtidas pelos extratos metanólicos correspondentes ao precipitado (0,16 g alga/mL) das três amostras em estudo (média; N=2). Onde: T – Tetrasporófito; GF – Gametófito feminino; TNF – Talo não frutificado.

Observando os resultados, é possível verificar que neste ensaio, quer no extrato com o sobrenadante (Figura 22), quer no extrato do precipitado (Figura 23), ambos do extrato metanólico, todas as amostras mostraram atividade redutora de Fe. Sendo que no extrato com o sobrenadante a amostra com mais atividade foi a amostra do talo não frutificado, seguida da amostra do gametófito feminino e por último a amostra do tetrasporófito, sendo que estes resultados são resultados promissores. Já no extrato do precipitado a amostra com mais atividade foi a amostra do gametófito feminino, seguida da amostra do tetrasporófito e por último a amostra do talo não frutificado.

#### 3.3.4. Cromatografia de camada fina (TLC): análise de pigmentos

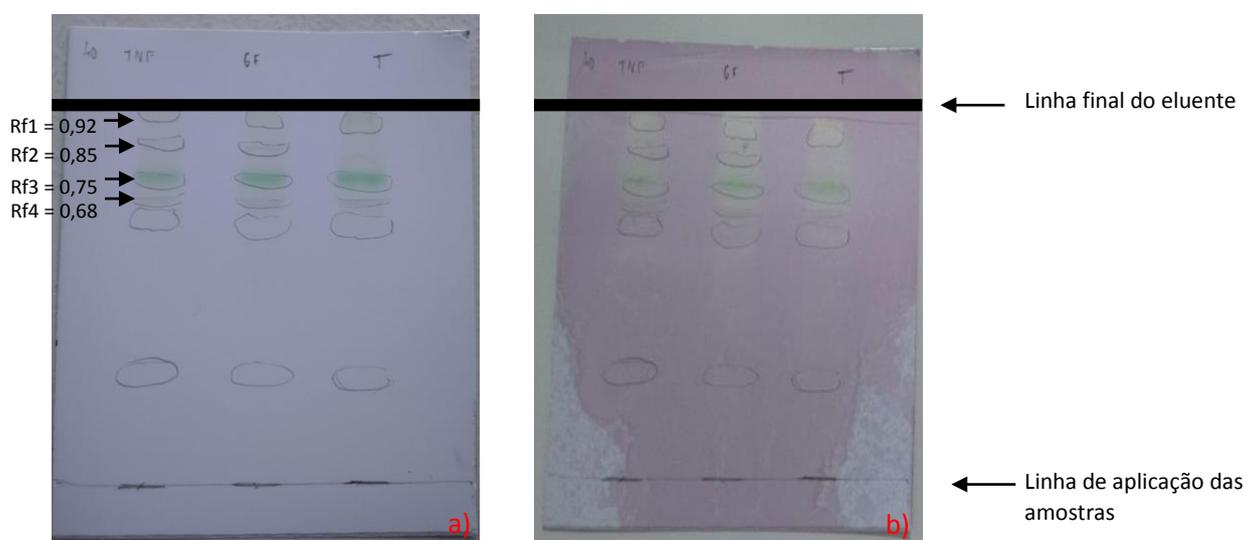
Para uma análise rápida e preliminar da composição dos extratos metanólicos, fez-se uma cromatografia de camada fina (TLC) orientada para a pesquisa de pigmentos. Através da medição das distâncias de migração de cada composto foi possível obter o fator de retenção ( $R_f$ ). Neste estudo foram testados os precipitados das três amostras em estudo e obtidos através da extração sequencial com metanol.

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

A figura 24 ilustra os cromatogramas obtidos, após desenvolvimento das placas e revelação dos compostos separados.

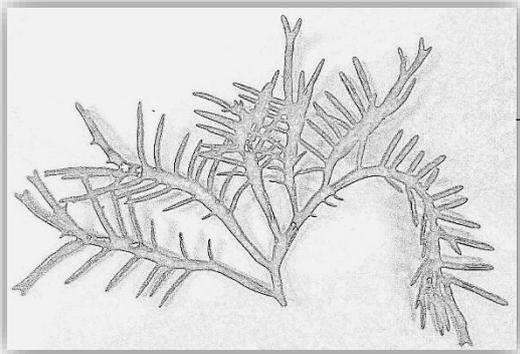


**Figura 24** – Perfil cromatográfico por TLC: a) placa sem revelador; b) placa revelada com DPPH que mostra perfil antioxidante (preparado com 2 mg de DPPH para 20 mL de metanol). (Imagens por: Nídia André).

Abreviaturas: TNF – amostra metanólica do extrato do talo não frutificado; GF – amostra metanólica do extrato do gametófito feminino; T – amostra metanólica do extrato do tetrasporófito.

Observando os resultados foi possível verificar que os pigmentos são iguais para as três amostras. Na primeira placa (Figura 24a) não foi utilizado qualquer reagente revelador, sendo que se pode observar diferentes pigmentos com diferentes cores entre si, em cada amostra. Na segunda placa (Figura 24b) a detecção de atividade antioxidante por parte dos pigmentos foi realizada com DPPH que funcionou como revelador de atividade.

Nos extratos metanólicos sem agente revelador, é visível o aparecimento de manchas de cor verde e outras de cor amarela nas três amostras em estudo.



---

#### 4. Discussão

## 4. Discussão

### 4.1. 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 os solventes são fatores que têm influência sobre o rendimento, havendo sempre pequenas perdas de material.

Neste trabalho pode verificar-se a obtenção de rendimentos dos extratos entre os 5% e os 38%. Em outros estudos, a *Gigartina pistillata* obteve uma média de 38,2% no estudo de variação sazonal em todas as estações do ano (Pereira, 2004).

De acordo com os resultados do presente trabalho, o extrato que obteve o maior rendimento foi o extrato de verão do gametófito feminino. Enquanto o extrato com menor rendimento pertence a uma amostra de outono do tetrásporófito o que pode ser indício de que existe uma maior quantidade de carragenana sintetizada pela alga nas épocas mais quentes como é o verão.

O peso seco de *G. pistillata* tem uma reduzida variação sazonal, ao contrário da variação da produtividade em carragenana, que apresenta grandes oscilações entre os períodos de outono/inverno e de primavera/verão (Pereira, 2004). Sendo que neste estudo as percentagens de rendimento dos polissacarídeos diferem entre estações do ano (verão e outono) e entre as várias fases do ciclo de vida (gametófito feminino, tetrásporófito e talo não frutificado). Pode verificar-se que o rendimento do gametófito feminino no verão foi de 29% e no outono cerca de 23%. Do tetrásporófito resultou um rendimento de 17% no verão e cerca de 16% no outono e por fim, do talo não frutificado resultaram percentagens de aproximadamente 25% no verão e de 23% no outono. O que leva a concluir que efetivamente a produção de carragenana difere de estação para estação sendo que é no período de primavera/verão que existem os picos mais altos de produção de carragenana em oposição ao período de outono/inverno. O baixo conteúdo em ficocolóides registado no outono, em oposição ao elevado teor verificado nas amostras de verão, pode estar relacionado, respetivamente, com os elevados e reduzidos níveis de nutrientes (azoto e fósforo) presentes na água sendo que estes

resultados são concordantes com os apresentados em trabalhos anteriores de Pereira (2004).

As variações das características físico-químicas do meio, durante as diferentes estações do ano, têm uma notável influência no crescimento e composição química dos talos das algas carragenófitas (Mathieson *et al.*, 1984; Cosson *et al.*, 1990; Zinoun & Cosson, 1996; Chopin e Wagey, 1999; Pereira & Mesquita, 2004).

Os fatores responsáveis pelos padrões sazonais do conteúdo em ficocolóides incluem o fotoperíodo, a fase do ciclo de vida, o nível de crescimento, a temperatura (do ar e da água do mar), o pH e a salinidade da água e os nutrientes (níveis de fósforo e azoto). No entanto os fatores que mais fortemente se relacionam com o conteúdo em carragenana são a temperatura e o nível de nutrientes possuindo um papel chave nas flutuações do teor deste ficocolóide.

Podem referir-se diversos estudos efetuados com *Chondrus crispus*, onde é referido, como principal fator na variação sazonal do teor em carragenana, o nível de nutrientes na água (Kopp, 1975; Kopp & Perez, 1979; Chopin *et al.*, 1999a; Chopin *et al.*, 1995; Chopin *et al.*, 1999b).

A correlação negativa entre os níveis de nutrientes e o conteúdo em carragenana foi também referida em estudos com outras algas carragenófitas como *C. jubata* (Zinoun, 1993; Zinoun & Cosson, 1996), *G. crenulatus* (Mathieson *et al.*, 1984; Cosson *et al.*, 1990), *M. stellatus* (Mathieson & Tveter, 1975, 1976), *C. teedei* e *C. teedei* var. *lusitanicus* (Zinoun, 1993; Zinoun *et al.*, 1993; Pereira & Mesquita, 2004).

A alga deste trabalho foi colhida na baía de Buarcos que está sujeita a uma variação sazonal no nível de nutrientes presentes na água. Essa variação relaciona-se com a proximidade à foz do rio Mondego e da permanente descarga de água na baía. O rio Mondego descarrega anualmente  $8,5 \times 10^3 \text{ m}^3/\text{ano}^{-1}$  de água, 120 toneladas de azoto (N) e 15 toneladas de fósforo (P) (Flindt *et al.*, 1997). No entanto, grandes variações nos níveis de azoto inorgânico dissolvido (com elevados valores registados no inverno e baixos valores no verão), caracterizam as águas despejadas na baía de Buarcos (Flindt *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2001), sendo responsáveis pelos padrões sazonais do conteúdo em ficocolóides das carragenófitas presentes nesta baía como é o caso da *G. pistillata*.

Estudos realizados por Zinoun e Cosson (1996), mostram que o teor em carragenana decresce durante o crescimento ativo dos talos, que tem início no final do

inverno e continua durante a primavera. Nesse período, caracterizado pelos elevados níveis de nutrientes na água e temperaturas baixas, há uma acumulação preferencial de amido florídeo (substância de reserva que se encontra na parede celular), sobretudo no princípio da primavera. No período seguinte, de maio a agosto, o nível de nutrientes decresce e a irradiação solar aumenta e, conseqüentemente, o ritmo de crescimento dos talos diminui.

Segundo Zinoun (1993), o conteúdo em amido florídeo varia, sazonalmente, na razão inversa à do conteúdo em carragenana. Assim, os elevados conteúdos de amido florídeo registados na primavera sugerem que os talos com crescimento ativo sintetizam predominantemente este polímero de reserva citoplasmático. Durante o período de verão, as quantidades de amido florídeo decrescem e as de carragenana aumentam. Assim, o amido florídeo é provavelmente usado na síntese de carragenana, durante a formação das paredes celulares.

#### **4.2. Espectroscopia vibracional (FTIR-ATR)**

A espectroscopia vibracional FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance) permite identificar os tipos de ligações químicas dos compostos e como tal determinar a composição de ficocolóides. Esta técnica é rápida, não-destrutiva, e exige pequenas quantidades de amostra (Pereira *et al.*, 2003).

A matriz extracelular das carragenófitas é constituída, em grande parte, por poligalactanas sulfatadas hidrofílicas. A presença de D-galactose e anidro-D-galactose distingue as carragenanas mais sulfatadas, dos agares menos sulfatados (anidro-L-galactose) (Craigie, 1990; Knutsen *et al.*, 1994).

Existe uma maior concentração de polissacarídeos sulfatados na parte mais externa dos talos das espécies carragenófitas, sobretudo na zona cortical comparativamente à parte mais interna (zona medular) (Pereira, 2004).

Analisando os espectros FTIR-ATR do gametófito feminino e do talo não frutificado de *G. pistillata* (Gigartinaceae) podemos verificar que estes apresentam bandas de forte absorção na região: de aproximadamente 930 cm<sup>-1</sup> (924 cm<sup>-1</sup> no gametófito feminino e 927 cm<sup>-1</sup> no talo não frutificado) que mostram a presença de 3,6-anidro-D-galactose (DA) que é característica da carragenana *kappa*, *iota*, *beta* e *theta*; apresentam também picos na região 845 cm<sup>-1</sup> (no gametófito feminino) e 843 cm<sup>-1</sup> (no talo não frutificado)

associados às vibrações do  $C_{(4)}-O-SO_3$ , fragmento da galactose sulfatada (G4S), que é característica dos espectros da carragenana *kappa*, *iota* e dos respectivos precursores biológicos *mu* e *nu*, típicos da carragenana *kappa*. Exibem também picos nas regiões de  $970\text{ cm}^{-1}$  (no gametófito feminino) e  $969\text{ cm}^{-1}$  (no talo não frutificado) que indicam a presença de galactose, sendo um espectro característico das carragenanas *kappa*, *iota*, *beta* e *theta*. Contudo, estes espectros apresentam reduzida absorvância na região  $805\text{ cm}^{-1}$  ( $802\text{ cm}^{-1}$  no gametófito feminino e  $804\text{ cm}^{-1}$  no talo não frutificado) que se relaciona com as vibrações em torno de  $C_{(2)}-O-SO_3$ , fragmento da 3,6-anidrogactose sulfatada (DA2S), e que é apenas observado nos espectros da carragenana *iota* e *theta*, o que significa a presença de pequenas quantidades de carragenana *iota* (Pereira, 2004). Resumindo, os espectros do gametófito feminino e dos talos não frutificados pertencem a um espectro de carragenana híbrida *kappa/iota* com os respectivos precursores biológicos *mu* e *nu*.

Grande parte dos gametófitos das espécies pertencentes à família Gigartinaceae produz carragenanas híbridas *kappa/iota* com rácios específicos entre as unidades *kappa* e as unidades *iota*, independentes de variações sazonais (Pereira, 2004).

Os espectros FTIR-ATR dos tetrasporófitos de *G. pistillata* apresentam uma banda larga na região espectral  $821\text{ cm}^{-1}$ , que se relaciona com as vibrações de  $C_{(2)}-O-SO_3$ , fragmento da galactose (G/D2S), sendo observada nos espectros das carragenanas *theta* e *lambda* e do precursor *nu*. E apresentam também outro pico na região de  $936\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença de 3,6-anidrogactose (DA), característica dos espectros da carragenana *kappa*, *iota*, *beta* e *theta* (Pereira, 2004). Este espectro pertence, portanto, a um espectro de carragenana híbrida *xi/lambda*, maioritariamente tipo *lambda*.

Por fim, todos os espectros das três fases do ciclo de vida de *G. pistillata* apresentam em comum outras bandas de forte absorção para além das já mencionadas, como é o caso de bandas na região  $1210-1260\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes ao S=O dos ésteres sulfato (estas bandas estão sempre presentes nas amostras de polissacarídeos sulfatados, em contraste com outras bandas vibracionais que são características das carragenanas) e das bandas na região  $1010-1080\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes à ligação glicosídica, comum a todas as carragenanas (Pereira *et al.*, 2003). Resumidamente, os outros grupos químicos são característicos de cada tipo de 3,6-anidrogactose (DA) a  $925-935\text{ cm}^{-1}$ ; a galactose-4-sulfato (G4S) a  $845-850\text{ cm}^{-1}$ ; galactose-2-sulfato (G/D2S) a

820-830  $\text{cm}^{-1}$  e 3,6-anidrogactose-2-sulfato (DA2S) (Roberts & Quemener, 1999; Pereira *et al.*, 2003).

Descobertas feitas por Yaphe e Arsenaul (1965) comprovaram que a carragenana *kappa* era predominante nos ficocolóide produzidos pelos gametófitos e a carragenana *lambda* nos tetrasporófitos.

Mais tarde, pesquisas feitas com amostras portuguesas de tetrasporófitos e analisadas por Anderson e colaboradores (1968) e por Pereira e Mesquita (2003), mostravam a existência aparente de carragenana *lambda*. Após algum tempo, estes estudos foram corroborados por Pereira (2004) que de acordo com dados espectroscópicos (FT-Raman), concluíram que os estudos de ambos os autores estavam corretos, ou seja, os tetrasporófitos de *G. pistillata* produzem uma carragenana híbrida, apresentando simultaneamente frações *xi* e *lambda*. A produção de uma carragenana híbrida *xi/lambda* pelos tetrasporófitos de *G. pistillata* ficou confirmada no estudo de Pereira (2004), estando de acordo com as análises feitas por Amimi e colaboradores (2001), com base num espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN. Após a identificação das carragenanas, obtemos a informação do seu aspeto e da sua capacidade para formar uma solução espessa ou géis, sendo que a carragenana *lambda* é uma carragenana espessante/viscosificante, e por sua vez, as carragenanas *iota* e *kappa* são gelificantes (van de Velde *et al.*, 2002).

#### **4.3. Determinação da atividade antioxidante**

O potencial antioxidante das macroalgas vermelhas é tido como um importante regulador de processos de oxidação quer *in vivo* quer *in vitro* (Mohamed *et al.* 2012), derivando a maioria da atividade antioxidante de compostos ricos em polifenóis, carotenoides, vitaminas e hormonas (Abad *et al.* 2013).

##### **4.3.1. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: polissacarídeos**

Os polissacarídeos derivados de algas têm vindo a desempenhar um papel extremamente importante no que toca à eliminação de radicais livres *in vitro* e em processos de prevenção de riscos oxidativos (Kumar *et al.*, 2008).

Estudos mostram que glucanos sulfatados exibem um maior poder antioxidante do que outros tipos de polissacarídeos, o que sugere que estes terão maior propensão

a ter uma maior atividade sequestradora de radicais livres (Tsipali *et al.*, 2001). Resultados de vários estudos, sugerem também, que carragenanas e os seus oligómeros e derivados, têm imensas propriedades antioxidantes (Abad *et al.*, 2013).

Neste estudo, no ensaio de DPPH com os polissacarídeos, apenas os polissacarídeos correspondentes à amostra do gametófito feminino revelaram alguma resposta a este ensaio, 1,7% de redução, no entanto não foi um resultado promissor sendo que a atividade demonstrada por esta amostra foi baixa. As amostras do talo não frutificado e do tetrasporófito não apresentaram qualquer atividade. Estes resultados não são concordantes com estudos que afirmam que estes compostos derivados de algas vermelhas têm um grande poder antioxidante.

Isto pode dever-se, em primeiro lugar, ao facto de a produção de carragenana variar com a estação do ano, de espécie para espécie, nas diferentes etapas do ciclo de vida, no meio e na idade da espécie. No outono, o conteúdo em ficocolóides é inferior ao registado no verão, o que se relaciona respetivamente com os elevados e reduzidos níveis de nutrientes (azoto e fósforo) na água (Pereira, 2004). Outros fatores que influenciam esta variação no conteúdo em ficocolóides abrangem também o fotoperíodo, a fase do ciclo de vida, o nível de crescimento, a temperatura (do ar e da água do mar), o pH, a salinidade da água e os nutrientes (níveis de fósforo e azoto). No entanto, os fatores que mais fortemente se relacionam com o conteúdo em carragenana, são a temperatura e o nível de nutrientes (Pereira, 2004). Uma vez que para estes ensaios antioxidantes foram usados os extratos das amostras recolhidas no período de outono, esta poderá ser uma explicação para o facto de apenas os extratos do gametófito feminino terem revelado atividade, embora reduzida.

Em segundo lugar, outro fator que poderá ter influenciado os resultados deste estudo é o facto de na mesma alga, a carragenana que é obtida a partir das partes mais jovens (ramos terminais), que são submetidas a um grande crescimento, apresenta menor qualidade do que aquela que se encontra contida nas outras porções mais velhas (na base da alga) (Pereira, L.). Ou seja, a quantidade de alga que foi utilizada para extrair a carragenana no processo de extração é muito reduzida, apenas 1 g de alga, portanto poderá ser considerada uma quantidade baixa, o que pode influenciar, uma vez que essa quantidade utilizada poderá apenas conter carragenana de baixa qualidade sendo que

no ensaio de DPPH a atividade tenha sido reduzida ou até mesmo nula em algumas das amostras.

#### **4.3.2. Determinação da atividade antioxidante – DPPH: extrato metanólico**

Neste ensaio foi usado todo o extrato metanólico (o sobrenadante e o precipitado). Os resultados apresentaram baixa atividade, 7,35% de redução no caso da amostra do gametófito feminino, 1,65% de redução no caso da amostra do tetrasporófito e 0% de redução no caso do tetrasporófito, no entanto, a percentagem de redução em algumas destas amostras foi superior às percentagens registadas no caso do ensaio com os polissacarídeos. As amostras do gametófito feminino e do talo não frutificado mostraram sinais de atividade redutora de radicais DPPH, podendo este valor sugerir que estão presentes compostos antioxidantes como carotenoides (ex. Zeaxantina, Luteína) (Dring, 1982) e outro tipo de pigmentos.

É sabido que a eficiência da utilização de metanol é consideravelmente grande, sendo, portanto, expectável que os extratos metanólicos apresentem conteúdos superiores em compostos antioxidantes relativamente aos polissacarídeos. A eficiência do metanol como solvente orgânico, em quantidade e diversidade de compostos extraídos, poderá dever-se a uma maior abundância de compostos lipídicos polares na *Gigartina pistillata*. Contudo, todos os valores observados de potencial antioxidante, sejam altos ou baixos, não dependem só de uma boa capacidade de carga/extração do solvente utilizado, visto existir influência direta de diferentes variáveis ambientais e bioquímicas, características do meio onde o espécime cresce (Lehninger, 2005). Diferentes condições de crescimento podem revelar valores de conteúdos e potenciais antioxidantes bastante distintos. A capacidade antioxidante é diretamente relacionada com mecanismos de fotoproteção, sendo esta aparentemente mais elevada em espécies características do horizonte médio litoral, local onde se pode encontrar a *Gigartina pistillata*, expostas a mudanças drásticas no espectro de radiação luminosa e UV (Aguilera *et al.*, 2002). Todos os resultados dependem também do tratamento ulterior oferecido às amostras, podendo a secagem na estufa a uma temperatura mais elevada e o subsequente armazenamento reduzir drasticamente todo este potencial (Aguilera *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2005; Ambrozova *et al.*, 2014).

Os estudos desenvolveram-se com concentrações muito baixas de amostra, sendo que as extrações são realizadas a partir de 1 g de alga, que é uma quantidade de alga baixa e isto pode levar a que a bioatividade seja reduzida ou nula ainda que o extrato tenha um bom rendimento e o processo de extração com metanol seja eficaz e vantajoso.

#### **4.3.3. FRAP (Ferric reducing ability of plasma)**

Neste ensaio a atividade antioxidante foi determinada pelo método de FRAP que depende da redução de Fe(III) a Fe(II) (Kaushik *et al.*, 2012). Quando o Fe(III) do complexo de Fe(III)-tripiriditriazina é reduzido a Fe(II) forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul passível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm e que é proporcional à quantidade de espécies redutoras presentes na amostra (Benzie & Strain, 1996). O referido ensaio é simples, rápido, pouco dispendioso e robusto, podendo ser realizado com o auxílio de métodos manuais, semiautomáticos ou automáticos (Prior *et al.*, 2005).

Os polissacarídeos não evidenciaram qualquer atividade redutora, facto que parece ser confirmado pela ausência de referências bibliográficas sobre esta atividade nestes compostos.

Já no extrato metanólico (sobrenadante e precipitado) os resultados mostram diferenças notáveis entre o controlo e as amostras em estudo. No precipitado, as amostras revelaram uma atividade antioxidante mais elevada, o que é espectável tendo em conta que existe mais quantidade de pigmentos e que estes são uma fonte de antioxidantes, comparativamente aos extratos do sobrenadante, o que pode justificar que a atividade revelada por esta alga neste estudo se deva aos pigmentos, tendo estes um papel crucial na atividade sequestradora de radicais livres desta espécie; contudo, todas as amostras dos dois ensaios mostraram capacidade bioativa.

A atividade redutora do precipitado (0,16 g alga/mL) foi superior ao sobrenadante (0,33 g alga/mL), isto poderá ser justificado pelo facto de no precipitado existir mais quantidade de pigmentos e conseqüentemente conferirem mais atividade redutora às amostras deste extrato comparativamente ao sobrenadante que terá menos quantidade destes pigmentos. Todavia, há a necessidade de realizar outros tipos de

ensaios de atividade redutora para fazer uma análise mais rigorosa dos constituintes destes extratos a fim de perceber quais os compostos responsáveis pela mesma.

#### **4.3.4. Cromatografia de camada fina (TLC): análise de pigmentos**

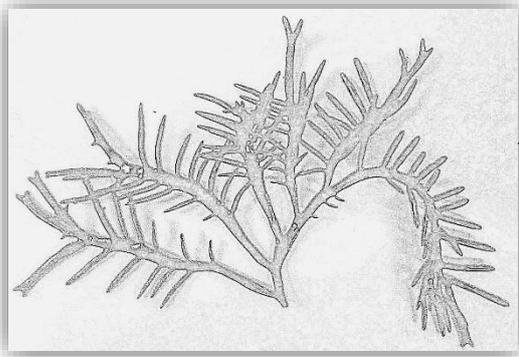
A aplicação de métodos de TLC permite a separação de compostos individualmente. Estes têm vindo a ser muito utilizados na deteção e quantificação de compostos existentes nas macroalgas, sendo muitas vezes complementado com a aplicação de outras técnicas.

Na TLC deste trabalho é de notar imediatamente os principais pigmentos: o  $\beta$ -caroteno ( $R_f=0,92$ ), a clorofila  $a$  ( $R_f=0,75$ ) (Reiss, 1994), a zeaxantina ( $R_f=0,85$ ) e a luteína ( $0,68$ ) (Sajilata *et al.*, 2008).

O  $\beta$ -caroteno foi o componente menos polar, interagindo mais com a fase móvel e menos com a fase estacionária (polar) sendo desta forma deslocado mais facilmente pela mistura de solventes. Já a clorofila desloca-se menos do que o caroteno ficando abaixo na corrida do solvente. É importante frisar que existem outros componentes que não são identificados e/ou visíveis na placa, sendo para isso necessário a realização de outros estudos mais aprofundados a fim de realizar a caracterização dos mesmos.

A coloração dos pigmentos identificados não é uma coloração muito carregada uma vez que a concentração e quantidade da amostra usadas foram baixas. Aqui poder-se-ia ter utilizado uma concentração maior de amostra para que os pigmentos fossem mais visíveis para assim facilitar a identificação.

A fim de verificar a bioatividade dos pigmentos foi utilizado na placa o DPPH como revelador e os resultados foram positivos e promissores uma vez que os compostos identificados possuem atividade antioxidante (a redução é visível pelo aparecimento de uma coloração amarela), sendo os pigmentos uma possível explicação para a atividade antioxidante dos extratos metanólicos, uma vez que estes também possuem pigmentos, comparativamente aos polissacarídeos onde estes pigmentos não estão presentes.



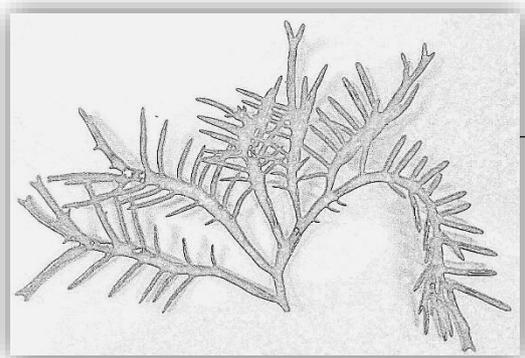
---

## 5. Conclusão e perspectivas futuras

## 5. Conclusão e perspectivas futuras

A *Gigartina pistillata* é uma boa fonte de carragenanas com interesse no desenvolvimento biotecnológico em setores industriais, alimentares e farmacêuticos. Neste estudo, concluiu-se que a quantidade de carragenana produzida por esta alga varia com a época do ano e com o ciclo de vida. Neste trabalho, foram identificadas as carragenanas híbridas *kappa/iota* e *xi/lambda*, sendo que estes compostos não apresentaram atividade antioxidante significativa, no entanto, poderão apresentar outros tipos de atividades. No seguimento deste estudo será de extremo interesse avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral das carragenanas identificadas nesta alga, que poderão ter aplicações na área farmacêutica.

Esta alga é também uma fonte de pigmentos que, neste trabalho, apresentaram atividade antiradicalar e redutora, sendo desta forma provavelmente os principais responsáveis pela atividade antioxidante da mesma. Concluiu-se também que a quantidade destes pigmentos varia consoante a fase do ciclo de vida da alga, influenciando assim, a sua atividade antioxidante. Adicionalmente dever-se-á proceder à identificação de outros constituintes desta alga, bem como avaliar esta e outras atividades.



---

## 6. Referências bibliográficas

## 6. Referências bibliográficas

Abad, L.; Rellve, L.; Racadio, C.; Aranilla, C.; Alumanda, A. (2013). Antioxidant activity potential of gamma irradiated carrageenan. *Applied Radiation and Isotopes*, 79: 73-79.

Almeida, A. R. G. S. D. (2007). Estudo da flora algológica do intertidal da Praia da Vigia.

Ambrósio, C.; Campos, F.; Faro, Z. (2006). Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. *Rev. Nutr., Campinas*, 19 (2): 233-243.

Ambrozova, J. V.; Misurcova, L.; Vicha, R.; Machu, L.; Samek, D.; Baron, M.; Mlcek, J.; Sochor, J.; Jurikova, T. (2014). Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Molecules*, 19(2), pp.2344-2360.

Aguilera, J.; Bischof, K.; Karsten, U.; Hanelt, D.; Wiencke, C. (2002). Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Marine Biology*, 140(6), pp.1087-1095.

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).

Amimi, A.; Mouradi, A.; Givernaud, T.; Chiadmi, N.; Lahaye, M. (2001). Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydr Res* 333(4): 271-279.

Anderson, N. S.; Dolan, T. C. S.; Rees, D. A. (1965). Evidence for a common structural pattern in polysaccharide sulphates of Rhodophyceae. *Nature* 205(4976): 1060-1068.

Anderson, N. S.; Dolan, T. C. S.; Lawson, C. J.; Penman, A.; Rees, D. A. (1968). Carrageenans.V. Masked repeating structures of lambda- and mu-carrageenans. *Carbohydr Res* 7(4): 468.

Ardré, F. (1970). Contribution à l'étude des algues marines du Portugal. I. La flore. *Port. Act. Biol.* 10(1-4): 1-423.

Ardré, F. (1971). Contribution à l'étude des algues marines du Portugal. II. Ecologie et chorologie. *Bull. Cent. Etude. Rech. Sci. Biarritz* 8(3): 359-574.

Benzie, I. F. and Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.

Dapper, T.; Pujarra, S.; de Oliveira, A. J.; de Oliveira, F. G. (2014). Review of the potentialities of sea macroalgae in agriculture. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.7, n.2, p. 295-313.

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.

Dufossé, L.; Galaupa, P.; Yaronb, A.; Aradb, S. M.; Blancc, P.; Murthyd, K. N. C.; Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology* 16(9): 389-406.

Cáceres, P. J.; Faúndez, C. A.; Matsuhira, B.; Vasquez, J. A. (1997). Carrageenophyte identification by second-derivative Fourier transform infrared spectroscopy. *J Appl Phycol* 8(6): 523-527.

Campbell, A. and 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.

Chopin, T.; Gallant, T.; Davison, I. (1995). Phosphorus and Nitrogen Nutrition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta) - Effects on Total Phosphorus and Nitrogen-Content, Carrageenan Production, and Photosynthetic Pigments and Metabolism. *J Phycol* 31(2): 283-293.

Chopin, T.; Hourmant, A.; Floch, J.Y.; Penot, M. (1990). Seasonal-Variations of Growth in the Red Alga *Chondrus crispus* on the Atlantic French Coasts .2. Relations with Phosphorus Concentration in Seawater and Internal Phosphorylated Fractions. *Can J Bot* 68(3): 512-517.

Chopin, T.; Kerin, B.F.; Mazerolle, R. (1999). Phycocolloid chemistry as taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research* 47: 167-188.

Chopin, T.; Sharp, G.; Belyea, E.; Semple, R.; Jones, D. (1999). Open-water aquaculture of the red alga *Chondrus crispus* in Prince Edward Island, Canada. *Hydrobiologia* 399: 417-425.

Chopin, T. and Wagey, B.T. (1999). Factorial study of the effects of phosphorus and nitrogen enrichments on nutrient and carrageenan content in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and on residual nutrient concentration in seawater. *Bot Mar* 42(1): 23-31.

Cornish, M. L. and Garbary, D. J. (2010). Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. *Algae*, 25 (4): 155-171.

Cosson, J.; Deslandes, E.; Braud, J. P. (1990). Preliminary Approach to the Characterization and Seasonal-Variation of Carrageenans from 4 Rhodophyceae on the Normandy Coast (France). *Hydrobiologia* 204: 539-544.

Craigie, J. S. (1990). Cell walls. In: K.M. Cole e R.G. Sheath (Eds.) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge: 221-257.

Dias, G. (2001). Granulados bioclásticos – algas calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18 (3): 307-318.

Dring, M. J., (1982). *The Biology of Marine Plants*.

Fleurence, J.; Moranças, 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.

Freire, P.; Oliveira, F. S.; Capitão, R.; Fortes, C.; Costa, M. (2004). Cross-shore evolution of Buarcos beach, Portugal. *Coastal engineering*, 10, 9789812701916\_0186.

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.

Flindt, M. R.; Kamp-nielsen, L.; Marques, J. C.; Pardal, M. A.; Bocci, M.; Bendoricchio, G.; Salomonsen, J.; Nielsen, S. N.; Jorgensen, S. E. (1997). Description of the three shallow estuaries: Mondego River (Portugal), Roskilde Fjord (Denmark) and the Lagoon of Venice (Italy). *Ecol Model* 102(1): 17-31.

Fusetani, N. (2000). *Drugs From The Sea*. Karger. Tokyo. Japan.

Grossman, A. R., Schaefer, M. R.; Chiang, G. C.; Collier, J. L. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental-conditions. *Microbiol. Rev.* 57: 725-749.

Gurgel, C. F. D.; J. Lopez-Bautista. (2007). *Red Algae*. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.

Heimann, Kirsten (2012). *Advances in Algal Cell Biology*, Alemanha: de Gruyter.

Hommersand, M.; Fredericq, S.; Cabioch, J. (1992). Developmental morphology of *Gigartina pistillata* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 31 (3 – 4): 300-325.

Hommersand, M.; Guiry, M.; Fredericq, S.; Leister, G. (1993). New perspectives in the taxonomy of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) *Hydrobiologia* 260/261: 105-120.

Kang, K.; Park, Y.; Hwang, H. J.; Kim, S. H.; Lee, J. G.; Shin, H. C. (2003). Antioxidant properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive against vascular risk factors. *Arch Pharm Res.* 6: 286-293.

Kaushik, A.; Jijta, C.; Kaushik, J.; Zeray, R.; Ambesajir, A.; Beyene, L. (2012). FRAP (Ferric reducing ability of plasma) assay and effect of *Diplazium esculentum* (Retz) Sw. (a green vegetable of North India) on central nervous system. *Indian Journal of Natural Products and Resources.* 3(2): 228-231.

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.

Kim, D. H. (1976). A study of the development of cystocarps and tetrasporangial sori in Gigartinaceae (Rhodophyceae, Gigartinales). *Nova Hedwigia* 27: 1-146.

Knutsen, S. H.; Myslabodski, D. E.; Larsen, B.; Usov, A. I. (1994). A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans. *Bot Mar* 37(2): 163-166.

Kopp, J. (1975). Contribution à l'étude de l'algue rouge *Chondrus crispus* Stackh. *Biochimie des carraghénanes.* Tese de Doutoramento, Université Bretagne Occidentale, 93 pp.

Kopp, J. and Perez, J. (1979). Contribution à l'étude de l'algue rouge *Chondrus crispus* Stackh. Relation entre la croissance, la potentialité sexuelle, la quantité e la composition de carraghénanes. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 42: 291-324.

Kumar, K. S.; Ganesan, K.; SubbaRao, P. (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycusalvarezii* (Doty) Doty—an edible seaweed. *Food Chem.* 107, 289-295.

Lee, Robert (2008). *Phycology*, Colorado State University, USA: Cambridge University Press.

- Nelson, D. and Cox, M. (2005). Lehninger, Principles of Biochemistry. p.1119.
- Lewis, J. R. (1964). The ecology of rocky shores. English Universities Press Ltd., London, 300 pp.
- 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.
- Mathieson, A. C.; Penniman, C. E.; Tvetter-gallagher, E. (1984). Phycocolloid ecology of underutilized economic Red Algae. Hydrobiologia 116(Sep): 542-546.
- Matsuhiro, B. (1996). Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. Hydrobiologia 327: 481-489.
- Matsukawa, R.; Dubinsky, Z.; Kishimoto, E.; Masaki, K.; Masuda, Y.; Takeuchi, T.; Chihara, M.; Yamamoto, Y.; Niki, E.; Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. Journal of Applied Phycology. 9, 29-35.
- Mchugh, D. J. (2003). A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper 441: 52-72.
- Martins, I.; Pardal, M. A.; Lillebo, A. I.; Flindt, M. R.; Marques, J.C. (2001). Hydrodynamics as a major factor controlling the occurrence of green macroalgal blooms in a eutrophic estuary: A case study on the influence of precipitation and river management. Estuar Coast Shelf S 52(2): 165-177.
- Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D.; Berlinck, R. G. S.; Hamann, M. T. (2009). Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antibuberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. Biochimica et Biophysica Acta. 1790: 283-308.
- Mesquita Rodrigues, J. E. (1963). Contribuição para o conhecimento das Phaeophyceae da costa portuguesa. Bol. Soc. Brot. 16: 1-124.

Milledge, J. J. (2010). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10(1): 31-41.

Mohamed, S.; Hashim, S. N.; Rahman, H. A., (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science and Technology*, 23(2), pp.83-96.

Moura, J.; Cardozo, M.; Belo, M.; Hacon, S.; Siciliano, S. (2011). The interface of public healthcare with the health of the oceans: proliferation of disease, socio-economic impacts and beneficial relationships. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(8):3469-3480.

Múrias, A. (1994). Estudo e caracterização dos povoamentos bentónicos intertidais de substrato rochoso do Norte de Portugal. Tese de Mestrado, Universidade do Porto.

Oneill, A. N. (1955a). 3,6-Anhydro-D-Galactose as a Constituent of K-Carrageenin. *Journal of the American Chemical Society* 77(10): 2837-2839.

Palminha, F. P. (1951). Contribuição para estudo das algas marinhas portuguesas. I. *Bol. Port. Ciênc. Nat.* 2(3): 226-250.

Pereira, L., "Extracção, caracterização e utilização das carragenanas". *Ciência Viva*.

Pereira, L. (2007). *As Algas Marinhas e Respektivas Utilidades*. Departamento de Botânica – Universidade de Coimbra.

Pereira, L. (1996). *Ecologia das macroalgas marinhas. Estudo ecológico duma população de Gigartina teedii da baía de Buarcos. Provas de aptidão e capacidade científica*, Universidade de Coimbra: 99.

Pereira, L. (2004). *Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa – aspectos ecológicos, bioquímicos e Citológicos*. PhD Thesis, University of Coimbra, Coimbra.

Pereira, L. (2008). *As algas marinhas e respectivas utilidades*. Monografias.com.

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. 12.

Pereira, L.; Sousa, A.; Coelho, H.; Amado, A.; Ribeiro-Claro, P. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering* 20: 223-228.

Pereira, L.; Amado, A.; Critchley, A.; van de Velde, F.; Ribeiro-Claro, P. (2009). Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids*: 1-7.

Pereira, L. and Correia, F., (2015). Macroalgas Marinhas da Costa Portuguesa. biodiversidade, ecologia e utilizações. Nota de Rodapé edições.

Pereira, L. and Mesquita, J. F. (2003). Carrageenophytes of occidental Portuguese coast: 1-spectroscopic analysis in eight carrageenophytes from Buarcos bay. *Biomolecular Engineering* 20: 217-222.

Pereira, L. and Mesquita, J.F. (2004). Population studies and carrageenan properties of *Chondrachantus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 16(5): 369-383.

Pereira, L.; Sousa, A.; Coelho, H.; Amado, A. M. e Ribeiro-Claro, P. J. A. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomol Eng* 20(4-6): 223-228.

Pereira, L.; Gheda, S. F.; Ribeiro-Claro, P. J. A. (2013). Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. Hindawi Publishing Corporation, *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 537202: 1-7.

Perez, R.; Kaas, R.; Campello, F.; Arbault, S.; Barbaroux, O. (1992). *La Culture des algues marines dans le monde*. IFREMER, Plouzane, 613 pp.

Plaza, M.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*. 19: 31-39.

Potin, P.; Bouarab, K.; Salaün, J. P.; Pohnert, G.; Kloareg, B. (2002). Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:1-10.

Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.

Reiss, C. (1994). *Experiments in Plant Physiology*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Ribier, J. and Godineau, J. C. (1984). *Les Algues*. La Maison Rustique, Flammarion: 15-26.

Rinaudo, M. (2002). Alginates and carrageenans. *Actual Chimique*(11-12): 35-38.

Roberts, M. A. and Quemener, B. (1999). Measurement of carrageenans in food: challenges, progress, and trends in analysis. *Trends Food Sci Tech* 10(4-5): 169-181.

Saá, C. F. (2002). *Algas do Atlântico, Alimento e Saúde. Propriedades, receitas e descrição*. Algamar, Redondela – Pontevedra. pp. 19.

Sagar, K. and Vidyasagar, G. M. (2013). Anti-dermatophytic activity of some traditionally used medicinal plants of North Karnataka Region. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3: 077-083

Sajilata, M. G.; Singhal, R. S.; Kamat, M. Y. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin—A Review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 7: 29-49.

Smith, D. B.; O'Neill, A. N.; Perlin, A. S. (1955). Studies on the Heterogeneity of Carrageenin. *Can J Chem* 33(8): 1352-1360.

Smit, A. J. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *J. Appl. Phycol*. 16:245-62.

Spieler, R. (2002). Seaweeds compound's anti-HIV efficacy will be tested in southern Africa. *Lancet* 359:1675.

Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2): 87-96.

Stringheta, P.; Nachtigall, A.; Oliveira, T.; Ramos, A.; Santana, H.; Gonçalves, M. (2006). Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. *Alim. Nutr., Araraquara*, 17 (2): 229-238.

Takeshi, S.; Yumiko, Y. S.; Joko, S. (2005). Mineral components and anti-oxidant activities of tropical seaweeds. *Journal of Ocean University of China*. 4: 205-208.

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

Tsipali, E.; Whaley, S.; Kalbfleisch, J.; Ensley, H.; Browder, I.; Williams, D. (2001). Exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radical Biol. Med.* 30, 393-402.

Tveter, E. and Mathieson, A. C. (1976). Sporeling Coalescence in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). *J Phycol* 12(1): 110-118.

van de Velde, F.; Knutsen, S. H.; Usov, A. I.; Rollema, H. S.; Cerezo, A. S. (2002). H-1 and C-13 high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends Food Sci Tech* 13(3): 73-92.

Woelkerling, W. J. (1990). An introduction In: (K.M. Cole and R.G. Sheath, eds) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1-6.

Yaphe, W. and Arsenaul, G. P. (1965). Improved Resorcinol Reagent for Determination of Fructose and of 3,6-Anhydrogalactose in Polysaccharides. *Anal Biochem* 13(1): 143-148.

Yuan, Y. V.; Bone, D.E.; Carrington, M. F. (2005). Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chemistry*, 91(3), pp.485-494.

Zemke-White, W. L. and Ohno, M. (1999). World seaweed utilisation: An end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology* 11: 369-376.

Zinoun, M. (1993). Etudes biochimiques des polysaccharides parietaux produits par deux Gigartinales (Rhodophycées) des cotes de la Mache, in situ et en cultures controlées: *Calliblepharis jubata* et *Gigartina teedii*. Tese de Doutoramento em Ciências, Université de Technologie de Compiègne, pp. 219.

Zinoun, M. and Cosson, J. (1996). Seasonal variation in growth and carrageenan content of *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae, Gigartinales) from the Normandy coast, France. *J Appl Phycol* 8(1): 29-34.

Zinoun, M.; Cosson, J.; Deslandes, E. (1993). Influence of Culture Conditions on Growth and Physicochemical Properties of Carrageenans in *Gigartina teedii* (Rhodophyceae, Gigartinales). *Bot Mar* 36(2): 131-136.

[http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=C5fbed02517bbbc4d&sk=0&from=results](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=C5fbed02517bbbc4d&sk=0&from=results)) (acedido em 21 de novembro de 2015).

<http://descobrir-portugal.com/2010/11/figueira-da-foz-praia/> (acedido em 21 de novembro de 2015).

<http://pt.surf-forecast.com/breaks/Gala> (acedido em 21 de novembro de 2015).

[https://pt.wikipedia.org/wiki/Chondrus\\_crispus#/media/File:Life\\_cycle\\_Chondrus.jpg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Chondrus_crispus#/media/File:Life_cycle_Chondrus.jpg) (acedido em 21 de Novembro de 2015).

[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Ficoeritrina&lang=3](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Ficoeritrina&lang=3) (acedido em 1 de julho de 2016).

[http://escalera.bio.ucm.es/usuarios/criptogamas/plantas\\_criptogamas/materiales/glosario.html](http://escalera.bio.ucm.es/usuarios/criptogamas/plantas_criptogamas/materiales/glosario.html) (acedido em 1 de julho de 2016).