



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2016

**Stéphanie da Silva  
Trindade**

**Prospecção de compostos bioativos nas  
macroalgas *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira  
tamariscifolia* e *Sargassum muticum***





Universidade de Aveiro Departamento de Química  
Ano 2016

**Stéphanie da Silva  
Trindade**

**Prospecção de compostos bioativos nas  
macroalgas *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira  
tamariscifolia* e *Sargassum muticum***

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Sónia Andreia Oliveira Santos, investigadora de pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho à minha família.



**o júri**

presidente

**Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro

**Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre**  
Professor associado da Universidade de Aveiro

**Doutora Sónia Patrícia Marques Ventura**  
Investigadora de pós-doutoramento da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Aos meus orientadores, Doutor Armando Silvestre e Doutora Sónia Santos, pela orientação, disponibilidade e conhecimentos cedidos ao longo deste trabalho.

A Doutora Carla Vilela pela disponibilidade e orientação prestada.

Ao grupo de investigação LignoMacro pelo bom ambiente de trabalho e por todas as ajudas que tornaram esta jornada mais fácil.

Aos amigos pela paciência e pelos bons momentos de descontração. Um especial agradecimento à Selesa, a Diana, ao António e a Carolina pelo apoio.

Ao Sérgio pela sua paciência, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos.

E por último, agradeço à minha família, em particular a minha mãe e irmãos, pelo apoio e pela confiança depositada em mim.



**palavras-chave**

Macroalgas, *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia*, compostos bioativos, compostos lipofílicos, compostos fenólicos, atividade biológica, atividade antioxidante

**resumo**

O trabalho apresentado teve como principal objetivo caracterizar os extratáveis lipofílicos e polares de três espécies de macroalgas castanhas existentes na costa portuguesa, a *Bifurcaria bifurcata*, a *Cystoseira tamariscifolia* e a *Sargassum muticum*, de forma a contribuir para a sua valorização.

As frações lipofílicas foram obtidas por extração Soxhlet com diclorometano, e as frações polares foram obtidas por extração sólido-líquido, utilizando diferentes misturas de solventes (acetona:H<sub>2</sub>O e MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH). Os extratos resultantes foram analisados por GC-MS e HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>, respetivamente. Os extratos polares foram ainda avaliados quanto ao teor de fenóis totais (método de Folin-Ciocalteu) teor de florotaninos totais (método DMBA) e à sua atividade antioxidante (DPPH). A fração lipofílica da *C. tamariscifolia* e da *S. muticum* é composta maioritariamente por ácidos gordos e esteróis, sendo os compostos maioritários de cada família o ácido hexadecanóico e o fucosterol, respetivamente. No que diz respeito à fração lipofílica da *B. bifurcata*, esta é composta maioritariamente por diterpenos derivados do fitol.

Os extratos polares apresentaram rendimentos elevados, tendo os extratos em MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH da *C. tamariscifolia* e da *S. muticum* apresentado os valores mais elevados, 57.29 e 56.68% respetivamente, enquanto no caso da *B. bifurcata*, o extrato acetona:H<sub>2</sub>O foi o que apresentou rendimento mais elevado, 85.33%. No que diz respeito ao teor de fenóis totais, os extratos acetona:H<sub>2</sub>O apresentaram valores mais elevados (148.16-204.62 g EFG/kg peso seco), enquanto os teores de florotaninos totais mais elevados foram observados para os extratos em MeOH:H<sub>2</sub>O (0.126-2.917 g EFG/kg peso seco). Os extratos em acetona:H<sub>2</sub>O apresentaram atividade antioxidante superior, com valores de IC<sub>50</sub> entre 7.62 e 8.68 µg/mL. Apesar de estes extratos possuírem atividade antioxidante inferior à do ácido ascórbico, os valores são superiores ao determinado para o butil-hidroxitolueno (BHT). A análise por HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> não permitiu detetar compostos fenólicos nos extratos polares estudados.

Estes resultados mostraram ser uma contribuição relevante para a valorização destas espécies de macroalgas como fonte de compostos bioativos.



**keywords**

Macroalgae, *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia*, bioactive compounds, lipophilic compounds, phenolic compounds, biological activity, antioxidant activity

**abstract**

The objective of this work was to characterize the lipophilic and polar extractives of three macroalgae species from the Portuguese coast, namely *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia* and *Sargassum muticum* in order to contribute to their valorization.

The lipophilic fractions were obtained by Soxhlet extraction with dichloromethane, and the polar fractions were obtained by solid-liquid extraction using different solvent mixtures (acetone:H<sub>2</sub>O and MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH). The resulting extracts were analyzed by GC-MS and HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>, respectively. The total phenols were also evaluated for total phenolic content (Folin-Ciocalteu method) and also the total phlorotannins content (DMBA method) and their antioxidant activity (DPPH). The lipophilic fraction of *C. tamariscifolia* and *S. muticum* were mainly composed of fatty acids and sterols, with hexadecanoic acid and fucosterol as the major compounds, respectively. The lipophilic fraction of *B. bifurcata* is mainly composed of diterpenes derived from phytol.

The polar extracts have shown high extraction yields. For *C. tamariscifolia* and *S. muticum* the higher extraction yields were obtained with MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (57.29 and 56.68% respectively), while in the case of *B. bifurcata*, the extract in acetone:H<sub>2</sub>O showed the highest yield (85.33%). For the total phenolic content, the extracts acetone:H<sub>2</sub>O showed higher values (148.16-204.62 g EFG / kg dry weight), but the total phlorotannins content the extracts in MeOH: H<sub>2</sub>O: AcOH showed the higher values (0.126- 2,917 g EFG / kg dry weight). The extracts in acetone:H<sub>2</sub>O showed higher antioxidant activity, with IC<sub>50</sub> values between 7.62 and 8.68 mg/mL. Although these extracts possess lower antioxidant activity than ascorbic acid, they have higher antioxidant activity than butylated hydroxytoluene (BHT). The HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> analysis did not allow to detect phenolic compounds in the polar extracts.

These results proved to be a relevant contribution to the recovery of these species of macroalgae as a source of bioactive compounds.



# Índice

Índice de Figuras .....	iii
Índice de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas .....	vi
1. Objetivos .....	1
2. Introdução .....	2
2.1. Aplicações das algas.....	3
3. Metabolitos primários e secundários.....	5
4. Composição química das algas e atividade biológica dos seus constituintes.....	6
4.1 Compostos lipofílicos.....	7
4.2. Compostos fenólicos .....	13
4.3. Composição química de macroalgas castanhas em estudo: <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cystoseira tamariscifolia</i> e <i>Sargassum muticum</i> .....	18
4.4. Métodos de extração de metabolitos secundários .....	24
4.5. Atividade biológica de macroalgas .....	26
4.5.1. Atividade antioxidante .....	29
4.5.2. Avaliação e potencial atividade antioxidante dos extratos das macroalgas .....	31
5. Materiais e métodos .....	33
5.1. Amostras e Reagentes .....	33
5.2. Extração da fração lipofílica .....	34
5.2.1. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) .....	34
5.3. Extração da fração polar.....	36
5.3.1. Quantificação do Teor de Fenóis Totais (TPC).....	37
5.3.2. Quantificação do teor de florotaninos totais (TFT) pelo método do 2,4-dimetoxibenzaldeído (DMBA).....	37
5.3.3. Avaliação da atividade antioxidante – Ensaio DPPH.....	38
5.3.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detetor de Arranjo de Díodos e Espectrometria de Massa tandem (HPLC-DAD-MS <sup>n</sup> ).....	38
5.3.5. Análise por Ultravioleta-Vível (UV-Vis) .....	39
5.3.6. Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.....	40

6. Resultados e discussão .....	41
6.1. Extração de compostos lipofílicos.....	41
6.1.1. Identificação e quantificação dos componentes dos extratos lipofílicos por GC-MS ....	42
6.2. Extração dos compostos polares .....	55
6.2.1. Rendimento global das extrações dos compostos polares.....	55
6.2.2. Quantificação do teor de fenóis (TPC) e de florotaninos (TFT) totais.....	56
6.2.3. Atividade antioxidante .....	58
6.2.4. Identificação dos componentes dos extratos polares.....	60
7. Conclusões e trabalhos futuros.....	64
8. Referências bibliográficas .....	65
9. Anexos .....	73



## Índice de Figuras

Figura 1 Utilização mundial de macroalgas (12).....	3
Figura 2 Exemplos de alguns PUFAs presentes em macroalgas: ácido $\alpha$ -linolénico, ácido estearidónico e ácido araquidónico.....	8
Figura 3 Estrutura geral de um triacilglicerol ( $R_1$ , $R_2$ e $R_3$ representam os ácidos gordos)..	8
Figura 4 Exemplos de glicoglicolípidos presentes nas macroalgas castanhas ( $R_1$ e $R_2$ representam os ácidos gordos) (adaptado de (17)).	9
Figura 5 Formação dos intermediários IPP e DMAPP a partir da via MVA e da via DOXP/MEP (adaptado de (24)).	10
Figura 6 Estrutura química dos diterpenos identificados em algas castanhas do género <i>Dictyota</i> (26).	11
Figura 7 Carotenóides e clorofilas existentes em macroalgas.	12
Figura 8 Estrutura química de alguns esteróis presentes em macroalgas (adaptado de (2)).	13
Figura 9 Alguns exemplos de ácidos e aldeídos fenólicos presentes em algas.	14
Figura 10 Esquema base e estrutura base das diferentes subclasses de flavonóides.	15
Figura 11 Exemplos de alguns flavonóis identificados em macroalgas (19).	16
Figura 12 Exemplos de taninos presentes em plantas terrestres (adaptado de (38)).	16
Figura 13 Estrutura química das 6 sub-classes de florotaninos (24).	17
Figura 14 Formação do floroglucinol (adaptado de (43,44)).	18
Figura 15 Imagem das três macroalgas em estudo: A – <i>Bifurcaria bifurcata</i> , B – <i>Cystoseira tamariscifolia</i> e C – <i>Sargassum muticum</i> .	19
Figura 16 Principais tipos de diterpenos acíclicos existentes na <i>B. bifurcata</i> .	20
Figura 17 Estrutura de alguns diterpenos identificados na <i>B. bifurcata</i> (25,47)	20
Figura 18 Estrutura química de Apo-9'-fucoxantina (55).	22
Figura 19 Estrutura química do 7-floroeol e do fucodifloroetol (43).	23
Figura 20 Esquema de um aparelho de extracção Soxhlet (adaptado de (37)).	24
Figura 21 Proposta de mecanismo de reação entre o radical DPPH e um composto antioxidante (adaptado de (37)).	32
Figura 22 Cromatograma de GC-MS do extrato em diclorometano trimetilsililado da <i>S. muticum</i> (AG – Ácidos gordos; PI – Padrão interno).	42
Figura 23 Principais famílias de compostos lipofílicos identificados nos extratos em diclorometano das macroalgas <i>B. bifurcata</i> , <i>C. tamariscifolia</i> e <i>S. muticum</i> . AG - ácidos gordos, E - esteróis, AACL - álcoois alifáticos de cadeia longa e MG – monoglicerídeos.	45
Figura 24 Espetro de massa de impacto eletrónico de ácido hexadecanóico trimetilsililado.	46
Figura 25 Quantidade de ácidos gordos saturados (AGS) e insaturados (AGI) presentes nos extratos de diclorometano das macroalgas <i>B. bifurcata</i> , <i>C. tamariscifolia</i> e <i>S. muticum</i> .	47
Figura 26 Espetro de massa do hexadecan-1-ol trimetilsililado.	49
Figura 27 Espetro de massa do fucosterol trimetilsililado.	50
Figura 28 Cromatograma de GC-MS do extrato lipofílico sem derivatização da <i>B. bifurcata</i> (PI – Padrão interno).	51
Figura 29 Estruturas químicas dos diterpenos identificados a partir da análise de GC-MS do extrato em diclorometano da <i>B. bifurcata</i> .	52
Figura 30 Espetro de massa do neofitadieno.	53
Figura 31 Identificação dos principais fragmentos do espectro de massa do neofitadieno.	53
Figura 32 Espetro de massa do trans-geranilgeraniol.	54

Figura 33 Identificação dos principais fragmentos do trans-geranilgeraniol. ....	54
Figura 34 Cromatograma de HPLC-DAD-MS <sup>n</sup> a 280 nm do extrato em acetona:H <sub>2</sub> O e MeOH:H <sub>2</sub> O:AcOH da <i>S. muticum</i> . ....	60
Figura 35 Espectros UV-Vis dos extratos obtidos à partir da extração acetona:H <sub>2</sub> O das macroalgas <i>S. muticum</i> , <i>C. tamariscifolia</i> e <i>B. bifurcata</i> . ....	61
Figura 36 Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do extrato em acetona:H <sub>2</sub> O da <i>B. bifurcata</i> . ....	62
Figura 37 Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato em acetona:H <sub>2</sub> O da <i>B. bifurcata</i> . ....	63
Figura 38 Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga <i>B. bifurcata</i> . ....	73
Figura 39 Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga <i>C. tamariscifolia</i> . ....	73

## Índice de Tabelas

Tabela 1 Caraterização e classificação das macroalgas de acordo com os principais pigmentos presentes na sua composição. ....	2
Tabela 2 Polissacarídeos presentes na parede celular das macroalgas com respetiva estrutura molecular. ....	7
Tabela 3 Algas castanhas existentes na costa portuguesa. ....	19
Tabela 4 Teor relativo de ácidos gordos ( $g_{AG}/100g_{AG}$ ) presente na <i>S. muticum</i> (adaptado de (60)). ....	22
Tabela 5 Compostos isolados a partir de macroalgas com respetiva atividade biológica. ...	27
Tabela 6 Florotaninos encontrados em macroalgas castanhas e as suas respetivas potenciais atividades biológicas (adaptado de (86)). ....	28
Tabela 7 Macroalgas escolhidas, condições de colheita e respetivo lote. ....	33
Tabela 8 Rendimentos das extrações Soxhlet com diclorometano das macroalgas <i>B. bifurcata</i> , <i>C. tamariscifolia</i> e <i>S. muticum</i> . ....	41
Tabela 9 Identificação e quantificação dos compostos lipofílicos (mg/kg peso seco) presentes nos extratos lipofílicos das macroalgas <i>B. bifurcata</i> , <i>C. tamariscifolia</i> e <i>S. muticum</i> . ....	43
Tabela 10 Identificação e quantificação dos diterpenos (mg/kg peso seco) presentes no extrato lipofílico da macroalga <i>B. bifurcata</i> . ....	52
Tabela 11 Rendimento das extrações com acetona:H <sub>2</sub> O e MeOH:H <sub>2</sub> O:AcOH das algas castanhas <i>B. bifurcata</i> , <i>C. tamariscifolia</i> e <i>S. muticum</i> . ....	56
Tabela 12 Teores de fenóis totais e florotaninos dos extratos em acetona:H <sub>2</sub> O e em MeOH:H <sub>2</sub> O:AcOH das espécies <i>B. bifurcata</i> , <i>C. tamariscifolia</i> e <i>S. muticum</i> . ....	57
Tabela 13 Atividade antioxidante dos extratos em acetona:H <sub>2</sub> O e em mMeOH:H <sub>2</sub> O:AcOH das algas castanhas <i>B. bifurcata</i> , <i>C. tamariscifolia</i> e <i>S. muticum</i> . ....	59

## Lista de Abreviaturas

<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AACL</b>	Álcool alifático de cadeia longa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AG</b>	Ácido gordo
<b>AGI</b>	Ácido gordo insaturado
<b>AGS</b>	Ácido gordo saturado
<b>ASE</b>	Extração acelerada por solvente (do inglês <i>Accelerated Solvent Extraction</i> )
<b>BHT</b>	3,5-di-terc-4-butil-hidroxitolueno
<b>BSTFA</b>	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DGDG</b>	Digalactosil-diacilglicerol
<b>DHA</b>	Ácido docosa-hexanóico
<b>DMAPP</b>	Pirofosfato de dimetilalilo
<b>DMBA</b>	Ensaio 2,4-dimetoxibenzaldeído
<b>DOXP</b>	1-desoxi-D-Xilulose-5-fosfato
<b>DOXP/MEP</b>	Desoxixilulose-fosfato
<b>DPPH</b>	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>DT</b>	Diterpeno
<b>E</b>	Esteróis
<b>EAA</b>	Equivalentes de ácido ascórbico
<b>EAE</b>	Extração assistida por enzimas (do inglês <i>Enzyme-Assisted Extraction</i> )
<b>EAG</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>EBHT</b>	Equivalentes de BHT
<b>EFG</b>	Equivalentes de floroglucinol
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentanóico
<b>GC-MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
<b>GL</b>	Glicerolípidos
<b>GPx</b>	Glutationa peroxidase

<b>GSH</b>	Glutathiona
<b>HMBPP</b>	1-hidroxi-2-metil-2-( <i>E</i> )-butenil-4-difosfato
<b>HMG-CoA</b>	3-( <i>S</i> )-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
<b>HPLC-DAD-MS<sup>n</sup></b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detetor de Arranjo de Díodos e Espetrometria de Massa tandem
<b>IC<sub>50</sub></b>	Quantidade de extrato necessária para reduzir 50% da concentração de DPPH
<b>IPP</b>	Pirofosfato de isopentenilo
<b>MAE</b>	Extração assistida por micro-ondas (do inglês <i>Microwave-Assisted Extraction</i> )
<b>MEP</b>	2-C-Metil-D-eritritol-4-fosfato
<b>MG</b>	Monoglicerídeos
<b>MGMG</b>	Monogalactosil-diacilglicerol
<b>MUFAs</b>	Ácidos gordos monoinsaturados (do inglês <i>Monounsaturated fatty acids</i> )
<b>MVA</b>	Mevalonato
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>PI</b>	Padrão interno
<b>PUFAs</b>	Ácidos gordos poli-insaturados (do inglês <i>Polyunsaturated fatty acids</i> )
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RNS</b>	Espécies reativas de azoto (do inglês <i>Reactive nitrogen species</i> )
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i> )
<b>SFE</b>	Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico (do inglês <i>Supercritical Fluid Extraction</i> )
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SQDQ</b>	Sufoquinovosil-diacilglicerol
<b>TFT</b>	Teor de florotaninos totais
<b>TG</b>	Triacilglicerol
<b>TMS</b>	Trimetilsililado
<b>TMSCI</b>	Trimetilclorossilano

<b>TPC</b>	Teor de fenóis totais
<b>UAE</b>	Extração assistida por ultra-sons (do inglês <i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> )
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Vível

## 1. Objetivos

Apesar de Portugal ser dono de uma das maiores zonas económicas exclusivas do mundo, a procura de recursos aquáticos é ainda muito limitado (1–3). No entanto, têm sido abordadas várias estratégias sustentáveis a fim de desenvolver a valorização desses recursos marinhos e, paralelamente, contribuir para o desenvolvimento económico português (1,4,5). De facto, a biotecnologia marinha tem sido um dos setores com maior crescimento, destacando-se a exploração de organismos marinhos como fonte de compostos biologicamente ativos (6). Sendo que, atualmente se observa um elevado interesse nesse tipo de compostos, devido às suas inúmeras propriedades, estes apresentam diversas aplicações a nível industrial, nomeadamente na cosmética e nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (7).

Dentro dos recursos marinhos, as macroalgas, embora sejam utilizadas na alimentação direta e na medicina tradicional há vários séculos, são pouco exploradas em Portugal, apesar de diversos estudos já terem demonstrado que estas podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos (1,2).

A grande diversidade de espécies de algas presentes na costa Portuguesa, associada à elevada variabilidade que estas apresentam na sua composição, faz com que mais estudos tenham de ser feitos a fim de valorizar estes recursos. Sendo assim, foram definidos como objetivos deste trabalho:

- I. Identificar e quantificar compostos lipofílicos e polares a partir de macroalgas castanhas recolhidas na costa Portuguesa: *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia* e *Sargassum muticum*;
- II. Avaliar o teor de fenóis totais e florotaninos totais e a atividade antioxidante dos extratos polares;
- III. Com o conhecimento gerado, contribuir para a valorização económica das macroalgas da costa Portuguesa.

## 2. Introdução

Os oceanos representam cerca de 70% da superfície terrestre possuindo uma grande diversidade de organismos vivos, tais como as algas que existem nesse meio há mais de dois mil milhões de anos (1). As algas podem ser classificadas em função das suas dimensões em micro- ou macroalgas. As microalgas são organismos microscópicos fotossintéticos com uma estrutura procariótica ou eucariótica, podendo apresentar uma estrutura unicelular ou multicelular simples (8). Por sua vez, as macroalgas são organismos macroscópicos fotossintéticos com uma estrutura eucariótica que apresentam uma grande diversidade de cores, formas e tamanhos. Devido à combinação de diferentes pigmentos presentes nas suas células, que lhes conferem cores diferentes, as macroalgas podem ser classificadas em algas castanhas (*Phaeophyceae*), verdes (*Chlorophyceae*) ou vermelhas (*Rhodophyceae*), de acordo com os principais pigmentos (carotenóides, clorofilas e ficobilinas, respetivamente) presentes na sua composição, como representado na Tabela 1 (2).

**Tabela 1** Caracterização e classificação das macroalgas de acordo com os principais pigmentos presentes na sua composição.

Macroalgas	Pigmentos	
	Clorofila	Carotenóides
Verdes ( <i>Chlorophyceae</i> )	<i>a e b</i>	$\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina
Vermelhas ( <i>Rhodophyceae</i> )	<i>a</i>	$\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina e ficobilinas
Castanhas ( <i>Phaeophyceae</i> )	<i>a</i>	$\beta$ -caroteno, violaxantina e fucoxantina

A distribuição das macroalgas é importante na determinação da estrutura e funcionalidade dos ecossistemas costeiros marinhos e a sua dinâmica tem sido vista como um reflexo das alterações das condições ambientais (9). De facto, a distribuição, composição e abundância dessas comunidades dependem de diversos fatores, sendo esses químicos (salinidade, nutrientes e pH), físicos (marés, exposição às ondas, luz, substrato, temperatura e dessecação) e biológicos (competição) (10). As macroalgas podem habitar superfícies rochosas apresentando alguns milímetros de comprimento e aspeto frágil, como

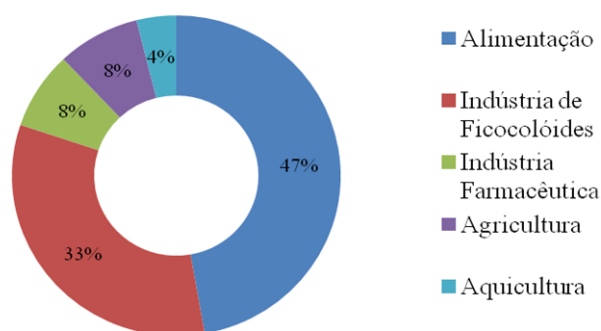


também podem alcançar tamanhos significativos, superiores a cinquenta metros, formando florestas subaquáticas (9).

A costa portuguesa tem uma extensão de aproximadamente 830 km, com boas condições para o desenvolvimento de algas, composta maioritariamente por extensões rochosas e apresentando um gradiente acentuado na distribuição da flora algal (11). Ao longo da costa podem encontrar-se dois grupos distintos de algas, as presentes na zona Norte (entre a foz do rio Minho e a foz do rio Tejo), que apresentam semelhanças com as existentes na zona central da Europa, e as da zona Sul (entre a foz do rio Tejo e o Algarve), que tem uma nítida influência do Mediterrâneo e da zona Norte da costa Ocidental Africana. Ao longo da costa, foi também observada a existência de um decréscimo no número de algas castanhas de Norte para Sul (11). No final da década de 60, foram descobertas e identificadas 404 espécies: 246 *Rhodophyceae*, 98 *Phaeophyceae* e 60 *Chlorophyceae* (11).

## 2.1. Aplicações das algas

As macroalgas têm sido utilizadas como alimento, na cosmética, na agricultura, na aquicultura e na indústria alimentar e farmacêutica (como fonte de ficocolóides e outros compostos químicos) (Figura 1) (2,12).



**Figura 1** Utilização mundial de macroalgas (12).

De entre as aplicações mais comuns das macroalgas destaca-se a sua utilização na indústria alimentar, essencialmente, na China, Coreia e Japão, onde o seu cultivo se tornou

um sector económico importante. Em Portugal o seu uso na alimentação ainda é reduzido, com exceção de algumas comunidades dos Açores (11,12). No entanto, as algas com maior procura em Portugal, devido ao seu conteúdo em ficocolóides (agar), são a *Gelidium corneum*, colhida na zona Centro e Sul da costa portuguesa, e a *Pterocladia capillacea*, que é colhida nos Açores (11,12).

Os ficocolóides extraídos/provenientes de macroalgas, tais como o agar, o carragenano e o alginato, têm diversas aplicações na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética como espessantes, gelificantes e estabilizantes de suspensões e emulsões (11,12). O agar, por exemplo, é fundamental na biotecnologia, pois é usado na elaboração de meios de cultura gelificados (cultura de bactérias, algas, fungos e em cultura de tecidos), na obtenção de anticorpos monoclonais, interferões, alcalóides, esteroides. O agar é ainda usado na separação de macromoléculas por eletroforese e na sequenciação de ácido desoxirribonucleico (ADN) (12). O carragenano é utilizado na cosmética como agente de branqueamento, na alimentação, como por exemplo em pudins, gelados, gelatinas, entre outros, e ainda em aplicações farmacêuticas, onde tem apresentado um papel importante na redução do colesterol, no tratamento de úlceras gástricas, apresentando também atividade anti-tumoral, anti-inflamatória e anti-viral (12). Por fim, a utilização alginato abrange a indústria farmacêutica e cosmética, como agente de neutralização de metais pesados e radioativos e ainda podendo ser usado em compressas e ligaduras para queimaduras, ajudando na cicatrização (12).

Em Portugal, a exploração industrial de ficocolóides a partir de macroalgas iniciou-se quando o agar oriundo da Ásia se tornou escasso devido a II Guerra Mundial. O agar produzido na indústria portuguesa teve bastante sucesso a nível mundial, devido à abundância e qualidade das algas portuguesas, tendo a sua produção atingido cerca de 1620 toneladas por ano, na década de 1970 (11). A primeira fábrica foi construída em 1947, tendo chegado a seis fábricas em 1971. No entanto, a extinção de algumas populações de agarófitas levou ao quase desaparecimento desta indústria, existindo atualmente apenas uma fábrica, localizada a 30 km de Lisboa (11).

### 3. Metabolitos primários e secundários

Tal como os outros organismos, as algas necessitam de sintetizar e transformar um vasto número de compostos orgânicos indispensáveis para estas viverem, crescerem e se reproduzirem. A produção destes compostos dá-se através de um conjunto de reações químicas, que ocorrem sequencialmente e se encontram organizadas em vias metabólicas, mediadas e reguladas por enzimas, que necessitam de energia na forma de ATP (13). Estas vias são comuns em todos os organismos, apresentando apenas pequenas variações, constituindo o denominado metabolismo primário, sendo os compostos envolvidos descritos como metabolitos primários. Por outro lado, os compostos sintetizados por outras vias e que não são considerados essenciais para a sobrevivência das espécies são sintetizados pelo designado metabolismo secundário e intitulados de metabolitos secundários, sendo que estes apresentam uma distribuição mais limitada na Natureza (13). Apesar destes metabolitos não serem essenciais para o crescimento dos organismos, estes apresentam um papel indispensável para a proteção contra o *stress* abiótico e biótico, uma vez que, uma das funções ligada a estes metabolitos sintetizados é promover mecanismos de defesa contra agentes patogénicos e predadores (14). Alguns destes metabolitos são exclusivos das algas (15). Para além das funções que desempenham nestes organismos, estes metabolitos secundários são igualmente interessantes na medida em que muitos apresentam propriedades únicas para a saúde e no tratamento de certas doenças (1,16).

#### **4. Composição química das algas e atividade biológica dos seus constituintes**

As algas marinhas são conhecidas por serem um alimento nutritivo com baixo teor calórico, tendo na sua constituição proteínas, hidratos de carbono (acima designados por ficocolóides), compostos lipofílicos, compostos fenólicos, vitaminas e sais minerais (17,18). As macroalgas são principalmente constituídas por água (80-90%); uma vez secas, estas contêm cerca de 50% de hidratos de carbono, 7-38% de minerais e uma pequena quantidade de compostos lipofílicos (1-3%), para além de quantidades menores de compostos fenólicos e vitaminas. Relativamente ao conteúdo proteico e ao teor de fibra (hidratos de carbono não digeridos pelo trato gastrointestinal) os valores são bastante variáveis. No caso do conteúdo proteico, este apresenta valores entre os 10 e os 47%, contendo quantidades elevadas de aminoácidos essenciais. A nível do teor de fibras, as macroalgas possuem valores entre os 33 e os 50% (18). Para além disso, as algas são uma fonte de vitaminas solúveis (vitamina B, B2, B3, B5, B12 e C) e insolúveis (vitamina A, E D e K) e de minerais (cálcio, sódio, potássio, iodo, ferro, zinco, entre outros) (17,18).

A parede celular das macroalgas é constituída por polissacarídeos, maioritariamente celulose, ulvano, alginato, fucoidanos, laminarina, carragenano e agar, Tabela 2. O ulvano é característico das algas verdes, o carragenano e o agar das algas vermelhas, em contrapartida, os alginatos, fucoidanos e as laminarinas são típicos das algas castanhas (12).

**Tabela 2** Polissacarídeos presentes na parede celular das macroalgas com respectiva estrutura molecular.

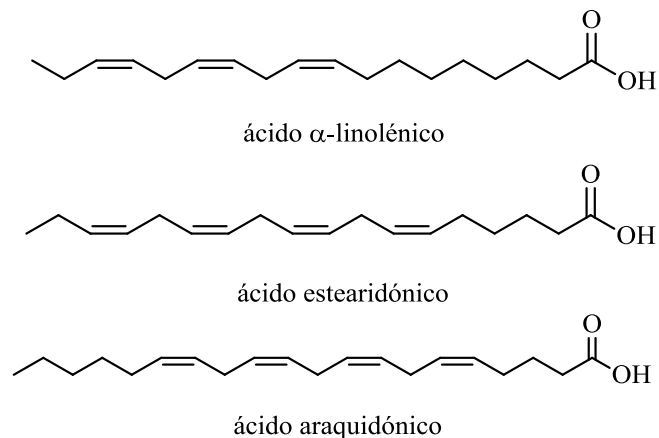
<b>Polissacarídeos</b>	<b>Estrutura Molecular</b>
Celulose	Unidade repetidas de $\beta$ -glucose, através de ligações $\beta(1-4)$
Ulvano	Unidades repetidas de ácido ulvanobiurónico-3-sulfato, composto por ramnose-3-fosfato e ácido glucorónico
Alginato	Unidades repetidas de $\beta$ -D-manurónico e de $\alpha$ -L-gulurónico, com ligações glicosídicas entre os carbonos 1 e 4
Fucoidanos	Polissacarídeo sulfatado com estrutura complexa, para além de ser constituído por fucose e sulfato, também pode conter outros monossacarídeos tal como a manose, galactose, entre outros
Laminarina	Unidades monoméricas de glucose com ligações $\beta(1-3)$ , formando trímeros, que por sua vez formam ligações $\beta(1-6)$
Carragenano	Unidades repetidas de galactose unidas alternadamente por ligações $\alpha(1-3)$ e $\beta(1-4)$
Agar	Unidades repetidas alternadas de $\beta(1-3)$ -D-galactose e de $\alpha(1-4)$ -3,6-anidro-L-galactose

De entre as diferentes classes de metabolitos secundários presentes nas macroalgas, os compostos lipofílicos e fenólicos têm apresentado um maior interesse, essencialmente devido às várias propriedades biológicas a que têm sido associados, fundamento pelo qual, estas famílias de compostos serão consideradas em detalhe neste estudo (1,19).

#### **4.1 Compostos lipofílicos**

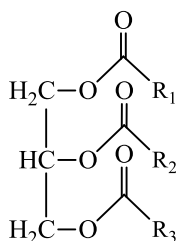
A fração lipofílica das algas castanhas é essencialmente constituída por ácidos gordos (AG), esteróis e terpenos.

Os AG são constituídos por uma cadeia alifática, com ou sem ligações duplas, e um grupo carboxílico, denominando-se insaturados ou saturados, respetivamente. A classificação dos AG insaturados depende do número de ligações duplas, sendo divididos em monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs). As algas castanhas geralmente têm na sua constituição MUFAs, em particular ómega-3 ( $\omega$ -3) e ómega-6 ( $\omega$ -6) (17). Os principais PUFAs  $\omega$ -3 encontrados nas algas foram o ácido eicosapentaenóico, estearidónico e  $\alpha$ -linolénico, enquanto  $\omega$ -6, o ácido araquidónico é o principal AG (Figura 2) (20).



**Figura 2** Exemplos de alguns PUFAs presentes em macroalgas: ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido estearidónico e ácido araquidónico.

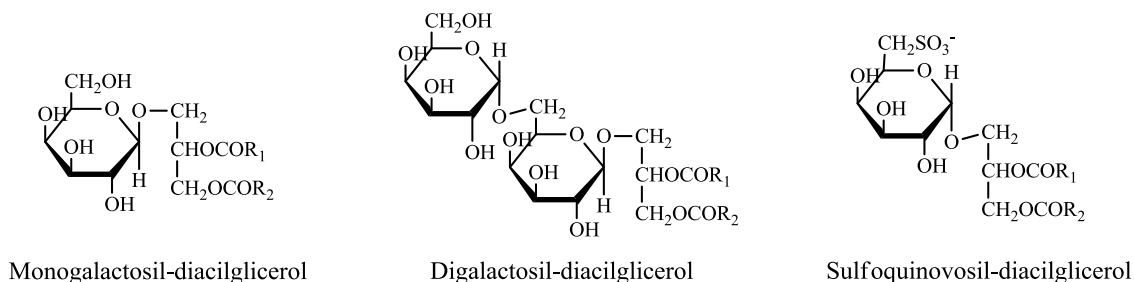
Os AG podem ser encontrados na sua forma livre ou esterificados com uma molécula de glicerol. Os glicerídeos podem ser classificados em mono, di ou triacilgliceróis (TG), consoante o número de ácidos gordos esterificados com o glicerol (Figura 3). Os TG são lípidos neutros acumulados nas algas como produtos de armazenamento e reservatório de energia (17).



**Figura 3** Estrutura geral de um triacilglicerol ( $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  representam os ácidos gordos).

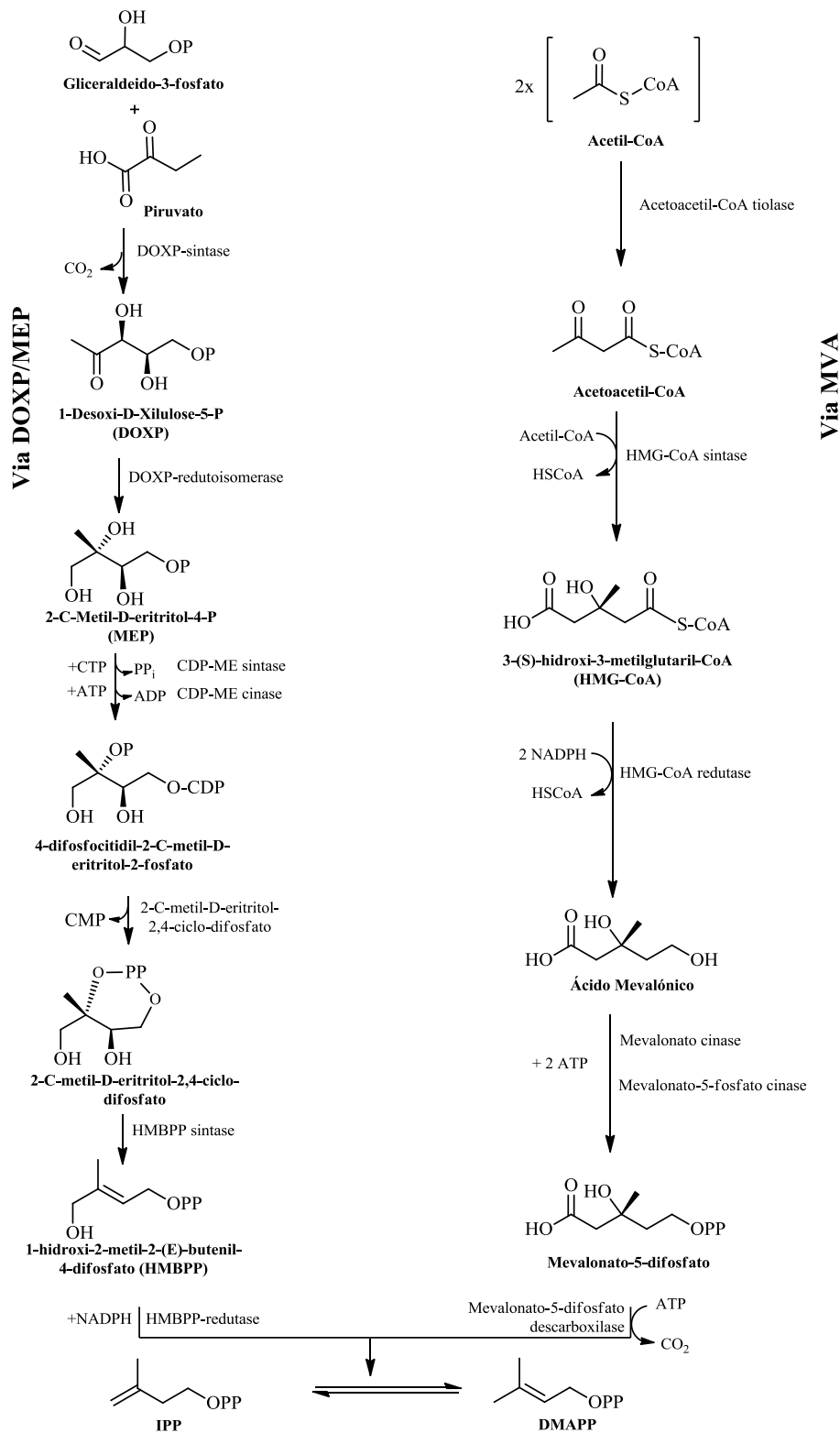
As algas castanhas podem apresentar na sua composição níveis elevados de lípidos totais (10-20 % do peso seco), que para além dos TG, contêm, também, os glicerolípidos (GL) (20). Os GL são derivados do glicerol-3-fosfato, sendo esterificados nas posições 1 e 2 com dois ácidos gordos (principalmente por  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6) e um mono- ou um oligossacarídeo na posição 3 (20). Apesar das algas terem um teor de lípidos mais baixo do que os peixes, estas são uma potencial fonte de lípidos funcionais, devido à sua biodisponibilidade. Os GL mais comuns nas algas são o monogalactosil-diacilglicerol

(MGDG), o digalactosil-diacilglicerol (DGDG) e o sulfolípido sulfoquinovosil-diacilglicerol (SQDG) (Figura 4) (17,20).



**Figura 4** Exemplos de glicoglicolípido presentes nas macroalgas castanhas ( $R_1$  e  $R_2$  representam os ácidos gordos) (adaptado de (17)).

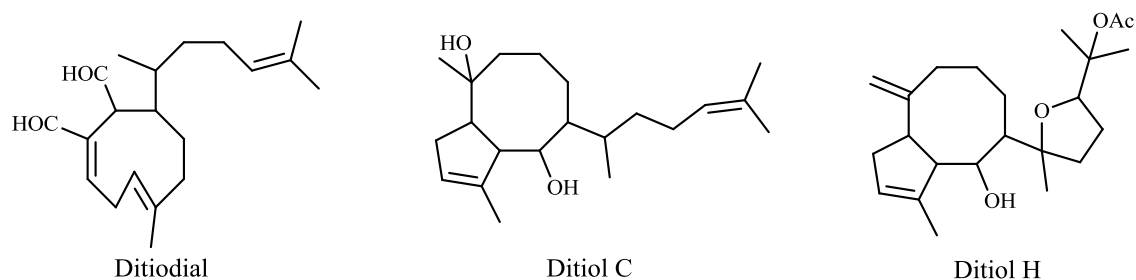
Relativamente aos terpenos, estes são uma família de compostos orgânicos, estruturalmente constituídos por unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), de estrutura muito diversa, tendo sido já identificados cerca de 30 000 compostos diferentes de diversas plantas (21,22). Estes são biossintetizados por seres procarióticos e eucarióticos como resposta ao *stress* ambiental (17,23). No entanto, o precursor destes compostos é o ácido mevalónico ou mevalonato pela via do mevalonato (MVA), originado através da união de duas unidades acetil-CoA, ou unidades de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato pela via desoxixilulose-fosfato (DOXP/MEP). Independentemente da via utilizada, os produtos finais são o pirofosfato de isopentenilo (IPP) e o pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Figura 5) (23).



**Figura 5** Formação dos intermediários IPP e DMAPP a partir da via MVA e da via DOXP/MEP (adaptado de (24)).



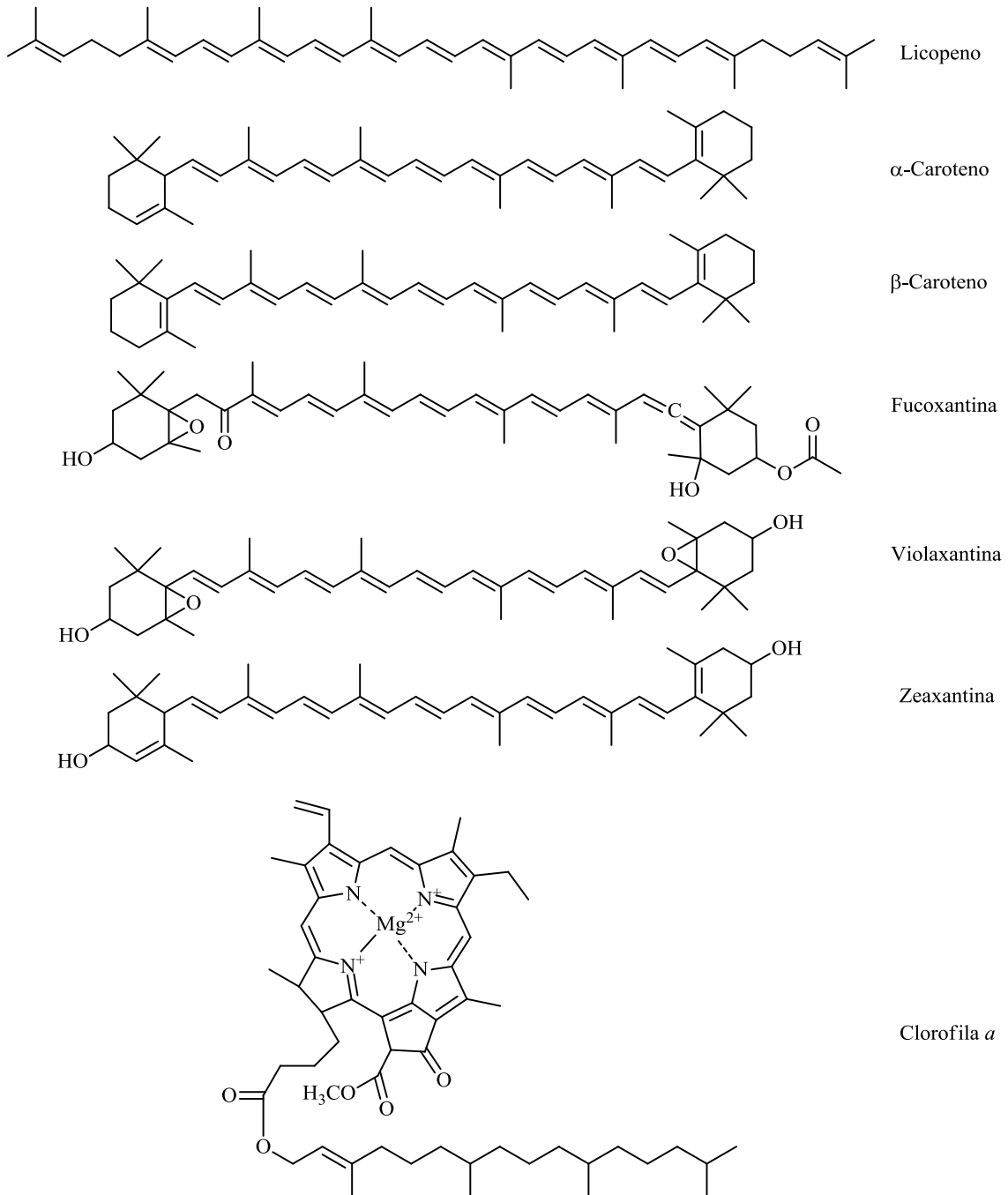
As algas castanhas (particularmente as espécies pertencentes às famílias Dictyotaceae e Sargassaceae) são bastantes ricas em terpenos, em particular diterpenos (DT). Os DT são constituídos por quatro unidades de isopreno ( $C_{20}$ ), podendo apresentar uma estrutura linear ou (poli)cíclica (25). Já foi reportada por Manzo *et al.* (26) a presença de diterpenos (ditiodial, ditiol C e ditiol H – Figura 6) em algas castanhas do gênero *Dictyota*. Os extratos ricos em diterpenos obtidos desta macroalga mostraram propriedades anti-virais e atividade citotóxica contra células cancerígenas (26).



**Figura 6** Estrutura química dos diterpenos identificados em algas castanhas do gênero *Dictyota* (26).

Os carotenóides são pigmentos naturais da família dos terpenos bastante abundantes na natureza. Estes apresentam um esqueleto de 40 átomos de carbono (tetraterpenos), podendo ter até 15 ligações duplas conjugadas. Uma ou ambas as ligações das extremidades podem sofrer ciclização formando um anel do tipo  $\beta$ -ionona que pode ter grupos substituintes oxo-, hidroxi-, ou epóxi- em diferentes posições, formando diferentes xantofilas (27,28). Estes compostos são constituintes essenciais do sistema fotossintético. Diferentes carotenóides foram identificados em macroalgas (Figura 7), tais como o licopeno,  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, lutéina, violaxantina e fucoxantina (29), sendo o  $\beta$ -caroteno, a violaxantina e a fucoxantina os carotenóides mais abundantes nas algas castanhas (27,30). Estes compostos exercem ainda importantes funções biológicas em bactérias, algas e animais, embora estes últimos não tenham a capacidade de biosintetizar estes compostos, pelo que têm de ser obtidos através da sua dieta (28). A fucoxantina em particular apresenta diversos efeitos benéficos para a saúde, tais como, anti-obesidade, através do aumento de gasto energético do tecido adiposo branco da região abdominal e anti-diabetes melhorando a resistência à insulina e diminuindo o nível de glicose no sangue (20). Além

destes pigmentos, as algas castanhas apresentam um outro pigmento, comum às plantas terrestres, a clorofila *a* (Figura 7), que na sua estrutura apresenta o diterpeno fitol (29).

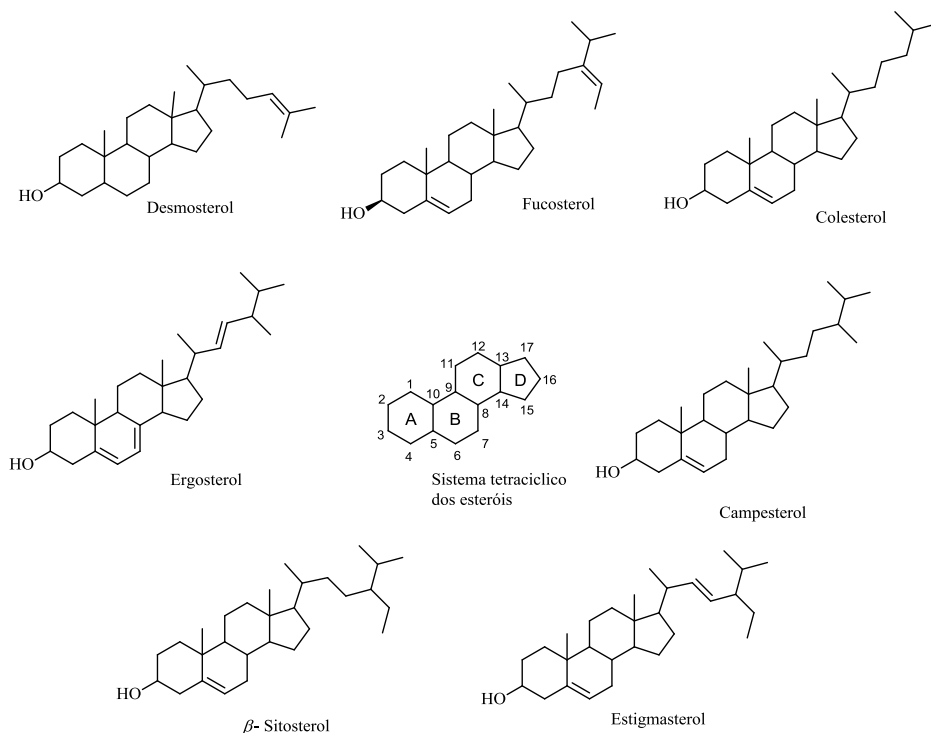


**Figura 7** Carotenóides e clorofilas existentes em macroalgas.

Os esteróis pertencem à família dos esteróides e são constituídos por uma estrutura tetracíclica com um grupo hidroxilo na posição C3 do anel A e uma cadeia lateral de comprimento variável em C17 (Figura 8). Os esteróis são normalmente encontrados na

natureza na sua forma livre, esterificados com AG ou ácidos fenólicos, podendo surgir na forma de glicosídeos. Estes são componentes importantes das membranas celulares, pois regulam a sua fluidez e permeabilidade. Os esteróis também podem ser biossintetizados pelas vias do MVA e DOXP/MEP (2).

Os fitosteróis (esteróis de origem vegetal) apresentam um grupo alquilo substituinte em C24. O fucosterol é o fitoesterol predominante nas algas castanhas. São ainda encontrados o desmosterol, colesterol, fucosterol, ergosterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (Figura 8). Alguns estudos têm atribuído a estes compostos diversos benefícios para a saúde, tais como a redução do colesterol, propriedades anticancerígenas, antioxidantes, antifúngicas, entre outras (2).



**Figura 8** Estrutura química de alguns esteróis presentes em macroalgas (adaptado de (2)).

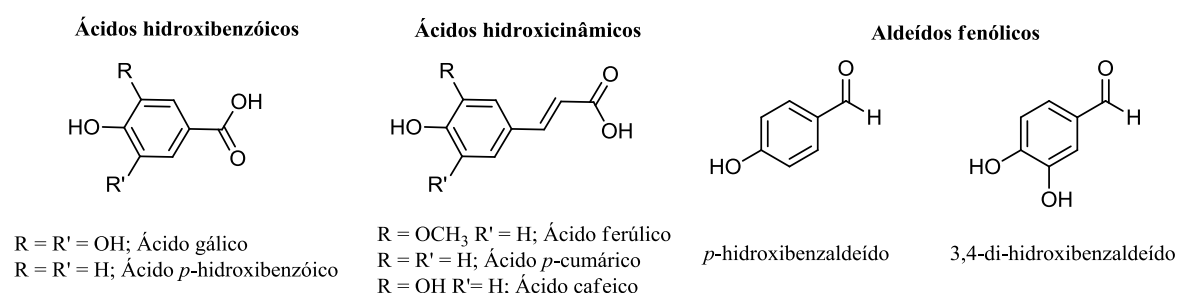
## 4.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos que têm na sua composição um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais substituintes hidroxilo, podendo ser monoméricos, oligoméricos ou poliméricos. Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no

reino vegetal, com mais de 8 000 estruturas identificadas, incluindo ácidos e aldeídos fenólicos, flavonóides e taninos (30–33).

Os compostos fenólicos desempenham um papel importante como componentes estruturais da parede celular e podem possuir um papel essencial na sinalização e resposta ao *stress* ambiental (32). Esta família de compostos é também parcialmente responsável pelas qualidades nutricionais dos alimentos de origem vegetal. Estes compostos podem ser classificados consoante o grupo funcional ligado ao anel aromático, estando assim associados a diversos benefícios para a saúde. Os compostos fenólicos são metabolitos secundários derivados da via chiquimato, biossintetizando aminoácidos aromáticos, tirosina e fenilalanina, precursores de fenilpropanóides (13,34).

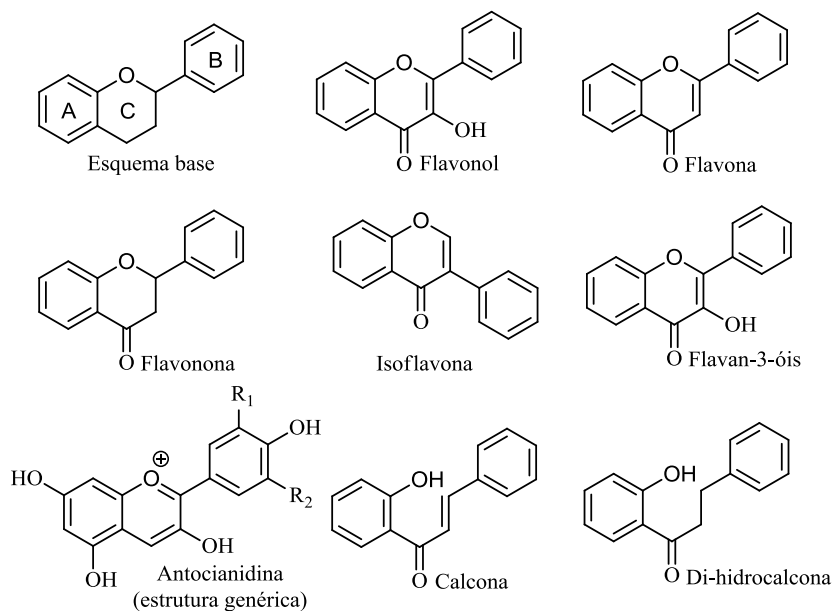
Os ácidos e aldeídos fenólicos são caracterizados por terem um grupo carboxílico ou um grupo aldeído, respetivamente, como substituinte principal no anel aromático (35). Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois subgrupos: os ácidos hidroxibenzóicos, como por exemplo o ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatequínico, ácido 2,3-dihidroxibenzóico, ácido salicílico e o ácido gálico; e os ácidos hidroxicinâmicos, que são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos, que incluem os ácidos ferúlico, 5-hidroxiferúlico, sinapílico, cinâmico, *p*-cumárico, cafeico, entre outros. Existem ainda os aldeídos fenólicos, onde temos como exemplo o *p*-hidroxibenzaldeído e o 3,4-dihidroxibenzaldeído (36). Estes compostos fenólicos (Figura 9), entre outros, foram já identificados em algas marinhas (19,36).



**Figura 9** Alguns exemplos de ácidos e aldeídos fenólicos presentes em algas.

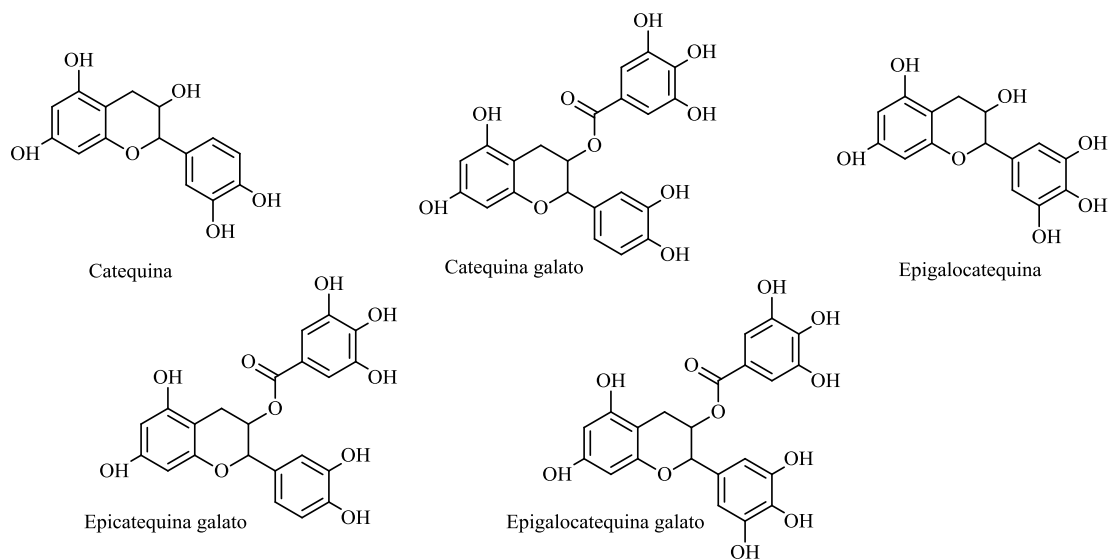
Os flavonóides são o maior grupo de compostos fenólicos, apresentando uma estrutura típica constituída por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos: C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 10) (32,33). Os flavonóides podem ser divididos em diferentes subclasses tendo em conta o arranjo da cadeia C<sub>3</sub> e o seu nível de oxidação. Se o grupo C<sub>3</sub>

se apresentar na forma de um anel pirânico, os flavonóides serão classificados como flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavan-3-óis e antocianidinas. Se a cadeia C<sub>3</sub> se encontrar aberta, então passamos a outro grupo de compostos fenólicos que contém as calconas e as di-hidrocalconas (32,33).



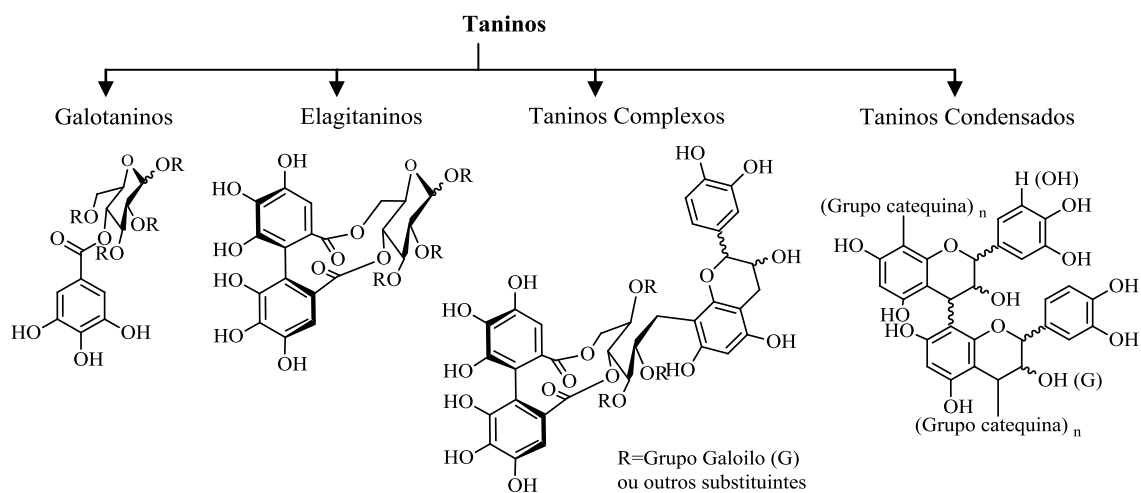
**Figura 10** Esquema base e estrutura base das diferentes subclasses de flavonóides.

Nas macroalgas castanhas *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca* e *Undaria pinnatifida*, colhidas na costa da Galiza, foram detetados alguns flavonóides (19), entre os quais a catequina, a catequina galato, a epicatequina, a epigalocatequina e a epigalocatequina galato (Figura 11) (19).



**Figura 11** Exemplos de alguns flavonóis identificados em macroalgas (19).

Relativamente aos taninos, estes apresentam uma grande diversidade estrutural sendo classificados em taninos hidrolisáveis, taninos complexos e taninos condensados, ilustrados na Figura 12 (37,38).

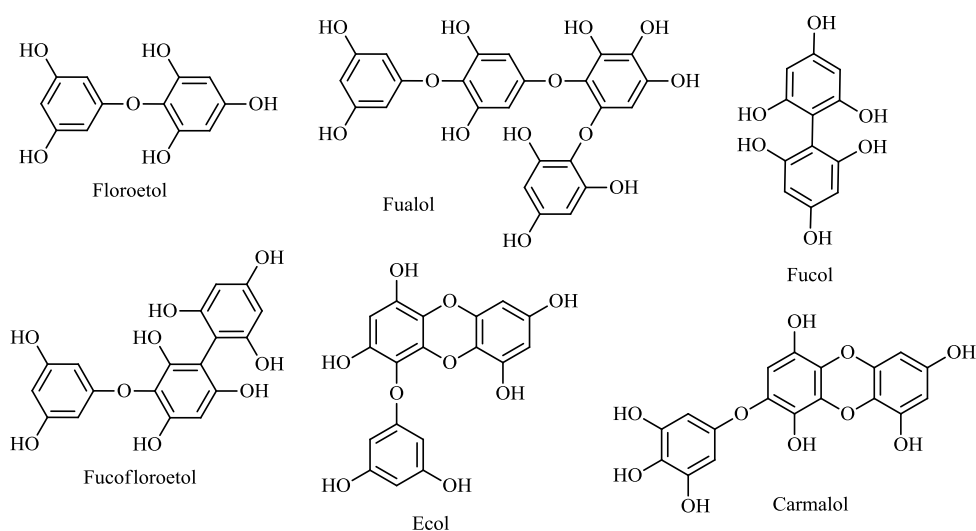


**Figura 12** Exemplos de taninos presentes em plantas terrestres (adaptado de (38)).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico (galotaninos) e elágico (elagitaninos). Os galotaninos contêm um núcleo poliál (usualmente glucose), substituído com um número variável de resíduos de ácido gálico. Por sua vez, os elagitaninos são derivados de pentagalóilglucose e possuem ligações C-C adicionais entre resíduos galoilo adjacentes (32,33).

Os taninos complexos são compostos por uma molécula de catequina ligada a unidades de galotaninos ou elagitaninos por ligações glicosídicas (32), por outro lado, os condensados têm como precursores os flavonóides, flavan-3-ol e flavano-3,4-diol (32,33).

Em macroalgas castanhas existe um grupo específico de taninos, denominado de florotaninos (39). Os florotaninos são compostos hidrofílicos, com pesos moleculares entre 126 Da a 650 kDa, não sendo encontradas em plantas terrestres (24,30,39). Estes compostos podem ser oligômeros ou polímeros derivados do floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno), podendo ser classificados em 6 sub-classes (Figura 13), com base na ligação entre as unidades de floroglucinol: floretóis e fualóis (ligações éter), fucóis (ligações arilo-arilo), fucofloretóis (ligações arilo-arilo e éter), ecóis e carmalóis (ligação dibenzodioxina) (24,40,41). A percentagem de florotaninos nas algas é afetada pelo seu tamanho, idade, salinidade e temperatura da água, estação do ano e intensidade de luz (24,42).

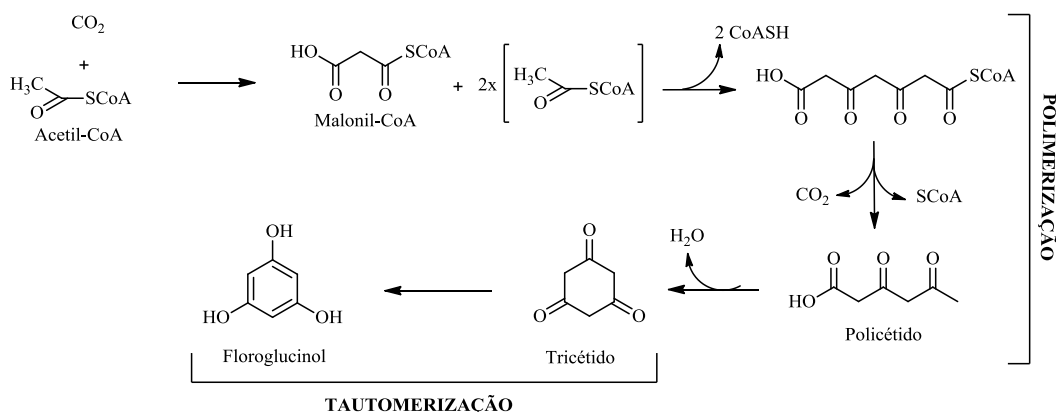


**Figura 13** Estrutura química das 6 sub-classes de florotaninos (24).

A via biossintética pela qual o floroglucinol dá origem aos florotaninos ainda não é totalmente conhecida. No entanto, é sabido que o floroglucinol é biossintetizado pela via acetato-malonato no complexo de Golgi, na área perinuclear da célula, sendo armazenados em vesículas como líquido incolor (24,40).

Nos primeiros passos da via acetato-malonato, uma molécula de acetil-CoA é convertida em malonil-CoA, através da adição de dióxido de carbono. Sendo assim, há

alteração do grupo metilo do acetilo num grupo metileno reativo, ajudando assim no processo de polimerização (Figura 14) (43,44). O resultado da polimerização é uma cadeia de policétido. Essa cadeia é transformada por ciclização intramolecular e por eliminação de água, produzindo um sistema de anel hexa-cíclico (tricétido). Como o tricétido não é estável, este sofre tautomerização, a fim de formar um anel aromático mais estável, dando origem ao floroglucinol (Figura 14) (43).



**Figura 14** Formação do floroglucinol (adaptado de (43,44)).

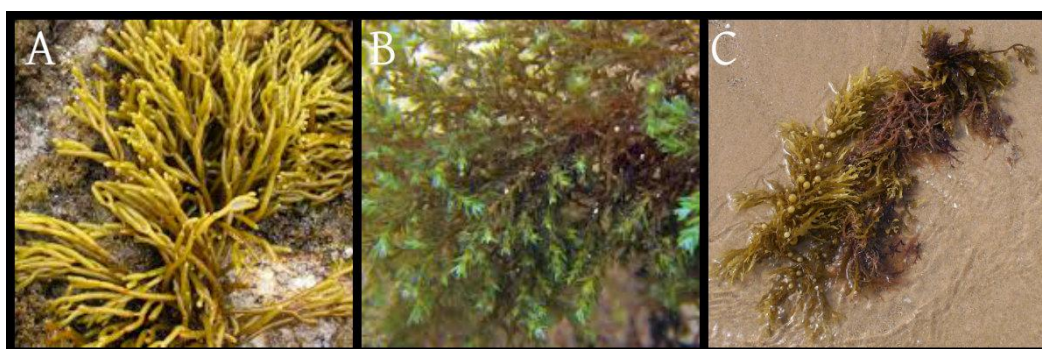
### 4.3. Composição química de macroalgas castanhas em estudo: *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia* e *Sargassum muticum*

Como já foi descrito anteriormente, neste trabalho irá ser estudada a composição lipofílica e fenólica das algas castanhas, nomeadamente de algumas espécies existentes na costa portuguesa (Tabela 3), incluindo a *Sargassum muticum* (uma espécie invasora), a *Bifurcaria bifurcata* e a *Cystoseira tamariscifolia* (Figura 15) (45).



**Tabela 3** Algas castanhas existentes na costa portuguesa.

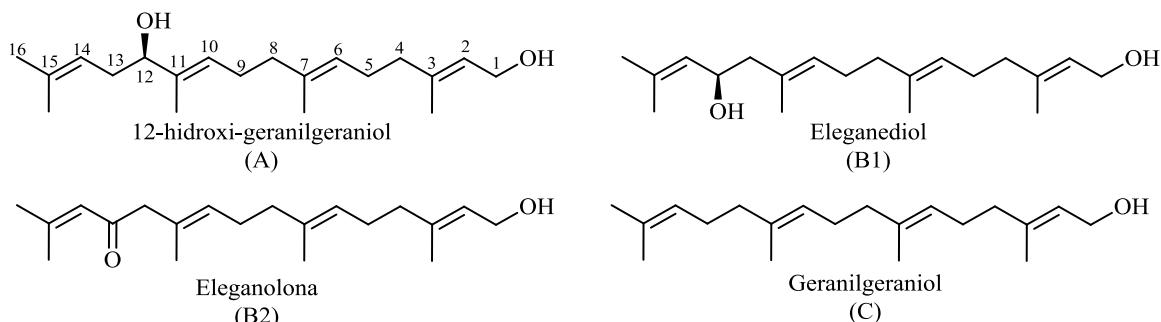
Espécie	Distribuição Geográfica
<i>Acitospora crinita</i>	Madeira e Portugal Continental
<i>Asperococcus fistulosus</i>	Madeira e Portugal Continental
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Portugal Continental
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	Portugal Continental e Ilhas
<i>Sargassum muticum</i>	Europa e Ásia
<i>Sphacelaria radicans</i>	Portugal Continental
<i>Undaria pinnatifida</i>	Portugal Continental



**Figura 15** Imagem das três macroalgas em estudo: A – *Bifurcaria bifurcata*, B – *Cystoseira tamariscifolia* e C – *Sargassum muticum*

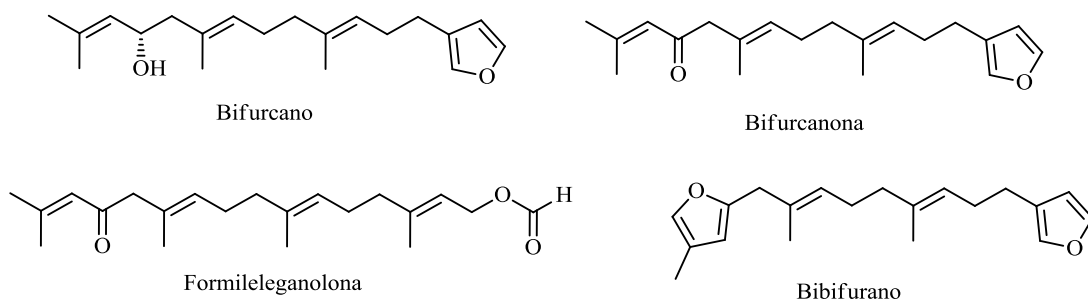
A *Bifurcaria bifurcata* (*B. bifurcata*) encontra-se distribuída ao longo da costa do Atlântico Noroeste, sendo limitada a Sul por Marrocos e a Norte pela Irlanda (16,25). Em termos da composição em extratáveis, esta macroalga é caracterizada pela sua variedade de diterpenos acíclicos (biossintetizados a partir do geranilgeraniol), não sendo essa variedade de diterpenos muito comum na natureza (46). Estes diterpenos geralmente possuem uma cadeia principal com 16 carbonos, que contêm 4 ligações duplas e 5 grupos metilos não substituídos (46). As principais variações na estrutura química destes compostos ocorrem nas posições C1, C12 e C13 (Figura 16). No entanto, moléculas oxidadas em C12 e C13 não são encontradas simultaneamente na mesma amostra, mas sim em algas colhidas em locais diferentes (46). Os diterpenos isolados a partir *B. bifurcata* podem ser agrupados em três grupo diferentes (Figura 16) (46). O grupo A é constituído pelos compostos oxidados em C12, sendo esses derivados do 12-hidroxi-geranilgeraniol. O grupo B (subdividido em B1 e B2) é constituído pelos compostos oxidados em C13 com um grupo –OH (B1) ou carbonilo (B2), sendo esses derivados do eleganediol ou eleganolona, respetivamente.

Relativamente ao grupo C, este reúne compostos derivados diretamente do geranylgeraniol, através da presença de grupos oxigenados em diferentes carbonos, onde em alguns casos, ocorre posterior desidratação (46).



**Figura 16** Principais tipos de diterpenos acíclicos existentes na *B. bifurcata*.

Em algas desta espécie recolhidas em França (Bretanha), Le Lann *et al.* (25) identificaram os diterpenos bifurcano, bifurcanona, eleganediol e eleganolona (Figura 16 e 17). No entanto, foi verificado que esta espécie era maioritariamente rica em bifurcanona e em eleganolona quando exposta a radiação ultravioleta. Porém, quando esta não se encontrava exposta a este tipo de radiação, verificou-se que os compostos mais abundantes eram o eleganediol e o bifurcano (25). Também em macroalgas colhidas em França, Göthel *et al.* (47) identificaram outros dois diterpenos, nomeadamente a formileleganolona e o bibifurano (Figura 17) (47). Para além desses compostos, já foram identificados nesta espécie diversos derivados de geranylgeraniol, nomeadamente os derivados de (S)-13-hidroxi-geranylgeraniol, para os quais foi observada atividade citotóxica (48–50). Em algas recolhidas em Marrocos, também foram identificados derivados de (S)-12-hidroxi-geranylgeraniol (51).



**Figura 17** Estrutura de alguns diterpenos identificados na *B. bifurcata* (25,47)

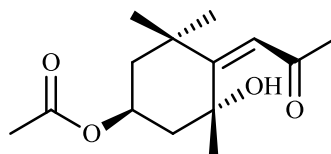
Relativamente aos compostos fenólicos, existem estudos desta macroalga proveniente da costa Francesa, Espanhola e Portuguesa. No entanto, nenhum composto fenólico foi ainda identificado como constituinte desta alga (15,16,52).

A *Sargassum muticum* (*S. muticum*) é uma alga nativa da Ásia Oriental. O seu consumo remonta a mais de 1 000 anos (53–55). Esta alga, como apresenta um crescimento muito rápido (cerca de 2 a 4 cm por dia), elevada fecundidade e vários mecanismos de dispersão, é considerada uma espécie invasora em quase todo o mundo. Esta espécie foi introduzida acidentalmente no oceano Pacífico, na zona da América do Norte em 1940, na costa Europeia em 1970 e na Península Ibérica em 1980 (54,56). Esta invasão tem vindo a aumentar nos ecossistemas marinhos devido, principalmente, às atividades humanas, tais como a navegação internacional e a aquicultura (53,56). Na Península Ibérica a distribuição e abundância desta espécie é muito variável, devido às condições ambientais, tais como a temperatura do ar e do mar, condições hidrodinâmicas variáveis e topografia (54,56,57). Esta espécie encontra-se principalmente distribuída em costas rochosas semi-abrigadas, invadindo principalmente os habitats de espécies de algas do género *Cystoseira* (54).

Dentro das três macroalgas escolhidas, a *S. muticum* é a macroalga mais estudada. A nível de metabolitos secundários, esta alga é conhecida por ser rica em ácidos gordos, sendo predominante a presença de ácido palmítico (Tabela 4) (58–60). Foi também observada a presença de Apo-9<sup>7</sup>-fucoxantina na *S. muticum*, sendo este um composto lipofílico, um norisoprenóide pertencente a família dos terpenos, que apresenta atividade anti-inflamatório (Figura 18) (55).

**Tabela 4** Teor relativo de ácidos gordos ( $\text{g}_{\text{AG}}/100\text{g}_{\text{AG}}$ ) presente na *S. muticum* (adaptado de (60)).

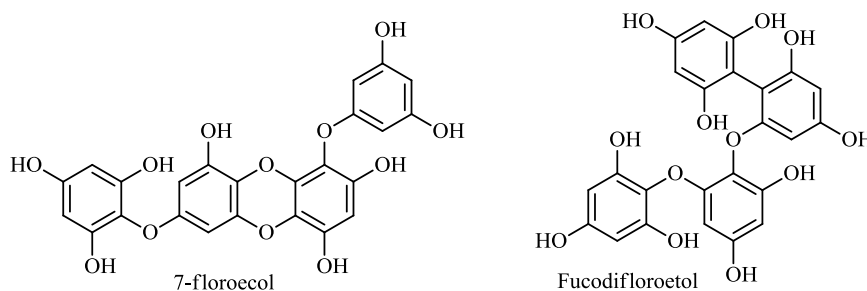
Ácidos Gordos		<i>Sargassum muticum</i>
<b>Ácidos gordos saturados</b>		<b>42.17 ± 0.19</b>
C14:0	Ácido tetradecanóico	2.94 ± 0.01
C16:0	Ácido hexadecanóico	30.33 ± 0.03
C18:0	Ácido octadecanóico	0.47 ± 0.01
C20:0	Ácido eicosanóico	5.18 ± 0.01
C24:0	Ácido tetracosanóico	0.20 ± 0.02
<b>MUFAs</b>		<b>21.13 ± 0.15</b>
C14:1	Ácido tetradeca-9-enóico	0.23 ± 0.01
C16:1	Ácidos hexadeca-7-enóico	0.20 ± 0.01
C16:1	Ácidos hexadeca-9-enóico	6.08 ± 0.13
C18:1	Ácido octadeca-9-enóico	8.68 ± 0.02
C18:1	Ácido octadeca-11-enóico	0.46 ± 0.02
C20:1	Ácido eicosa-9-enóico	2.09 ± 0.01
C20:1	Ácido eicosa-11-enóico	0.58 ± 0.05
C22:1	Ácido docosa-9-enóico	2.30 ± 0.04
<b>PUFAs</b>		<b>36.70 ± 0.01</b>
<b>PUFAs ω-6</b>		<b>27.46 ± 0.30</b>
<b>PUFAs ω-3</b>		<b>8.88 ± 0.17</b>
<b>Rácio ω-6/ω-3</b>		<b>3.09 ± 0.44</b>
C16:2	Ácido hexadeca-9,12-dienóico	0.76 ± 0.02
C16:3	Ácido hexadeca-7,10,13-trienóico	0.22 ± 0.02
C18:2	Ácido octadeca-9,12-dienóico	5.73 ± 0.01
C18:3	Ácido octadeca-6,9,12-trienóico	8.87 ± 0.01
C18:3	Ácido octadeca-9,12,15-trienóico	0.34 ± 0.01
C20:4	Ácido eicosa-5,8,11,14-tetraenóico	12.43 ± 0.04
C20:5	Ácido eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico	7.54 ± 0.02



**Figura 18** Estrutura química de Apo-9'-fucoxantina (55).

Relativamente a fração fenólica, existem diversos estudos que quantificam o teor de fenóis totais, porém não foi identificado nenhum composto fenólico (61–64). Tanniou *et al.* (64) compararam o teor total de fenóis totais da *S. muticum* proveniente da Irlanda, Noruega, França, Espanha e Portugal, sendo possível averiguar que as amostras provenientes da costa Portuguesa apresentam maior teor de fenóis totais, seguidas pelas provenientes da costa Norueguesa (64).

A *Cystoseira tamariscifolia* (*C. tamariscifolia*) tem origem, tal como a *B. bifurcata*, na costa do Atlântico. Esta espécie tem sido explorada pela sua capacidade de produzir compostos bioativos (2). Em relação à sua composição química, foi verificada a presença de vários esteróis em amostras recolhidas na costa Portuguesa, nomeadamente o campesterol, colesterol, desmosterol, ergosterol, fucosterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (2). Andrade *et al.* (42) quantificaram diversos compostos provenientes de extratos desta macroalga colhida em Portugal, observando-se a presença de ácido hexadecanóico ( $29.60 \pm 5.96$  mg/100 g de alga seca), ácido octadecanóico ( $25.54 \pm 1.20$  mg / 100 g de alga seca) e fucosterol ( $34.62 \pm 3.44$  mg / 100 g de alga seca) (42). Em algas recolhidas em Espanha foi ainda verificado o efeito positivo da incidência de radiação ultravioleta na acumulação de polifenóis, o que origina maior atividade antioxidante (31,65,66). Já foram feitos estudos acerca do teor de florotaninos em amostras de *C. tamariscifolia* provenientes da costa portuguesa e da costa francesa (40,67). No entanto, apenas Ferreres *et al.* (41) identificaram, a partir de HPLC-DAD-ESA-MS<sup>n</sup>, dois compostos fenólicos característicos da *C. tamariscifolia*, o 7-floroecol e o fucodifloroetol (Figura 19) (41).



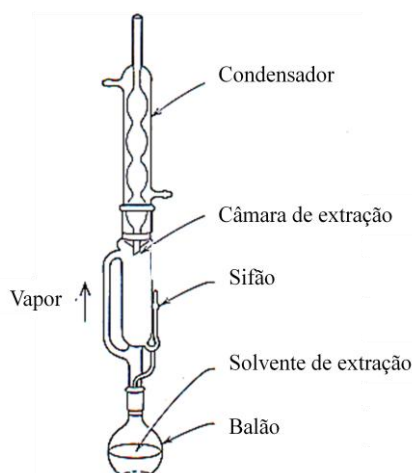
**Figura 19** Estrutura química do 7-floroecol e do fucodifloroetol (43).

#### 4.4. Métodos de extração de metabolitos secundários

A identificação e caracterização de metabolitos secundários presentes em algas envolve uma primeira fase de recolha de amostra para depois se proceder à extração dos respetivos componentes. De uma forma geral, as macroalgas são colhidas em zonas costeiras, sendo posteriormente lavadas, a fim de remover sal ou impurezas. Para se poder proceder à extração, as algas têm de ser secas e moídas de forma a obter uma amostra homogénea (68).

A escolha do solvente de extração é essencial para a composição final do extrato obtido. Esta escolha irá depender da polaridade dos compostos que se pretende extrair, podendo se tratar de um mistura de solventes se assim for necessário. Têm sido utilizados um grande número de solventes, como por exemplo, a água, acetona, tolueno, hexano, ciclo-hexano, metanol, etanol, clorofórmio e diclorometano (69,70). Extrato lipofílicos de algas têm sido extraídos com sucesso usando o diclorometano como solvente (1).

A extração de compostos a partir de amostras sólidas é de uma forma geral realizada pelo método de extração sólido-líquido (71). A escolha do método mais adequado varia de acordo com a natureza dos compostos alvo, de forma a obter-se o maior rendimento e pureza possíveis (68). A fim de extrair compostos lipofílicos, a extração em Soxhlet tem sido utilizada como técnica de referência (Figura 21) (1,72,73). Esta é uma técnica relativamente barata e simples, permitindo obter um rendimento de extração mais elevado do que a maioria dos outros métodos (por exemplo a extração com fluidos supercríticos ou extração por micro-ondas) (71).



**Figura 20** Esquema de um aparelho de extração Soxhlet (adaptado de (37)).

No que diz respeito à extração de compostos fenólicos, diversos autores têm optado por extrair estes compostos por extrações sólido-líquido simples à temperatura ambiente (24,41,74). Diversos parâmetros influenciam o rendimento de extração dos compostos fenólicos, incluindo o tempo de extração, a temperatura, a razão solvente/líquido e o número de extrações a partir da mesma amostra (74). A escolha dos solventes de extração, tais como a água, metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etilo e respectivas misturas, irá influenciar também o rendimento dos compostos fenólicos extraídos. No caso particular dos compostos fenólicos, o aumento do tempo e da temperatura pode provocar degradação ou reações indesejáveis, tal como a oxidação enzimática por tempos de extração prolongados e temperaturas elevadas (74).

Para além das técnicas convencionais referidas, outras técnicas têm sido aplicadas para extrair compostos bioativos presentes em macroalgas, destacando-se a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (SFE), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração assistida por ultra-sons (UAE), extração acelerada por solvente (ASE), bem como alguns pré-tratamentos da amostra, como por exemplo, a extração assistida por enzimas (EAE) (36,59,61,68,75–78).

A SFE tem sido utilizada para extrair ácidos gordos, carotenóides e clorofilas a partir das macroalgas (59,68,77,78). No entanto, este método apresenta algumas desvantagens no que diz respeito ao elevado custo do equipamento e a baixa polaridade do CO<sub>2</sub> supercrítico, o que limita o seu uso na extração de famílias de compostos de mais baixa polaridade, mesmo com a utilização de solventes como o etanol como co-solventes (68).

A MAE tem sido utilizada para extrair compostos bioativos de algas, como por exemplo os carotenóides e os fucoïdanos. De entre as vantagens deste método destaca-se a melhoria do rendimento de extração e o uso de quantidades menores de solvente (68). Porém, esta técnica não é adequada a compostos termolábeis.

Ao contrário da MAE, a UAE é conciliável com a extração de compostos sensíveis à temperatura (68,77). Para além disso, o UAE é uma alternativa simples e de baixo custo, o uso de ultra-sons na extração sólido-líquido tem ainda como vantagem o aumento do rendimento e da velocidade da extração (68).

Tal como a MAE, a ASE utiliza temperaturas elevadas. No entanto, tem sido vista como uma técnica com bastante potencial para extrair diferentes famílias de compostos a partir de algas (68). Alguns estudos referiram ser possível aplicar a ASE na extração de clorofilas, carotenóides, ácidos gordos e compostos fenólicos (61,68,76,77).

A EAE é um processo de pré-tratamentos das amostras que permite hidrolisar polissacarídeos e proteínas insolúveis em água, tornando-os extratos solúveis, sem recorrer a solventes orgânicos (79). Além disso, a EAE é uma técnica de custo relativamente baixo pois utiliza enzimas tais como a celulase, a  $\alpha$ -amilase e a pepsina (68). A aplicação deste método, seguido de um dos métodos de extração referidos anteriormente, tem permitido melhorias significativas no que diz respeito aos rendimentos dos lípidos totais e na extração da fucoxantina a partir de macroalgas (75). Para além disso, os extratos polares também têm apresentado teores mais elevados de compostos fenólicos quando usada a EAE (68).

#### **4.5. Atividade biológica de macroalgas**

As algas castanhas, devido à presença de compostos bioativos na sua composição, são também já usadas devido à sua afinidade biológica, nomeadamente atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica (1). Na Tabela 5 estão listados compostos isolados a partir de diferentes espécies de macroalgas, para os quais existe já reportada uma atividade biológica bem definida.



**Tabela 5** Compostos isolados a partir de macroalgas com respetiva atividade biológica.

<b>Classes de compostos</b>	<b>Composto(s)</b>	<b>Macroalga(s)</b>	<b>Local de colheita</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Ref.</b>
Ácidos gordos	Ácido estearidónico e ácido $\gamma$ -linolénico	<i>Enteromorpha linza</i>	Coreia	Atividade antimicrobiana	(80)
	PUFAs $\omega$ 3 e $\omega$ 6			Redução do risco de doenças cardiovasculares	(20)
Esteróis	$\beta$ -sitosterol Fucosterol			Redução do colesterol	(27)
	Fucosterol	<i>Pelvetia siliquosa</i>	Coreia	Anti-diabetes	(81)
Diterpenos	8,10,18-tri-hidroxi-2,6-dolabeladieno	<i>Dictyota pfaffii</i>	Brasil	Inibição da infeção de HSV 1; diminuição do teor de proteínas precoces de HSV 1	(82)
	(6R)-6-hidroxicotoma-1,14-dieno-1,17-dial	<i>Dictyota menstrualis</i>			
Polissacarídeos	Galactofucanos	<i>Adenocystis utricularis</i>	Argentina	Inibição da infeção do HSV 1 e 2	(83)
	Fucoidanos	<i>Undaria pinnatifida</i>	Coreia	Anti-tumoral	(84)
	Laminarina	<i>Laminaria japonica</i>	Coreia	Anti-apoptótica	(85)

Para além destes compostos, também se destacam os florotaninos, devidas às várias atividades biológicas (Tabela 6), com vista à sua utilização na indústria farmacêutica (86).

**Tabela 6** Florotaninos encontrados em macroalgas castanhas e as suas respetivas potenciais atividades biológicas (adaptado de (86)).

<b>Florotaninos</b>	<b>Espécie</b>	<b>Atividades biológicas</b>
6,6'-Biecol Florofucofuroecol B Ecol e Diecol	<i>Ecklonia cava</i> <i>Eisenia arbórea</i> <i>Ecklonia stolonifera</i>	Anti-alérgico
Dioxinodesidroecol	<i>Ecklonia cava</i>	Anti-cancerígeno
Diecol Ecol Florofucofuroecol Difloreto-hidroxycarmalol	<i>Eisenia bicyclis</i> e <i>Ecklonia cava</i> <i>Eisenia bicyclis</i> <i>Ecklonia stolonifera</i> <i>Ishige okamurae</i>	Anti-diabético
Diecol Ecol	<i>Ecklonia cava</i> e <i>Ecklonia stolonifera</i>	Anti- fotoenvelhecimento
Ecol Florofucofuroecol Diecol	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Anti-hipertensão
6,6'-Biecol 8,8'-Biecol 8,8'-Diecol	<i>Ecklonia cava</i>	Anti vírus da imunodeficiência humana
8,8'-Biecol Florofucofuroecol-A Ecol Diecol	<i>Eisenia bicyclis</i> , <i>Ecklonia cava</i> e <i>Ecklonia kurome</i>	Antioxidante
Diecol Ecol e Fucofuroecol-A	<i>Ecklonia cava</i> <i>Eisenia bicyclis</i>	Inibição da metaloproteinase da matriz

O facto de as macroalgas se encontrarem expostas a radiação ultravioleta origina a formação de radicais livres e outros oxidantes, estimulando a produção de compostos antioxidantes, nomeadamente os florotaninos, como forma de as espécies se protegerem dos danos estruturais nos seus órgãos, o que as torna em bons candidatos para a procura de compostos bioativos de origem natural (41,87).

A atividade antioxidante é uma das propriedades mais explorada nos florotaninos uma vez que, devido as alterações ambientais e climatéricas, o *stress* oxidativo se torna

uma condição presente no dia-a-dia (24). O interesse na procura de compostos antioxidantes provenientes de fontes naturais, tem sido reforçado pela preferência do consumidor por este tipo de produtos, assim como pela preocupação dos potenciais efeitos tóxicos associados aos antioxidantes sintéticos (87).

#### 4.5.1. Atividade antioxidante

O *stress* oxidativo pode ser definido pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e antioxidantes. Quando esse desequilíbrio é atingido, existe um aumento na produção de espécies reativas, podendo oxidar e danificar os componentes celulares, tais como as proteínas, lípidos e ADN (24,41). De entre estas espécies, as mais comuns são as espécies reativas de oxigénio (ROS) e as espécies reativas de azoto (RNS) (24).

A maior produção de ROS dá-se nas mitocôndrias, devido à sua função de produtor principal de energia química. As ROS incluem espécies radicalares e não radicalares derivadas do oxigénio e representam a classe mais importante de espécies reativas formadas em organismos vivos. As espécies radicalares incluem o grupo hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), alcóxido ( $\text{RO}\cdot$ ) e o anião superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que são os mais comuns. O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é formado por redução do oxigénio molecular podendo este ser um processo mediado por enzimas (como o NADPH oxidase) ou um processo não enzimático, mediado por compostos com reatividade *redox*, como por exemplo o composto ubiquinona da cadeia transportadora de eletrões da mitocôndria. O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é o principal ROS produzido nas células (24,41). Nas espécies não radicalares estão incluídos o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o oxigénio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) (24,41).

O radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) e os não-radicaís ácidos peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) são os principais RNS, sendo os últimos bastante prejudiciais para o sistema nervoso central (SNC). O radical  $\cdot\text{NO}$  é produzido na oxidação da L-arginina, catalisada pelo óxido nítrico sintase (NOS). No entanto, como este radical tanto é solúvel em meio aquoso como em meio lipídico, difunde-se através do plasma e da membrana plasmática, afetando assim a transmissão neuronal no SNC. Quando a geração de RNS excede a capacidade do sistema de os neutralizar e eliminar, ocorre uma situação de *stress* nitrosamínico (24).

O *stress* oxidativo pode resultar de causas naturais, situações de exercício físico extremo ou metabolismo aeróbico, e de causas não-naturais, como a presença de xenobióticos no corpo. Tendo em conta que existe uma necessidade contínua de inativação de oxidantes, a ingestão de antioxidantes na dieta pode ajudar a manter um estado antioxidante adequado (24).

Os antioxidantes são conhecidos como substâncias que retardam ou impedem a oxidação. A defesa contra os radicais livres, resultante do *stress* oxidativo, envolve mecanismos de prevenção e reparação através de compostos químicos com capacidade antioxidante, podendo estes ser enzimáticos ou não-enzimáticos (24).

A superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) são exemplos de antioxidantes enzimáticos. A SOD atua na transformação de radicais superóxidos a peróxido de hidrogénio e oxigénio. Esta pode ocorrer por três vias diferentes, dependendo do metal a que está associada (cobre e zinco no citoplasma de células eucariotas, manganês na matriz mitocondrial e ferro nas bactérias). A GPx é uma enzima localizada no citosol e na matriz mitocondrial, que reduz os peróxidos em geral usando a glutathiona (GSH). Os principais locais de ação da GPx são o fígado e eritrócitos, podendo também ocorrer no coração, pulmões e músculos. A CAT atua sobre o peróxido de hidrogénio transformando-o em oxigénio e água e encontra-se localizada nos peroxissomas (24).

Os antioxidantes não-enzimáticos incluem o ácido ascórbico, a glutathiona, os carotenóides e os compostos fenólicos. O ácido ascórbico, sendo hidrossolúvel, possui maior ação no plasma sanguíneo, enquanto o  $\alpha$ -tocoferol, lipossolúvel, tem maior ação nas membranas celulares. Os carotenóides são um grupo de compostos, onde se destacam os  $\beta$ -carotenos, precursores da vitamina A, e o licopeno. Na circulação, os carotenóides agem principalmente como capturadores de radicais livres.

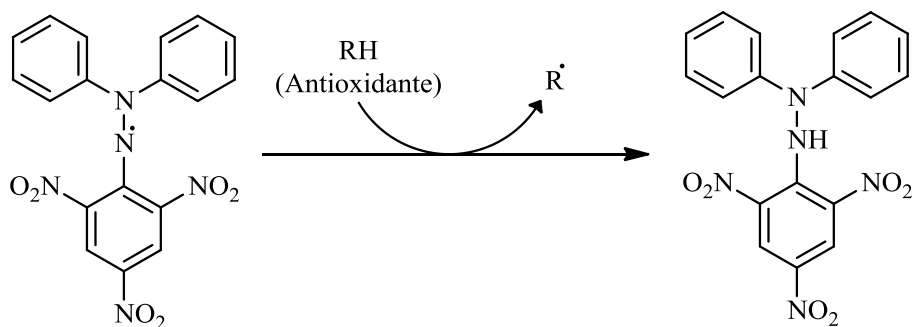
A maior fonte de antioxidantes não-enzimáticos é a alimentação (principalmente frutas e legumes). Deste modo, uma alimentação equilibrada é extremamente importante para o bom funcionamento dos mecanismos antioxidantes no nosso organismo (24).

#### 4.5.2. Avaliação e potencial atividade antioxidante dos extratos das macroalgas

Atualmente, existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, tais como, o ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), o método da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico ou a análise por fluorescência (88). O método da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico avalia a capacidade de uma substância prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno, protegendo-o dos radicais formados durante a peroxidação do ácido linoléico. Neste método procede-se a uma leitura imediata de 15 em 15 minutos, num período de 2 horas (tempo pelo qual se verifica a perda da coloração do  $\beta$ -caroteno) com o auxílio de um espectrofotômetro a 470 nm (88). Relativamente à análise por fluorescência, esta procura métodos analíticos mais sensíveis, para amostragem mais pequena, sendo um método que combina a alta sensibilidade sem perda de especificidade ou de precisão. Dentro da análise por fluorescência temos o exemplo do sequestro do peróxido de hidrogénio, que permite avaliar a capacidade de uma determinada substância sequestrar o peróxido de hidrogénio, tal como o nome indica. O propósito do peróxido de hidrogénio nesse método é oxidar a escopoletina. No entanto, na presença de um agente antioxidante, a oxidação da escopoletina é inibida e o peróxido de hidrogénio pode ser medido com o auxílio de um espectrofluorímetro a 430 nm (88). Porém, devido aos diferentes tipos de radicais livres e à diferente forma como atuam nos organismos, dificilmente virá a existir um método simples e universal, onde a medida da atividade antioxidante seja precisa. No entanto, o DPPH é um dos métodos mais simples e precisos na avaliação de extratos vegetais (37,88). O ensaio com DPPH foi primeiramente descrito por Brand-Williams *et al.* (89) em 1995. Concluíram que a interação do potencial antioxidante com o DPPH depende da conformação estrutural e do número de grupos hidroxilos disponíveis. Entretanto, Sanchez-Moreno *et al.* (90) tiveram em conta, não somente a concentração do antioxidante, como também o tempo de reação, podendo assim avaliar a eficiência antirradicalar. Sendo também o tamanho molecular um fator importante na reação, moléculas pequenas podem apresentar uma maior atividade que moléculas grandes por terem melhor acesso à zona radicalar (88).

A molécula de DPPH é caracterizada como sendo um radical livre estável. Esta molécula apresenta uma coloração violeta que se deve à deslocação do eletrão desemparelhado ao longo de toda a molécula, esta é caracterizada por uma banda de

absorvância em metanol a cerca de 517 nm. A medição da atividade antioxidante é feita reduzindo o DPPH à correspondente hidrazina (Figura 20), havendo mudança na coloração violeta para amarelo pálido (88).



**Figura 21** Proposta de mecanismo de reação entre o radical DPPH e um composto antioxidante (adaptado de (37)).

O objetivo deste estudo é caracterizar a composição química das macroalgas *C. tamariscifolia*, *B. bifurcata* e *S. muticum* da costa portuguesa. Irão ser extraídas e caracterizadas as frações lipofílicas e polares das macroalgas em estudo. As frações polares serão ainda analisadas quanto à sua atividade antioxidante, recorrendo ao DPPH. Pretende-se com este estudo contribuir para a valorização destas algas, com vista à sua utilização, quer em fins nutracêuticos, quer na indústria da cosmética e farmacêutica.

## 5. Materiais e métodos

### 5.1. Amostras e Reagentes

As macroalgas utilizadas neste estudo foram fornecidas pela empresa ALGApus conforme descrito na Tabela 7.

**Tabela 7** Macroalgas escolhidas, condições de colheita e respetivo lote.

<b>Espécie</b>	<b>Condições</b>	<b>Lote</b>
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Alga de cultivo	B1.1914.M
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	Colhida em Mindelo, em Novembro de 2013	C3.4513.M
<i>Sargassum muticum</i>	Colhida em Mindelo, em Março de 2014	S1.1214.M

Após a colheita, as algas foram sujeitas a diferentes condições de tratamento e secagem de amostra: a *B. bifurcata* e a *S. muticum* foram lavadas e secas num túnel de vento a 25°C, a *C. tamariscifolia* não foi sujeita a lavagem e foi seca ao ar. De seguida foram trituradas (1-2 mm de diâmetro) e embaladas em sacos herméticos apresentando um teor de humidade de 18 a 22%.

A acetona (p.a. 99.5%) foi fornecida pela *Chem Lab Analytical*. Os solventes diclorometano (p.a.,  $\geq 99\%$  pureza) e metanol (p.a.,  $\geq 99.99\%$  pureza) foram fornecidos pela *Fischer Scientific* (Pittsburgh, PA). O ácido clorídrico (p.a.,  $\geq 37\%$ ), *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (99% pureza), n-hexadecano ( $\geq 98.5\%$  pureza) trimetilclorosilano ( $\geq 99\%$  pureza), tetracosano ( $\geq 99\%$  pureza) e ácido ascórbico ( $\geq 99.5\%$  pureza) foram fornecidos pela *Fluka Chemie* (Madrid, Espanha). O ácido acético glacial (99 %) e carbonato de sódio (p.a. 98%) foram fornecidos pela *Panreac Química S.A.* (Barcelona, Espanha). O hidróxido de potássio (p.a.,  $\geq 85\%$  pureza), ácido hexadecanóico ( $\geq 99\%$  pureza), sulfato de sódio (p.a.,  $\geq 99\%$  pureza), colesterol (99% pureza), nonadecanol (p.a.  $\geq 99\%$  pureza), piridina (p.a.,  $\geq 99.8\%$  pureza), ácido gálico (pureza  $\geq 97.5\%$ ), reagente Folin-Ciocalteu, 3,5-di-*tert*-4-butil-hidroxitolueno (BHT) (pureza  $\geq 99\%$ ), hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,4-dimetoxibenzaldeído (DMBA)

(p.a. 98%) e floroglucinol (p.a. 99 %) foram fornecidos pela *Sigma Chemicals Co.* (Madrid, Espanha).

## 5.2. Extração da fração lipofílica

Cerca de 20 g (peso seco) de cada espécie de macroalga foi extraída num extrator Soxhlet, com cerca de 250 mL de diclorometano, durante 6 horas. O solvente foi evaporado até à secura sob vácuo, utilizando um evaporador rotativo. O procedimento foi realizado em triplicado.

### 5.2.1. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

- *Análise de ácidos gordos, álcoois alifáticos e esteróis*

Antes da análise por GC-MS, três amostras de cada extrato foram submetidas a um processo de derivatização por trimetilsilação. Para tal, cerca de 20 mg de cada extrato foi dissolvido em 250 µL de piridina com 0.6 mg de padrão interno (tetracosano) e foi trimetilsililado, pela adição de 250 µL de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de trimetilclorossilano (TMSCl), usado como catalisador, de forma a converter os grupos funcionais hidroxilo e carboxílico em éteres e ésteres de trimetilsililo, respetivamente. No entanto, no caso da *Bifurcaria bifurcata* foi necessário usar um padrão interno diferente, nomeadamente o *n*-hexadecano (em 250 µL de piridina) mantendo-se o restante procedimento. A mistura reacional foi colocada em banho de óleo a 70 °C durante 30 minutos.

A análise por GC-MS foi realizada com recurso a um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa *GCMS-QP2010 Ultra* (Shimadzu, U.S.A.). A separação dos compostos foi realizada numa coluna capilar *DB-1 J&W* (30 m x 0.32 mm de diâmetro interno e um filme de 0.25 µm de espessura), utilizando hélio como gás de arraste (40 cm/s).

As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial 80°C durante 5 min; aumento de 4°C/min até aos 260°C, seguido de um aumento de 2°C/min até aos



285°C, temperatura que foi mantida durante 8 minutos; temperatura do injetor 250°C; temperatura da linha da transferência 290°C; razão de *split* 1:50. O espectrómetro de massa foi usado no modo de impacto eletrônico a uma energia de 70 eV e os dados obtidos foram recolhidos a uma taxa de 1 scan/s, na gama de  $m/z$  35-700. A fonte de ionização foi mantida a 250°C.

Os compostos foram identificados como derivados de TMS por comparação dos seus espectros de massa com bases de dados (NIST14), pelos tempos de retenção característicos nas condições experimentais descritas, por comparação dos seus perfis de fragmentação com a literatura e por injeção de padrões.

Para a análise quantitativa, o GC-MS foi calibrado com padrões representativos das famílias de compostos mais abundantes, no caso do ácido hexadecanóico para os ácidos gordos, o nonadecan-1-ol para os álcoois alifáticos de cadeia longa e o colesterol para os esteróis, tendo sido obtidos fatores de resposta em relação ao respetivo padrão interno. Cada alíquota foi injetada em duplicado.

- *Análise de compostos diterpénicos*

Para identificar e quantificar os compostos diterpénicos existentes na *B. bifurcata*, três alíquotas de 10 mg foram dissolvidas em 1100  $\mu$ L de diclorometano com 0.8 mg de padrão interno (n-hexadecano).

A análise por GC-MS foi realizada com recurso ao mesmo equipamento e coluna acima referidos.

As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial 80°C durante 5 min; aumento de 5°C/min até aos 200°C, seguido de um aumento de 2°C/min até aos 240°C, e por fim, um aumento de 5°C/min até aos 285°C, temperatura que foi mantida durante 8 minutos; temperatura do injetor 250°C; temperatura da linha da transferência 290°C; razão de *split* 1:40. O espectrómetro de massa foi usado no modo de impacto eletrônico a uma energia de 70 eV e os dados obtidos foram recolhidos a uma taxa de 1 scan/s, na gama de  $m/z$  35-700. A fonte de ionização foi mantida a 250°C.

Os compostos foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com bases de dados (NIST14) e por comparação dos seus perfis de fragmentação com a literatura.

Na indisponibilidade de um padrão interno representativo dos diterpenos, foi feita uma quantificação direta a partir do padrão interno (n-hexadecano). Cada amostra foi injetada em triplicado.

### **5.3. Extração da fração polar**

Os extratos polares foram obtidos usando duas metodologias de extração adaptadas da literatura (19,91). Numa das metodologias (A) foram usados os resíduos sólidos resultantes da extração com diclorometano (91). Foram pesadas 0.2 g de resíduo de alga que foi suspenso em 10 mL de acetona:água (70:30 – V/V) contendo ácido ascórbico (0.3 % – m/V), durante 1 hora à temperatura ambiente. A fase líquida foi separada do resíduo por centrifugação (3600 rpm, 10 min), repetindo-se o processo mais três vezes. A acetona da fase líquida foi removida com uma corrente de azoto. O extrato aquoso foi novamente centrifugado (3600 rpm, 15 min) para remover resíduos sólidos, decantado e congelado. A água foi removida por liofilização e os extratos quantificados em percentagem de peso seco (91).

Para a análise por HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>, os extratos foram dissolvidos em acetona:água (70:30) (grau HPLC), em concentrações finais de extrato de 6 e 80 mg/mL, sendo de seguida filtrados com um filtro de seringa PTFE de porosidade 0.45 µm (91).

Numa segunda metodologia de extração (B) foram pesadas cerca de 0.1 g de macroalga à qual foi adicionada 10 mL de metanol:água:ácido acético (30:69:1 – V/V/V) contendo ácido ascórbico (0.2% – m/V), levando de seguida a mistura ao vortéx durante 2 minutos (19). As amostras foram colocadas em banho de água com agitação constante a 70 °C durante 50 min. De seguida, foram centrifugadas a 3600 rpm durante 15 min, o sobrenadante/extrato foi separado do resíduo sólido e o solvente foi removido por evaporação a baixa pressão. Uma alíquota de 1 mL de sobrenadante foi retirada antes de evaporar e filtrada através de um filtro PTFE de 0.45 µm para seguinte análise por HPLC. Os resultados para ambas as metodologias foram expressos em percentagem de peso seco (19). O procedimento foi realizado em triplicado.

### 5.3.1. Quantificação do Teor de Fenóis Totais (TPC)

A quantificação de TPC dos extratos polares foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu (92). Os extratos secos foram dissolvidos em água, com concentrações entre 0.17 e 0.22 mg/mL para os extratos (A) e concentrações entre 0.26 e 0.32 mg/mL para os extratos (B). De seguida, a 500 µL de extrato, adicionou-se 2.5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, antecipadamente diluído com água (1:10 – V/V) e 2.0 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 75 g/L). Cada mistura foi mantida durante 5 minutos a 50 °C e, após arrefecimento, a sua absorvância foi lida contra um branco, a 760 nm usando um espectrofotómetro *UV-Vis Evolution 220, Thermo Scientific*.

Simultaneamente, foram preparadas soluções padrão de ácido gálico e de floroglucinol, ambas de 10 a 90 µg/mL, para as correspondentes curvas de calibração. Os resultados foram expressos em g de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato e g de equivalentes de floroglucinol (EFG) por g de extrato. O procedimento foi realizado em triplicado.

### 5.3.2. Quantificação do teor de florotaninos totais (TFT) pelo método do 2,4-dimetoxibenzaldeído (DMBA)

O TFT dos extratos foi determinado pelo método DMBA, sendo a metodologia seguida adaptada da literatura (40). A mistura reacional foi preparada adicionando volumes iguais de DMBA (2% – m/V) e HCl (6% – V/V) preparados em ácido acético glacial. A 750 µL desta mistura foram adicionadas 150 µL de extrato (com uma concentração aproximada de 2 mg/mL). A reação ocorreu à temperatura ambiente, ao abrigo da luz durante 60 minutos. A absorvância foi determinada a 515 nm num espectrofotómetro *UV-Vis Evolution 220, Thermo Scientific*. A determinação quantitativa dos florotaninos foi feita a partir de uma reta de calibração obtida com uma solução padrão de floroglucinol, de 1.0 a 3.6 µg/mL. Os resultados foram expressos em g de equivalentes de floroglucinol (EFG) por g de extrato. O procedimento foi realizado em triplicado.

### 5.3.3. Avaliação da atividade antioxidante – Ensaio DPPH

A atividade antioxidante dos extratos polares foi determinada pela sua capacidade de redução do radical DPPH, sendo os extratos secos previamente dissolvidos em água. Adicionou-se 0.25 mL de DPPH (0.95 mM em metanol) e 2.75 mL de metanol a alíquotas de 1 mL de extrato, correspondendo a concentrações finais entre 1.7 e 15.4 µg/mL e 3.6 e 26.4 µg/mL para os extratos (A) e (B), respetivamente. As misturas permaneceram ao abrigo da luz durante 30 min, à temperatura ambiente. A sua absorvância foi determinada a 517 nm (lidas contra um branco) comparando com um controlo sem extrato, utilizando um espectrofotómetro UV-Vis *Evolution 220, Thermo Scientific*. O ácido ascórbico e o 3,5-di-*tert*-4-butil-hidroxitolueno (BHT) foram utilizados como compostos de referência.

A atividade antioxidante foi expressa como a percentagem de redução do radical DPPH e calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Redução DPPH} = \frac{\text{Abs}(\text{controlo}) - \text{Abs}(\text{amostra})}{\text{Abs}(\text{amostra})} \times 100$$

Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados a partir dos gráficos de redução do DPPH vs Concentração dos extratos. O IC<sub>50</sub> é definido como a concentração de extrato necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de radicais DPPH, sendo expressos em µg/mL. A atividade antioxidante foi ainda expressa em mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/mg de extrato e em mg de equivalentes de BHT (EBHT)/mg de extrato. O procedimento foi realizado em triplicado.

### 5.3.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detetor de Arranjo de Díodos e Espetrometria de Massa tandem (HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>)

A análise da fração polar foi realizada num sistema de HPLC, contendo um *autosampler Accela* de loop variável (capacidade para 200 frascos) com uma temperatura controlada de 15 °C, bomba *Accela 600 LC* e um detetor *PDA Accela 80 Hz (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, U.S.A)*. A separação dos compostos foi feita numa coluna *Kinetex C18* (50 mm x 2.1 mm x 1.7 µm) fornecida por *Phenomenex*, com um caudal de

0.5 mL.min<sup>-1</sup> e uma temperatura controlada de 45°C. O volume de injeção foi de 10 µL e a fase móvel consistiu em água:acetonitrilo (99:1, V/V) (A) e acetonitrilo (B), ambas com 0.1% de ácido fórmico. O perfil do gradiente aplicado foi o seguinte: 0-3 min: 2%B, 3-18 min: 2-30%B, 18-20 min: 30-100%B, 20-24 min: 100-2%B, seguindo-se um gradiente isocrático de 3 min para reequilíbrio da coluna, antes da injeção seguinte. A detecção foi realizada no detetor de díodos, com aquisição de espectros de UV entre 200-600 nm e foram ainda adquiridos cromatogramas a comprimento de onda fixo de 280 e 340 nm. Antes da injeção, cada extrato foi dissolvido na mistura de solventes de extração (solventes com pureza HPLC), de forma a obter concentrações do extrato final de 6 e 80 mg/mL e, filtrado através de um filtro de seringa *PTFE* de 0.45 µm.

A análise MS foi realizada num espectrómetro de massa *ion trap LCQ Fleet* (*ThermoFinnigan, San Jose, CA, U.S.A.*), equipado com uma fonte de ionização *electrospray* e operado em modo negativo. O fluxo de gás nebulizador (azoto) e de gás auxiliar (azoto) foi ajustado para 40 e 10 (unidades arbitrárias), respetivamente. A voltagem aplicada ao spray na fonte foi de 5 kV e a temperatura do capilar foi de 350°C. A voltagem capilar e da lente foram fixadas em -25 V e -125 V, respetivamente. A análise CID-MSn foi realizada através dos iões percursos de massa selecionada com uma gama de *m/z* de 100-2000. A largura de iões percursos isolados foi de 1.0 unidades de massa. O tempo de varredura foi de 100 ms e a energia de colisão foi otimizada entre 20 e 35 (unidades arbitrárias), utilizando hélio como gás de colisão. A aquisição de dados foi realizada usando o sistema de dados *Xcalibur® data system* (*ThermoFinnigan, San Jose, CA, U.S.A.*).

### **5.3.5. Análise por Ultravioleta-Vísivel (UV-Vis)**

A análise por UV-Vis foi obtida a partir dos extratos de acetona:água e de metanol:água:ácido acético, dissolvidos em água com concentrações a variar entre 1.4-1.5 e 2.2-2.5 mg/mL, respetivamente, num espectrofotómetro UV-Vis *Evolution 220, Thermo Scientific*, a comprimentos de onda entre 200 a 600 nm.

### 5.3.6. Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos usando acetona e água deuterados, para os extratos acetona:água, e metanol e água deuterados, para os extratos metanol:água:ácido acético, como solventes deuterados, num espectrômetro *Brüker AMX 300* a operar numa frequência de 300.13 MHz para  $^1\text{H}$  e 75.47 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os desvios químicos foram registrados em partes por milhão (ppm) relativamente à ressonância do tetrametilsilano, usado como referência interna.

## 6. Resultados e discussão

Este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar os compostos lipofílicos e polares (especificamente os compostos fenólicos) presentes em macroalgas castanhas colhidas na costa portuguesa.

As macroalgas *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum* foram sujeitas a extração em Soxhlet com diclorometano, para extrair os compostos lipofílicos. Relativamente à extração de compostos polares, estes foram sujeitos a dois processos de extração sólido-líquido distintos, adaptados da literatura, um em acetona:água (acetona:H<sub>2</sub>O) (70:30) e outro em metanol:água:ácido acético (MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH) (30:69:1) (19,91). Os extratos lipofílicos obtidos foram analisados por GC-MS, enquanto que as frações polares foram avaliadas relativamente ao seu teor de fenóis totais, teor de florotaninos totais, atividade antioxidante e analisados por HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>, UV-Vis e RMN.

### 6.1. Extração de compostos lipofílicos

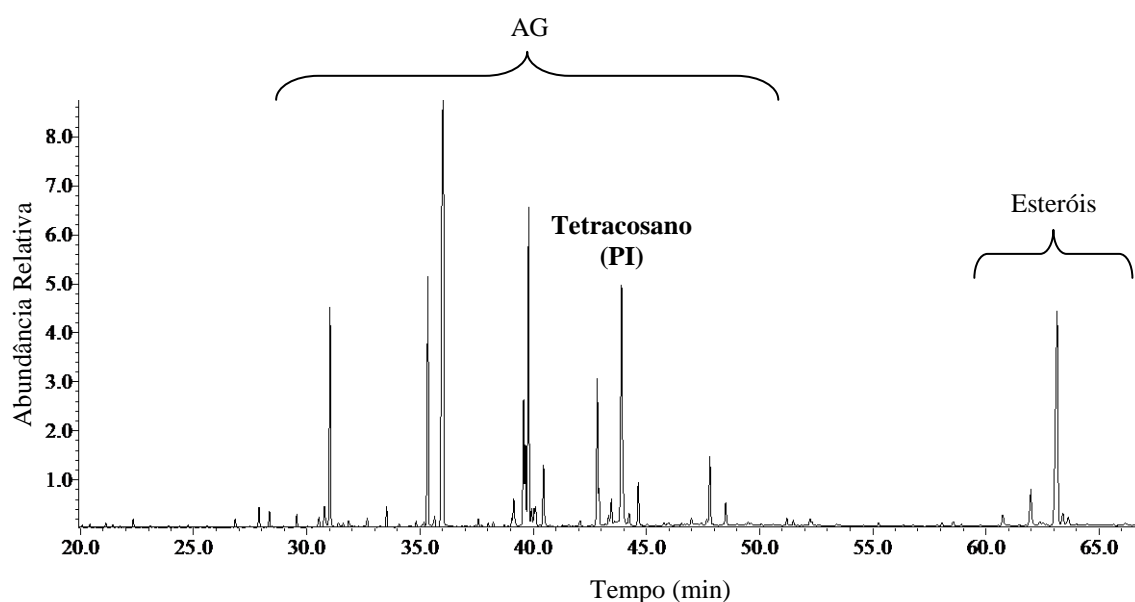
Os rendimentos das extrações Soxhlet com diclorometano das algas em estudo encontram-se na Tabela 8. É possível verificar que os rendimentos diferiram entre si, apresentando a *B. bifurcata* o valor mais elevado ( $3.92 \pm 0.09\%$ ), seguindo-se a *S. muticum* ( $1.19 \pm 0.11\%$ ) e por último a *C. tamariscifolia* ( $0.25 \pm 0.02\%$ ). Os valores obtidos encontram-se na gama dos rendimentos reportados para diferentes macroalgas (1,93).

**Tabela 8** Rendimentos das extrações Soxhlet com diclorometano das macroalgas *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*.

Macroalgas	Rendimento de extração (%)
<i>B. bifurcata</i>	$3.92 \pm 0.09$
<i>C. tamariscifolia</i>	$0.25 \pm 0.02$
<i>S. muticum</i>	$1.19 \pm 0.11$

### 6.1.1. Identificação e quantificação dos componentes dos extratos lipofílicos por GC-MS

A identificação e quantificação dos extratáveis lipofílicos presentes nas amostras das três macroalgas foi realizada por análise GC-MS. Na Figura 22 encontra-se um exemplo de um cromatograma representativo dos extratos lipofílicos obtidos, neste caso da macroalga *S. muticum*. É possível observar a presença de duas famílias de compostos maioritários, nomeadamente os ácidos gordos e os esteróis. A identificação detalhada dos extratos lipofílicos das três macroalgas e a sua respetiva quantificação encontra-se descrita na Tabela 9.



**Figura 22** Cromatograma de GC-MS do extrato em diclorometano trimetilsililado da *S. muticum* (AG – Ácidos gordos; PI – Padrão interno).



**Tabela 9** Identificação e quantificação dos compostos lipofílicos (mg/kg peso seco) presentes nos extratos lipofílicos das macroalgas *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*.

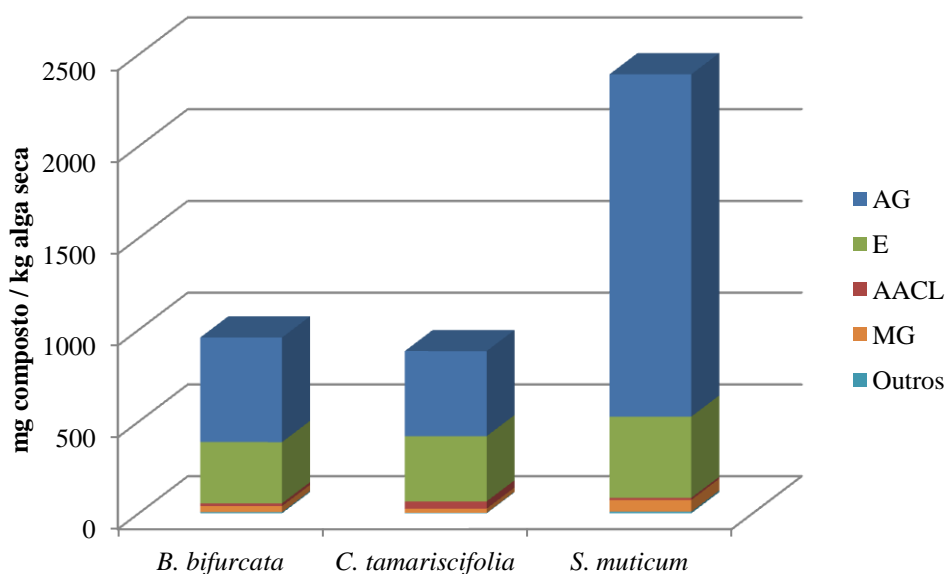
	tR (min)	mg/kg peso seco		
		<i>B.</i> <i>bifurcata</i>	<i>C.</i> <i>tamariscifolia</i>	<i>S.</i> <i>muticum</i>
<b>Ácidos Gordos</b>		569.6	463.4	1865.1
<i>Saturados</i>		354.1	283.9	987.6
Ácido nonecanóico	16.4		2.0	3.1
Ácido decanóico	19.6		0.7	1.3
Ácido dodecanóico	25.6		1.3	1.3
Ácido tetradecanóico	31.0	47.6	56.5	175.8
Ácido pentadecanóico	33.5	6.3	5.9	15.3
Ácido hexadecanóico	36.0	241.7	163.4	657.7
Ácido heptadecanóico	38.2	7.4	5.8	4.6
Ácido octadecanóico	40.5	21.4	28.7	54.7
Ácido eicosanóico	44.7	17.4	7.5	39.5
Ácido docosanóico	48.5	6.3	6.2	22.5
Ácido tetracosanóico	52.2		5.9	7.9
Ácido 22-hidroxi-docosanóico	55.3	6.1		3.7
<i>Insaturados</i>		215.5	177.4	845.5
Ácido hexadeca-9-enóico	35.3	19.0	35.2	203.3
Ácido heptadeca-10-enóico	37.6		3.3	5.3
Ácido octadeca-9,12-dienóico	39.5	21.2	14.7	101.8
Ácido octadeca-9,12,15-trienóico	39.6	24.8	8.5	59.5
Ácido octadeca-9-enóico	39.9	117.3	81.0	296.1
Ácido eicosa-5,8,11,14-tetraenóico	42.8		28.8	127.7
Ácido eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico	42.9	27.1	5.9	23.1
Ácido eicosa-5,8,11-trienóico	43.3	1.9		7.4
Ácido eicosa-11,14-dienóico	43.4	4.3		21.3
<i>Diácidos</i>			2.2	32.1
Ácido 2-butenedióico	16.1		0.6	2.4
Ácido pentanedióico	17.9		0.9	5.2
Ácido hexanedióico	21.1			4.4
Ácido octanedióico	26.9			7.3
Ácido nonanedióico	29.6		0.7	11.5
Ácido undecanedióico	34.5			1.3

<b>Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa</b>	15.1	39.4	11.2	
Tetradecan-1-ol	29.0	2.6	2.0	1.0
Hexadecan-1-ol	34.1	6.4	10.8	3.3
Octadeca-9-en-1-ol	38.0		13.0	3.3
Octadecan-1-ol	38.7	3.6	7.9	1.7
Octacosan-1-ol	58.9	2.5	5.6	1.9
<b>Esteróis</b>	333.6	355.5	442.7	
Colest-5-en-3-ol (3 $\beta$ ) 3-fenil-2-propenoato	52.5		1.9	
Colesterol	58.6	4.2	31.3	6.4
24-Metilenocolesterol	60.8			12.1
Desmosterol	62.0	35.3	30.1	49.6
Fucosterol	63.1	271.1	281.0	348.5
Campesterol	63.4	23.0	11.3	16.7
Brassicasterol	63.6			9.4
<b>Monoglicerídeos</b>	33.0	22.7	63.8	
2,3-Dihidroxi-propil tetradecanoato	44.0		11.5	
2,3-Dihidroxi-propil hexadecanoato	47.8	25.7	9.1	59.0
2,3-Dihidroxi-propil 9-octadecenoato	51.5	5.0	2.1	4.8
2,3-Dihidroxi-propil 5,8,11,14-eicosenoate	52.6	2.2		
<b>Outros</b>	6.3	2.9	9.1	
Pentadecan-2-ona	30.5	6.3	2.9	9.1
<b>TOTAL</b>	957.4	884.0	2391.8	

De acordo com a Tabela 9, observa-se que os compostos maioritários dos extratos lipofílicos das diferentes espécies, *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*, correspondem aos ácidos gordos, com 59.3%, 52.4% e 78.0% e esteróis com 34.8%, 40.2% e 18.5%, respetivamente, do total de compostos identificados nas frações lipofílicas. Além destes, foi possível identificar outras famílias de compostos presentes em menor quantidade, tais como álcoois alifáticos de cadeia longa e monoglicerídeos (Figura 23).

De acordo com a Figura 23, é possível observar uma diferença acentuada na composição das diferentes macroalgas. No entanto, esta variação poderá estar relacionada

com diversos fatores, tais como as condições climáticas ou o crescimento da macroalga que direta ou indiretamente, influenciam a quantidade de metabolitos secundários presentes na sua composição, pois a *C. tamariscifolia* e a *S. muticum* foram apanhadas em alturas do ano diferentes e a *B. bifurcata* foi obtida por aquicultura.



**Figura 23** Principais famílias de compostos lipofílicos identificados nos extratos em diclorometano das macroalgas *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*. AG - ácidos gordos, E - esteróis, AAAL - álcoois alifáticos de cadeia longa e MG – monoglicerídeos.

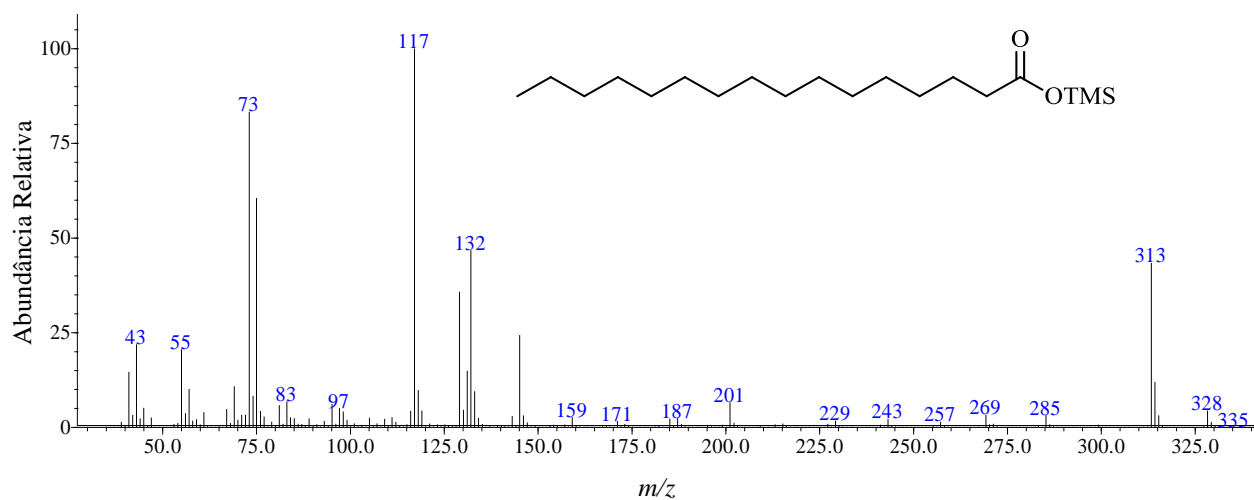
Os compostos lipofílicos sob a forma de derivados TMS podem ser facilmente distinguidos com base nos seus padrões de fragmentação típicos. Dentro dos compostos lipofílicos derivatizados irão ser discutidos os perfis de fragmentação característicos dos derivados TMS dos ácidos gordos, álcoois alifáticos de cadeia longa e esteróis.

Além dos compostos acima identificados (Tabela 9), observou-se que o extrato lipofílico da *B. bifurcata* possui uma grande variedade de diterpenos, cuja identificação será descrita mais abaixo (secção 6.1.1.4). A identificação destes compostos na *B. bifurcata* está de acordo com estudos previamente realizados (47–51).

### 6.1.1.1. Ácidos Gordos

Os derivados TMS de AG apresentam um fragmento correspondente ao ião molecular de baixa intensidade e o pico base resultante da perda de um grupo metilo do derivado TMS,  $[M-15]^+$ . Por exemplo, no caso do ácido hexadecanóico, é possível observar no seu espectro de massa (Figura 24) o ião molecular  $[M]^+$ , a  $m/z$  328 e o pico base,  $[M-15]^+$  a  $m/z$  313. Para além desse pico, é importante realçar os iões a  $m/z$  73 e 75, correspondentes aos fragmentos  $[(CH_3)_3Si]^+$  e  $[(CH_3)_2SiOH]^+$  respetivamente, sendo muito comuns nos espectros de massa dos derivados TMS. Outros fragmentos característicos do espectro de massa dos derivados TMS de AG são os iões a  $m/z$  117, 129, 132 e 145 (94–96).

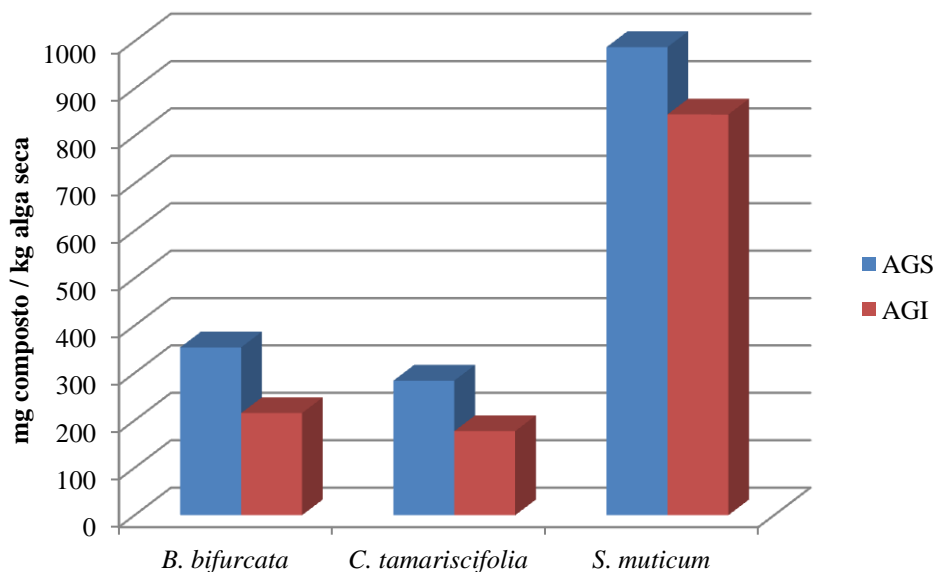
O fragmento a  $m/z$  132 resulta de um rearranjo de McLafferty que, ao perder o radical metilo, origina um novo fragmento com  $m/z$  117. O ião a  $m/z$  145 surge também de um rearranjo de McLafferty, seguido da transferência de um próton, eliminando um grupo metilo e formando o ião a  $m/z$  129 (96).



**Figura 24** Espectro de massa de impacto eletrónico de ácido hexadecanóico trimetilsililado.

Os espectros de massa dos derivados TMS de ácidos gordos insaturados, para além dos fragmentos referidos anteriormente, apresentam ainda o fragmento correspondente a  $[M-90]^+$ , resultante da perda do grupo  $[Si(CH_3)_3OH]^+$ . Por outro lado, uma diferença relevante nos espectros de massa dos ácidos gordos insaturados, relativamente aos saturados, é a abundância relativa do pico correspondente ao fragmento  $[M-15]^+$ , que diminui à medida que aumenta o grau de insaturação (96).

No que diz respeito à quantificação de ácidos gordos, é possível averiguar que a *S. muticum* possui uma maior quantidade destes compostos (1865.1 mg/kg peso seco) e que a *C. tamariscifolia* possui menor abundância (463.4 mg/kg peso seco). Para além disso, é possível averiguar que existe maior abundância de ácidos gordos saturados nas três macroalgas, Figura 25.



**Figura 25** Quantidade de ácidos gordos saturados (AGS) e insaturados (AGI) presentes nos extratos de diclorometano das macroalgas *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*.

Os principais ácidos gordos encontrados nas três macroalgas em estudo foram os ácidos hexadecanóico, tetradecanóico, octadecanóico, eicosanóico, octadeca-9-enóico e hexadeca-9-enóico. No que diz respeito aos PUFAs C18 e C20, destaca-se a presença dos ácidos octadeca-9,12-dienóico ( $\omega$ -6), octadeca-9,12,15-trienóico ( $\omega$ -3) e dos ácidos gordos eicosa-5,8,11,14-tetraenóico ( $\omega$ -6) e eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico ( $\omega$ -3), respetivamente. Esta composição encontra-se de acordo com outros estudos já realizados em macroalgas castanhas (97–99).

Para todas as algas em estudo, o ácido gordo saturado mais abundante foi o ácido hexadecanóico, tendo a *S. muticum* apresentado um teor mais elevado (657.7 mg/kg peso seco), seguida da *B. bifurcata* (241.7 mg/kg peso seco) e, por fim, da *C. tamariscifolia* (163.4 mg/kg peso seco). O ácido hexadecanóico foi já referido na literatura como sendo o ácido gordo mais abundante em macroalgas castanhas (98–100). O ácido tetradecanóico foi

o segundo ácido gordo saturado mais abundante nestas espécies, com valores compreendidos entre 175.8 mg/kg peso seco (*S. muticum*) e 47.6 mg/kg peso seco (*B. bifurcata*).

Relativamente aos ácidos gordos insaturados, a *S. muticum* apresentou um teor mais elevado (845.5 mg/kg peso seco), seguido da *B. bifurcata* (215.5 mg/kg peso seco) e, por fim, da *C. tamariscifolia* (177.4 mg/kg peso seco). Dentro dos ácidos gordos insaturados identificados, o ácido octadeca-9-enóico foi o mais abundante, com valores entre 296.1 (*S. muticum*) e 81.0 mg/kg peso seco (*C. tamariscifolia*).

Foram também detetados ácidos gordos essenciais, como os ácidos octadeca-9,12-dienóico ( $\omega$ -6), octadeca-9,12,15-trienóico ( $\omega$ -3), eicosa-5,8,11,14-tetraenóico ( $\omega$ -6) e eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico ( $\omega$ -3). O ácido eicosa-5,8,11,14-tetraenóico ( $\omega$ -6) foi apenas detetado na *C. tamariscifolia* e na *S. muticum* com valores de 28.8 e 127.7 mg/kg peso seco, respetivamente.

Os ácidos gordos essenciais detetados nas macroalgas em estudo apresentam uma importância significativa na saúde, uma vez que se encontram envolvidos em diversos mecanismos de regulação fisiológica. Os mamíferos não possuem a capacidade de sintetizar  $\omega$ -3 devido à ausência de uma dessaturase, a qual converte o ácido octadeca-9-enóico em ácido octadeca-9,12-dienóico. É devido a falta desta enzima que estes ácidos gordos são designados de ácidos gordos essenciais, necessitando de serem ingeridos. De entre os ácidos gordos essenciais destacam-se os ácidos octadeca-9,12-dienóico, do qual é metabolizado o ácido eicosa-5,8,11,14-tetraenóico (AA, de ácido araquidónico), e octadeca-6,9,12-trienóico, de onde são metabolizados os ácidos docosa-hexanóico (DHA) e eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico (EPA, de ácido eicosapentanóico) (101,102).

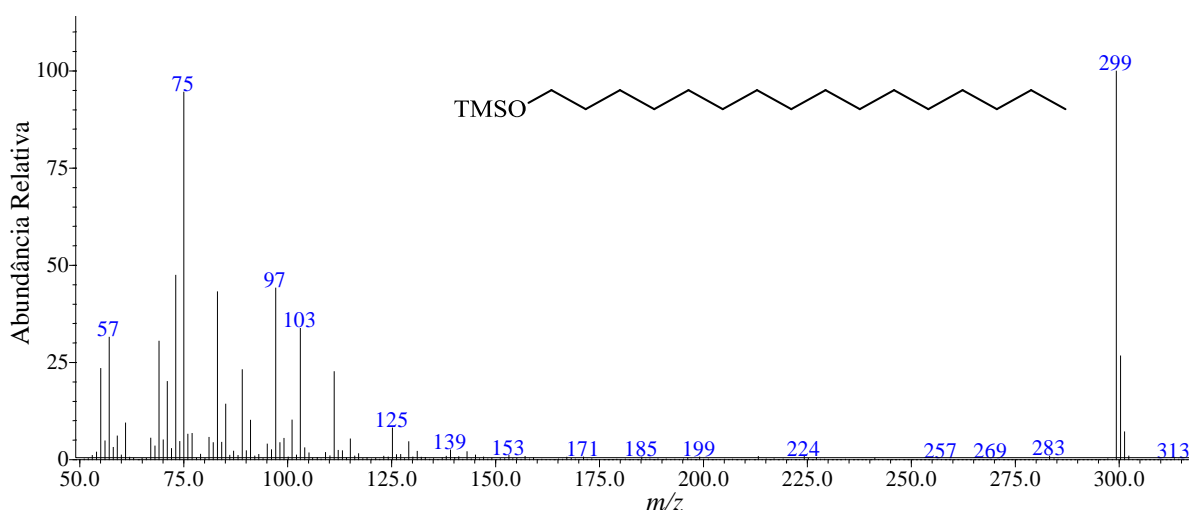
A síntese/ingestão de AA, EPA e DHA é importante uma vez que estes ácidos gordos são componentes estruturais chave nas membranas celulares, bem como precursores metabólicos de eicosanóides como as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos. De uma forma geral, é possível afirmar que o consumo deste tipo de ácidos essenciais tem efeito hipolipidémico, anti trombótico e anti-inflamatório (101).

Para além dos ácidos gordos saturados e insaturados, alguns diácidos foram identificados pela primeira vez nas macroalgas *C. tamariscifolia* e *S. muticum*, com um teor total de 2.2 e 32.1 mg/kg de peso seco, respetivamente.

### 6.1.1.2. Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa

Os álcoois alifáticos representam uma pequena fração do total de extratáveis identificados por GC-MS, tendo valores compreendidos entre 11.2 (*S. muticum*) e 39.4 mg/kg de peso seco (*C. tamariscifolia*).

Os AACL foram identificados a partir das bases de dados do equipamento e com base na literatura (103,104). Os fragmentos característicos para a identificação dos derivados TMS dos AACL são o  $[M-15]^+$  e o fragmento a  $m/z$  75, correspondente ao fragmento  $[(CH_3)_2SiOH]^+$ , este último apresentando elevada intensidade. Por exemplo, no caso do hexadecan-1-ol, é possível observar no seu espectro de massa (Figura 26) o ião  $[M-15]^+$  a  $m/z$  299, para além do ião a  $m/z$  75 (103,104).

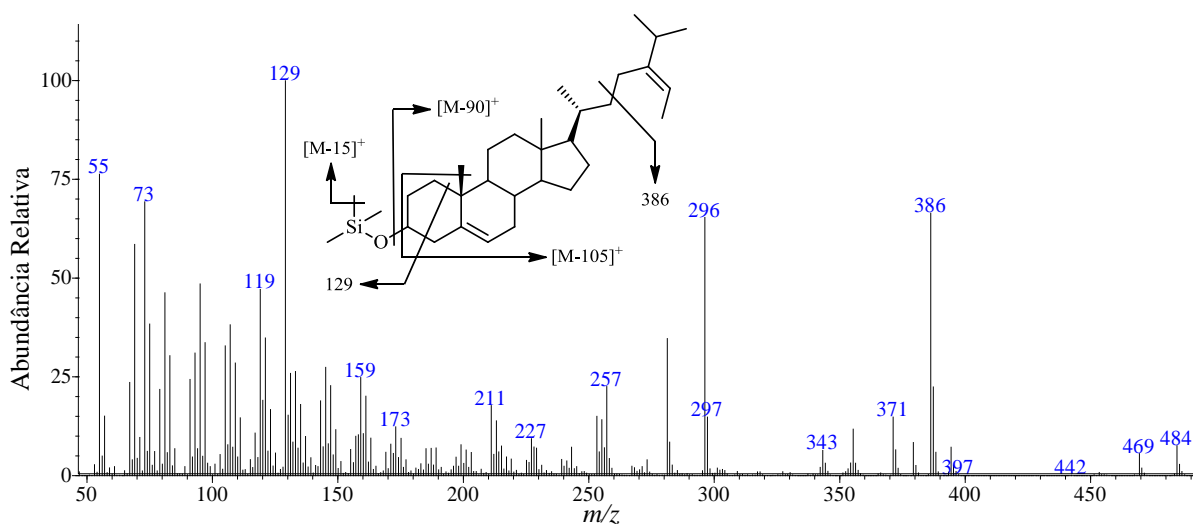


**Figura 26** Espectro de massa do hexadecan-1-ol trimetilsililado.

O AACL mais abundante das macroalgas *C. tamariscifolia* e *S. muticum* foi o octadec-9-en-1-ol, com valores de 13.0 e 3.3 mg/kg de peso seco, seguindo-se o hexadecan-1-ol, com valores de 10.8 e 3.3 mg/kg de peso seco, respetivamente. No caso particular da *B. bifurcata*, esta possui maior abundancia de hexadecan-1-ol (6.4 mg/kg de peso seco), seguindo-se o octadecan-1-ol (3.6 mg/kg de peso seco).

### 6.1.1.3. Esteróis

O padrão de fragmentação dos esteróis varia consoante a presença, número e posição de ligações duplas, assim como a natureza dos vários grupos substituintes (94). De uma forma geral, para além dos fragmentos a  $m/z$  73 e 75, comuns em todos os derivados TMS, os espectros de massa dos esteróis na forma de derivados TMS apresentam um pico com baixa intensidade correspondente ao ião molecular e coincidente, portanto, com o seu peso molecular, caso contrário, este pode ser deduzido a partir do ião  $[M-15]^+$ . Outro fragmento característico dos derivados TMS dos esteróis é o ião  $[M-90]^+$ , correspondente à eliminação do grupo trimetilsilanol, que após perda de mais um grupo metilo resulta no fragmento  $[M-105]^+$  (105). Os iões a  $m/z$  129 e  $[M-129]^+$ , que correspondem à perda do grupo TMS conjuntamente com três carbonos do anel A (carbono 1, 2 e 3), permitem obter informação adicional sobre a estrutura molecular do composto em estudo (106–108). Por exemplo, no caso do fucosterol, é possível observar no seu espectro de massa (Figura 27) o ião molecular  $[M]^+$  a  $m/z$  484, assim como o ião  $[M-15]^+$  a  $m/z$  469. Para além disso, também é possível observar o ião  $[M-90]^+$  a  $m/z$  394, assim como o ião  $[M-105]^+$  a  $m/z$  379 e o ião  $[M-129]^+$  a  $m/z$  355.



**Figura 27** Espectro de massa do fucosterol trimetilsililado.

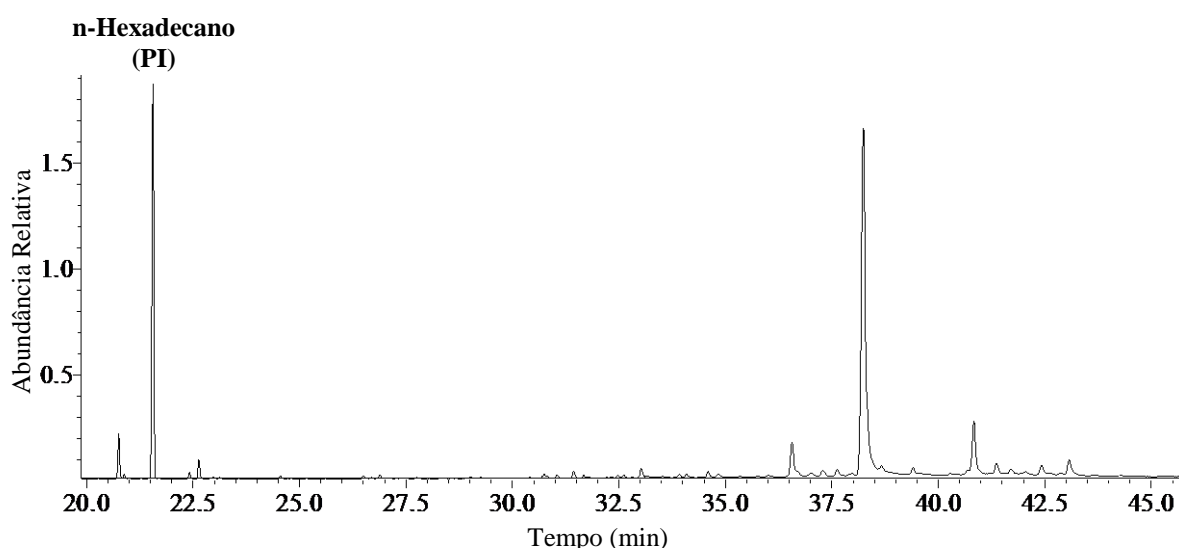
No que diz respeito à quantificação de esteróis, verifica-se que a *S. muticum* possui uma maior quantidade de esteróis (442.7 mg/kg peso seco), seguida da *C. tamariscifolia* (355.5 mg/kg peso seco) e, por fim, da *B. bifurcata* (333.6 mg/kg peso seco). Todos os



esteróis identificados nos extratos lipofílicos das espécies em estudo foram já previamente identificados em macroalgas castanhas, realçando que o desmosterol, fucosterol e campesterol foram já identificados em extratos de macroalgas provenientes da costa Portuguesa (2,109). O fucosterol é o esterol mais abundante nas três macroalgas em estudo, compreendendo valores entre 348.5 (*S. muticum*) e 271.1 mg/kg peso seco (*B. bifurcata*) (Tabela 9). O fucosterol é um fitoesterol importante uma vez que possui a capacidade de regular os níveis de colesterol no sangue, permitindo-lhe atuar como agente terapêutico (110). Para além disso, esta molécula apresenta potencial atividade antioxidante (111), anti-inflamatória (112) e atua ainda como um dermatoprotetor (113).

#### 6.1.1.4 Diterpenos

Tal como já foi referido anteriormente, é conhecido que a *B. bifurcata* possui uma grande variedade de diterpenos na sua composição (47–51). No entanto, este constitui o primeiro estudo detalhado por GC-MS da composição química do extrato lipofílico da *B. bifurcata*. Na Figura 28 encontra-se representado o cromatograma de GC-MS da fração lipofílica sem derivatização da macroalga em estudo. A identificação, e correspondente quantificação, encontram-se apresentadas na Tabela 10.

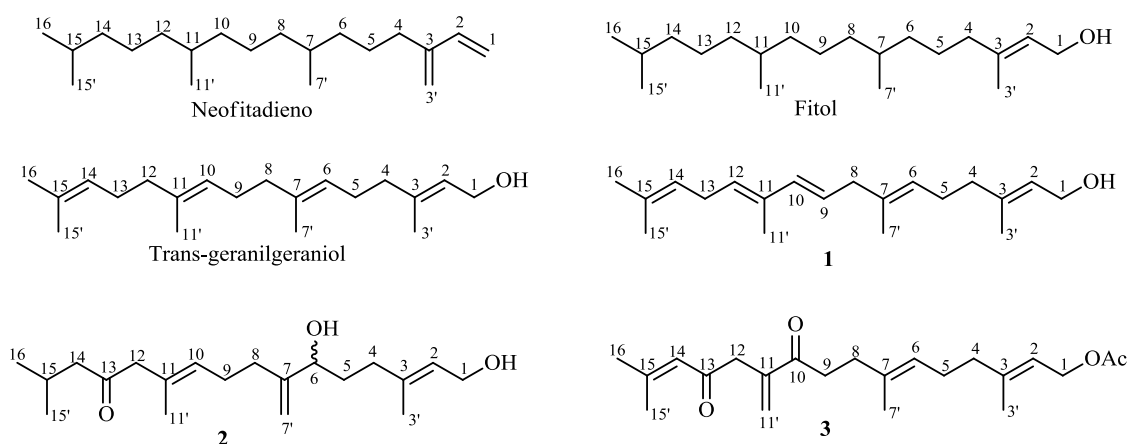


**Figura 28** Cromatograma de GC-MS do extrato lipofílico sem derivatização da *B. bifurcata* (PI – Padrão interno).

**Tabela 10** Identificação e quantificação dos diterpenos (mg/kg peso seco) presentes no extrato lipofílico da macroalga *B. bifurcata*.

	tR (min)	mg/kg peso seco
Diterpenos		1895.4
Neofitadieno	26.8	60.0
Fitol	32.4	34.1
Trans-geranilgeraniol	34.0	66.6
6,7,9,10,11,12,14,15-tetradesidrofitol (1)	34.5	94.5
6-hidroxi-13-oxo-7,7',10,11-didesidrofitol (2)	36.5	638.7
1-acetil-10,13-dioxo-6,7,11,11',14,15-tridesidrofitol (3)	40.7	1001.6

Na figura 29, é possível observar as estruturas químicas dos diterpenos identificados com base na análise de GC-MS. Os compostos 1, 2 e 3 são derivados do fitol com insaturações e grupos OH, carbonilo e acetilo adicionais, Figura 29.



**Figura 29** Estruturas químicas dos diterpenos identificados a partir da análise de GC-MS do extrato em diclorometano da *B. bifurcata*.

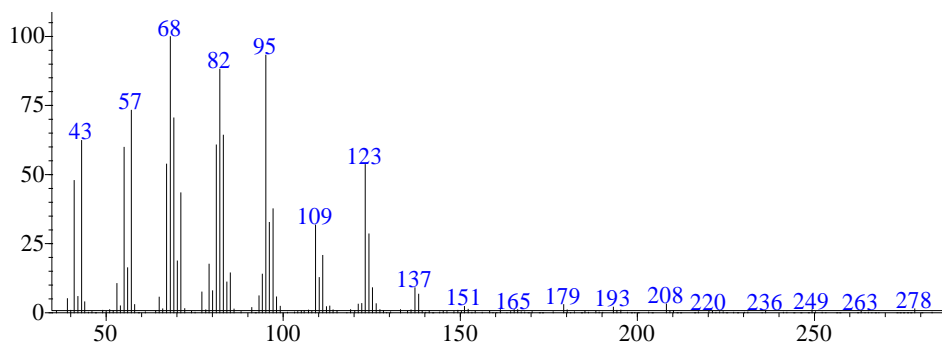
Tal como é possível verificar, o extrato proveniente da *B. bifurcata* possui uma maior quantidade de diterpenos do que o total de AG, AACL, esteróis e monoglicerídeos (Tabela 9 e 10). Os diterpenos têm despertado a atenção da comunidade científica pois estes apresentam propriedades únicas para a saúde (30). De facto, diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas a diterpenos provenientes de macroalgas, como atividade

antioxidante (114), antifúngica (26), anti microbiana (5), anti viral (5,82) e anti tumoral (5,115).

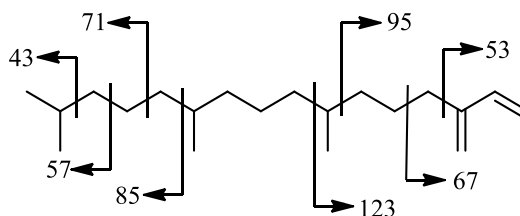
O padrão de fragmentação dos diterpenos varia consoante o número e posição de ligações duplas, assim como da natureza dos vários substituintes. Estes compostos são identificados com base nos perfis de fragmentação e literatura (49–51), descrevendo-se aqui a título ilustrativo os espectros de massa do neofitadieno e do trans-geranilgeraniol.

O neofitadieno foi identificado através da base de dados do equipamento. O espectro de massa correspondente a este diterpeno e a identificação dos principais fragmentos encontram-se ilustrados na Figura 30 e 31, respetivamente.

De acordo com a Figura 30, os fragmentos principais correspondem aos iões a  $m/z$  43, 57, 68, 82, 95, 109 e 123. No que diz respeito aos iões a  $m/z$  43, 57, 95 e 123, estes correspondem aos fragmentos  $[C_3H_7]^+$ ,  $[C_4H_9]^+$ ,  $[C_7H_{11}]^+$  e  $[C_9H_{15}]^+$ , respetivamente (Figura 31). Ainda é possível destacar o ião a  $m/z$  278, correspondente ao ião  $[M]^+$ , embora também possua uma abundância relativa baixa, 1.5%.



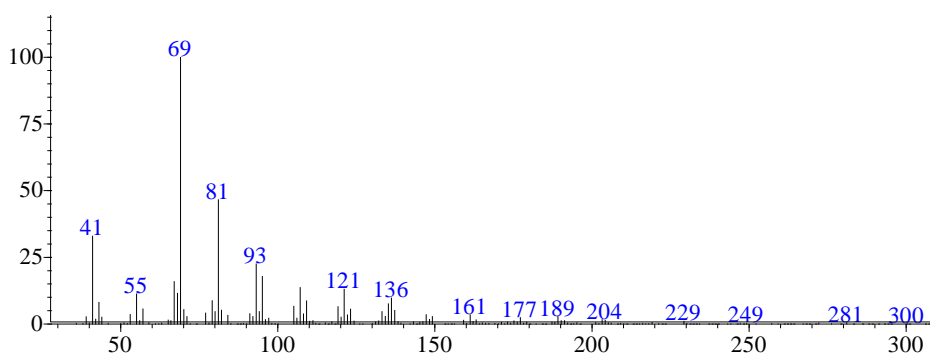
**Figura 30** Espectro de massa do neofitadieno.



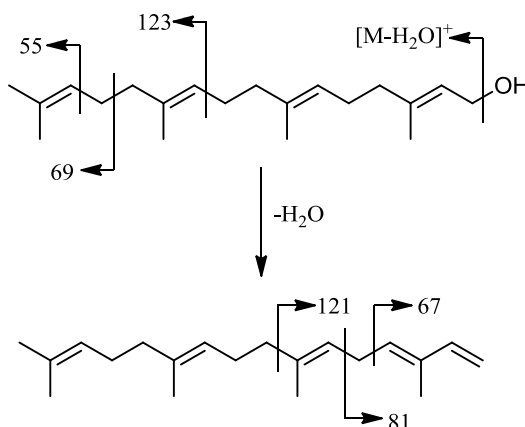
**Figura 31** Identificação dos principais fragmentos do espectro de massa do neofitadieno.

O trans-geranilgeraniol também foi identificado através da base de dados do equipamento. O espectro de massa correspondente a este diterpeno e a identificação dos principais fragmentos encontram-se ilustrados na Figura 32 e 33, respetivamente.

De acordo com a Figura 32, os fragmentos principais correspondem aos iões a  $m/z$  69, 81, 93, 107 e 121. No que diz respeito ao ião a  $m/z$  69, este corresponde ao fragmento  $[C_5H_9]^+$  (Figura 34). Quanto aos iões a  $m/z$  81 e 121, estes correspondem a fragmentos que resultam da libertação de uma molécula de água,  $[C_6H_9]^+$  e  $[C_{11}H_{19}]^+$ , respetivamente (Figura 33). Ainda é possível realçar a presença de um ião a  $m/z$  272 com uma abundância relativa baixa (0.5%), resultante da perda de uma molécula de água ( $[M-H_2O]^+$ ), devido a presença de um grupo hidroxilo em C1. Por fim, ainda é possível dar destaque ao ião a  $m/z$  290, correspondente ao ião  $[M]^+$ , embora também com uma abundância relativa baixa,  $<0.5\%$ .



**Figura 32** Espectro de massa do trans-geranilgeraniol.



**Figura 33** Identificação dos principais fragmentos do trans-geranilgeraniol.

## 6.2. Extração dos compostos polares

De forma a extrair compostos polares, foram realizadas diversas extrações sólido-líquido, baseadas na literatura, variando a temperatura, solventes ou mistura de solventes, tempo de extração e presença ou ausência de agentes estabilizadores (19,91,95,116). Após serem efetuadas as diversas extrações, selecionaram-se dois métodos de extração com melhores resultados para extrair a fração polar, sendo a extração acetona:H<sub>2</sub>O (70:30 – V/V) com 0.3% de ácido ascórbico, durante uma hora a temperatura ambiente e a extração MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (30:69:1 – V/V/V) com 0.2% de ácido ascórbico, durante 50 minutos a 70°C (19,91). Nestas duas extrações os agentes estabilizadores são o ácido ascórbico e o ácido acético, sendo que o ácido acético é estabilizador para os florotaninos e o ácido acético para as protocianidinas e as catequinas (19,91).

### 6.2.1. Rendimento global das extrações dos compostos polares

Os rendimentos de extração das macroalgas em estudo, *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*, obtidos com acetona:H<sub>2</sub>O e MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH encontram-se descritos na Tabela 11.

A extração acetona:H<sub>2</sub>O foi realizada após a remoção da fração solúvel em diclorometano, enquanto a extração MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH foi realizada sem qualquer extração prévia. Relativamente à primeira extração, em que a mistura de solventes usada foi acetona:H<sub>2</sub>O (70:30), os rendimentos obtidos para as diferentes algas variaram entre 46.04-85.33%, enquanto para a segunda extração, com MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH, os valores variaram entre 56.68-64.25%. A extração MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH apresentou um rendimento de extração mais elevado, exceto no caso da *B. bifurcata*, que apresentou um rendimento mais elevado na extração acetona:H<sub>2</sub>O (85.33%). A espécie que apresentou o rendimento mais elevado em ambas as extrações foi a *B. bifurcata*. É importante referir que o facto dos rendimentos de extração serem tão elevados poderá dever-se à extração simultânea de polissacarídeos, uma vez que estes são solúveis em água. Embora os valores de rendimento de extração sejam elevados, estes encontram-se abaixo dos referidos na literatura para ambas as metodologias (acetona:H<sub>2</sub>O – 93.5-95%; MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH – 94.9%) (19,117).

**Tabela 11** Rendimento das extrações com acetona:H<sub>2</sub>O e MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH das algas castanhas *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*.

Espécie	Rendimento (%)	
	Acetona:H <sub>2</sub> O (70:30)	MeOH:H <sub>2</sub> O:AcOH (30:69:1)
<i>B. bifurcata</i>	85.33	64.25
<i>C. tamariscifolia</i>	46.04	57.29
<i>S. muticum</i>	55.83	56.68

### 6.2.2. Quantificação do teor de fenóis (TPC) e de florotaninos (TFT) totais

A quantificação do teor de fenóis e de florotaninos totais encontra-se apresentada na Tabela 12. Os extratos em acetona:H<sub>2</sub>O apresentaram um TPC mais elevado, com valores entre 204.62 (*S. muticum*) e 148.16 g de equivalentes de floroglucinol (EFG)/kg peso seco (*C. tamariscifolia*). No que diz respeito ao extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH, esta apresentou um TPC com valores entre 162.34 (*B. bifurcata*) e 96.21 g de equivalentes de floroglucinol (EFG)/kg peso seco (*S. muticum*). Os extratos estudados apresentaram TPC significativamente superiores aos reportados na literatura (0.2-3.2 g EFG/kg peso seco), para diversas espécies de macroalgas castanhas, seguindo as mesmas metodologias de extração (15,87). Este facto pode dever-se à presença de outros compostos, para além dos compostos fenólicos na amostra. Com efeito, o reagente de Folin-Ciocalteu pode sofrer interferências de outras substâncias redutoras presentes na amostra, tal como os polissacarídeos, aumentando assim os valores obtidos (118). Ao contrário do teor de fenóis totais, os extratos em MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH apresentaram valores mais elevados de TFT, obtendo valores entre 2.917 (*B. bifurcata*) e 0.126 g de equivalentes de floroglucinol (EFG)/kg peso seco (*S. muticum*). No que diz respeito ao extrato em acetona:H<sub>2</sub>O, este apresentou um TFT com valores entre 2.833 (*B. bifurcata*) e 0.018 g de equivalentes de floroglucinol (EFG)/kg peso seco (*C. tamariscifolia*).

Comparativamente ao que já foi descrito na literatura em diferentes macroalgas, os extratos da *B. bifurcata* apresentaram um TFT significativamente superior em ambas as extrações (0.03-0.82 g EFG/kg peso seco), no que diz respeito às espécies *C. tamariscifolia* e *S. muticum*, que apresentaram valores de TFT semelhantes, para ambas as extrações (40).

**Tabela 12** Teores de fenóis totais e florotaninos dos extratos em acetona:H<sub>2</sub>O e em MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH das espécies *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*.

		Teor de Fenóis Totais (TPC)				Teor Florotaninos Totais (TFT)	
		g EAG/g de extrato	g EAG/kg de peso seco	g EFG/g de extrato	g EFG/kg de peso seco	g EFG/g de extrato	g EFG/kg de peso seco
Acetona: H <sub>2</sub> O	<i>B. bifurcata</i>	0.31	267.73	0.21	182.01	$3.32 \times 10^{-3}$	2.833
	<i>C. tamariscifolia</i>	0.46	211.52	0.32	148.16	$0.04 \times 10^{-3}$	0.018
	<i>S. muticum</i>	0.52	293.05	0.37	204.62	$0.12 \times 10^{-3}$	0.067
MeOH: H <sub>2</sub> O: AcOH	<i>B. bifurcata</i>	0.27	170.45	0.25	162.34	$4.54 \times 10^{-3}$	2.917
	<i>C. tamariscifolia</i>	0.20	114.57	0.18	100.77	$0.81 \times 10^{-3}$	0.464
	<i>S. muticum</i>	0.21	113.74	0.18	96.21	$0.23 \times 10^{-3}$	0.126

### 6.2.3. Atividade antioxidante

Os antioxidantes naturais têm sido encarados como uma boa alternativa aos antioxidantes sintéticos. Os compostos naturais podem substituir aditivos sintéticos tais como o BHA e BHT (92).

Os valores de atividade antioxidante dos extratos obtidos, expressos em termos de quantidade de extrato necessário para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH (IC<sub>50</sub>), encontram-se apresentados na Tabela 13. As atividades antioxidantes foram ainda expressas em mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/g de peso seco de alga e em mg de equivalentes de BHT (EBHT)/g de peso seco de alga. Os valores de IC<sub>50</sub> para o ácido ascórbico e BHT encontram-se descritos na Tabela 13 para fins comparativos.

Os extratos em acetona:H<sub>2</sub>O revelaram uma atividade antioxidante mais elevada do que o BHT e inferior ao ácido ascórbico. Os valores de IC<sub>50</sub> da *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum* foram, respetivamente, 7.78, 7.62 e 8.68 µg/mL. Os extratos em MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH apresentaram uma atividade antioxidante inferior aos extratos em acetona:H<sub>2</sub>O (tal se pode dever a seletividade dos solventes utilizados nas extrações), para além disso, este último revelou também atividade antioxidante inferior aos antioxidantes comerciais BHT e ácido ascórbico. Nestes últimos extratos, os valores de IC<sub>50</sub> da *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum* foram, respetivamente, 17.04, 11.41 e 13.43 µg/mL. Apesar de os valores de atividade antioxidante dos extratos obtidos serem relativamente diferentes, estes apresentaram atividade antioxidante mais elevada do que a que se encontra relatada na literatura para diferentes espécies de macroalgas castanhas (0.07 – 0.48 mg EAA/mg extrato) (30,87).

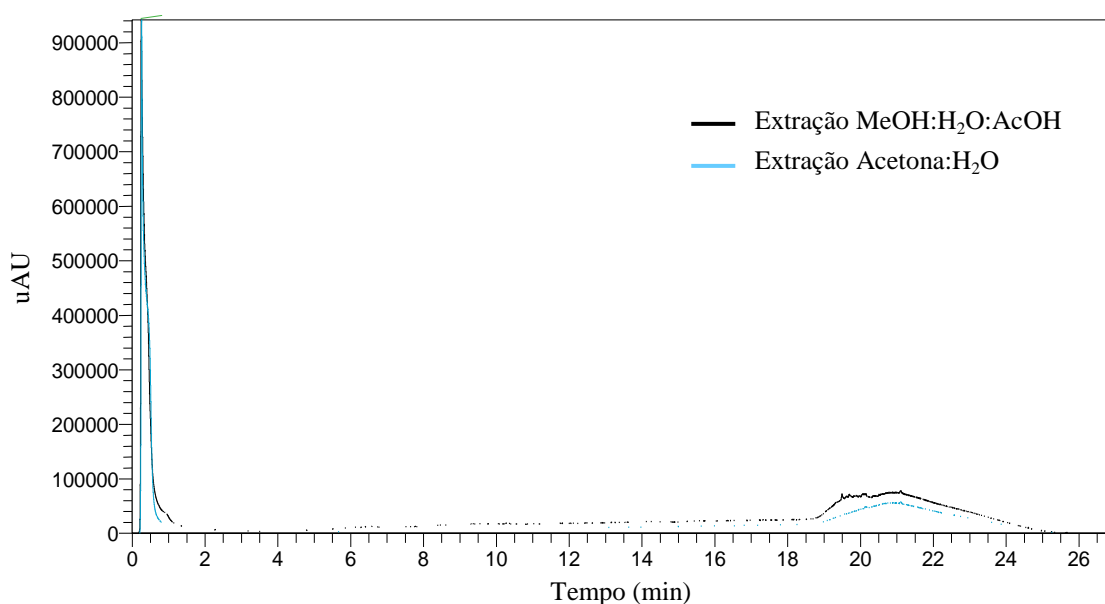


**Tabela 13** Atividade antioxidante dos extratos em acetona:H<sub>2</sub>O e em mMeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH das algas castanhas *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum*.

		<b>Atividade antioxidante</b>				
		IC <sub>50</sub> (µg/mL)	mg EAA/mg de extrato	mg EAA/g de peso seco	mg EBHT/mg de extrato	mg EBHT/g de peso seco
Ácido ascórbico		5.34±0.20				
BHT		9.34±0.53				
Acetona: H <sub>2</sub> O	<i>B. bifurcata</i>	7.78±0.27	0.69	585.35	1.20	1024.35
	<i>C. tamariscifolia</i>	7.62±0.26	0.70	322.66	1.23	564.64
	<i>S. muticum</i>	8.68±0.46	0.61	343.33	1.08	600.82
MeOH: H <sub>2</sub> O: AcOH	<i>B. bifurcata</i>	17.04±0.46	0.31	201.32	0.55	352.31
	<i>C. tamariscifolia</i>	11.41±0.44	0.47	268.06	0.82	469.09
	<i>S. muticum</i>	13.43±0.30	0.40	217.46	0.70	380.55

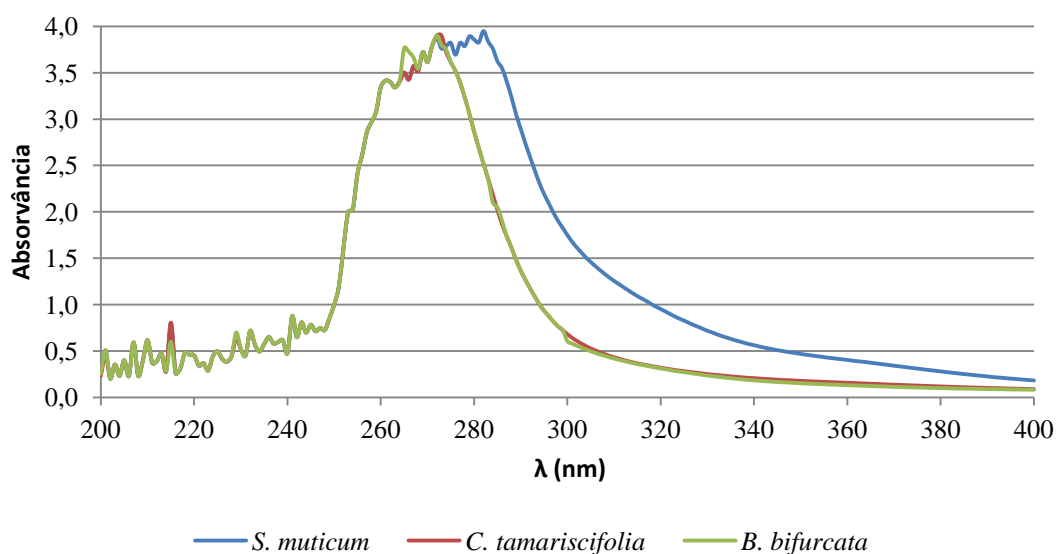
#### 6.2.4. Identificação dos componentes dos extratos polares

Após a realização de diversas metodologias, os cromatogramas de HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> dos extratos em acetona:H<sub>2</sub>O e MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH das macroalgas em estudo não permitiram a detecção de nenhum composto fenólico, tal como ilustra a Figura 34. Os picos detetados devem-se aos solventes utilizados na extração e preparação da amostra sendo que os picos finais correspondem a contaminantes. Estes resultados não se encontram de acordo com os valores de TPC e TFT, nem com a atividade antioxidante observada.



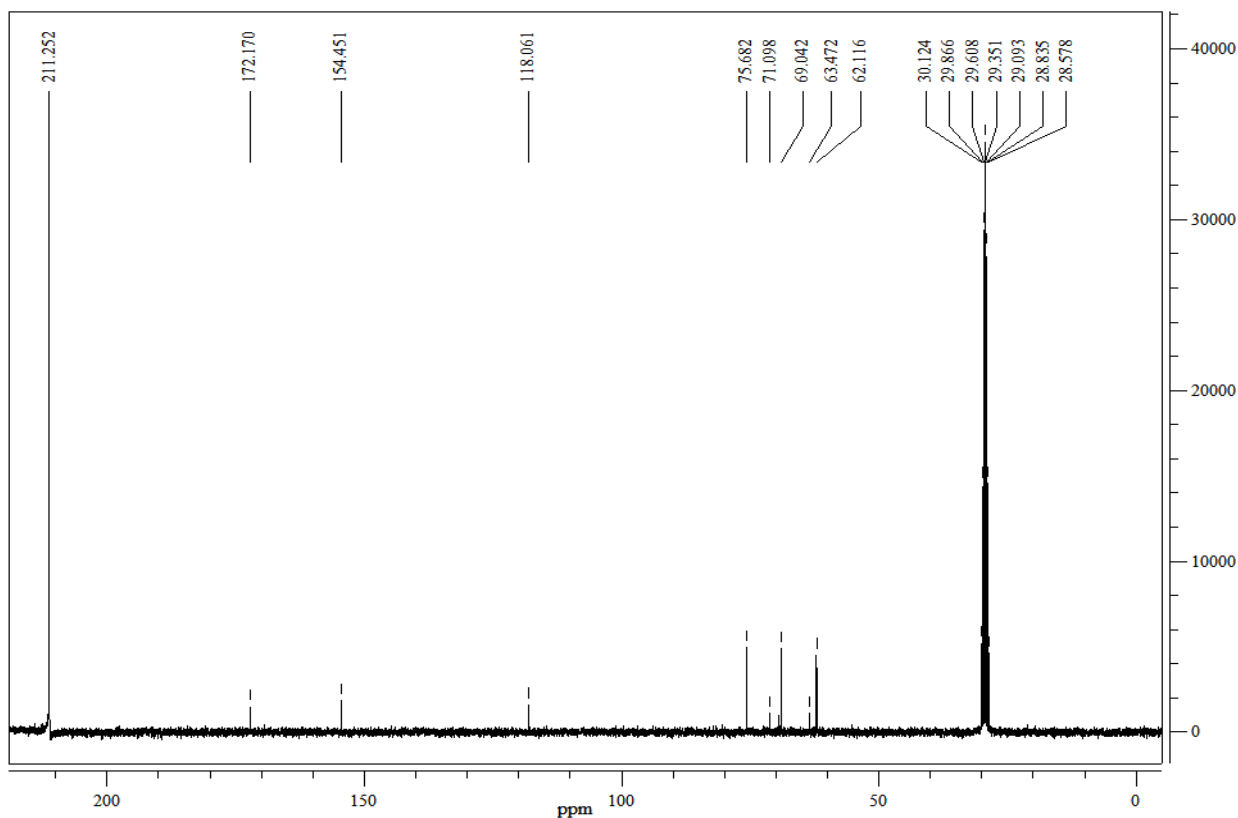
**Figura 34** Cromatograma de HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> a 280 nm do extrato em acetona:H<sub>2</sub>O e MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH da *S. muticum*.

De forma a esclarecer esta discordância, recorreu-se à espectrometria UV-Vis e à análise por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos extratos em acetona:H<sub>2</sub>O e em MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH. No espectro de UV-Vis do extrato da extração acetona:H<sub>2</sub>O das macroalgas castanhas em estudo (Figura 35) é possível observar um máximo de absorvância a 260-280 nm, compatível com a presença de compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos, catequinas e florotaninos (119–121), cuja presença não é no entanto detetada na análise por HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>.



**Figura 35** Espectros UV-Vis dos extratos obtidos à partir da extração acetona:H<sub>2</sub>O das macroalgas *S. muticum*, *C. tamariscifolia* e *B. bifurcata*.

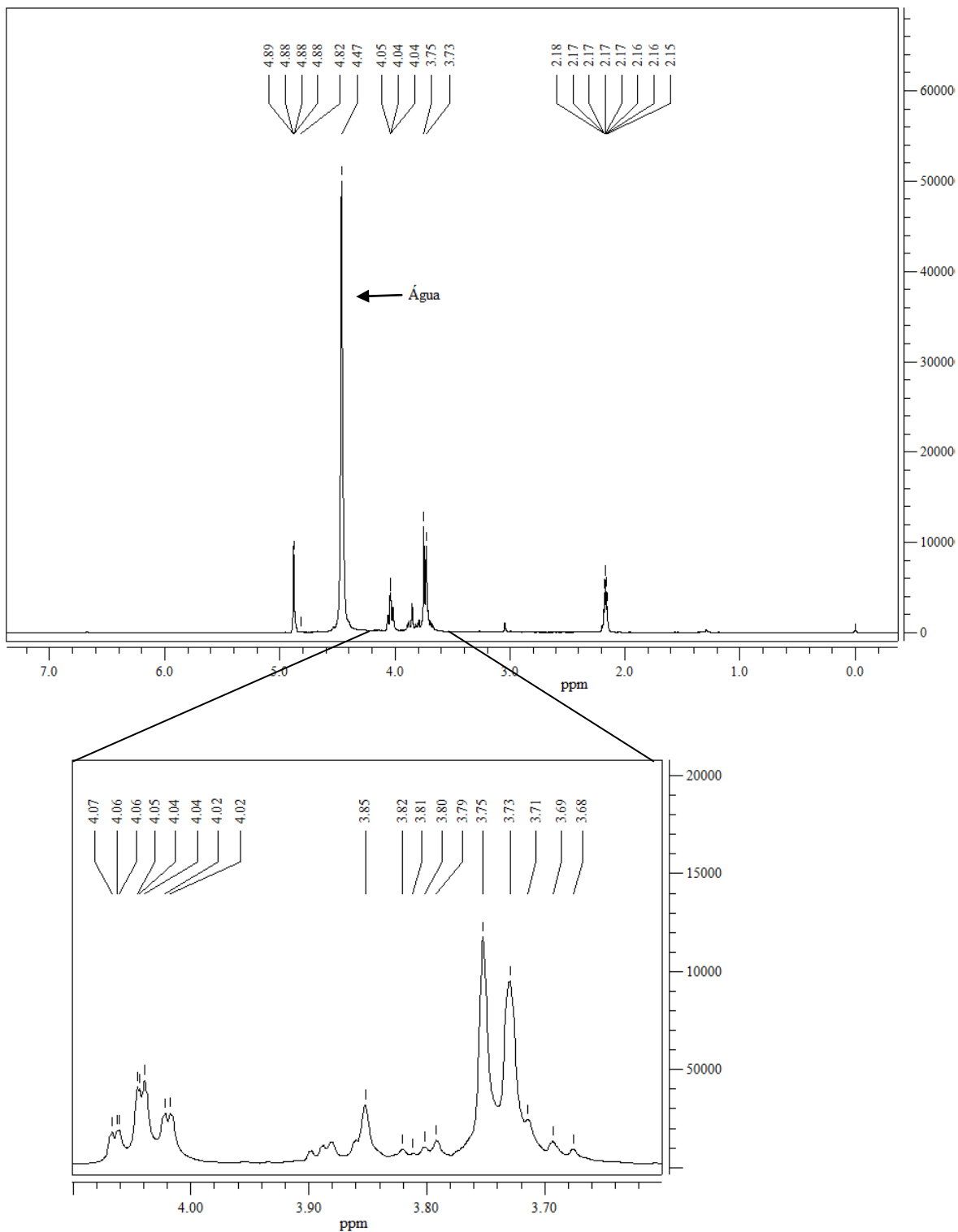
De forma a obter informação mais detalhada sobre a composição química das frações polares obtidas, foram efetuadas análise de RMN de <sup>13</sup>C e de <sup>1</sup>H dos extratos em acetona:H<sub>2</sub>O da macroalga *B. bifurcata* (Figura 36 e 37, respetivamente). Na Figura 36 é possível observar cinco ressonâncias de <sup>13</sup>C com valores de 62.1 a 75.7 ppm, correspondentes a carbonos ligados a grupos –OH. Estas ressonâncias podem ser atribuídas a polissacarídeos, no entanto, não se observam ressonâncias representativas do carbono anomérico (α-C1 e β-C1) das formas cíclicas de açúcares (ressonâncias por volta dos 100 ppm) (122). O espetro de RMN de <sup>13</sup>C não apresenta desvios químicos característicos dos compostos fenólicos (vários sinais entre aproximadamente 65 a 160 ppm) (123–125).



**Figura 36** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato em acetona:H<sub>2</sub>O da *B. bifurcata*.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível detectar sinais na zona dos prótons alifáticos entre 3.68 e 4.07 ppm, no entanto é possível verificar a ausência de sinais para os carbonos anoméricos, uma vez que não se observam sinais entre 4.5 e 5.5 ppm, representativos dos  $\beta\text{-H}$  e  $\alpha\text{-H}$  (Figura 37) (126,127). Para além disso, não se observaram ressonâncias características de prótons aromáticos, apresentando um espectro com ausência de sinais característicos (67,123,124). Assim, não foi possível, por RMN, confirmar a presença de compostos fenólicos.

Assim sendo, embora os espectros de UV-Vis dos extratos obtidos confirmem a presença de compostos fenólicos, esta não foi confirmada por HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> e RMN.



**Figura 37** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato em acetona: $\text{H}_2\text{O}$  da *B. bifurcata*.

## 7. Conclusões e trabalhos futuros

Neste trabalho foi estudada por GC-MS a composição química dos extratos lipofílicos da macroalgas *B. bifurcata*, *C. tamariscifolia* e *S. muticum* colhidas na costa Portuguesa. Nos extratos da *C. tamariscifolia* e *S. muticum* foi possível identificar 44 compostos, destacando-se os ácidos gordos (saturados e insaturados) e os esteróis. O ácido hexadecanóico foi o ácido gordo mais abundante detetado em todos os extratos, seguido pelo ácido tetradecanóico. No que diz respeito aos esteróis, é possível destacar a predominância do fucosterol, seguida do desmosterol. De um ponto de vista geral, estas duas macroalgas possuem uma composição química muito semelhante. No caso do extrato da *B. bifurcata* foi possível identificar 33 compostos, destacando-se os diterpenos e os ácidos gordos (saturados e insaturados). Os derivados de fitol foram os diterpenos mais abundantes detetados no extrato. No que diz respeito aos ácidos gordos, foi possível detetar a abundância de ácido hexadecanóico, seguido do ácido tetradecanóico (tal como as outras duas espécies de macroalgas em estudo).

Para além dos extratos lipofílicos, também foram estudados os extratos polares, obtidos por extração com acetona:H<sub>2</sub>O e com MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH. A análise dos extratos pelos métodos de Folin-Ciocalteu, do DMBA e do DPPH revelaram teores de fenóis totais e de florotaninos, assim como atividades antioxidantes relevantes. Estas propriedades mostram o efeito benéfico para a saúde ao incluir estas macroalgas como parte da dieta.

Embora os espectros de UV-Vis dos extratos obtidos apresentassem bandas de absorção compatíveis com a presença de compostos fenólicos, a análise destes por HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> e por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C não permitiu confirmar a presença destes componentes. Sendo assim, de forma de confirmar a presença destes compostos nos extratos das macroalgas em estudo, será necessário numa etapa seguinte realizar alguns ensaios com compostos modelo de forma a compreender o seu comportamento nas condições usadas. Propõe-se também como trabalho futuro otimizar as condições de fracionamento e/ou purificação da fração fenólica presente nos extratos polares.

## 8. Referências bibliográficas

1. Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, Abreu MH, Rocha SM, Silvestre AJD. Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food Chem.* 2015;183:122–8.
2. Lopes G, Sousa C, Bernardo J, Andrade PB, Valentão P, Ferreres F, Mouga T. Sterol Profiles in 18 Macroalgae of the Portuguese Coast. *J Phycol.* 2011;47:1210–8.
3. Araújo R, Bárbara I, Tibaldo M, Berecibar E, Tapia PD, Pereira R, Santos R, Pinto IS. Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Bot Mar.* 2008;52:24–46.
4. Dellasala DA. Oceans and Global Change: One Blue Planet. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. 2013:1–3.
5. Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends Food Sci Technol.* 2008;19:31–9.
6. Pangestuti R, Kim S. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J Funct Foods.* 2011;3:255–66.
7. Direção Geral de política do Mar. Estratégia Nacional Para o Mar 2013-2020 [Internet]. Available from: <http://www.dgpm.mam.gov.pt/Pages/default.aspx> (3 de Maio de 2016)
8. Cadoret J-P, Garnier M, Saint-Jean B. Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology. *Adv Bot Res.* 2012;64:285–341.
9. Richmond A. Handbook of Marine Macroalgae. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2004.
10. Martínez B, Arenas F, Trilla A, Viejo RM, Carreño F. Combining physiological threshold knowledge to species distribution models is key to improving forecasts of the future niche for macroalgae. *Glob Chang Biol.* 2014;21:1422–33.
11. Pereira L. As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. Universidade de Coimbra; 2008.
12. Pereira L. A Review of the Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds - Chapter 2. In: Pomin VH, editor. “Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses.” Coimbra: Nova Science Publishers Inc.; 2011. p. 15–47.
13. Dewick PM. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 Ed. Jonh Wiley & Sons, Lda, Chichester, UK; 2002.
14. Dias D, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* 2012;2:303–36.
15. Jiménez-Escrig A, Gómez-Ordóñez E, Rupérez P. Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. *J Appl Phycol.* 2012;24:1123–32.
16. Horta A, Pinteus S, Alves C, Fino N, Silva J, Fernandez S, Rodrigues A, Pedrosa R. Antioxidant and antimicrobial potential of the *Bifurcaria bifurcata* epiphytic bacteria. *Mar Drugs.* 2014;12:1676–89.
17. Domínguez H. Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. Domínguez H, editor. Oxford, UK. Woodhead Publishing Limited. 2013.

18. El-Said GF, El-Sikaily A. Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt. *Environ Monit Assess.* 2013;185:6089–99.
19. Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, Lage-Yusty M a., López-Hernández J. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chem.* 2010;121:634–8.
20. Miyashita K, Mikami N, Hosokawa M. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *J Funct Foods.* 2013;5:1507–17.
21. Schmidt A, Wächtler B, Temp U, Krekling T, Séguin A, Gershenzon J. A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies*. *Plant Physiol.* 2010;152:639–55.
22. Cheng A, Wang L, Sun Y, Lou H. Identification and expression analysis of key enzymes of the terpenoids biosynthesis pathway of a liverwort *Plagiochasma appendiculatum* by EST analysis. *Acta Physiol Plant.* 2013;35:107–18.
23. Dhar MK, Koul A, Kaul S. Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. *N Biotechnol.* 2013;30:114–23.
24. Lopes GLL. Seaweeds from the portuguese coast: chemistry, antimicrobial and anti-inflammatory capacity. Universidade do Porto; 2014.
25. Le Lann K, Rumin J, Cérantola S, Culioli G, Stiger-Pouvreau V. Spatiotemporal variations of diterpene production in the brown macroalga *Bifurcaria bifurcata* from the western coasts of Brittany (France). *J Appl Phycol.* 2014;26:1207–14.
26. Manzo E, Ciavatta ML, Bakkas S, Villani G, Varcamonti M, Zanfardino A, Gavagnin M. Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. *Phytochem Lett.* 2009;2:211–5.
27. Pal A, Kamthania MC, Kumar A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds—A Review. *OALib.* 2014;01:1–17.
28. Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E. Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2007;146:60–78.
29. Pereira L. Guia Ilustrado das Macroalgas: conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa. Imprensa da Universidade de Coimbra; 2009.
30. Balboa EM, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem.* 2013;138:1764–85.
31. Abdala-Díaz RT, Cabello-Pasini A, Pérez-Rodríguez E, Álvarez RMC, Figueroa FL. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar Biol.* 2006;148:459–65.
32. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev.* 1998;56:317–33.
33. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006;99:191–203.



34. Herrmann KM. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell*. 1995;7:907–19.
35. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jime L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727–47.
36. Onofrejevová L, Vasícková J, Klejdus B, Stratil P, Misurcová L, Krácmar S, Kopecky S, Vacek J. Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;51:464–70.
37. Santos SAO. Compostos fenólicos a partir de subprodutos da indústria florestal. Universidade de Aveiro; 2012.
38. Khanbabaee K, Ree T Van. Tannins : Classification and Definition. *R Soc Chem*. 2001;641–9.
39. Lee S-H, Jeon Y-J. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia*. 2013;86:129–36.
40. Lopes G, Sousa C, Silva LR, Pinto E, Andrade PB, Bernardo J, Mouga T, Valentão P. Can phlorotannins purified extracts constitute a novel pharmacological alternative for microbial infections with associated inflammatory conditions? *PLoS One*. 2012;7.
41. Ferreres F, Lopes G, Gil-Izquierdo A, Andrade PB, Sousa C, Mouga T, Valentão P. Phlorotannin extracts from fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. *Mar Drugs*. 2012;10:2766–81.
42. Andrade PB, Barbosa M, Matos RP, Lopes G, Vinholes J, Mouga T, Valentão P. Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chem*. 2013;138:1819–28.
43. Koivikko R. Brown algal phlorotannins. University of Turku, Finland; 2008.
44. Achkar J, Xian M, Zhao H, Frost JW. Biosynthesis of Phloroglucinol. *JACS Communications*. 2005;21:5332–3.
45. Guiry, M.D., Guiry MG. *algaebase* [Internet]. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2015. Available from: <http://www.algaebase.org> (27 de Abril de 2016)
46. Muñoz J, Culioli G, Köck M. Linear diterpenes from the marine brown alga *Bifurcaria bifurcata*: a chemical perspective. *Phytochem Rev*. 2012;12:407–24.
47. Göthel Q, Muñoz J, Köck M. Formyleleganolone and bibifuran, two metabolites from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochem Lett*. 2012;5:693–5.
48. Valls R, Piovetti L, Banaigs B, Archavlis A, Pellegrini M. (S)-13-hydroxygeranylgeraniol-derived furanoditerpenes from *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*. 1995;39:145–9.
49. Ortalo-Magné A, Culioli G, Valls R, Pucci B, Piovetti L. Polar acyclic diterpenoids from *Bifurcaria bifurcata* (Fucales, Phaeophyta). *Phytochemistry*. 2005;66:2316–23.
50. Culioli G, Daoudi M, Mesguiche V, Valls R, Piovetti L. Geranylgeraniol-derived diterpenoids from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*. 1999;52:1447–54.

51. Daoudi M, Ortalo-magne A, Valls R, Piovetti L. ( S ) -12-Hydroxygeranylgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*. 2001;57:529–35.
52. Le Lann K, Jégou C, Stiger-Pouvreau V. Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycol Res*. 2008;56:238–45.
53. Hardouin K, Burlot A-S, Umami A, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V, Widowati I, Bedous G, Bourgougnon N. Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *J Appl Phycol*. 2014;26:1029–42.
54. Vaz-Pinto F, Martínez B, Olabarria C, Arenas F. Neighbourhood competition in coexisting species: The native *Cystoseira humilis* vs the invasive *Sargassum muticum*. *J Exp Mar Bio Ecol*. 2014;454:32–41.
55. Yang E-J, Ham YM, Lee WJ, Lee NH, Hyun C-G. Anti-inflammatory effects of apo-9'-fucoxanthinone from the brown alga, *Sargassum muticum*. *Daru*. 2013;21:62.
56. Cacabelos E, Olabarria C, Viejo RM, Rubal M, Veiga P, Incera M, Gestoso I, Vaz-Pinto F, Mejia A, Engelen AH, Arenas F. Invasion of *Sargassum muticum* in intertidal rockpools: patterns along the Atlantic Iberian Peninsula. *Mar Environ Res*. 2013;90:18–26.
57. Sabour B, Reani A, EL Magouri H, Haroun R. *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Fucales, Phaeophyta) in Morocco, an invasive marine species new to the Atlantic coast of Africa. *Aquat Invasions*. 2013;8:97–102.
58. Plouguerné E, Ioannou E, Georgantea P, Vagias C, Roussis V, Hellio C, Kraffe E, Stiger-Pouvreau V. Anti-microfouling Activity of Lipidic Metabolites from the Invasive Brown Alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Mar Biotechnol*. 2010;12:52–61.
59. Conde E, Moure A, Domínguez H. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*. *J Appl Phycol*. 2014;27:957–64.
60. Rodrigues D, Freitas AC, Pereira L, Rocha-Santos T a P, Vasconcelos MW, Roriz M, Rodríguez-Alcalá LM, Gomes AMP, Duarte AC. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chem*. 2015;183:197–207.
61. Sánchez-Camargo ADP, Montero L, Stiger-Pouvreau V, Tanniou A, Cifuentes A, Herrero M, Ibáñez E. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chem*. 2016;192:67–74.
62. Balboa EM, Moure A, Domínguez H. Valorization of *Sargassum muticum* Biomass According to the Biorefinery Concept. *Mar Drugs*. 2015;13:3745–60.
63. Rodrigues D, Sousa S, Silva A, Amorim M, Pereira L, Rocha-Santos TAP, Gomes AMP, Duarte AC, Freitas AC. Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *J Agric Food Chem*. 2015;63:3177–88.
64. Tanniou A, Vandanjon L, Incera M, Serrano Leon E, Husa V, Le Grand J, Nicolas JL, Poupart N, Kervarec N, Engelen A, Walsh R, Guerard F, Bourgougnon N, Stiger-Puvreau V. Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *J Appl Phycol*. 2013;1215–30.

65. Figueroa FL, Domínguez-González B, Korbee N. Vulnerability and acclimation to increased UVB radiation in three intertidal macroalgae of different morpho-functional groups. *Mar Environ Res.* 2014;97:30–8.
66. Celis-Plá PSM, Bouzon ZL, Hall-Spencer JM, Schmidt EC, Korbee N, Figueroa FL. Seasonal biochemical and photophysiological responses in the intertidal macroalga *Cystoseira tamariscifolia* (Ochrophyta). *Mar Environ Res.* 2015;1–9.
67. Jégou C, Kervarec N, Cérantola S, Bihannic I, Stiger-Pouvreau V. NMR use to quantify phlorotannins: the case of *Cystoseira tamariscifolia*, a phloroglucinol-producing brown macroalga in Brittany (France). *Talanta.* 2015;135:1–6.
68. Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J Agric Food Chem.* 2013;61:4667–75.
69. Starmans IDAJ, Nijhuis HH. Extraction of secondary metabolites from plant material : A review. *Trends in Food Science & Technology.* 1996;71:191–7.
70. Ramluckan K, Moodley KG, Bux F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel.* 2014;116:103–8.
71. Luque de Castro M., Garcia-Ayuso L. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta.* 1998;369:1–10.
72. Vilela C, Santos SAO, Coelho D, Silva AMS, Freire CSR, Neto CP, Silvestre AJD. Screening of lipophilic and phenolic extractives from different morphological parts of *Halimione portulacoides*. *Ind Crops Prod.* 2014;52:373–9.
73. Ramos PAB, Guerra ÂR, Guerreiro O, Freire CSR, Silva AMS, Duarte MF, Silvestre AJD. Lipophilic extracts of *Cynara cardunculus* L. var. *atilis* (DC): a source of valuable bioactive terpenic compounds. *J Agric Food Chem.* 2013;61:8420–9.
74. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 2013;18:2328–75.
75. Billakanti JM, Catchpole OJ, Fenton TA, Mitchell KA, MacKenzie AD. Enzyme-assisted extraction of fucoxanthin and lipids containing polyunsaturated fatty acids from *Undaria pinnatifida* using dimethyl ether and ethanol. *Process Biochem.* 2013;48:1999–2008.
76. Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Avalo B, Cifuentes A, Reglero G, Garcia-Blairsy Reina G, Señoránz FJ, Ibáñez E. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Sci Technol.* 2012;46:245–53.
77. Mitra S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry.* Winefordner JD, editor. New Jersey, Canada: John Wiley & Sons, Inc, Hoboken; 2003.
78. Herrero M, Sánchez-Camargo ADP, Cifuentes A, Ibáñez E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC Trends Anal Chem.* 2015;71:26–38.
79. Heo S-J, Park E-J, Lee K-W, Jeon Y-J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol.* 2005;96:1613–23.

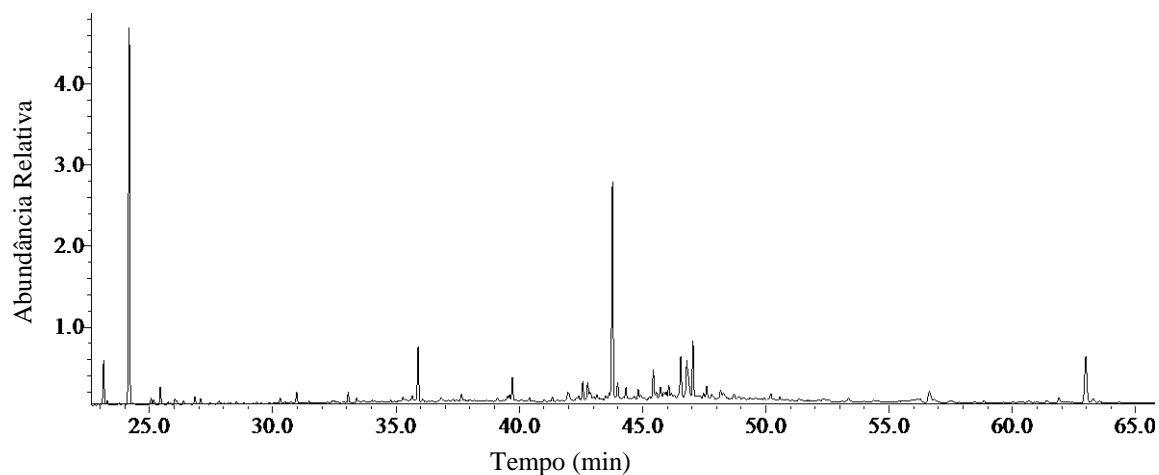
80. Park N-H, Choi J-S, Hwang S-Y, Kim Y-C, Hong Y-K, Cho K, Coi I. Antimicrobial activities of stearidonic and gamma-linolenic acids from the green seaweed *Enteromorpha linza* against several oral pathogenic bacteria. *Bot Stud.* 2013;54:39.
81. Lee YS, Shin KH, Kim B, Lee S. Anti-Diabetic Activities of Fucosterol from *Pelvetia siliquosa*. 2004;27:1120–2.
82. Abrantes JL, Barbosa J, Cavalcanti D, Pereira RC, Frederico Fontes CL, Teixeira VL, Moreno Souza TL, Paixão ICP. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota paffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. *Planta Med.* 2010;76:339–44.
83. Trincherro J, Ponce NMA, Córdoba OL, Flores ML, Pampuro S, Stortz CA, Salomón H, Turk G. Antiretroviral Activity of Fucoidans Extracted from the Brown Seaweed *Adenocystis utricularis*. 2009;23:707–12.
84. Yang C, Chung D, Shin I-S, Lee H, Kim J, Lee Y, You S. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Int J Biol Macromol.* 2008;43:433–7.
85. Kim K-H, Kim Y-W, Kim HB, Lee BJ, Lee DS. Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Biotechnol Lett.* 2006;28:439–46.
86. Thomas NV, Kim S-K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2011;32:325–35.
87. Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Lann K Le, Stiger-Pouvreau V, Fauchon M, Deslandes E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem.* 2009;116:693–701.
88. Alves CQ, Davis JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim Nova.* 2010;33:2202–10.
89. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28:25–30.
90. Sánchez-Moreno, Larrauri A, Saura-calixto F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J Sci Food Agric.* 1998;76:270–6.
91. Koivikko R, Loponen J, Pihlaja K, Jormalainen V. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Phytochem Anal.* 2007;18:326–32.
92. Touati R, Santos SAO, Rocha SM, Belhamel K, Silvestre AJD. The potential of cork from *Quercus suber* L. grown in Algeria as a source of bioactive lipophilic and phenolic compounds. *Ind Crops Prod.* 2015;76:936–45.
93. Kumari P, Kumar M, Gupta V, Reddy CRK, Jha B. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chem.* 2010;120:749–57.
94. Oliveira ALP. Extração e Caracterização de Constituintes da Bananeira “Dwarf Cavendish”. Universidade de Aveiro. 2007.
95. Machu L, Misurcova L, Ambrozova JV, Orsavova J, Mlcek J, Sochor J, Jurikova T. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules.* 2015;20:1118–33.

96. Murphy RC. Mass spectrometry of lipids, in Handbook of lipid research, Vol 7. F. (Ed.). Plenum Press, New York; 1993.
97. Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 2004;85:439–44.
98. Van Ginneken VJT, Helsper JPFG, de Visser W, van Keulen H, Brandenburg WA. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from North Atlantic and tropical seas. *Lipids Health Dis.* 2011;10:104.
99. Li X, Fan X, Han L, Lou Q. Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry.* 2002;59:157–61.
100. Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.* 2007;103:891–9.
101. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1991;438–63.
102. Simopoulos A. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002;56:365–79
103. AOCS Lipid Library - Part 2. Derivatives Other than Nicotines. Available from: <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39523> (23 de Abril de 2016)
104. Watson JT, Sparkman OD. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation.* East Lansing, Michigan; 2008.
105. Kitson FG, Larsen BS, McEwen CN. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A practical Guide.* San Diego, USA: Academic Press Inc.; 1996; 447–50.
106. Diekman J, Djarassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl esters. *J Org Chem Am Chemistry Soc.* 1967;32:1005–12.
107. Gustaffon JA, Ryhage R, Sjovall J, Moriarty RM. Migrations of the trimethylsilyl group upon electron impact in steroids. *J Am Chem Soc.* 1969;91:1234–6.
108. Brooks CJW. Some Aspects of Mass Spectrometry in Research on Steroids. *Philos Trans R Soc London A.* 1979;293:53–67.
109. Easa HSaL, Kornprobot JM, Rizk AM. Major sterol composition of some algae from Qatar. 1995;39:373–4.
110. Hoang M-H, Jia Y, Jun H, Lee JH, Lee BY, Lee S-J. Fucosterol is a selective liver X receptor modulator that regulates the expression of key genes in cholesterol homeostasis in macrophages, hepatocytes, and intestinal cells. *J Agric Food Chem.* 2012;60:11567–75.
111. Lee S, Lee YS, Jung SH, Kang SS, Shin KH. Anti-Oxidant Activities of Fucosterol from the Marine Algae *Pelvetia siliquosa*. *Arch Pharm Res.* 2003;26:719–22.
112. Jung HA, Jin SE, Ahn BR, Lee CM, Choi JS. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2013;59:199–206.

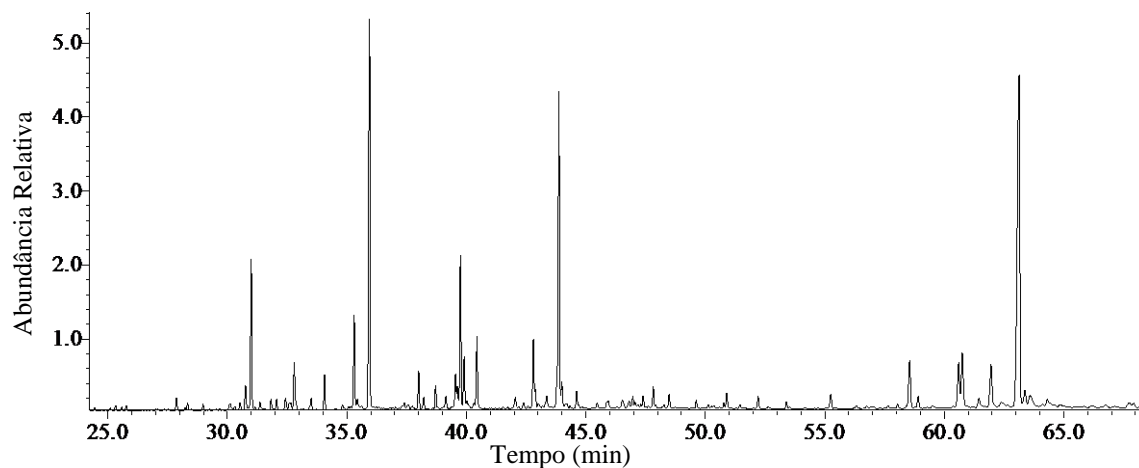
113. Hwang E, Park S-Y, Sun Z, Shin H-S, Lee D-G, Yi TH. The protective effects of fucosterol against skin damage in UVB-irradiated human dermal fibroblasts. *Mar Biotechnol (NY)*. 2014;16:361–70.
114. Jang KH, Lee BH, Choi BW, Lee H, Shin J. Chromenes from the Brown Alga *Sargassum siliquastrum*. 2005;2:716–23.
115. Awad NE. Bioactive Brominated Diterpenes from the Marine Red Alga *Jania Rubens* ( L .) Lamx. 2004;279:275–9.
116. Yoshie Y, Wang W, Petillo D, Suzuki T. Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fisheries Science*. 2000;998–1000.
117. Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen V. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *J Chem Ecol*. 2005;31:195–212.
118. Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim Nov*. 2009;32:689–702.
119. Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huamán A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem*. 2009;113:1243–51.
120. Mitra SP. UV-Vis spectrophotometry plus HPLC to measure the level of catechin / poly – phenolics and to understand its oxidized conditions in commercially available green and black teas. 2014;53:1255–62.
121. Roleda MY, Clayton MN, Wiencke C. Screening capacity of UV-absorbing compounds in spores of Arctic Laminariales. *J Exp Mar Bio Ecol*. 2006;338:123–33.
122. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Zhang H, Niu X. Structural studies on a novel fucogalactan sulfate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol*. 2010;47:126–31.
123. Kumar NS, Rajapaksha M. Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 2005;1083:223–8.
124. Parys S, Kehraus S, Krick A, Glombitza K-W, Carmeli S, Klimo K, Gerhäuser C, König GM. In vitro chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by antioxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*. 2010;71:221–9.
125. Yotsu-Yamashita M, Kondo S, Segawa S, Lin Y-C, Toyohara H, Ito H, Konoki K, Cho Y, Uchida T. Isolation and structural determination of two novel phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* Okamura, and their radical scavenging activities. *Mar Drugs*. 2013;11:165–83.
126. Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. *Mar Drugs*. 2011;9:2605–21.
127. Rocha HAO, Moraes FA, Trindade ES, Franco CRC, Torquato RJS, Veiga SS, Valente AP, Mourão PAS, Leite EL, Nader HB, Dietrich CP. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? *J Biol Chem*. 2005;280:41278–88.

## 9. Anexos

Cromatogramas resultantes dos extratos em diclorometano das macroalgas da *B. bifurcata* (Figura 38) e da *C. tamariscifolia* (Figura 39).



**Figura 38** Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga *B. bifurcata*.



**Figura 39** Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga *C. tamariscifolia*.