



Universidade de Aveiro
2023

**Rodrigo Trindade
Fernandes Pedro**

**Obtenção de extratos ricos em compostos
antioxidantes e iodo a partir de macroalgas castanhas
para uso em produtos alimentares**



Universidade de Aveiro
2023

**Rodrigo Trindade
Fernandes Pedro**

Obtenção de extratos ricos em compostos antioxidantes e iodo a partir de macroalgas castanhas para uso em produtos alimentares

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Marta Gonçalves, Investigadora do Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra e do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e da Doutora Andreia Filipa Sousa Ferreira, Bolseira Pós-Doutoramento do LAVQ-REQUIMTE, Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professor Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
Professor associado com agregação, Universidade de Aveiro

vogais

Professora Doutora Teresa Margarida Lopes da Silva Mougá
Professora coordenadora, Instituto Politécnico de Leiria

Doutora Ana Marta dos Santos Mendes Gonçalves
Investigadora auxiliar, Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Agradeço às minhas orientadoras, Doutora Ana Marta Gonçalves e Doutora Andreia Ferreira, pela ajuda que me prestaram e pelo tempo e dedicação que investiram em mim.

Agradeço à Doutora Cláudia Nunes que também me acompanhou durante o trabalho e contribuiu com o seu conhecimento para desenvolver o trabalho.

Agradeço aos membros do grupo de investigação GlycoFoodChem que sempre mostraram total disponibilidade para me ajudar naquilo que fosse necessário.

Agradeço ao Doutor Pedro Pato e à Doutora Carla Patinha do Departamento Geociências pelo apoio prestado na análise de iodo.

Agradeço aos meus pais e irmão pela motivação e apoio.

Palavras-chave

Macroalgas castanhas, métodos de secagem, atividade antioxidante, polissacarídeos, iodo, Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo-ICP-MS

Resumo

Com o crescimento populacional a evoluir muito rapidamente, a nutrição adequada das pessoas é cada vez mais um desafio. Atualmente, estima-se que cerca de 2 mil milhões de pessoas sofrem de deficiência de iodo. Apesar de em muitas situações esta deficiência poder ser superada por adaptações da tiroide, em casos mais graves pode originar problemas mais severos, como bócio e posteriormente, hipotiroidismo. Em mulheres grávidas a deficiência de iodo pode ainda ter implicações mais severas, uma vez que este é fundamental durante o desenvolvimento do feto. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), deve ser ingerido pelo menos 150 µg de iodo por dia para um adulto e entre 200 – 250 µg para mulheres grávidas para satisfazer as necessidades humanas.

As macroalgas castanhas têm uma capacidade natural para concentrar elevadas quantidades de iodo, o qual funciona como antioxidante inorgânico ou como parte do mecanismo de defesa antibacteriano. Por esta razão, as macroalgas podem desempenhar um papel muito importante em mitigar o problema da deficiência de iodo na população, além de serem nutricionalmente ricas em polissacarídeos, proteína e compostos fenólicos.

Neste trabalho foram testadas várias extrações de forma a obter diferentes extratos ricos em compostos antioxidantes e em iodo. Numa fase inicial, foram feitas extrações aquosas e etanólicas às macroalgas castanhas *Undaria pinnatifida*, *Bifurcaria bifurcata* e *Fucus* sp., obtendo-se extratos ricos em compostos antioxidantes, nomeadamente a partir das macroalgas *Fucus* sp. e *B. bifurcata*. Para avaliar o efeito do método de secagem nos compostos antioxidantes e no iodo total, as macroalgas *Fucus* sp. e *B. bifurcata* foram secas com recurso a uma estufa com ventilação (50 °C) e por liofilização, com o intuito de perceber até que ponto a temperatura podia ser responsável pela volatilização do iodo. Pela análise total do iodo por espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo - ICP-MS, verificou-se que a macroalga *Fucus* sp. contém um valor superior de iodo total relativamente à macroalga *B. bifurcata*. Para além disso, foi possível verificar que a secagem das macroalgas em estufa ventilada permitiu obter biomassa com maior quantidade de iodo. Posteriormente, foram realizadas extrações aquosas com água destilada à temperatura ambiente e a 90 °C, verificando-se maior extratibilidade do iodo total com água quente.

Em relação à quantidade de polissacarídeos, a extração de *B. bifurcata* com água a 90 °C permitiu obter maior quantidade de açúcares (49,7 % m/m) relativamente à extração à temperatura ambiente (44,8 % m/m) e em relação a ambas as extrações efetuadas à macroalga *Fucus* sp. (entre 34,6 e 37,0 % m/m), sendo o alginato o polissacarídeo predominante. Por fim, os testes da atividade antioxidante mostraram que extratos de *Fucus* sp. obtidos com água quente apresentaram, em geral, maior capacidade antioxidante.

A partir destas observações foi possível concluir que a extração aquosa 90 °C de *Fucus* sp. previamente seca na estufa a 50 °C permitiu a obtenção do extrato mais rico em iodo (1104 mg/kg). A adição de 136 mg ou 226 mg deste extrato a um alimento confere-lhe a quantidade de iodo recomendada por dia para um adulto ou uma mulher grávida, respetivamente. Assim, este trabalho mostrou a viabilidade da obtenção de extratos antioxidantes ricos em fibra e em iodo a partir de algas castanhas, que têm potencial para serem aplicados em produtos alimentares, tornando-os mais saudáveis

keywords

Brown macroalgae, drying methods, antioxidant activity, polysaccharides, iodine, inductively coupled plasma – mass spectrometry – ICP-MS

abstract

With population growing very quickly, adequate nutrition for people is increasingly a challenge. Currently, it is estimated that around 2 billion people suffer from iodine deficiency. Although in many situations this deficiency can be overcome by thyroid adaptations, in more serious cases it can lead to more severe problems, such as goiter or even hypothyroidism. In pregnant women, iodine deficiency can have more severe implications, as it is essential during the development of the fetus. According to the World Health Organization (WHO) at least 150 µg of iodine should be ingested per day for adults and 200 - 250 µg of iodine for pregnant women, to meet human needs.

Brown algae have a natural ability to concentrate large amounts of iodine, which functions as an inorganic antioxidant or as part of their antibacterial defense mechanism. For this reason, macroalgae can play a very important role in mitigating the problem of iodine deficiency in the population, while their high content of polysaccharides, proteins and phenolic compounds make them even more nutritionally rich.

In this work, several extractions were performed in order to obtain different extracts rich in antioxidant compounds and iodine. Firstly, aqueous and ethanolic extractions were carried out using the brown macroalgae *Undaria pinnatifida*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus* sp., obtaining extracts rich in antioxidant compounds, particularly from *B. bifurcata* and *Fucus* sp. To evaluate the effect of the drying method on antioxidant compounds and on total iodine, *B. bifurcata* and *Fucus* sp. were dried using a ventilated oven (50 °C) and by freeze-drying, with the aim of understanding the extent to which temperature could be responsible for iodine volatilization. By analysing total iodine by inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS), it was found that the macroalgae *Fucus* sp. contains more iodine compared to *B. bifurcata*. Furthermore, it was possible to verify that drying macroalgae in a ventilated oven made it possible to obtain biomass with greater amount of iodine. Subsequently, water extractions were carried out using distilled water at room temperature and at 90 °C, allowed to verify greater iodine extractability with hot water.

In relation to the amount of polysaccharides, the extraction of *B. bifurcata* with water at 90 °C (49.7 % m/m) allowed obtaining a greater amount compared to the extraction at room temperature (44.8 % m/m) and to both extractions with *Fucus* sp. (between 33.9 and 43.1% m/m), being alginate the predominant present polysaccharide. Moreover, extracts of *Fucus* sp. obtained with hot water generally had greater antioxidant capacity.

Thus, it was possible to conclude that hot aqueous extraction of *Fucus* sp., previously dried in an oven at 50 °C, allowed to obtain the richest extract in iodine content (1104 mg/kg). Adding 136 mg or 226 mg of this extract to a food product provides it the amount of iodine recommended per day for an adult or a pregnant woman respectively. Thus, this work showed the feasibility of obtaining antioxidant extracts rich in fiber and iodine from brown algae, which have the potential to be applied in food products, making them healthier.

Índice

Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas.....	vi
1 Introdução	1
1.1 Iodo	1
1.1.1 A importância do iodo na saúde	2
1.1.2 Funcionamento da tiroide	7
1.1.3 Acumulação de iodo nas algas e sua função	8
1.2 Algas	11
1.2.1 Algas castanhas	11
1.2.1.1 Alginato.....	12
1.2.1.2 Laminarana	13
1.2.1.3 Fucoïdana.....	14
1.2.1.4 Compostos fenólicos	16
1.2.2 Aplicações alimentares.....	16
1.3 Métodos de quantificação de iodo.....	18
1.4 Objetivo.....	20
2 Materiais e métodos	21
2.1 Set 1 de amostras.....	21
2.1.1 Colheita e preparação das amostras.....	21
2.1.2 Extração etanólica.....	21
2.1.3 Extração aquosa	22
2.2 Set 2 de amostras.....	22
2.2.1 Colheita e preparação das amostras.....	22
2.2.2 Extrações aquosas a temperatura ambiente e a quente	23
2.3 Análise de açúcares neutros.....	25
2.4 Análise de ácidos urónicos	26
2.5 Quantificação do teor total de compostos fenólicos	27
2.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS	28
2.7 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH	29
2.8 Determinação da quantidade de iodo	30
2.8.1 Extração alcalina	30
2.8.2 Análise de iodo no ICP-MS	31
3 Resultados e discussão	33
3.1 Amostras set 1: obtenção de extratos antioxidantes	33

3.1.1	Rendimento das extrações aquosas e etanólicas a temperatura ambiente	33
3.1.2	Determinação de compostos fenólicos	34
3.1.3	Determinação da atividade antioxidante	35
3.2	Amostras set 2: avaliação do impacto método de secagem nas algas	37
3.2.1	Rendimento das extrações aquosas à temperatura ambiente e a quente	37
3.2.2	Polissacarídeos	39
3.2.3	Atividade antioxidante e compostos fenólicos	41
3.2.4	Iodo	43
4	Conclusão	49
5	Bibliografia	50

Lista de figuras

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo biogeoquímico do iodo. Retirado de (Dissanayake et al., 1999).....	2
Figura 2 - Representação esquemática do metabolismo responsável pela formação das hormonas da tiroide. Retirado de (Pradhan et al., (2018).....	8
Figura 3 - Representação esquemática do metabolismo oxidativo apoplástico para acumulação de iodo nas algas castanhas. O I ⁻ é oxidado por intermédio da haloperoxidase para formas mais lipofílicas como I ₂ e HOI permitindo assim a sua entrada pela membrana plasmática. Retirado de (Leblanc et al., 2006)	10
Figura 4 - a) <i>U. pinnatifida</i> , b) <i>F. vesiculosus</i> e c) <i>B. bifurcata</i> . Retirado de BioDiversity4All.	12
Figura 5 - Estrutura química dos blocos G, M e GM do alginato. Retirado de (Lee & Mooney, 2012).	13
Figura 6 - Estrutura química da laminarana e as suas cadeias G e M. Retirado de (Y. Li et al., 2021).	14
Figura 7 – Estrutura química dos dois tipos possíveis da cadeia principal de fucoidana. A) Cadeia caracterizada por ligações glicosídicas 1, 3 e 1, 4 alternadas entre os resíduos de fucose em <i>Ascophyllum nodosum</i> . B) Cadeia caracterizada por ligações 1, 3 entre os resíduos de fucose em <i>Chorda filum</i> . Retirado de (Mensah et al., 2023).	15
Figura 8 - <i>U. pinnatifida</i> a) antes de ser seca na estufa e b) depois de ser seca na estufa.	21
Figura 9 - Representação esquemática da colheita e preparação das amostras até à extração.	24
Figura 10 – a) Bloco de aquecimento onde ocorreu a extração do iodo das amostras durante 3 horas e b) monitor de controlo da temperatura do bloco de aquecimento.	31
Figura 11 - ICP-MS Aligent 7700 Series.....	32
Figura 12 - Rendimento dos extratos aquosos (a) e etanólicos (b) de <i>U. pinnatifida</i> , <i>Fucus</i> sp. e <i>B. bifurcata</i> na primeira extração.	34
Figura 13 - Concentração de compostos fenólicos nos extratos aquosos e etanólicos das algas <i>U. pinnatifida</i> , <i>Fucus</i> sp. e <i>B. bifurcata</i> , representada por mg EAG/g extrato.....	35
Figura 14 - Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos das algas <i>U. pinnatifida</i> , <i>Fucus</i> sp. e <i>B. bifurcata</i> através do método a) ABTS (expresso em mg de equivalentes de ácido ascórbico por g de extrato) e b) DPPH (expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato).....	36
Figura 15 - Rendimento das extrações realizadas a) a 90 °C e b) à temperatura ambiente (TA).	38

Figura 16 - Quantidade de iodo presente nas biomassas de *B. bifurcata* e *Fucus* sp. secas na estufa e liofilizadas. BBS – biomassa *Bifurcaria* seca; BBL - biomassa *Bifurcaria* liofilizada; BFS – biomassa *Fucus* seca; BFL - biomassa *Fucus* liofilizada44

Figura 17 - Quantidade de iodo presente nos a) extratos e b) resíduos de extração das algas. EBSTA – Ext. aquoso *Bifurcaria* seca à temperatura ambiente; EBSTQ – Ext. aquoso *Bifurcaria* seca à temperatura quente; EBLTA – Ext. aquoso *Bifurcaria* liofilizada à temperatura ambiente; EBLTQ – Ext. aquoso *Bifurcaria* liofilizada à temperatura quente; EFSTA – Ext. aquoso *Fucus* seca à temperatura ambiente; EFSTQ – Ext. aquoso *Fucus* seca à temperatura quente; EFLTA – Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura ambiente; EFLTQ – Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura quente; RBSTA – Resíduo *Bifurcaria* seca à temperatura ambiente; RBSTQ – Resíduo *Bifurcaria* seca à temperatura quente; RBLTA – Resíduo *Bifurcaria* liofilizada à temperatura ambiente; RBLTQ – Resíduo *Bifurcaria* liofilizada à temperatura quente; RFSTA – Resíduo *Fucus* seca à temperatura ambiente; RFSTQ – Resíduo *Fucus* seca à temperatura quente; RFLTA – Resíduo *Fucus* liofilizada à temperatura ambiente; RFLTQ – Resíduo *Fucus* liofilizada à temperatura quente.46

Lista de tabelas

Tabela I - Extratos e resíduos obtidos apos as extrações realizadas.	24
Tabela II - Percentagem molar (% mol) relativa de cada monossacarídeo e percentagem mássica do total de em carboidratos presente nas biomassas e respetivos extratos aquosos.	40
Tabela III - Resultados obtidos para os testes de atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e da quantidade de compostos fenólicos para cada um dos extratos obtidos.	42

Lista de abreviaturas

ABTS – 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

DIT – Diiotirosina

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EAA – Equivalentes de ácido ascórbico

EAG – Equivalentes de ácido gálico

FNRI-DOST - Instituto de Pesquisa em Alimentos e Nutrição do Departamento de Ciência e tecnologia

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

ICP-AES – Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy

ICP-MS – Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry

MAE – Extração assistida por micro-ondas

MIT – Monoiodotirosina

OMS – Organização Mundial de Saúde

T3 – Triiodotironina

T4 – Tiroxina

TMAH – Hidróxido tetrametilamónio

TRH – Hormona libertadora de tiotropina

TSH – Hormona estimulante da tiroide

UAE – Extração assistida por ultrassons

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

1 Introdução

1.1 Iodo

A população mundial atingiu em outubro de 2022 os 8,5 mil milhões de humanos, aumentando cada vez mais os desafios relacionados com uma boa nutrição de toda a população. Atualmente estima-se que mais de 2 mil milhões de pessoas sofram de deficiência de iodo pelo que esta é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a causa evitável mais comum para danos cerebrais (Chen & Hetzel, 2010; Hatch-McChesney & Lieberman, 2022). No caso de Portugal a deficiência de iodo é sobretudo um problema que afeta mulheres grávidas ou lactantes, já que o iodo tem um papel fundamental para o normal desenvolvimento do feto. Em 2010 um estudo realizado por Limbert et al. (2010), com 3631 mulheres portuguesas grávidas, mostrou que apenas 16,8% das mulheres ingeria a quantidade de iodo recomendada pela OMS. Já em 2011 um novo estudo foi feito onde mais uma vez se verificou a deficiência de iodo entre a população de mulheres grávidas e lactantes em Portugal, verificando-se que em média estas ingerem apenas 100 – 124 μg , valor consideravelmente mais baixo do que o recomendado (200 – 250 μg) (Ittermann et al., 2020).

O iodo foi descoberto pela primeira vez em 1811 por Courtois, enquanto fazia pólvora para o exército de Napoleão. Ao usar as cinzas de algas um vapor violeta surgiu devido à presença do iodo. Em 1895 o investigador Baumann identificou pela primeira vez a presença de iodo na tiroide e por fim os investigadores David Marine e Kimball verificaram uma relação entre o alargamento da tiroide e a deficiência de iodo. Depois de começar a trabalhar em um hospital de Cleveland, David Marine teve a opção de começar a investigar sobre um problema à sua escolha. Este escolheu investigar sobre o bócio e mais tarde ao realizar um estudo em jovens raparigas da cidade de Akron com a ajuda do seu assistente, acabou por descobrir que esta doença podia ser prevenida através da suplementação deste elemento (Hetzel & Clugston, 1999; Zimmermann, 2008, 2009).

O iodo está presente em todo o planeta, porém distribuído de forma heterogénea, presente em maior quantidade no oceano devido ao seu ciclo biogeoquímico. O iodo nas suas formas inorgânicas nomeadamente iodeto (I^-) encontra-se normalmente no solo e é através da erosão, glaciação e inundações que este acaba posteriormente por chegar ao mar devido à sua solubilidade. No mar estes iões oxidam-se para o iodo molecular (I_2) e outras formas orgânicas como CH_3I , CH_2I_2 , CH_2CII , $\text{C}_2\text{H}_5\text{I}$ e $\text{C}_3\text{H}_7\text{I}$ e acabam por volatilizar

para a atmosfera, como se pode ver na figura 1 (Amachi, 2008; Zimmermann, 2009). As algas desempenham também um papel muito importante nesta parte do ciclo biogeoquímico do iodo, visto que estas acumulam grandes quantidades de iodo e têm a capacidade de libertar I_2 para a atmosfera (Küpper et al., 1998; Nitschke et al., 2018). Por fim este acaba por voltar ao solo devido à chuva. No entanto, como em alguns locais do planeta este ciclo é muito lento ou está incompleto, os solos e a água acabam por se tornar pobres em iodo (Zimmermann, 2009). Regiões montanhosas como os Alpes, Andes, Himalaias ou regiões onde ocorrem frequentemente inundações nomeadamente no sul da Ásia, como as chuvas das monções, é recorrente ter solos deficientes em iodo, uma vez que a sua solubilidade em água faz com que este seja arrastado. Por esta razão, este não entra de forma eficiente na cadeia alimentar, fazendo com que as pessoas dessas regiões sofram de deficiência em iodo (Zimmermann, 2009).

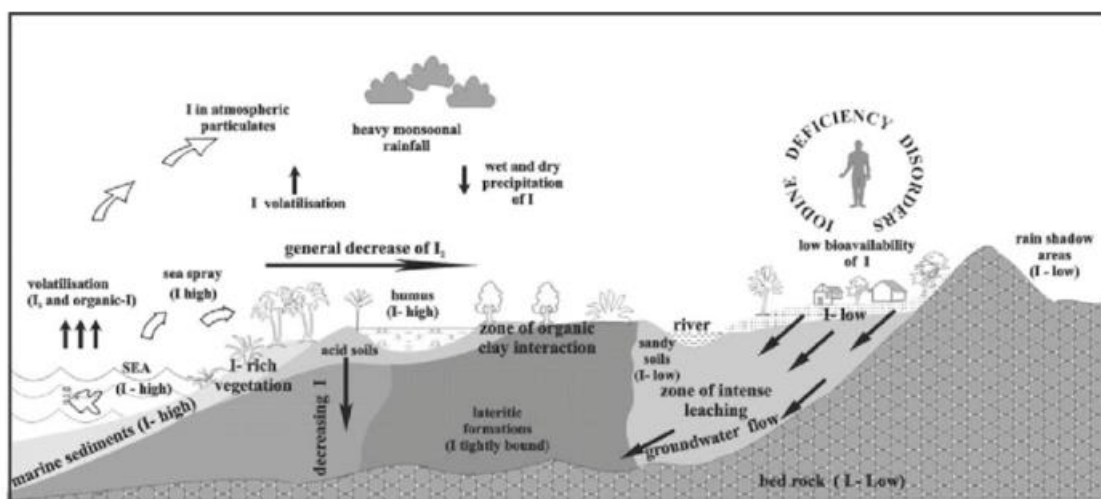


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo biogeoquímico do iodo. Retirado de (Dissanayake et al., 1999).

1.1.1 A importância do iodo na saúde

O iodo é essencial para o bom funcionamento do ser humano, nomeadamente para o bom funcionamento da tiroide, já que é um dos constituintes das hormonas produzidas por esta glândula. De acordo com a OMS e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a quantidade de iodo recomendada que deve ser ingerida por dia varia consoante a idade, género e estado de saúde. Em geral é recomendado que crianças e jovens ingiram entre 70 – 120 μg de iodo por dia. Em relação aos adultos devem ingerir cerca de 150 μg por dia e por fim para mulheres grávidas ou lactantes a quantidade

recomendada está entre os 200 - 250 µg (*Iodine Deficiency*, n.d.). No caso de mulheres grávidas as recomendações devem ser especialmente atendidas já que o iodo desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do feto, pelo que a sua deficiência pode levar a um atraso mental.

As hormonas triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) controlam o metabolismo de quase todas as células do corpo e são responsáveis pelo seu crescimento e bom desenvolvimento. Para manter o bom funcionamento, o corpo humano de um adulto deve ter entre 15 e 20 mg de iodo, dos quais 70 a 80% se encontram na tiroide. Para garantir as suas necessidades, a tiroide deve reter pelo menos 60 µg de iodo por dia. Isto acontece devido a um mecanismo de transporte ativo de iodo chamado bomba de iodo, o qual é estimulado pela hormona estimulante da tiroide (TSH). Pelo gasto de energia é então possível manter um gradiente de 100:1 entre o interior e o exterior de tiroide. Em caso de deficiência de iodo este gradiente pode passar para 400:1 (Hetzl & Clugston, 1999).

A ingestão excessiva de iodo também pode ser prejudicial para a saúde, podendo mesmo levar ao desenvolvimento de sintomas iguais aos que aparecem devido à falta da sua ingestão. Apesar dos dados para os limites superiores para a ingestão de iodo serem bem mais escassos, é recomendado que um adulto não deva ingerir mais de 1100 µg por dia. Porém um estudo realizado na população chinesa evidenciou que a partir de 800 µg já há uma elevada probabilidade de desenvolver hipotiroidismo subclínico (Sang et al., 2012). Em um estudo que envolveu 7190 mulheres na China, Shi et al., (2015) verificou que para valores de iodo na urina partir de 500 µg/L (150 – 249 µg/L é o recomendável) a probabilidade de desenvolver hipotiroxinemia é bastante alta. Hipotiroxinemia, é uma condição caracterizada pela baixa concentração de tiroxina em mulheres grávidas, que têm os níveis de TSH normais (Shi et al., 2015).

A deficiência de iodo pode levar ao desenvolvimento de doenças e prejudicar a saúde das pessoas. Na maioria dos casos onde ocorre deficiência de iodo, a tiroide adapta-se devido à maior secreção da TSH pela glândula pituitária. Esta adaptação permite então que a tiroide absorva uma maior quantidade de iodeto através do aumento da expressão do co-transportador sódio-iodeto, diminuindo a sua excreção e permitindo que a quantidade de iodo na tiroide se mantenha nos limites normais (Zimmermann, 2009; Zimmermann & Boelaert, 2015).

Caso a deficiência de iodo seja mais significativa, esta pode levar ao aparecimento de doenças, nomeadamente o desenvolvimento de bócio. Esta doença provoca um alargamento da tiroide (> 20 cm³ em homens e 15 cm³ em mulheres) (Mariani et al., 2021). O bócio pode ser dividido em dois tipos, bócio difuso, no qual a tiroide sofre um aumento

geral do seu volume, e, posteriormente, pode progredir para bócio nodular onde aparecem nódulos na glândula (Zimmermann, 2009). Normalmente esta doença é causada pela constante estimulação pela TSH, porém no caso do bócio difuso que aparece maioritariamente em populações que sofrem de deficiência de iodo suave não há um aumento dos níveis de TSH, pelo que o mecanismo que leva ao desenvolvimento deste tipo de bócio não está completamente entendido (Triggiani et al., 2009; Zimmermann & Boelaert, 2015).

O bócio pode também ter origem ou ser agravado pelo efeito de substâncias goitrogénicas. Estas substâncias competem com o iodo para serem absorvidas pela tiroide, fazendo com que a absorção do iodo diminua (Zimmermann, 2009). Os principais goitrogénicos são o tiocianato e o isotiocianato, os quais podem ser metabolizados a partir de glicosídeos cianogénicos presentes nos vegetais pertencentes à família Cruciferae como a couve, o nabo e a rúcula. Também o fumo dos cigarros pode levar a um aumento de tiocianato (Gaitan, 1988; Triggiani et al., 2009; Zimmermann, 2009).

Outra doença relacionada com a tiroide que pode aparecer devido à deficiência de iodo é o hipotiroidismo. Esta doença ocorre normalmente em casos mais graves do que o bócio e pode ter origem em diferentes causas. Esta condição ocorre quando a tiroide não é capaz de produzir as quantidades necessárias das hormonas da tiroide (T3 e T4) para satisfazer as necessidades dos tecidos periféricos, sendo que estas hormonas são responsáveis pela regulação do metabolismo de grande parte das células do corpo (Chaker et al., 2022; Khandelwal & Tandon, 2012).

Consoante a causa responsável pela deficiente produção das hormonas, o hipotiroidismo pode ser dividido em diferentes tipos. O hipotiroidismo primário acontece devido à falha da própria glândula tiroide levando a uma diminuição da concentração de hormonas T3 e T4 produzidas. Para corrigir a menor produção das hormonas há um aumento na produção da TSH por parte da glândula pituitária (Chaker et al., 2022; Khandelwal & Tandon, 2012). Quando a glândula pituitária ou o hipotálamo são responsáveis pelo decréscimo na produção das hormonas T3 e T4 estamos perante hipotiroidismo central. Isto pode acontecer devido a uma diminuição da produção de TSH pela glândula pituitária fazendo com que esta não estimule o suficiente a tiroide ou devido à fraca produção de TRH (hormona libertadora de tirotropina) pelo hipotálamo, a qual é responsável por estimular a produção de TSH na pituitária (Chaker et al., 2022; Khandelwal & Tandon, 2012). O hipotiroidismo pode ainda ter como causa a deficiência de iodo já que este é um elemento requerido para a síntese das duas hormonas da tiroide (Chaker et al., 2022).

O hipotireoidismo afeta todos os órgãos nomeadamente devido a uma redução generalizada dos processos metabólicos, levando a sintomas como a fadiga, intolerância ao frio, redução do batimento cardíaco e aumento do peso (Chaker et al., 2022). O cérebro é o órgão mais afetado e, por esta razão, é o primeiro órgão a sentir os efeitos da doença. Desta forma o funcionamento do cérebro pode ser comprometido e levar, por exemplo, a tempos de resposta mais elevados e respostas mais lentas. Também a capacidade de tomar decisões pode ser afetada pelo hipotireoidismo, impedindo o desenvolvimento de comunidades. Porém em casos menos severos da doença esta pode ser reversível através do reforço com o iodo (Hetzl & Clugston, 1999).

No caso de a deficiência de iodo afetar fetos ou recém-nascidos pode levar ao desenvolvimento de casos mais graves da doença, pelo que mulheres grávidas ou lactantes devem ter especial atenção às quantidades de iodo que ingerem e em muitos casos pode até ser recomendável que tomem suplementos para prevenir o mau desenvolvimento do feto. No caso de afetar os fetos, o hipotireoidismo pode até ser responsável pelo aborto espontâneo ou o aparecimento de anomalias congénitas (Hetzl & Clugston, 1999). As hormonas da tiroide têm um papel muito importante na mielinização dos neurónios do sistema nervoso central. Como estes não se multiplicam, durante o desenvolvimento do feto e nos primeiros estágios de desenvolvimento pós-natal é um período crítico, onde a deficiência de iodo pode ter implicações muito severas (Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001). Nos casos mais extremos de deficiência de iodo em fetos ou recém-nascidos pode-se desenvolver cretinismo que pode provocar deficiência mental, surdez ou falta de crescimento (Hetzl & Clugston, 1999).

Numa meta-análise conduzida por Bleichrodt e Born em 1994 que incluía 18 estudos, estes concluíram que regiões com deficiência de iodo podem levar a uma média de QI de menos 13,5 em relação a outras regiões que não apresentem este problema (Hetzl & Clugston, 1999; Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001).

Além da deficiência de iodo, também o excesso da sua ingestão pode configurar um problema para a saúde dos mamíferos. A ingestão excessiva de iodo pode levar ao desenvolvimento de várias doenças como bócio, hipotireoidismo ou hipertireoidismo, para grupos de risco, nomeadamente, pessoas expostas à deficiência de iodo ou já com um histórico de problemas relacionados com a tiroide (Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001; Leung & Braverman, 2014). Para as pessoas que não se encontram no grupo de risco, para o excesso de ingestão de iodo é normalmente bem tolerado, uma vez que a tiroide consegue adaptar-se ao excesso de iodo, fazendo com que durante um período transitório a síntese de hormonas da tiroide seja reduzida ou mesmo inibida para

que não haja um excesso destas (Leung & Braverman, 2014; Pearce et al., 2016). Este período de transição acontece devido ao efeito Wolff-Chaikoff, que apesar de não ser completamente compreendido, sabe-se que este mecanismo ocorre devido à produção de substâncias inibidoras da enzima peroxidase da tiroide que é responsável por catalisar várias reações importantes na tiroide. Também a redução da atividade da desidrase intratiroidal que leva a um conseqüente decréscimo na síntese das hormonas da tiroide (Leung & Braverman, 2014; Wolff & Chaikoff, 1948). O efeito Wolff-Chaikoff está relacionado com uma diminuição da expressão do co-transportador sódio-iodeto, o qual é responsável pelo transporte ativo de iodo para o interior da tiroide (Leung & Braverman, 2014).

O hipotireoidismo induzido pelo excesso de iodo pode ocorrer no caso de haver uma falha na adaptação da tiroide aos níveis mais elevados de iodo, normalmente devido a um histórico de lesões na tiroide. O aumento da ingestão de iodo pode assim levar a um decréscimo na libertação de hormonas da tiroide, ainda que os níveis de TSH esteja no valor normal (Leung & Braverman, 2014).

O hipertireoidismo ocorre normalmente em populações que estão habituadas a conviver com a escassez de iodo e de repente passam a ter um aumento no seu consumo. Vários países com uma escassez crónica de iodo tiveram problemas devido ao hipertireoidismo nas populações devido ao programa universal de iodização do sal. Devido à iodização excessiva do sal, países como o Zimbabué ou República Democrática do Congo viram as suas populações mais vulneráveis, nomeadamente as pessoas mais velhas, a desenvolverem hipertireoidismo. Esta doença ocorre quando os tirócitos presentes nos nódulos da tiroide deixam de responder à TSH devido à ingestão excessiva de iodo e passam a produzir demasiada quantidade de hormonas da tiroide (Zimmermann et al., 2008). Apesar de ter alguns sintomas como a perda de peso, taquicardia ou fraqueza nos músculos, o hipertireoidismo costuma ser quase sempre transitório caso seja alvo de intervenção. O maior risco envolvendo esta doença está relacionado com as pessoas que sofrem de doenças do coração, para as quais o hipertireoidismo se pode tornar letal (Zimmermann et al., 2008). A ingestão de muitas gramas de iodo pode também levar ao aparecimento de sintomas agudos bastante graves devido ao envenenamento por iodo. Alguns desses sintomas são o queimar da boca, garganta ou estômago e ainda dor abdominal, febre, vômito, diarreia, entre outros (Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001).

1.1.2 Funcionamento da tiroide

Em condições normais a absorção de iodo proveniente da alimentação é de mais de 90% (Platel & Srinivasan, 2016). O ião iodeto é a principal forma de iodo proveniente da alimentação e esta é rapidamente absorvida ao longo do trato gastrointestinal. Outras formas inorgânicas de iodo como o ião iodato são reduzidas no intestino antes de serem também quase completamente absorvidas (Hazell, 1985; Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001). Quanto às formas orgânicas de iodo nomeadamente quando este se encontra ligado a aminoácidos são absorvidas mais devagar e com menos eficácia. O co-transportador sódio-iodeto presente na membrana basal da tiroide permite concentrar o iodo no órgão, onde vai sofrer posteriormente um conjunto de reações com vista à síntese das hormonas da tiroide (Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001). A tiroglobulina é uma grande glicoproteína sintetizada pelas células da tiroide responsável pela iodização. Quando na presença de iodeto e da tiroglobulina, as enzimas tiroperoxidase e peroxidase de hidrogénio vão ser responsáveis pela oxidação e posterior ligação do iodo aos resíduos de tirosol que se encontram na molécula triglobulina (figura 2). Desta forma, são formados os precursores para a síntese das hormonas da tiroide, a monoiodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT). A catálise fornecida pela tiroperoxidase permite a ligação de duas moléculas DIT para formar a hormona T4 ou a ligação dos precursores MIT e DIT para formar a hormona T3 (Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001). A glicoproteína é depois armazenada fora da tiroide onde fica até que as hormonas da tiroide que esta contém sejam necessárias para o organismo. Entre 0,1 a 1% do peso molecular da tiroglobulina é composto por iodo, dos quais um terço são hormonas da tiroide e os restantes dois terços são os precursores destas. Por fim, quando as hormonas armazenadas são necessárias, a tiroglobulina vai ser digerida por proteases de forma a libertar as hormonas para circulação, enquanto os precursores delas vão ser reciclados na tiroide de forma a conservar o iodo no organismo (Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001).

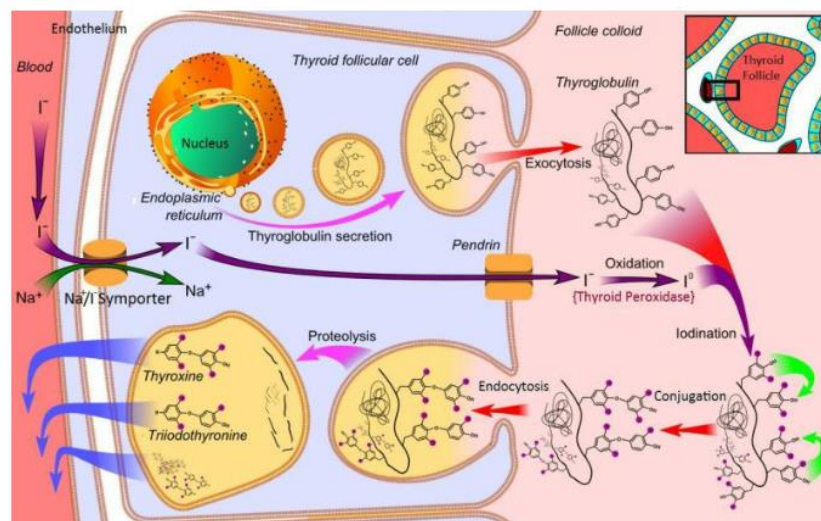


Figura 2 - Representação esquemática do metabolismo responsável pela formação das hormonas da tireoide. Retirado de (Pradhan et al., (2018).

Após entrar em circulação o iodo é removido sobretudo pela tireoide consoante a necessidade que tiver deste micronutriente. O restante iodo que sobra pode também ser captado pelos rins para ser posteriormente excretado (Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients., 2001).

1.1.3 Acumulação de iodo nas algas e sua função

Devido ao ciclo biogeoquímico do iodo as espécies de seres vivos que mais acumulam iodo são sobretudo espécies marinhas, já que este se encontra em maior quantidade na água do mar. Desta forma estas são muitas vezes a maior fonte de fornecimento de iodo para os seres humanos. Quanto aos outros alimentos de origem terrestre as quantidades de iodo provenientes destes são extremamente variáveis e dependem em grande parte da sua concentração no solo. Por esta razão, a contribuição de alimentos terrestres para a ingestão de iodo é extremamente variável, podendo por vezes ser maior do que as espécies marinhas. O iodo é por isso considerado o elemento cuja sua concentração é a mais variável nos alimentos de origem terrestre (Hazell, 1985).

Os tecidos de origem animal terrestre com maior quantidade de iodo presente pertencem à glândula tiroide. Como este é um tecido onde o iodo está sobretudo na forma orgânica não é tão biodisponível para o ser humano quanto o caso dos peixes onde o iodo presente está quase todo na forma de iodeto e por isso é muito biodisponível (Hazell, 1985).

Quanto às plantas para as quais não é conhecida nenhuma função metabólica do iodo é mais provável que este se encontre totalmente na forma de iodo inorgânico. Porém a presença em muitas plantas de goitrogénicos que competem com o iodo para a sua absorção na tiroide faz com que este se torne muito menos biodisponível (Hazell, 1985).

No ambiente marinho, as algas constituem a maior fonte de iodo devido à sua habilidade para concentrar grandes quantidades deste a partir da água do mar. Tal como os mamíferos conseguem concentrar iodo na glândula da tiroide em relação ao que está presente no sangue, as algas também conseguem concentrá-lo em relação à água do mar, mas de forma extremamente eficiente, conseguindo por vezes acumular 30.000 vezes mais iodo que a água do mar (Smyth, 2021). Apesar da quantidade e das formas de iodo divergirem muito entre as diferentes espécies de algas é reconhecido que em geral as algas castanhas são aquelas que têm maior capacidade para bioacumular iodo (Roleda et al., 2018; Smyth, 2021).

Nas algas duas funções para a acumulação de iodo têm sido propostas. Uma dessas funções está relacionada com a sua resposta imunitária inata contra microrganismos patogénicos. Uma vez que estes patógenos são identificados, uma resposta imunitária é ativada. Primeiramente as células respondem com a emissão oxidativa de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), seguido pouco depois de um efluxo de I^- . A reação de H_2O_2 e I^- , catalisada pela haloperoxidase leva à formação das espécies bactericidas I_2 ou o ácido hipoiódico (HOI), responsáveis pelo mecanismo de defesa antibacteriano (Küpper & Carrano, 2019). O iodo desempenha ainda outro papel muito relevante para as algas castanhas, já que é utilizado por estas como um antioxidante inorgânico. Durante o período de maré baixa, as algas ficam muitas vezes vulneráveis ao stress oxidativo devido à exposição à luz solar, à dessecação e à presença de ozono atmosférico. Assim, em resposta ao stress oxidativo, as algas conseguem usar o iodo armazenado nos apoplastos, havendo, posteriormente, um efluxo de I^- por parte das algas. Ao reagir com o ozono (O_3), o iodo é responsável pela formação de óxido de iodo permitindo assim a desintoxicação do ozono à volta das algas (Küpper et al., 2008; Leblanc et al., 2006; Palmer et al., 2005). Desta forma, o iodo presente em amostras de algas expostas à atmosfera é significativamente maior do que em amostras completamente submersas, o que está de acordo com a necessidade das algas expostas a stress oxidativo precisarem de mais iodo para servir de antioxidante (Küpper & Carrano, 2019). O I^- pode ainda ser utilizado como antioxidante contra várias espécies reatoras de oxigénio (ROS) tais como H_2O_2 , O_3 , superóxido (O_2^-) e radicais hidroxilo. Através do efluxo de I^- as algas conseguem remover o excesso de H_2O_2 e HOI e outras espécies de ROS catalisadas pela

haloperoxidase produzindo água, oxigénio e iodo molecular no processo (Küpper & Carrano, 2019; Leblanc et al., 2006).

As algas castanhas nomeadamente as Laminárias conseguem acumular grandes quantidades de iodo devido ao seu metabolismo oxidativo apoplástico. Este mecanismo ocorre no apoplasto das algas e permite a oxidação de iodeto que é a principal forma de iodo presente no mar em outras formas mais lipofílicas como o I_2 ou HOI, permitindo que estas se difundam pela membrana plasmática (figura 3). Para ocorrer esta oxidação é fundamental a presença da molécula haloperoxidase-dependente de vanádio, responsável pela catalisação da reação de oxidação de I^- para I_2 e HOI (Küpper et al., 1998; Küpper & Carrano, 2019; Leblanc et al., 2006). Devido ao facto das algas do género *Laminaria* terem uma família de enzimas haloperoxidasas especializadas que se ramifica em duas espécies, as bromoperoxidasas e as iodoperoxidasas, estas conseguem ser bastante mais eficientes em absorver iodo do que as restantes algas castanhas (Küpper & Carrano, 2019). O iodo nas formas I_2 e HOI está presente no oceano em concentrações muito baixas, daí que seja fundamental manter as concentrações destas espécies ainda mais baixas no interior das células das algas de forma a existir um gradiente favorável para que estas moléculas continuem a entrar. Para que isso ocorra, é fundamental que mal entrem na célula as formas I_2 e HOI sejam reduzidas de volta para I^- (Leblanc et al., 2006).

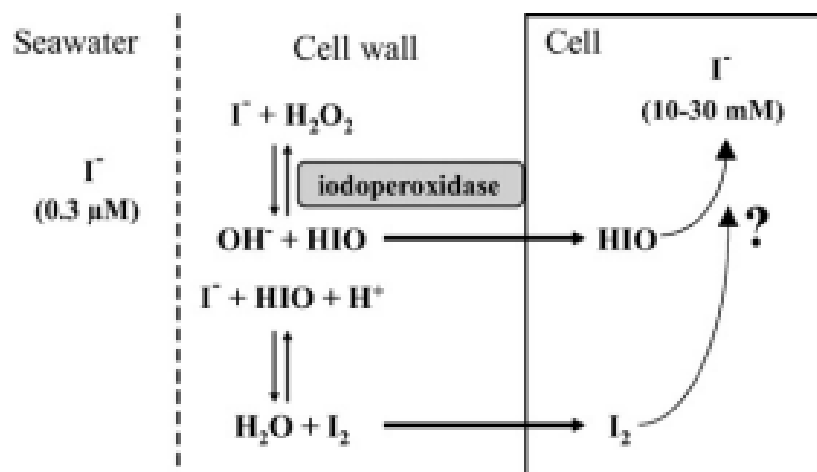


Figura 3 - Representação esquemática do metabolismo oxidativo apoplástico para acumulação de iodo nas algas castanhas. O I^- é oxidado por intermédio da haloperoxidase para formas mais lipofílicas como I_2 e HOI permitindo assim a sua entrada pela membrana plasmática. Retirado de (Leblanc et al., 2006)

Devido à elevada acumulação de iodo por parte de algas castanhas e posterior volatilização deste para a atmosfera, estas são reconhecidas como uma das principais responsáveis por manter o ciclo biogeoquímico deste elemento. Em zonas costeiras com elevada proliferação de algas castanhas, o iodo devolvido à atmosfera através destas é de tal forma elevado que pode influenciar o clima da região (Küpper & Carrano, 2019; Nitschke et al., 2013).

1.2 Algas

As algas são seres vivos da qual fazem parte um largo espetro de organismos. Dentro deste grupo de organismos, fazem parte espécies que podem ser unicelulares até espécies multicelulares, pelo que o seu tamanho e complexidade também varia de forma muito grande. Em termos de tamanho as algas podem variar entre poucos micrómetros no caso das unicelulares, até cerca de 70 metros no caso de alguns kelps. Além da sua heterogeneidade em termos de tamanho e complexidade estas também se destacam por colonizarem diversos tipos de ambientes, desde terrestres como o solo até ambientes aquáticos como o mar, rios ou lagos (El Gamal, 2010; Pereira & Neto, 2014). As algas podem ser empiricamente divididas em dois grupos, nomeadamente as microalgas e as macroalgas. As macroalgas incluem as algas verdes (Chlorophyta), vermelhas (Rhodophyta) e castanhas (Ochrophyta - Phaeophyceae). (El Gamal, 2010; Pereira & Neto, 2014).

1.2.1 Algas castanhas

As algas castanhas estão inseridas na classe *Phaeophyceae* contabilizando cerca de 2000 espécies em aproximadamente 285 géneros (Wehr, 2015). Esta linhagem de algas é composta apenas por espécies multicelulares não apresentando por isso fases vegetativas unicelulares como ocorre em outros membros do filo. Apesar disso, esta é uma classe que apresenta bastante diversidade variando entre algas pequenas e filamentosas até algas grandes e complexas (Bringloe et al., 2020; Wehr, 2015). Em muitas regiões espalhadas pelo planeta, as algas castanhas representam as espécies dominantes, tornando-se por isso, frequentemente, as principais responsáveis pela produção primária, ao transformar a matéria inorgânica em matéria orgânica. Neste caso as grandes algas castanhas, particularmente as que pertencem às ordens Laminariales, Tilopteridales,

Fucales e Desmarestiales, acabam por formar complexas florestas marinhas moldando assim estes ecossistemas. As florestas marinhas são o habitat de muitas espécies de animais proporcionando-lhes alimento e facilitando a sua reprodução (Bringloe et al., 2020; Cock et al., 2011).



Figura 4 - a) *U. pinnatifida*, b) *F. vesiculosus* e c) *B. bifurcata*. Retirado de BioDiversity4All.

As algas castanhas apresentam vários pigmentos fotossintéticos tais como clorofila *a*, *c1*, e *c2*, β -caroteno, diatoxantina e fucoxantina. A cor deste filo de algas, que varia entre amarelo até castanho pardo, é obtida sobretudo devido à presença do pigmento fucoxantina que ofusca os restantes pigmentos presentes (Pereira & Neto, 2014; Wehr, 2015). Os principais polissacarídeos presentes nas algas castanhas são laminarana, alginato e fucoídano, representando mais de 50 % do peso seco das algas e podendo chegar a 70 % em algumas espécies. Na figura 4 estão representadas as 3 algas castanhas utilizadas neste trabalho, a *Undaria pinnatifida*, o *Fucus vesiculosus* e a *Bifurcaria bifurcata*.

1.2.1.1 Alginato

O alginato é um polissacarídeo linear composto por dois tipos de ácidos urónicos: por resíduos de ácido α -L-gulurónico (G) e por resíduos de ácido β -D-manurónico (M) (figura 5), que estão ligados na cadeia polissacarídica através de ligações glicosídicas do tipo 1, 4. Dependendo da forma como estão organizados, os monossacarídeos na cadeia podem levar à formação de diferentes tipos de blocos. Estes blocos são compostos por secções seguidas de Gs, de Ms ou ainda secções aleatoriamente constituídas por unidades G e M. A proporção entre os dois tipos de ácidos urónicos é geralmente 1:1, porém pode variar de acordo com a espécie de alga, as condições de crescimento ou a parte da alga (Brownlee et al., 2005; Y. Li et al., 2021). Quando o polissacarídeo é rico em

resíduos G, este é caracterizado por uma maior solubilidade, assim como as suas propriedades gelificantes em relação aos blocos M. Isto ocorre devido ao facto de os blocos G terem uma maior afinidade de se ligarem a cationes de cálcio (Ca^{2+}) (Brownlee et al., 2005; Lee & Mooney, 2012; Li et al., 2021).

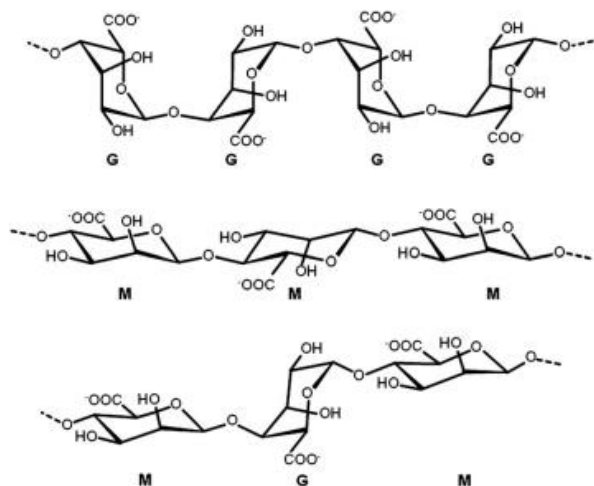


Figura 5 - Estrutura química dos blocos G, M e GM do alginato. Retirado de (Lee & Mooney, 2012).

O alginato apresenta um uso importante que vai desde indústrias como a da graxa de sapatos como é utilizada para usos médicos, com o microencapsulamento que serve de vetor para medicamentos ou para ingredientes ativos em curativos absorventes (Brownlee et al., 2005; Y. Li et al., 2021). (Lee & Mooney, 2012)

Apesar do alginato poder ser usado em diferentes indústrias, é a indústria alimentar que movimenta mais dinheiro, nomeadamente devido às suas aplicações para a nutrição humana. Enquanto na Ásia as algas marinhas são consumidas em grandes quantidades, no Ocidente o principal uso destas está relacionado com a inclusão dos polissacarídeos ficolóides como o alginato em alimentos como espessantes, estabilizadores ou emulsionantes (Brownlee et al., 2005).

1.2.1.2 Laminarana

A laminarana é um polissacarídeo presente nas algas castanhas, nas quais serve como reserva de açúcares que se encontra em vacúolos dentro das células. Este polissacarídeo pode ser encontrado em maiores quantidades em espécies dos géneros *Laminaria* e *Saccharina* e em menores quantidades também pode ser encontrada nos

gêneros *Ascophyllum*, *Fucus* e *Undaria* (Holdt & Kraan, 2011; Kadam et al., 2015; Y. Li et al., 2021).

O polissacarídeo é uma β -glucana composto na sua grande maioria por resíduos β -1,3-glucopirranose. A cadeia principal que consiste em ligações β -1,3-glicosídicas é ramificada através de ligações glicosídicas do tipo β -1,6. A quantidade de resíduos de β -1,6-glucose ramificados, contabiliza menos de 10% do total em geral, mas depende também do tipo de alga (Kadam et al., 2015; Y. Li et al., 2021).

Existem dois tipos de laminaranas presentes nas algas castanhas, dependendo da presença ou não de um resíduo de D-manitol na extremidade redutora da cadeia do polissacarídeo. No caso deste monossacarídeo estar presente vai dar origem a uma cadeia M, enquanto que no caso deste monossacarídeo não estar presente, trata-se uma cadeia G (figura 6). A proporção de cadeias M e G depende em grande parte da espécie de alga e fatores ambientais (Holdt & Kraan, 2011; Kadam et al., 2015; Y. Li et al., 2021).

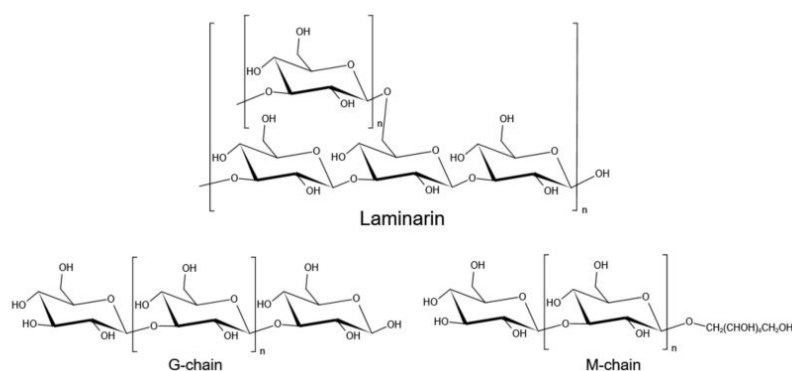


Figura 6 - Estrutura química da laminarana e as suas cadeias G e M. Retirado de (Y. Li et al., 2021).

1.2.1.3 Fucoidana

Entre os polissacarídeos presentes em maior quantidade nas algas castanhas, a fucoidana é aquele que apresenta maior variedade, dependendo em grande parte da espécie de alga, mas também de outros fatores, como local e altura do ano de colheita. Apesar de ser um polissacarídeo com uma estrutura altamente variável, é composto maioritariamente por resíduos de fucose sulfatados (Y. Li et al., 2021; van Weelden et al., 2019).

A fucoidana é maioritariamente encontrada na parede celular das algas castanhas, onde atua como um polissacarídeo estrutural conferindo proteção contra a dessecação das algas durante os períodos de maré baixa. A sua presença relativa nas algas castanhas

varia entre 4 a 8% do peso total seco, embora possa chegar aos 40% em relação à parede celular (Holdt & Kraan, 2011; Y. Li et al., 2021).

Este polissacarídeo é composto por uma cadeia principal de resíduos sulfatados de α -L-fucopirranose ligados através de ligações glicosídicas que podem acontecer tanto no carbono 3 como no carbono 4 do monossacarídeo, dando assim origem a diferentes tipos de fucoidana (figura 7). No tipo 1 ocorrem apenas ligações glicosídicas 1, 3, enquanto no tipo 2 estão presentes de forma alternada ligações glicosídicas 1, 3 e 1, 4 (van Weelden et al., 2019).

Quanto aos padrões de sulfatação dos resíduos de fucose, estes variam dependendo da estrutura do polissacarídeo. A sulfatação ocorre maioritariamente no C-2 e em menor quantidade nos C-3 e C-4. Pode ainda ocorrer a sulfatação de dois carbonos da mesma fucose originando uma fucose dissulfatada. Os grupos sulfato aqui presentes são determinantes para conferir a atividade biológica à fucoidana (Y. Li et al., 2021; van Weelden et al., 2019).

Além da cadeia principal, a fucoidana pode frequentemente ramificar-se em outras cadeias, originando uma grande diversidade de estruturas possíveis para o polissacarídeo e dificultando, assim, o seu estudo. Tendo em conta as cadeias que se ramificam a partir da cadeia principal do polissacarídeo, este pode também apresentar diversos tipos de monossacarídeos em quantidades relativamente pequenas em relação à fucose. Entre esses monossacarídeos estão glucose, galactose, xilose, manose e ainda ácidos urónicos (Y. Li et al., 2021; van Weelden et al., 2019).

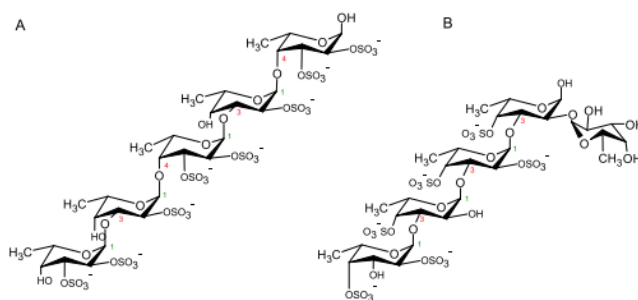


Figura 7 – Estrutura química dos dois tipos possíveis da cadeia principal de fucoidana. A) Cadeia caracterizada por ligações glicosídicas 1, 3 e 1, 4 alternadas entre os resíduos de fucose em *Ascophyllum nodosum*. B) Cadeia caracterizada por ligações 1, 3 entre os resíduos de fucose em *Chorda filum*. Retirado de (Mensah et al., 2023).

1.2.1.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos provenientes do metabolismo secundário de todos os organismos fotossintéticos, pelo que estão presentes em todas as espécies de fotoautotróficos onde desempenham diversas funções, nomeadamente para o seu crescimento, reprodução e proteção contra organismos patogénicos e antioxidante. Esta classe de compostos comporta uma grande variedade de moléculas e, conseqüentemente, a sua estrutura também é muito variável, tornando-os numa classe de grande interesse para a ciência em diferentes aplicações industriais (Bravo, 1998).

Os compostos fenólicos são caracterizados por ter uma estrutura, onde sempre aparece um grupo hidroxilo ligado diretamente a um grupo aromático benzénico. No caso das plantas terrestres, este grupo deriva normalmente do ácido gálico ou elágico, enquanto nas algas provém de unidades de floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzénico) (Holdt & Kraan, 2011; Mekinić et al., 2019).

Entre os compostos fenólicos um dos grupos mais relevantes são os taninos, dos quais emerge um grupo que só aparece nas algas castanhas, os florotaninos, que derivam do floroglucinol. Os florotaninos estão presentes em vesículas citoplasmáticas e a sua fusão com a membrana celular pode levar à secreção destes. Por representarem a porção dominante em relação aos compostos fenólicos nas algas castanhas, os florotaninos desempenham várias funções de extrema importância, como proteção química contra outros organismos, absorção de radiação UV, proteção antioxidante e mecanismos de resistência contra metais pesados (Mekinić et al., 2019).

1.2.2 Aplicações alimentares

As algas marinhas são consideradas uma fonte muito rica de nutrientes como vitaminas, minerais essenciais, fibras, proteínas e aminoácidos essenciais (Lomartire et al., 2021). Com a necessidade cada vez maior de aumentar a produção alimentar, as algas têm sido reconhecidas como uma importante solução, dada a vastidão do oceano, sendo consideradas um dos 50 alimentos de futuro que podem contribuir para a transformação do sistema alimentar global (Tagliapietra & Clerici, 2023). Apesar de só recentemente as populações ocidentais começarem a olhar para as algas com mais atenção, a verdade é que em países asiáticos o seu uso alimentar e medicinal remonta a vários séculos atrás (Qin, 2018a). No Japão, país que mais algas consome, estima-se que em média cada

peessoa coma cerca de 10,4 g de alga por dia. Além disso, este é um país conhecido pela elevada longevidade dos seus habitantes, uma característica que se pensa poder estar também relacionada com o elevado consumo de algas. Também na Coreia do Sul e na China há um elevado consumo de algas desde há vários séculos, 8,5 g e 5,2 g por dia respetivamente, algo que se deve ao facto destes organismos crescerem em grande abundância e durante todo o ano principalmente em zonas costeiras com algumas algas castanhas a terem a capacidade de crescer cerca de 50 cm por dia (El Gamal, 2010; Murai et al., 2021; Qin, 2018a; Tagliapietra & Clerici, 2023).

Além da ingestão direta de algas, estas podem também ser utilizadas pela indústria alimentar para obtenção de produtos alimentares funcionais. Devido à sua habilidade para criar soluções viscosas quando em contacto com a água, os hidrocolóides produzidos pelas algas apresentam uma grande importância para a indústria alimentar, já que as suas propriedades gelificantes, emulsificantes e espessantes são muito utilizadas nesta indústria. Entre os hidrocolóides produzidos pelas algas, encontram-se o agar e carragenana obtidos a partir das algas vermelhas e o alginato obtido a partir das algas castanhas (Qin, 2018b). O alginato já vem sendo usado na indústria alimentar para preparação de geleias, anéis de cebola e outros produtos alimentares, beneficiando das suas propriedades gelificantes. Porém, recentemente, este polissacarídeo também tem sido cada vez mais usado para formar géis com a capacidade de encapsulamento e imobilização de comida processada. Devido à forma espontânea com que estes se formam, permite aprisionar enzimas ou células probióticas sem as danificar. A carragenana é utilizada em vários alimentos quer a temperaturas altas de 70 °C ou mais ou temperaturas baixas. Desta forma o polissacarídeo é usado como um recheio que vai conferir as propriedades de alimentos como pudim, gelado ou mousse. O agar é o hidrocolóide com origem nas algas usado há mais tempo e aquele que apresenta uma maior variedade aplicações na alimentação. O agar é usado em rebuçados, geleias ou marmeladas, onde atua como agente espessante e gelificante. Pode ainda ser usado na indústria da panificação como recheio em bolos, permitindo a aderência de chocolate sem que este se parta (Qin, 2018b).

A adição de algas ou os seus extratos a alimentos funcionais também pode aumentar o seu valor nutricional, melhorando o seu potencial antioxidante, a quantidade de fibras e de minerais como K, Ca, Mg e Mn em alimentos como a carne, pão, laticínios ou sumos (Cofrades et al., 2008; Cox & Abu-Ghannam, 2013; Kusuma Damayanti et al., 2021; López-López et al., 2009; O'Sullivan et al., 2014; Qin, 2018b). O uso de algas no pão pode também ajudar a aumentar a sua validade (Kilinc et al., 2013).

O uso de algas também pode ser usado como forma de aumentar o valor nutricional, em termos de iodo, de vários alimentos. Em países com deficiência de iodo alimentos enriquecidos com algas podem assim contribuir para obter a quantidade mínima de iodo recomendada de 150 µg por dia. O Instituto de Pesquisa em Alimentos e Nutrição do Departamento de Ciência e Tecnologia (FNRI-DOST) nas Filipinas criou um produto chamado macarrão miki fresco com lato para tentar mitigar o problema de falta de iodo presente no país. O macarrão enriquecido com alga permitiu um suplemento significativo de iodo, apenas 100 g de macarrão são suficientes para obter 170 µg de iodo, atingindo assim o valor aconselhado pela OMS e UNICEF (*Greenish Noodles*, n.d.).

Os autores He et al., (2002) também usaram algas como fonte de iodo para obter alimentos mais ricos. Neste caso foi usada a alga castanha *Laminaria digitata* como fonte de alimentação para porcos de forma a tornar a carne destes mais rica nesse mineral. O estudo mostrou que os porcos alimentados com a alga tiveram um aumento significativo na quantidade de iodo presente nos seus órgãos, como o fígado, rim, coração e músculo e também no tecido adiposo. Os porcos alimentados com algas tiveram ainda um ganho de peso corporal de cerca de 10%.

1.3 Métodos de quantificação de iodo

Para identificar a quantidade de iodo presente numa amostra, várias técnicas têm sido testadas com o intuito de encontrar a técnica mais sensível e rentável em termos de custos e tempo de análise. Assim, várias técnicas já foram propostas, das quais se destaca a técnica “inductively coupled plasma mass spectrometry” (ICP-MS) precedida de uma extração alcalina (Fecher et al., 1998; Romarís-Hortas et al., 2013). O uso de um forte reagente alcalino permite a extração de compostos de iodo a temperaturas elevadas (European Committee For Standardization, 2007). A extração alcalina é normalmente realizada com recurso a amónia ou, mais comumente, hidróxido tetrametilamónio (TMAH). Peter Fecher e os seus colegas propuseram pela primeira vez o uso da extração alcalina para extrair o iodo usando TMAH em 1998. Estes autores realizaram a extração a 90 °C, já que temperaturas a partir de 100 °C podem levar à decomposição de TMAH (Fecher et al., 1998). Este método de extração alcalina necessita de várias horas para que fique completo. De forma a eliminar este contratempo, Vanessa Romarís-Hortas e os seus colegas desenvolveram um novo método em 2009 (Romarís-Hortas et al., 2009). Para o método de extração assistida por micro-ondas (MAE) foi utilizado um forno micro-ondas com temperaturas que chegam aos 200°C proporcionando uma extração mais rápida assim

como o uso de amostras maiores para determinar pequenas quantidades do analito (Romarís-Hortas et al., 2009).

Além da extração alcalina do iodo, também métodos como a extração ácida ou espectrofotometria catalítica foram propostos (Romarís-Hortas et al., 2013). Apesar da extração ácida ser comumente usada para a extração de outros elementos, esta apresenta dois problemas essenciais no que toca à extração e determinação de iodo. Em primeiro lugar, esta técnica pode levar a uma perda de precisão, já que vai originar espécies voláteis como I_2 e HI. Além disso, também já foi reportado que o sinal do iodo é menos estável quando presente em meio ácido. Quanto à espectrofotometria catalítica é um pré-tratamento que oferece boa sensibilidade e custo eficiência, porém tem como principal revés o facto de ser preciso que o iodo esteja todo na forma de I^- o que implica o recurso a outros pré-tratamentos que vão consumir mais tempo (Romarís-Hortas et al., 2009).

Outra opção para realizar a extração do iodo é através da técnica extração assistida por ultrassons (UAE), a qual tem como principal vantagem o facto de poder usar líquidos iónicos de forma a evitar o uso de solventes orgânicos diminuindo a poluição ambiental (Cao et al., 2016). Para a extração a amostra é sujeita ao “ultrasonic cleaner” durante 4 horas a 40 °C (Sun et al., 2015; Xu et al., 2016).

Outro método proposto para a deteção de iodo é a cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Este método proposto por Udo Nitschke e Dagmar B. Stengel pretende substituir a técnica ICP-MS, a qual é considerada algo cara (Nitschke & Stengel, 2015). Esta técnica permite apenas a determinação de I^- pelo que requer um pré-tratamento da amostra que consiste na incineração alcalina seca da mesma. Este pré-tratamento permite a incineração de componentes orgânicos que podem interferir com a técnica, usando hidróxido de potássio (KOH) como base forte. Além disso o pré-tratamento é também responsável por converter todas as espécies de iodo presentes na amostra em I^- de forma a permitir a determinação da quantidade total de iodo na amostra (Nitschke & Stengel, 2015). Os autores foram bem-sucedidos em obter um pico correspondente ao I^- no cromatograma a um comprimento de onda de 223 nm (Nitschke & Stengel, 2015).

1.4 Objetivo

O objetivo deste trabalho é a obtenção de um extrato com base em algas castanhas rico em iodo, que possa ser aplicado em alimentos. Para isso foram usadas algas castanhas devido à sua capacidade de acumular elevadas quantidades de iodo. O extrato pode assim contribuir para aumentar o valor nutricional de um alimento e contribuir para mitigar o problema da deficiência de iodo em várias regiões do planeta. A elevada quantidade de polissacarídeos e o elevado potencial antioxidante das algas castanhas, contribuem ainda para o aumento do valor nutricional do alimento.

Foram ainda testados dois métodos de secagem de algas comumente usados, secagem na estufa a 50 °C e através de liofilização, para perceber se a temperatura poderia ser responsável pela volatilização do iodo.

Por fim foram realizadas extrações à temperatura ambiente e a 90 °C para perceber qual a influencia de temperatura na extração do iodo.

2 Materiais e métodos

2.1 Set 1 de amostras

2.1.1 Colheita e preparação das amostras

No primeiro set de amostras analisadas, foram utilizadas 3 espécies de algas castanhas. As algas recolhidas na praia de Buarcos, na Figueira da Foz, e usadas neste estudo, foram respetivamente a *Undaria pinnatifida*, recolhida a 12 de março de 2020, a *Bifurcaria bifurcata* recolhida a 10 de outubro de 2020 e o *Fucus* sp. recolhida em 21 de setembro de 2020. As algas foram posteriormente congeladas a -20 °C até data a usar. Quando foi necessário usar as algas, estas foram descongeladas e lavadas de forma a remover o sal, detritos como areia e pequenos organismos presentes principalmente no rizoide, mas também no talo. As algas foram posteriormente secas com recurso à estufa a 50 °C durante 96 horas (figura 8) para remover completamente a água e por fim foram trituradas como recurso a um moinho de lâminas.

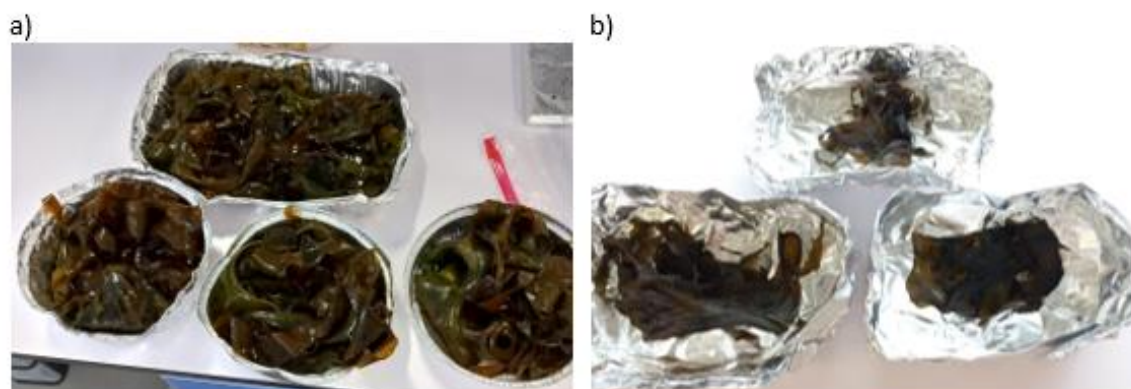


Figura 8 - *U. pinnatifida* a) antes de ser seca na estufa e b) depois de ser seca na estufa.

2.1.2 Extração etanólica

As biomassas secas e trituradas das algas *U. pinnatifida*, *B. bifurcata* e *Fucus* sp. foram sujeitas a uma extração etanólica. Assim, foram pesados 15 g de biomassa e

adicionados a 300 ml de etanol (100% v/v) e de seguida a suspensão foi sujeita à ação do sonicador durante 90 minutos. Posteriormente, a suspensão foi deixada em agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após o tempo de extração estar concluído, a solução obtida foi centrifugada durante 20 minutos a 15000 rpm e 4 °C e, por fim, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de fibra de vidro com poros de 1,6 µm. As soluções etanólicas foram ao evaporador rotativo que permitiu remover a maior parte do solvente. A solução que sobrou após ir ao evaporador rotativo foi depois posta em tubos de *speedvac* para evaporar o resto do solvente na *speedvac* e determinar o rendimento de extração (Nunes et al., 2018).

2.1.3 Extração aquosa

As algas castanhas foram sujeitas a uma extração aquosa. Para tal, foi pesado 7,5 g de biomassa e adicionado em 450 ml de água destilada. A concentração de biomassa usada (1,67 %m/v) foi inferior à concentração usada na extração etanólica (5 %m/v), dado que nas condições da extração etanólica seria obtida uma solução demasiado viscosa. A suspensão foi sujeita a sonicação durante 90 min e, posteriormente, a agitação constante durante 24 horas à temperatura ambiente. A solução obtida foi depois centrifugada e filtrada, tal como descrito para a extração etanólica (secção 3.1.2), e, por fim, foi liofilizada para determinar o seu rendimento (Nunes et al., 2018).

2.2 Set 2 de amostras

2.2.1 Colheita e preparação das amostras

Com o objetivo de inferir o impacto do método de secagem das macroalgas castanhas na quantidade de iodo na biomassa seca, um novo set de macroalgas castanhas foi colhido e preparado, dada a falta de biomassa para efetuar este estudo. Assim, no set 2 de amostras, foram usadas apenas duas macroalgas castanhas, a *Bifurcaria bifurcata* e *Fucus* sp., visto não haver *Undaria pinnatifida* disponível para colher. As algas foram ambas colhidas na praia de Buarcos, na Figueira da Foz, no dia 10 de novembro de 2022, e congeladas a -20 °C até serem utilizadas. As algas foram posteriormente descongeladas e sujeitas a lavagem abundante com água, tal como descrito na secção 2.1.1.

Com o objetivo de avaliar o impacto dos métodos de secagem que mais vulgarmente são usados em âmbito laboratorial para a secagem de algas, nomeadamente a secagem na estufa com ventilação e a liofilização, na volatilização do iodo presente nas algas, foram preparadas mais 4 biomassas: *Fucus* sp. e *B. bifurcata* secas na estufa a 50 °C durante 93 horas e liofilizadas (25 °C durante 144 horas), já que algumas espécies de iodo são muito voláteis como é o caso do iodo molecular (I₂) mas também as espécies de iodo orgânico como o iodeto de metil (CH₃I) (Wren et al., 2000). De seguida, as algas foram trituradas com recurso a um moinho até à obtenção de um pó fino. Imediatamente antes das algas serem colocadas no moinho, estas foram sujeitas a um banho em azoto líquido para se manterem frias durante o processo de trituração, já que o uso recorrente do moinho poderia levar a um aumento de temperatura.

2.2.2 Extrações aquosas a temperatura ambiente e a quente

Após a obtenção da biomassa de *B. bifurcata* e de *Fucus* sp., tanto seca na estufa como liofilizada, estas foram usadas para fazer dois tipos de extração aquosa, uma extração a quente (90 °C) e outra extração à temperatura ambiente. O método usado para fazer estas extrações foi diferente quando comparado à primeira extração. Foram realizadas extrações mais curtas de apenas 1 ou 2 horas como é descrito mais à frente, em vez de 1 dia, já que não é plausível que o ganho em termos de rendimento seja significativamente maior para uma extração que demora muito mais tempo.

Para as extrações aquosas foi usada uma relação de 1,5 %m/V para os dois tipos de extrações. No caso da extração à temperatura ambiente a solução ficou em agitação durante 1 hora, antes de esta ser centrifugada durante 20 minutos a 15000 rpm e 4°C. O pellet remanescente da centrifugação foi removido e utilizado de novo para uma nova extração de 1 hora com a adição de água de forma a ficar com o mesmo volume que na primeira extração. Passada essa hora a solução foi de novo centrifugada às mesmas condições sendo o pellet desta vez removido e armazenado para futuras análises. Quanto ao sobrenadante da 1ª extração e da 2ª foram misturados e posteriormente filtrados através de um filtro de fibra de vidro com poros de 1,6 µm. O extrato obtido foi por fim liofilizado.

Em relação à extração a quente foi realizada de forma semelhante à extração à temperatura ambiente, porém a placa de aquecimento foi previamente aquecida até aos 90°C e a solução foi deixada em agitação durante 1 hora. Após passar essa hora a solução teve o mesmo tratamento em relação à outra extração com a diferença de não ter havido uma segunda extração. Ou seja, após a centrifugação o sobrenadante foi logo filtrado e posteriormente liofilizado, ao passo que o pellet foi armazenado. Após as extrações foram

obtidos oito extratos aquosos e os respectivos resíduos, que estão sumariados na tabela I. A sequência de procedimentos desde a colheita até à extração das amostras de algas está sumariada na figura 9.

Tabela I - Extratos aquosos e resíduos obtidos após as extrações realizadas.

Extratos	Códigos dos extratos	Resíduos	Códigos dos resíduos
Extração de <i>Bifurcaria</i> seca à temperatura ambiente	EBSTA	Resíduo de <i>Bifurcaria</i> seca à temperatura ambiente	RBSTA
Extração de <i>Bifurcaria</i> liofilizada à temperatura ambiente	EBLTA	Resíduo de <i>Bifurcaria</i> liofilizada à temperatura ambiente	RBLTA
Extração de <i>Bifurcaria</i> seca à temperatura de 90 °C	EBSTQ	Resíduo de <i>Bifurcaria</i> seca à temperatura de 90 °C	RBSTQ
Extração de <i>Bifurcaria</i> liofilizada à temperatura de 90 °C	EBLTQ	Resíduo de <i>Bifurcaria</i> liofilizada à temperatura de 90 °C	RBLTQ
Extração de <i>Fucus</i> seca à temperatura ambiente	EFSTA	Resíduo de <i>Fucus</i> seca à temperatura ambiente	RFSTA
Extração de <i>Fucus</i> liofilizada à temperatura ambiente	EFLTA	Resíduo de <i>Fucus</i> liofilizada à temperatura ambiente	RFLTA
Extração de <i>Fucus</i> seca à temperatura de 90 °C	EFSTQ	Resíduo de <i>Fucus</i> seca à temperatura de 90 °C	RFSTQ
Extração de <i>Fucus</i> liofilizada à temperatura de 90 °C	EFLTQ	Resíduo de <i>Fucus</i> liofilizada à temperatura de 90 °C	RFLTQ

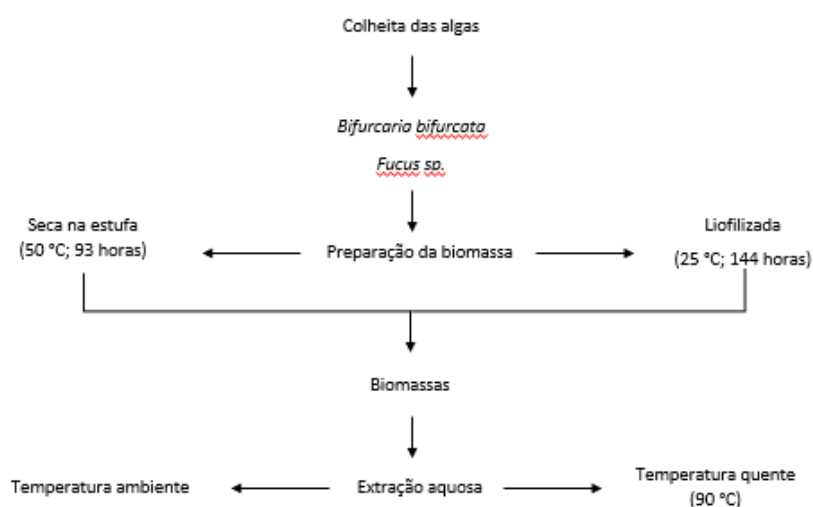


Figura 9 - Representação esquemática da colheita e preparação das amostras até à extração.

2.3 Análise de açúcares neutros

A composição em açúcares neutros da biomassa das algas castanhas *B. bifurcata* e *Fucus* sp. e dos respectivos extratos aquosos foi determinada de acordo com o procedimento proposto por Coimbra et al. (1996). Para realizar a análise de açúcares foi primeiramente feita uma hidrólise com o propósito de quebrar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos. Para isso, foram pesados com rigor 2 a 3 mg de amostra para um tubo de cultura, seguido da adição de 200 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 72%). Os tubos foram posteriormente deixados a incubar durante 3 horas e no fim deste tempo foram bem agitados. Posteriormente, foi adicionado a cada um dos tubos mais 2,2 ml de água destilada e os tubos foram deixados num bloco de aquecimento a 100 °C durante 2:30 horas para que ocorra a hidrólise. No entanto, após 1 h os tubos foram retirados do bloco de aquecimento para retirar 0,5 ml do hidrolisado para um novo tubo, para futura análise dos ácidos urónicos, e voltaram-se a colocar os tubos por mais 1:30h. Após a hidrólise ter ocorrido foi adicionado para cada tubo 200 µl de 2-desoxiglucose (1 mg/ml) para servir de padrão interno. De seguida, foi feita a redução dos açúcares para que as diferentes formas em que ocorrem os monossacarídeos se tornem em apenas uma forma, evitando a obtenção de vários picos por cada monossacarídeo após as amostras serem analisadas por cromatografia em fase gasosa. Assim, foi transferido 1 ml de cada um dos hidrolisados para um novo tubo de cultura, os quais foram neutralizados com amónia (NH₃) e reduzidos com 100 µl de uma solução de NaBH₄ (15 %m/v) preparado em NH₃ 3M durante 1 hora a 30°C.

O último passo para a preparação das amostras para a análise de açúcares foi a acetilação, realizada com o objetivo de tornar os monossacarídeos em acetatos de alditol voláteis para que possam ser analisados com recurso à cromatografia em fase gasosa. Assim, após a redução ter ocorrido foi adicionado ácido acético glacial e posteriormente transferidos 300 µl de amostra para novos tubos soviel. Para cada um dos novos tubos foi adicionado 450 µl de 1-metilimidazol e 3 ml de anidrido acético e, de seguida, os tubos foram bem agitados e incubados no bloco de aquecimento a 30 °C durante 30 minutos. Depois de terem passado os 30 minutos, foram adicionados 3 ml de água destilada e 2,5 ml de diclorometano. Os tubos são novamente muito bem agitados e centrifugados durante 30 segundos a 3000 rpm para permitir a separação das duas fases. Posteriormente, a fase aquosa foi expirada através de sucção e o procedimento de adição de água destilada e diclorometano e posterior agitação, centrifugação e remoção da fase aquosa foi repetido mais uma vez. Foram ainda feitas mais duas lavagens da fase orgânica, porém desta vez

apenas a água destilada foi adicionada. Por fim o diclorometano foi evaporado na *speedvac*. Após estar completamente evaporado foi repetido duas vezes o procedimento de adicionar 1 ml de acetona anidra e evaporado na *speedvac* para garantir que a água saiu toda da amostra.

A análise das amostras foi realizada através de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID). Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 50 µl de acetona anidra e dessa amostra 2 µl foram injetados no cromatógrafo Perkin Elmer – Claus 400 que tem uma coluna capilar DB-225 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura. Para a análise foram utilizadas temperaturas de 220 e 230 °C, respetivamente para o injetor e o detector. A temperatura inicial de 200 °C teve um aumento até 220 °C a 40 °C/min, à qual se manteve durante 7 minutos. De seguida houve um aumento até 230 °C a 20 °C/min, temperatura à qual ficou durante 1 minuto.

A análise de açúcares neutros foi efetuada em duplicado e os monossacarídeos foram identificados através do tempo de retenção e por comparação com padrões.

2.4 Análise de ácidos urónicos

A análise dos ácidos urónicos foi determinada a partir de o método colorimétrico proposto por Coimbra et al. (1996), com algumas alterações. As biomassas das macroalgas castanhas e os extratos aquosos, após submetidos a uma pré-hidrólise de 3 h e a uma hidrólise de 1 h a 100 °C em ácido sulfúrico a 1 M, foram diluídas com 3 ml de água destilada, devido ao elevado valor de ácidos urónicos nas amostras. De seguida foi pipetado 0,1 ml de cada amostra e cada padrão para tubos de cultura em triplicado de forma a ficar com um branco e duas réplicas. Todos os tubos de gelo foram deixados em um banho de gelo e foi adicionado a cada um 1 ml de borato de sódio 50 mM preparado em ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram agitadas durante alguns segundos de forma a permitir que o ácido se misture bem com a solução já que este é algo viscoso. As amostras foram de seguida colocadas em um banho a 100 °C durante 10 minutos e posteriormente arrefecidas em um banho de gelo. Depois de arrefecidos os tubos, foi adicionado em 2 tubos de cada amostra e padrão 20 µl de MFF (*m*-fenilfenol, 15% (m/v) em 0,5 % (m/v) NaOH) de forma a deixar um último tubo para o branco, já que o MFF é o reagente responsável por dar cor à solução devido à presença dos ácidos urónicos, com os tubos a serem novamente agitados durante alguns segundos para que a solução se misturasse bem. Por fim foram pipetados 300 µl de cada tubo de cultura para microplaca de 96 poços para ter posteriormente as suas absorvâncias lidas a 520 nm no leitor de microplacas (BioTek Eon, Singapura). O teor em ácidos urónicos foi determinado com

recurso a uma reta de calibração de ácido galacturónico, preparado com concentrações entre 0 e 100 µg/ml.

2.5 Quantificação do teor total de compostos fenólicos

O ensaio Folin-Ciocalteu é um dos mais utilizados quando o objetivo é determinar a concentração de compostos fenólicos totais em amostras de frutas, vegetais e bebidas. Os compostos fenólicos são responsáveis pela redução do reagente Folin para molibdénio-tungsténio, passando de uma cor amarela para azul. A intensidade da cor aumenta linearmente consoante a concentração de compostos fenólicos presentes em solução quando analisado espectralmente a 750 nm (Malta & Liu, 2014; Munteanu & Apetrei, 2021). A simplicidade, rapidez e fácil reprodutibilidade deste método faz com que este seja muito utilizado para analisar apenas a quantidade de compostos fenólicos das amostras. Porém, pelo facto do reagente reagir também com outros compostos oxidáveis como o ácido ascórbico, aminas, aminoácidos aromáticos e proteínas, poderá resultar numa sobre estimativa (Malta & Liu, 2014).

Para cada extrato aquoso foi pesado 1 mg de amostra e diluído em 1 ml de água obtendo soluções com uma concentração de 1 mg/ml. No caso do extrato de *U. pinnatifida* foi usada a solução mãe enquanto no caso dos extratos de *B. bifurcata* e *Fucus* sp. foi necessário diluir 10 vezes. Em relação aos extratos etanólicos foi necessário dissolver a amostra em um volume conhecido de etanol após terem ido à *speedvac*. Como a amostra estava consideravelmente mais concentrada em relação aos extratos aquosos foi necessário fazer várias diluições para perceber qual se enquadrava melhor dentro da curva de calibração. Após a diluição do extrato etanólico em etanol foram obtidas as soluções mãe de concentração 28,6 mg/ml para *U. pinnatifida*, 39,9 mg/ml para *Fucus* sp. e 53,7 mg/ml para *B. bifurcata*. Os extratos etanólicos, tiveram de ser todos diluídos 10 vezes.

Para determinar os compostos fenólicos foram preparadas soluções de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7 % (m/v). O carbonato de sódio tem como função impedir a formação de precipitado na solução (Rizvi et al., 2023). O reagente Folin foi diluído em água destilada numa diluição 1:10 tanto para as extrações aquosas quanto as etanólicas e, posteriormente, foi mantido no escuro e em agitação até ser pipetado para as microplacas de 96 poços. O ácido gálico (0,025 mg/ml) foi utilizado como padrão, tendo sido construída uma reta de calibração numa gama de concentrações entre 0 e 0,025 mg/ml. Posteriormente, foi pipetado em triplicado 30 µl de cada padrão/amostra para os poços de

uma microplaca e adicionado mais 150 µl do reagente Folin diluído 10 vezes. A placa ficou a incubar durante 5 minutos, após este tempo, foi adicionado 120 µl de Na₂CO₃ a 7 % (m/v) e a placa foi novamente incubada durante 1 hora a 30 °C antes de ser lida a absorvância a 750 nm num leitor de placas (marca). O teor de compostos fenólicos totais nas macroalgas e respetivos extratos foi expresso em mg de equivalentes em ácido gálico por g de extrato.

2.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS

O teste ABTS foi primeiramente desenvolvido por Miller et al., (1993), como forma de medir a capacidade antioxidante em amostras através do 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS). Este método tornou-se muito popular para medir a capacidade antioxidante em produtos alimentares, nomeadamente por ser barato e de fácil execução, permitir a determinação em ambientes hidrofílicos ou lipofílicos e permitir a determinação de uma elevada quantidade de antioxidantes diferentes (Munteanu & Apetrei, 2021).

O ABTS é uma substância que não apresenta cor, porém quando na presença de um poderoso antioxidante como o persulfato de potássio, este acaba por formar um radical catião estável (ABTS^{•+}), o qual apresenta cor azul-esverdeada. Apesar de terem sido usadas várias substâncias para gerar ABTS^{•+} a mais usada atualmente é o persulfato de potássio. Na presença de um antioxidante o ABTS^{•+} é reduzido de volta para ABTS, fazendo com que a cor fique mais clara. Por esta razão com o recurso a um espectrofotómetro é possível quantificar a presença de antioxidantes usando um comprimento de onda de 734 nm (Munteanu & Apetrei, 2021).

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS foi usada a diluição mãe para o extrato aquoso de *U. pinnatifida*, enquanto as amostras dos extratos aquosos de *Fucus* sp. e *B. bifurcata* foi preciso diluir 10 vezes. Quanto aos extratos etanólicos as soluções mãe (28,6 mg/ml para *U. pinnatifida*, 39,9 mg/ml para *Fucus* sp. e 53,7 mg/ml para *B. bifurcata*) de todos os extratos tiveram de ser diluídas 100 vezes.

Primeiramente foi preparada uma solução ABTS 7 mM em persulfato de potássio 2,45 mM e deixada durante a noite no escuro a 4 °C para formação do radical ABTS^{•+}. Esta solução foi depois diluída no solvente usado para as extrações (água destilada e etanol) até atingir uma absorvância que ficasse entre 0,7 e 0,8, tendo o cuidado de manter sempre a solução no escuro e em agitação.

Como padrão utilizou-se o ácido gálico (0,025 mg/ml), tendo sido preparada uma reta de calibração numa gama de concentrações entre 0 e 0,0175 mg/ml. Após terem sido preparadas as soluções foram pipetados para os poços da microplaca 50 µl de cada padrão/ amostra, em triplicado, e adicionados 250 µl de ABTS. Foi também pipetado 50 µl de amostra e 250 µl de solvente (branco da amostra). As pipetagens foram realizadas na hotte no escuro para que o ABTS não perdesse o seu efeito antioxidante. Por fim a placa ficou a incubar durante 20 minutos antes de ser lida a absorvância a 734 nm. Os valores obtidos foram expressos em mg de equivalentes em ácido gálico por g de extrato.

2.7 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) é um radical que quando se encontra em solução ganha cor violeta. Ao reagir com antioxidantes, este radical é neutralizado devido à doação de eletrões por parte dos antioxidantes, o que resulta numa mudança de cor para amarelo-claro. Esta mudança de cor permite então determinar a quantidade total de antioxidantes através de espectrofotometria, lendo a absorvância da solução a 517 nm (Malta & Liu, 2014; Munteanu & Apetrei, 2021). O radical DPPH dissolve-se em solventes orgânicos como o etanol ou metanol, mas tem baixa solubilidade em meios aquosos, pelo que para realizar o ensaio em amostras aquosas, é preciso ter em atenção que a quantidade de água presente na amostra não deve exceder os 60 %, caso contrário há o risco do radical não se dissolver (Munteanu & Apetrei, 2021).

Para o protocolo DPPH foram usadas as concentrações mãe (1 mg/ml) de todos os extratos aquosos. Quanto aos extratos etanólicos as concentrações mãe (28,6 mg/ml para *U. pinnatifida*, 39,9 mg/ml para *Fucus* sp. e 53,7 mg/ml para *B. bifurcata*) tiveram de ser todas diluídas 100 vezes para poder realizar o método.

A solução de DPPH foi preparada dissolvendo 3,4 mg de DPPH em etanol para ambos os tipos de extração. O etanol foi sendo adicionado aos poucos e foi sendo lida a absorvância da solução a 517 nm até obter uma absorvância entre 0,75 e 0,8, mantendo a solução no escuro e em agitação até ser usada.

Como padrão foi usado ácido gálico (0,025 mg/ml), tendo sido realizada uma reta de calibração com concentrações entre 0 e 0,025 mg/ml. Por fim, foi adicionado a uma microplaca de 96 poços 50 µl de cada padrão/amostra 250 µl da solução de (DPPH[•]) em triplicado. A microplaca foi incubada no escuro durante 30 minutos e a absorvância foi lida a 517 nm. Os valores obtidos foram expressos em mg de equivalentes em ácido gálico por g de extrato.

2.8 Determinação da quantidade de iodo

As biomassas iniciais liofilizadas e secas na estufa, assim como os extratos obtidos das extrações à temperatura ambiente e a quente e respectivos resíduos, foram alvo da análise da quantidade de iodo. Inicialmente, as biomassas após serem trituradas foram peneiradas num peneiro de 200 μm como recomendado por Fecher et al., (1998) para uma adequada determinação de iodo em algas. As biomassas (tamanho inferior a 200 μm) foram armazenadas a 4 °C e os respectivos porta-amostras isoladas com parafilme até a realização da análise.

A análise do iodo foi feita de acordo com um método referenciado e aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA) para análise de iodo em alimentos como proposto por Gray & Todorov, (2017).

2.8.1 Extração alcalina

As 20 amostras foram pesadas em duplicado para tubos “autosampler” próprios (polipropileno, com uma quantidade muito baixa de metais) para o procedimento de extração do iodo. No caso das biomassas foi pesado cerca de 0,5 g de amostra para os tubos, enquanto no caso dos extratos aquosos e dos resíduos foi pesado apenas cerca de 0,25 g, para permitir uma boa solubilidade/dispersão das amostras. Posteriormente foram adicionados 8 ml de água ultrapura miliQ e 2 ml de hidróxido de tetrametilamónio 25 % (TMAH) a todos os tubos, de forma a obter uma solução com TMAH 5 %, e os tubos foram agitados por cerca de 20 segundos cada. Foram ainda usados 3 brancos. Em 2 brancos foi adicionado 0,5 g de água em tubos aleatórios em vez de amostra com o restante procedimento a ser realizado de igual forma. Estes dois brancos têm como objetivo verificar uma possível contaminação nos tubos usados. No outro branco foi apenas adicionado água, já que este foi o tubo no qual foi colocado o termómetro para controlar a temperatura do bloco de aquecimento.

A extração alcalina ocorreu durante 3 horas (figura 10). Durante os primeiros 30 minutos a temperatura foi subindo continuamente até chegar aos 85 °C e de seguida ficou 150 minutos a esta temperatura. Após a digestão, as amostras ficaram mais 2 horas no bloco de aquecimento até que a sua temperatura descesse para menos de 30 °C.

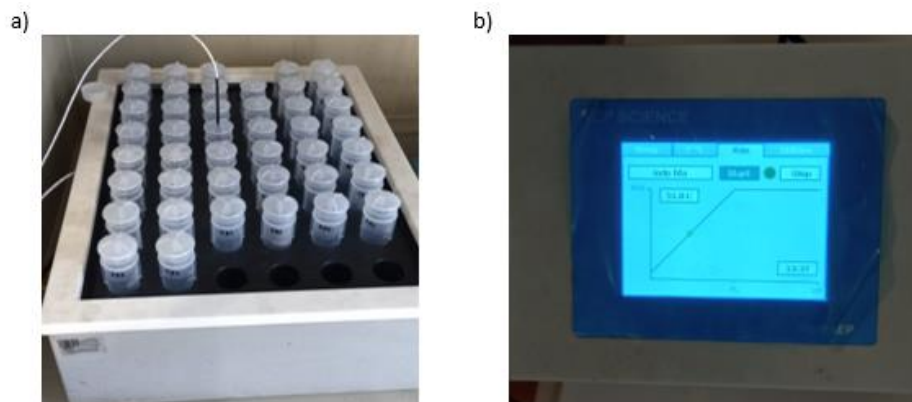


Figura 10 – a) Bloco de aquecimento onde ocorreu a extração do iodo das amostras durante 3 horas e b) monitor de controle da temperatura do bloco de aquecimento.

As amostras resultantes após a extração foram depois transferidas para novos tubos próprios para a centrifugação e diluídas até cerca de 10 ml. Os tubos da centrifuga foram pesados quando estavam vazios e com a amostra, para determinar a concentração de amostra (m/m). De seguida, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 3 minutos e os sobrenadantes foram obtidos.

2.8.2 Análise de iodo no ICP-MS

A determinação da quantidade de iodo nas biomassas e extratos foi realizada no espectrómetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) Aligent 7700 Series equipado com "nickel sampler" e "skimmer cones" (figura 11). Os parâmetros do ICP-MS foram selecionados de acordo com Gray & Todorov (2017). O ICP-MS foi usado no modo "no cell gas", com o 103 Rh usado como padrão interno e um tempo de integração de 0,3 segundos. Os extratos de TMAH foram convenientemente diluídos com 1% TMAH antes da medição no ICP-MS para ajustar a faixa de calibração. O limite de quantificação do método 0,05 mg/kg (baseado na porção analítica de 0,5 g e 50 g de solução analítica) e os brancos estiveram sempre abaixo do limite de deteção. A média da diferença relativa entre as amostras duplicadas (n=20) foi de 6 % com máximo de 14 %. As recuperações de determinações fortificadas variaram entre 106 e 111 %.



Figura 11 - ICP-MS Aligent 7700 Series.

3 Resultados e discussão

3.1 Amostras set 1: obtenção de extratos antioxidantes

No primeiro set de amostras, foram usados dois solventes distintos, água destilada e etanol 100%, com o objetivo obter extratos antioxidantes, com potencial para serem utilizados em produtos alimentares, tornando-os mais saudáveis.

3.1.1 Rendimento das extrações aquosas e etanólicas a temperatura ambiente

Foi avaliado o rendimento das extrações aquosas e etanólicas para determinar quais as algas castanhas e qual solvente tem maior capacidade de extratabilidade. Como é possível observar pela figura 12 a, a extração aquosa à temperatura ambiente permitiu obter um rendimento bastante superior quando comparado com a extração etanólica também à temperatura ambiente (figura 12 b). O rendimento dos extratos aquosos variou entre 11,43% e 14,08%, enquanto nos extratos etanólicos variou entre 2,32% e 7,07%. Isto acontece porque a maior parte dos componentes das algas são hidrofílicos, pelo que são mais facilmente extraídos por solventes com maior polaridade, como a água. É o caso dos polissacarídeos e proteínas que devido à sua polaridade são extraídos apenas por solventes polares (Sabeena Farvin & Jacobsen, 2013). Estes resultados estão de acordo com Sabeena Farvin & Jacobsen (2013) e Nunes et al. (2018) que verificaram que extratos aquosos de algas têm um rendimento significativamente maior quando comparado com os respectivos extratos etanólicos. Ao observar a figura 12 verifica-se ainda que a *B. bifurcata* mostrou ser a alga com maior rendimento de extração para os dois solventes usados.

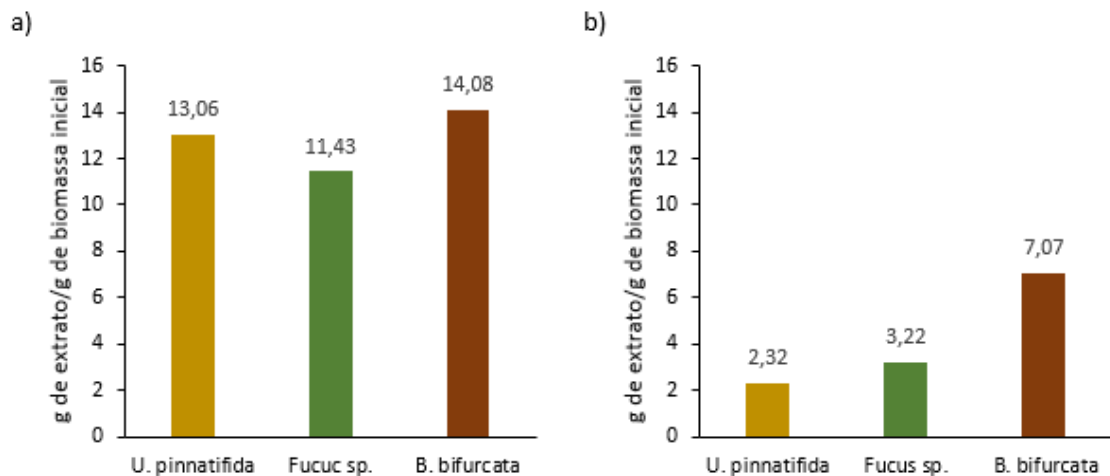


Figura 12 - Rendimento dos extratos aquosos (a) e etanólicos (b) de *U. pinnatifida*, *Fucus sp.* e *B. bifurcata* na primeira extração.

3.1.2 Determinação de compostos fenólicos

A determinação da quantidade de compostos fenólicos presente nas amostras foi realizada através do método Folin. A partir da figura 13 é possível observar que a *U. pinnatifida* apresentou a menor quantidade de compostos fenólicos principalmente para a extração aquosa, apenas $4,71 \pm 0,33$ mg EAG/g extrato. Quanto à macroalga *Fucus sp.*, esta apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais no extrato aquoso ($27,02 \pm 1,44$ mg EAG/g extrato) enquanto para o extrato etanólico apresentou um menor valor ($15,04 \pm 1,32$ mg EAG/g extrato). Porém este último valor poderá estar subestimado já que esta alga é uma das que apresenta maior quantidade de compostos fenólicos. Mekinić et al. (2019) compilou uma série de estudos acerca da quantidade de compostos fenólicos em algas castanhas e, apesar de estes estudos terem várias variáveis que podem alterar a quantidade extraída, denotou-se que as algas do género *Fucus*, em geral, apresentavam sempre valores bastante altos (14,8 – 134 mg EAG/g em extratos aquosos).

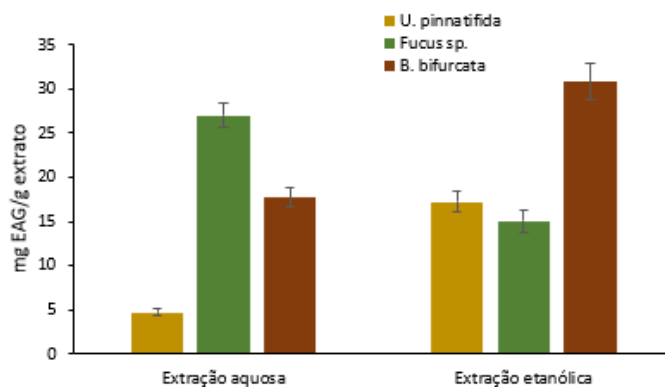


Figura 13 - Concentração de compostos fenólicos nos extratos aquosos e etanólicos das algas *U. pinnatifida*, *Fucus sp.* e *B. bifurcata*, representada por mg EAG/g extrato. Foram realizadas 3 réplicas.

Comparando os dois tipos de solventes usados para a extração, água e etanol, ambos estão entre os solventes que normalmente são utilizados para levar a cabo extrações cujo objetivo é extrair compostos fenólicos, assim como os solventes metanol e a acetona. Desta forma verifica-se que ambos os solventes são uma boa escolha quando o objetivo é extrair este tipo de compostos apesar de a maior parte deles ser considerado hidrofílico e por isso ter maior afinidade com a água (Boeing et al., 2014).

Os compostos fenólicos são um dos maiores e mais bem distribuídos grupos de substâncias no reino das plantas contabilizando mais de 8000 estruturas conhecidas até hoje (Bravo, 1998). Estes compostos apresentam uma elevada atividade biológica e devido à elevada quantidade presente nas algas, estes apresentam uma grande importância. Os estudos realizados mostram também que os compostos fenólicos estão presentes em maior quantidade em algas castanhas e apresentam maior capacidade antioxidante quando comparado com as algas verdes e vermelhas (Mekinić et al., 2019).

3.1.3 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos diversos extratos obtidos foi determinada através de dois métodos, o método ABTS e o método DPPH, com os respetivos resultados representados na figura 14 a e b. No caso do ensaio ABTS, os valores variam entre $6,49 \pm 0,39$ mg EAA/g extrato para o extrato aquoso de *U. pinnatifida* e $34,97 \pm 3,68$ mg EAA/g extrato para o extrato aquoso de *Fucus sp.* Por outro lado, no ensaio DPPH os valores encontram-se entre $0,24 \pm 0,04$ mg EAG/g extrato para o extrato aquoso de *U. pinnatifida* e $2,95 \pm 0,51$ mg EAG/g extrato para o extrato etanólico de *B. bifurcata*. A diferença de valores obtidos pelo método de ABTS e DPPH poderá estar relacionada com o padrão

usado na quantificação do potencial antioxidante, visto que no ABTS o padrão usado é o ácido gálico, enquanto que no método de ABTS é o ácido ascórbico.

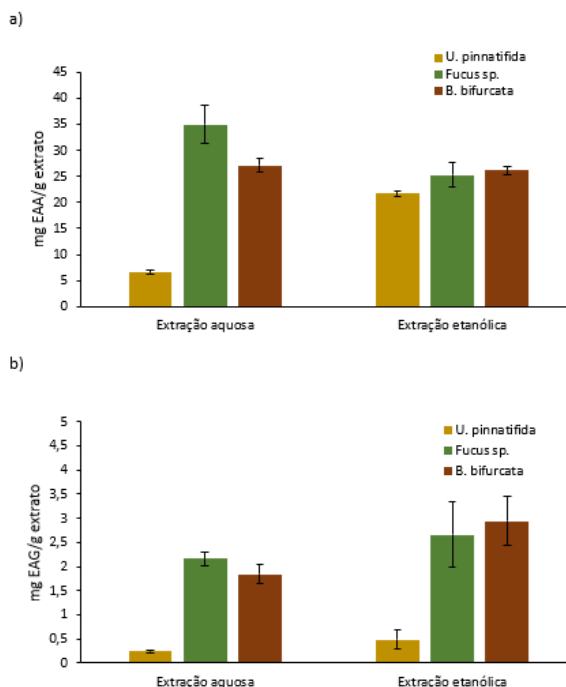


Figura 14 - Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos das algas *U. pinnatifida*, *Fucus sp.* e *B. bifurcata* através do método a) ABTS (expresso em mg de equivalentes de ácido ascórbico por g de extrato) e b) DPPH (expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato). Foram realizadas 2 réplicas para o ensaio ABTS e 3 réplicas para o ensaio DPPH.

A partir da figura 14 a e b é ainda possível perceber que a *U. pinnatifida* apresenta menor capacidade antioxidante, apresentando valores consideravelmente mais baixos tanto na análise da atividade antioxidante por ABTS (figura 14 a), como por DPPH (Figura 14 b). A menor capacidade antioxidante de extratos de *U. pinnatifida* pode ser justificada pelo facto de esta apresentar menor quantidade de compostos fenólicos (figura 13, secção 4.1.2), já que estes são considerados um dos compostos com maior poder antioxidante e constituem um dos principais grupos de antioxidantes nas algas (Ismail et al., 2023).

3.2 Amostras set 2: avaliação do impacto método de secagem nas algas

Com o objetivo de avaliar o impacto do método de secagem na volatilização do iodo, foram preparadas mais 4 biomassas: *Fucus* sp. *B. bifurcata* secas na estufa a 50 °C e liofilizadas. Além disso, foram ainda realizadas duas extrações aquosas a estas biomassas, à temperatura ambiente e a quente, de forma a avaliar o efeito do tempo/temperatura da extração nos compostos antioxidantes e no iodo.

O etanol já não foi usado como solvente de extração, uma vez que o seu rendimento era demasiado baixo. Mesmo que fosse possível extrair uma boa quantidade de iodo a partir das biomassas, também era importante extrair outros compostos e nutrientes, como proteína, polissacarídeos e outros minerais, já que os extratos se destinavam a ser usados em um produto alimentar.

É importante referir que, antes de ocorrer as extrações, a biomassa foi bem triturada. Este passo é importante para permitir a redução do tamanho das partículas aumentando por outro lado a área de superfície da alga que está em contacto com o solvente usado na extração (Michalak & Chojnacka, 2014).

3.2.1 Rendimento das extrações aquosas à temperatura ambiente e a quente

O rendimento das extrações aquosas das macroalgas castanhas *B. bifurcata* e *Fucus* sp. secas com recurso a estufa e liofilizador, feitas com recurso a duas temperaturas diferentes, temperatura ambiente (cerca de 25 °C graus) e a 90 °C, foi determinado com o objetivo de perceber se a temperatura de extração pode interferir no rendimento da mesma. A partir da observação da figura 15 a e b é possível verificar que, tanto no caso das extrações aquosas da macroalga *B. bifurcata* como da macroalga *Fucus* sp., o rendimento foi maior quando a macroalga foi liofilizada. Estas observações poderão dar a entender que estas algas apresentam compostos que possivelmente volatilizaram-se devido ao efeito da temperatura (50 °C), dando origem a rendimentos inferiores. As algas são um grupo conhecido por produzir um grande espectro de metabolitos voláteis, que variam entre as diferentes algas e também consoante as condições ambientais em que a alga se encontra (Garicano Vilar et al., 2020). Por serem seres vivos imóveis, as algas têm de encontrar formas de se adaptar ao meio que as rodeia. Os metabolitos voláteis que estas libertam para o meio em seu redor desempenham papéis de grande importância como mecanismos de defesa contra animais herbívoros, bactérias e fungos, ou como feromonas

sexuais permitindo assim a reprodução (Gressler et al., 2010; López-Pérez et al., 2017). São ainda responsáveis por várias características sensoriais como o sabor ou o cheiro destas (Garicano Vilar et al., 2020; S. Li et al., 2023; López-Pérez et al., 2017). No caso das algas castanhas, os metabolitos voláteis de maior relevância são os terpenóides, polifenóis, e metabolitos C₁₁ como os C₁₁-hidrocarbonetos ou componentes de enxofre C₁₁ (Narain, 2018; Schnitzler et al., 2001). Outra possibilidade para o menor rendimento de extração das algas secas na estufa é a possível existência de alguma água residual na sua biomassa.

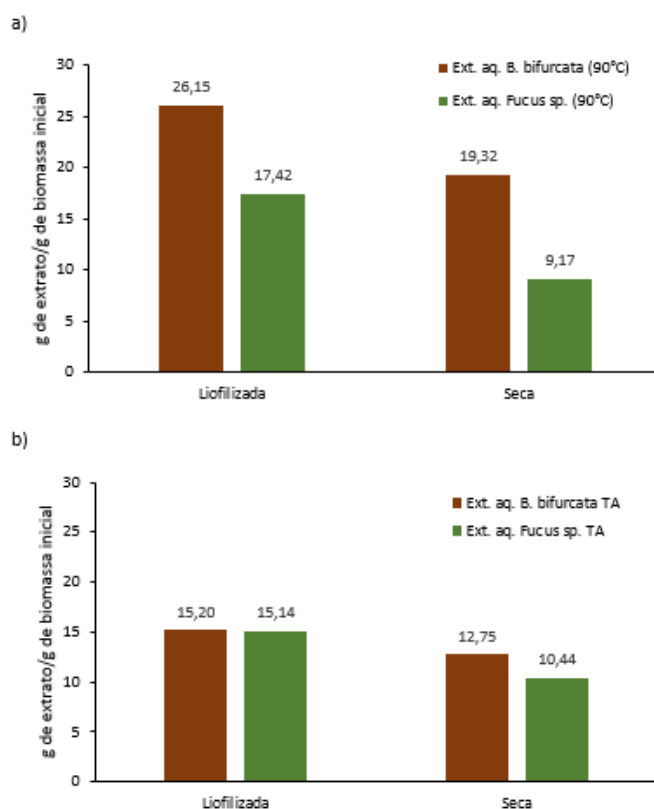


Figura 15 - Rendimento das extrações realizadas a) a 90 °C e b) à temperatura ambiente (TA).

Quanto à diferença de temperatura durante o processo de extração verificou-se que no caso da *B. bifurcata* a extração a 90 °C (figura 15 a) obteve um maior rendimento (19,32 e 26,15 %) quando comparado com a extração à temperatura ambiente (figura 15 b, 12,75 e 15,20 %), mesmo apenas com uma extração, visto que à temperatura ambiente foram realizadas duas extrações sequenciais. No caso da macroalga *Fucus sp.*, o rendimento não diferiu muito entre as duas temperaturas usadas.

Comparando a primeira extração (set 1) e a segunda extração aquosa (set 2), realizadas à temperatura ambiente, verificou-se que o rendimento na segunda extração foi idêntico, pelo que não há a necessidade de usar o primeiro método de extração, que é muito mais demorado (24 h).

3.2.2 Polissacarídeos

As biomassas das macroalgas castanhas, assim como seus respectivos extratos aquosos apresentaram uma elevada quantidade de polissacarídeos, variando entre 33,9 e 49,7 % m/m da massa total (tabela II). Estes resultados estão de acordo com a literatura, já que as algas marinhas são conhecidas pela quantidade elevada de polissacarídeos, podendo variar entre 4 a 76 % do seu peso seco (Holdt & Kraan, 2011). As algas castanhas apresentam nomeadamente 3 tipos de polissacarídeos: alginatos, fucoidanas e laminaranas. Apesar destes não conferirem valor energético à comida, são considerados fibras dietéticas com potencial prebiótico (Tagliapietra & Clerici, 2023).

Os polissacarídeos são o composto presente em maior quantidade nestas duas algas castanhas. A quantidade de polissacarídeos presentes nas biomassas mostrou ser semelhante variando entre 36,5 - 38,0 % m/m para a *B. bifurcata* e 35,7 - 38,3 % m/m na *Fucus* sp. Porém, os resultados obtidos mostraram que a extração aquosa de *B. bifurcata* permitiu a obtenção de extratos mais ricos em açúcares, com valores entre 44,6 – 49,7 % m/m. Os extratos aquosos obtidos de *Fucus* sp. contém um teor entre 33,9 – 43,1 % m/m de açúcares, estando estes valores de acordo com Catarino et al. (2018), que juntou os valores obtidos por vários autores, onde obteve valores que variavam entre 26 e 66% m/m.

Tabela II - Percentagem molar (% mol) relativa de cada monossacarídeo e percentagem mássica do total de carboidratos presente nas biomassas e respectivos extratos aquosos. Foram realizadas 2 réplicas.

	Carboidratos (%mol)						Total carboidratos (% m/m)
	Fucose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose	Ácidos urónicos	
BBS	22,5 ± 3,2	1,1 ± 0,0	1,7 ± 0,2	3,3 ± 0,3	13,4 ± 0,8	57,9 ± 3,9	36,5 ± 2,8
BBL	22,0 ± 1,1	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	3,3 ± 0,1	14,8 ± 1,4	57,2 ± 2,3	38,0 ± 0,4
EBSTA	41,6 ± 0,2	0,8 ± 0,0	7,0 ± 0,7	5,1 ± 0,0	9,0 ± 0,1	36,6 ± 0,9	44,8 ± 1,0
EBSTQ	32,7 ± 0,8	1,3 ± 0,0	3,7 ± 0,2	4,7 ± 0,1	5,2 ± 0,2	52,4 ± 1,1	49,7 ± 1,2
EBLTA	49,2 ± 1,6	0,8 ± 0,0	4,4 ± 0,4	7,0 ± 0,0	10,7 ± 0,5	27,9 ± 0,8	45,0 ± 1,0
EBLTQ	31,9 ± 1,9	1,3 ± 0,1	3,3 ± 0,0	5,6 ± 0,1	7,4 ± 0,6	50,5 ± 2,7	44,6 ± 1,9
BFS	30,1 ± 0,5	3,0 ± 0,3	2,2 ± 0,6	4,3 ± 0,2	15,0 ± 0,3	45,4 ± 0,5	38,3 ± 1,4
BFL	28,0 ± 0,3	2,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2	4,1 ± 0,0	14,0 ± 1,1	49,4 ± 0,7	35,7 ± 2,5
EFSTA	15,2 ± 0,5	1,9 ± 0,0	7,1 ± 0,1	5,9 ± 0,1	21,4 ± 0,2	48,6 ± 0,5	37,0 ± 1,5
EFSTQ	24,7 ± 2,4	3,5 ± 0,1	7,6 ± 0,1	5,7 ± 0,4	18,0 ± 1,4	40,6 ± 4,3	34,6 ± 2,1
EFLTA	14,8 ± 2,3	1,5 ± 0,1	12,3 ± 3,6	5,6 ± 0,7	19,2 ± 3,2	46,7 ± 2,7	33,9 ± 4,1
EFLTQ	26,1 ± 0,4	2,8 ± 0,0	5,8 ± 0,8	5,0 ± 0,1	14,8 ± 0,5	45,4 ± 0,1	43,1 ± 1,4

BBS – biomassa *Bifurcaria* seca; BBL - biomassa *Bifurcaria* liofilizada; EBSTA – Ext. aquoso *Bifurcaria* seca à temperatura ambiente; EBSTQ – Ext. aquoso *Bifurcaria* seca à temperatura quente; EBLTA – Ext. aquoso *Bifurcaria* liofilizada à temperatura ambiente; EBLTQ – Ext. aquoso *Bifurcaria* liofilizada à temperatura quente; BFS – biomassa *Fucus* seca; BFL - biomassa *Fucus* liofilizada; EFSTA – Ext. aquoso *Fucus* seca à temperatura ambiente; EFSTQ – Ext. aquoso *Fucus* seca à temperatura quente; EFLTA – Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura ambiente; EFLTQ – Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura quente.

A partir dos resultados apresentados na tabela II, observa-se que a biomassa da *Bifurcaria* é maioritariamente constituída por ácidos urónicos (27,9 – 57,9 %mol), o que revela que esta alga é rica principalmente em alginato. Além disso, apresenta também elevados valores de fucose (22,0 – 49,2 %mol), indicando a presença de fucoidanas. A quantidade de glucose presente nas amostras mostra também a presença significativa de um terceiro polissacarídeo, como a laminarana que serve como reserva de açúcares.

Quanto à macroalga *Fucus*, esta também apresenta elevados valores de ácidos urónicos (40,6 – 49,4 %) revelando também uma elevada quantidade de alginato, embora em menor quantidade relativa comparativamente à *Bifurcaria*. Já em relação à fucoidana (14,8 – 30,1 % fucose) é também o segundo polissacarídeo mais presente, porém desta vez em uma proporção maior relativamente à *Bifurcaria*. Por fim as quantidades idênticas de glucose nas duas biomassas mostram que a proporção relativa de laminarana é idêntica nas duas espécies de algas.

Os valores de polissacarídeos presentes em *Fucus* sp. variam muito consoante a sazonalidade, condições ambientais e origem geográfica. Segundo a literatura, o alginato é o polissacarídeo presente em maior quantidade na *Fucus* sp. podendo chegar a cerca de 59% do peso seco., estando de acordo com os resultados obtidos. O alginato está presente

na parede celular das algas e apresenta um papel estrutural, dado que lhes confere flexibilidade. Assim, em zonas de maior turbulência, é normal encontrar algas com maior quantidade de alginato (Catarino et al., 2018).

A fucoidana é outro polissacarídeo presente em grandes quantidades no género *Fucus*, particularmente na espécie *F. vesiculosus*, onde pode chegar a cerca de 26% do peso seco da alga. Devido à elevada concentração de fucoidana presente, esta alga é normalmente utilizada como fonte de extração do polissacarídeo. Quanto à laminarana é um polissacarídeo presente em maior quantidade no género *Laminaria*. Apesar disso, também a ordem Fucales apresenta elevados valores de laminarana, sendo que a espécie *F. serratus* é considerada a espécie com maior quantidade deste polissacarídeo, excluindo as Laminariales, podendo chegar a cerca de 19% do peso seco (Catarino et al., 2018).

A temperatura mais alta influencia positivamente o rendimento de extração dos polissacarídeos fucoidana e alginato já que facilita a destruição da parede celular e a solubilidade dos polissacarídeos (Arvizu-Higuera et al., 1996; Ptak et al., 2019).

3.2.3 Atividade antioxidante e compostos fenólicos

As algas castanhas são conhecidas por produzirem vários compostos com elevada capacidade biológica. Entre estes compostos um dos grupos mais importantes são os compostos fenólicos responsáveis por protegê-las contra fatores externos, aos quais estas estão frequentemente expostas e não podem fugir já que estão imóveis (Mekinić et al., 2019).

Devido à importância que os compostos fenólicos têm para as algas e o potencial que têm como antioxidantes, a sua quantidade tem sido bastante estudada em várias algas principalmente castanhas. Porém estabelecer comparações entre diferentes estudos é muito complicado devido ao tipo de extração (solventes, tempo e técnica), o padrão usado, a forma de expressar os resultados e ainda o período e região de colheita e a idade das algas (Mekinić et al., 2019; Silva et al., 2021).

A partir dos resultados da tabela III é possível perceber que os extratos provenientes da *Bifurcaria bifurcata* apresentam uma menor concentração de compostos fenólicos (24,37 – 55,15 mg EAG/g de extrato) quando comparados aos extratos de *Fucus* sp. (54,63 – 76,81 mg EAG/g de extrato). Apesar da dificuldade em estabelecer comparações entre estudos, estes resultados parecem estar de acordo com outros obtidos em estudos anteriores. Zubia et al., (2009) estudou a capacidade antioxidante de várias algas castanhas presentes na costa da Bretanha (França) entre as quais *B. bifurcata* e a

Fucus sp. Apesar de usar etanol como solvente para a extração das algas, este estudo mostrou que a *B. bifurcata* apresenta uma quantidade consideravelmente menor de compostos fenólicos (0,96 % em peso seco) em relação ao *Fucus* sp., (2,82 % peso seco). Num outro estudo, em que foram comparados extratos de diferentes algas, obtidos com vários tipos de solventes orgânicos Silva et al. (2021) também obteve resultados que mostraram uma quantidade de compostos fenólicos consideravelmente menores para a *B. bifurcata* para quase todos os solventes (Silva et al., 2021). A alga *Fucus* sp. tem sido reconhecida como uma alga muito rica em compostos fenólicos, nomeadamente devido à sua elevada quantidade de florotaninos (Heffernan et al., 2015; Wang et al., 2012).

A partir da tabela III é também possível perceber um padrão onde as biomassas das algas que foram secas a 50 °C durante 3 dias apresentam menor quantidade de compostos fenólicos quando comparadas com as algas em relação àquelas que foram liofilizadas. Devic et al., (2010) e; Djendoubi Mrad et al. (2012) estudaram o efeito da temperatura e do tempo de secagem na perda de compostos fenólicos em peras e maçãs e verificaram que uma secagem contínua ainda que a 30 e 45°C pode ser suficiente para reduzir consideravelmente a quantidade destes, caso a humidade seja baixa.

Tabela III - Resultados obtidos para os testes de atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e da quantidade de compostos fenólicos para cada um dos extratos obtidos. Foram realizadas 2 réplicas.

	Folin mg EAG/g de extrato	DPPH mg EAG/g de extrato	ABTS mg EAG/g de extrato
EBSTA	24,37 ± 0,13	3,67 ± 0,02	42,45 ± 1,65
EBSTQ	29,14 ± 0,13	6,92 ± 0,35	50,52 ± 0,36
EBLTA	54,14 ± 0,40	6,16 ± 0,63	59,80 ± 0,32
EBLTQ	55,15 ± 3,90	12,39 ± 0,86	74,51 ± 0,80
EFSTA	59,66 ± 4,32	7,26 ± 0,23	67,55 ± 8,27
EFSTQ	51,96 ± 2,34	8,35 ± 0,48	70,09 ± 1,51
EFLTA	76,81 ± 8,13	6,98 ± 1,58	78,73 ± 8,36
EFLTQ	54,63 ± 0,58	7,88 ± 0,22	72,22 ± 0,67

EBSTA – Ext. aquoso *Bifurcaria* seca à temperatura ambiente; EBSTQ – Ext. aquoso *Bifurcaria* seca à temperatura quente; EBLTA – Ext. aquoso *Bifurcaria* liofilizada à temperatura ambiente; EBLTQ – Ext. aquoso *Bifurcaria* liofilizada à temperatura quente; EFSTA – Ext. aquoso *Fucus* seca à temperatura ambiente; EFSTQ – Ext. aquoso *Fucus* seca à temperatura quente; EFLTA – Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura ambiente; EFLTQ – Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura quente.

Os métodos ABTS e DPPH são duas técnicas comumente usadas para avaliar a atividade antioxidante em vários produtos. Tendo em conta os dois métodos usados é possível perceber mais uma vez que os extratos de *Fucus* sp. apresentaram, em geral, um maior potencial antioxidante, o que está de acordo com a maior concentração de compostos fenólicos presentes na alga *Fucus* sp., uma vez que estes compostos são responsáveis por uma parte significativa do potencial antioxidante das algas (Bravo, 1998).

Os resultados da tabela III também estão de acordo com a literatura (Agregán et al., 2017) onde também se identificou uma maior capacidade antioxidante em extratos aquosos de *Fucus* sp. comparativamente aos extratos de *B. bifurcata* utilizando os métodos ABTS e DPPH (Agregán et al., 2017).

Os métodos ABTS e DPPH mostram ainda que os extratos obtidos com extrações a 90°C apresentaram em geral maior capacidade antioxidante. Isto pode acontecer devido ao aumento na solubilidade do soluto e coeficiente de difusão, apesar de alguns compostos fenólicos também poderem ser desnaturados com o aumento da temperatura (Spigno et al., 2007).

Ao contrário do que aconteceu no primeiro set de amostras, aqui os ensaios ABTS e DPPH foram realizados com o mesmo padrão (ácido gálico) pelo que a diferença de valores obtidos para os dois ensaios não está relacionada com o padrão. Neste caso, a maior atividade antioxidante aparentemente verificada no método ABTS é expectável, devido a interferências que podem surgir em ensaios espectrofotométricos onde é utilizado um comprimento de onda mais baixo, como é o caso do DPPH (515nm), em relação ao (730 nm) (Arnao, 2000). Ao comparar a atividade antioxidante em sumos e vinhos usando o método ABTS e DPPH Arnao (2000) verificou que os valores obtidos para o ensaio DPPH eram consideravelmente mais baixos uma vez que a presença de compostos com cor nas amostras faz com que a absorvância decresça. Também a possibilidade de ocorrência de reações secundárias pode ser uma interferência nomeadamente para comprimentos de onda baixos, contribuindo assim para a obtenção de valores mais baixos para o ensaio DPPH.

3.2.4 Iodo

O iodo é um mineral importante para o bom funcionamento da tiroide pelo que é recomendado a ingestão em média de 150 µg por dia para um adulto. Apesar de ser necessário pouca quantidade por dia, é um mineral que não se encontra presente em grandes quantidades na natureza, pelo que o uso de algas para obter a quantidade necessária pode ser recomendável, já que estas têm a capacidade de acumular grandes quantidades.

As duas algas usadas neste estudo, a *B. bifurcata* e a *Fucus* sp., foram alvo da quantificação do iodo tanto para a respetiva biomassa seca na estufa e liofilizada (figura

16), como para os extratos aquosos obtidos à temperatura ambiente e a 90 °C (figura 17 a) e respectivos resíduos (figura 17 b).

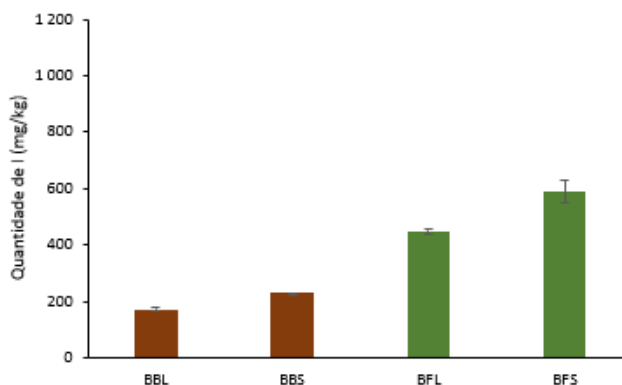


Figura 16 - Quantidade de iodo presente nas biomassas de *B. bifurcata* e *Fucus* sp. secas na estufa e liofilizadas. Foram realizadas 2 réplicas. BBS – biomassa *Bifurcaria* seca; BBL - biomassa *Bifurcaria* liofilizada; BFS – biomassa *Fucus* seca; BFL - biomassa *Fucus* liofilizada

Os resultados apresentados na figura 16 mostram que a biomassa da alga *Fucus* sp. apresentaram maior quantidade de iodo, 448 e 588 mg/kg relativamente à alga *B. bifurcata*, cujos valores variaram entre 171 e 229 mg/kg de iodo total. A comparação de valores relativos à quantidade de iodo em algas é complicada já que a concentração do mineral varia consoante vários fatores, como o local onde foi apanhado (temperatura, pH e salinidade), a época do ano e condições de armazenamento (Milinovic et al., 2021). Também a idade e condição da alga condicionam a quantidade de iodo presente, já que após parar de crescer a alga rapidamente começa a perder iodo (Teas et al., 2004). No entanto, a macroalga *Fucus* sp. é reconhecidamente uma alga com elevadas quantidades de iodo presente, que podem variar entre 276 até 734 mg/kg (Holdt & Kraan, 2011; Milinovic et al., 2021; Teas et al., 2004; Van Netten et al., 2000). Quanto à *B. bifurcata* a bibliografia é mais escassa. Milinovic et al., (2021) usou o método ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy) para quantificar o iodo em 10 algas da costa portuguesa. Neste estudo obteve 391 mg/kg de iodo total para a alga *B. bifurcata*. Apesar de ser um valor mais alto do que o obtido neste estudo, encontra-se na mesma ordem de valores.

De acordo com a figura 16, a biomassa que foi seca na estufa apresenta maior quantidade de iodo nas duas algas (229 e 588 mg/kg respetivamente para *Bifurcaria* e *Fucus*), relativamente às algas liofilizadas (171 e 448 mg/kg respetivamente para *Bifurcaria*

e *Fucus*). À partida seria de esperar que devido à volatilização de algumas espécies de iodo, houvesse maiores perdas nas biomassas que foram sujeitas a uma temperatura de secagem de 50 °C durante 93 horas. Porém a literatura tem mostrado que o uso de temperaturas altas para secar as amostras de algas não se traduz necessariamente numa perda de iodo. Stévant et al. (2018) analisou a quantidade de iodo em *Saccharina latissima* após secagem a 25, 40 e 70 °C, não obtendo diferenças estatisticamente significativas. Já (Nitschke & Stengel, (2016) quantificaram a quantidade de iodo em 3 algas frescas (*Alaria esculenta*, *Palmaria palmata* e *Ulva intestinalis*) bem como depois da lavagem das mesmas, não obtendo diferenças significativas. As algas foram depois sujeitas a 3 tipos de tratamento para secagem, através de secagem pelo ar a 23 °C, secagem no forno a 60 °C e liofilização. Em todos os tratamentos utilizados não se verificaram perdas significativas de iodo. O iodo das algas encontra-se maioritariamente na forma de I⁻ que não é volátil (Leblanc et al., 2006; Wren et al., 2000), razão pela qual as amostras de algas não perdem iodo de forma significativa durante o período de secagem.

Para a biomassa liofilizada foi notável uma maior perda de iodo relativamente à biomassa seca na estufa. Este resultado está de acordo com (Stévant et al., 2018), o qual também obteve perdas do iodo depois da liofilização para a alga *S. latissima*. As algas liofilizadas, apesar de terem estado sujeitas a temperaturas inferiores (cerca de 25 °C) relativamente à secagem na estufa (50 °C), foram sujeitas a mais horas de secagem (144 h), dado que o processo de liofilização foi mais demorado em relação à utilização da estufa (93 horas). Além disso, durante a liofilização as amostras foram sujeitas a baixas pressões (26,7 Pa), o que poderá ter também contribuído para a perda de iodo, devido à volatilização de algumas espécies como o iodo molecular (I₂) (Wren et al., 2000).

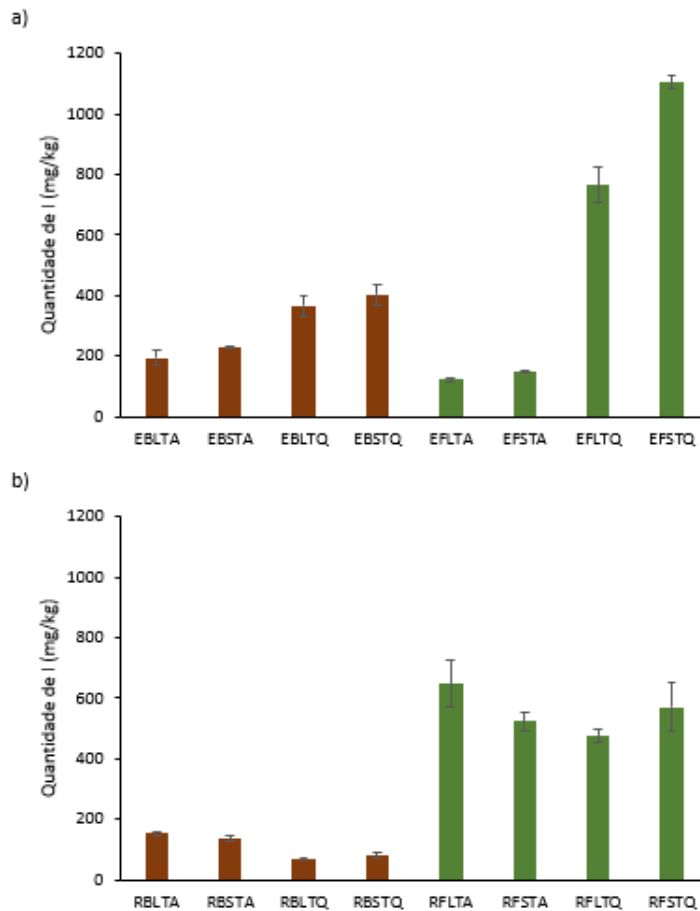


Figura 17 - Quantidade de iodo presente nos a) extratos e b) resíduos de extração das algas. Foram realizadas 2 réplicas. EBSTA – Ext. aquoso *Bifurcaria* seca à temperatura ambiente; EBSTQ – Ext. aquoso *Bifurcaria* seca à temperatura quente; EBLTA – Ext. aquoso *Bifurcaria* liofilizada à temperatura ambiente; EBLTQ – Ext. aquoso *Bifurcaria* liofilizada à temperatura quente; EFSTA – Ext. aquoso *Fucus* seca à temperatura ambiente; EFSTQ – Ext. aquoso *Fucus* seca à temperatura quente; EFLTA – Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura ambiente; EFLTQ – Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura quente; RBSTA – Resíduo *Bifurcaria* seca à temperatura ambiente; RBSTQ – Resíduo *Bifurcaria* seca à temperatura quente; RBLTA – Resíduo *Bifurcaria* liofilizada à temperatura ambiente; RBLTQ – Resíduo *Bifurcaria* liofilizada à temperatura quente; RFSTA – Resíduo *Fucus* seca à temperatura ambiente; RFSTQ – Resíduo *Fucus* seca à temperatura quente; RFLTA – Resíduo *Fucus* liofilizada à temperatura ambiente; RFLTQ – Resíduo *Fucus* liofilizada à temperatura quente.

Pela figura 17 a é possível perceber que as extrações realizadas com temperatura de 90 °C permitiram extratabilidade de iodo, dado que os extratos obtidos a quente apresentaram um iodo total entre 365 e 1104 mg/kg, enquanto os extratos obtidos à temperatura ambiente apresentaram uma quantidade de iodo total entre 69 e 231 mg/kg. Esta diferença é particularmente grande para a alga *Fucus* sp., onde se verificou que a extração com água quente permitiu obter 6 vezes mais a quantidade de iodo relativamente

à extração aquosa à temperatura ambiente. Para a *B. bifurcata* esta diferença não foi tão alta, porém ainda foi possível extrair cerca de 2 vezes mais iodo recorrendo à extração aquosa a 90 °C. Estes resultados estão de acordo com Ferreira et al., (2019) que investigou a quantidade de iodo extraído de *F. vesiculosus* durante 240 minutos para 5 temperaturas diferentes (25, 50, 75, 100 e 120 °C). Entre as temperaturas de 25 e 50 °C não foram notadas diferenças estatisticamente significativas, porém nas extrações em que a temperatura da água era mais alta verificou-se um aumento significativo na quantidade de iodo extraído. Enquanto a quantidade de iodo extraída a 25 °C foi de cerca de 104 mg/kg ao fim de 4 horas, para a temperatura de 120 °C foi possível extrair 490 mg/kg de iodo. Assim, a extração de iodo a partir de *Fucus* sp. é bastante mais recomendada em relação à *B. bifurcata*, mas apenas se for com recurso à água quente, já que os extratos de *Fucus* sp. obtidos à temperatura ambiente apresentam menor quantidade de iodo em relação aos respetivos extratos de *B. bifurcata* para o mesmo tipo de extração.

Ao observar a figura 17 b é possível perceber que apesar dos elevados valores de iodo obtidos nos extratos de *Fucus* sp. com água quente, ainda ficou uma parte significativa por extrair, já que os respetivos resíduos mostraram ter ainda quantidades elevadas de iodo, que variaram entre 476 e 571 mg/kg. Ferreira et al., (2019) analisou a quantidade de iodo extraída após 5, 60, 120 e 240 minutos de extração para as 5 temperaturas que estudou. Apesar das quantidades extraídas, em geral, não variarem muito a partir dos 60 minutos, o autor verificou que para a temperatura de 120 °C houve um aumento considerável de iodo extraído entre as 2 e as 4 horas, mostrando que talvez uma extração mais longa e com temperatura mais elevada pode ajudar a conseguir obter extratos mais ricos em iodo.

A quantidade de iodo que é recomendável ingerir por dia é de 150 µg no caso de um adulto e 250 µg para mulheres grávidas. Tendo em conta estes valores, é possível atingir a marca recomendável de iodo com 136 ou 226 mg, respetivamente para um adulto ou para uma mulher grávida, do extrato da macroalga *Fucus* sp., Extrato aquoso *Fucus* seca à temperatura quente (EFSTQ). Quanto ao extrato Ext. aquoso *Fucus* liofilizada à temperatura quente (EFLTQ) seria necessário respetivamente 196 e 327 mg. O extrato EFSTQ mostrou ainda ter um bom potencial antioxidante, 8,35 mg EAG/g de extrato para o método DPPH e 70,09 mg EAG/g de extrato para o método ABTS, revelando-se um dos extratos com melhor potencial antioxidante. Em relação à extração de polissacarídeos, este extrato permitiu uma extração de 34,58% m/m o que fica aquém de outros extratos nomeadamente no caso da *B. bifurcata* para a qual todos os extratos permitiram recuperar pelo menos 44% de polissacarídeos.

Tendo em conta os resultados obtidos, a alga com melhor potencial para a obtenção de um extrato rico em iodo é a *Fucus* sp. Além disso para a obtenção do melhor extrato, a biomassa deve ser seca na estufa a 50 °C, evitando a liofilização para a qual houve maior perda de iodo. Por fim, também é preferível usar como solvente a água quente (90 °C). De acordo com a literatura, a água permite a extração de 99% do iodo tanto na forma orgânica como inorgânica (Ferreira et al., 2019), porém a água quente mostrou ser muito mais eficiente na extração em relação à água à temperatura ambiente.

4 Conclusão

As algas castanhas apresentam uma variedade de compostos bioativos que fazem delas um alimento muito nutritivo e equilibrado. Entre esses compostos bioativos encontram-se os compostos fenólicos, particularmente, os florotaninos e o iodo, que as algas castanhas têm a capacidade de acumular em grandes quantidades. Com o objetivo de obter extratos ricos em compostos antioxidantes, foram realizadas extrações aquosas e etanólicas de duas espécies e género de macroalgas castanhas, nomeadamente, *U. pinnatifida*, *B.bifurcata* e *Fucus* sp.. obtendo-se extratos etanólicos e aquosos ricos em compostos antioxidantes, nomeadamente a partir das macroalgas *Fucus* sp. e *B. bifurcata*.

O iodo, por ser um elemento raro na natureza, acaba por ser escasso na alimentação em muitas regiões do planeta. Assim, de forma a perceber se a temperatura podia levar à perda de iodo devido à sua volatilização, uma parte da biomassa foi seca na estufa durante cerca de 4 dias (93 horas) a 50 °C, enquanto a outra parte foi liofilizada durante cerca de uma semana. Posteriormente, foram novamente realizadas extrações aquosas para as macroalgas *B. bifurcata* e *Fucus* sp., com recurso a água destilada à temperatura ambiente e a 90 °C. Como a extração com etanol 100% conduziu a um rendimento relativamente baixo, entre 2,32 e 7,07 %m/m, a extração com este solvente não foi efetuada para as biomassas secas na estufa com ventilação e liofilizadas. A análise de iodo total à biomassa mostrou que a secagem na estufa (229 e 588 mg/kg respetivamente para *B. bifurcata* e *Fucus* sp.), mostrou ser mais eficiente quando comparada com a secagem através de liofilização (171 e 448 mg/kg respetivamente para *B. bifurcata* e *Fucus* sp.). Comparando as extrações à temperatura ambiente e a 90 °C verificou-se que a segunda é muito mais eficiente, principalmente para a *Fucus* sp., onde foi possível extrair entre 765 e 1104 mg/kg, enquanto para a temperatura ambiente a quantidade de iodo obtido foi apenas entre 122 e 151 mg/kg. Apesar da análise do iodo nos resíduos ter mostrado que ficou uma parte importante de iodo no mesmo, foi possível a obtenção de um extrato rico em iodo através da extração a quente da biomassa seca na estufa a 50 °C da *Fucus* sp.

Assim, os extratos obtidos durante a realização desta tese mostraram ter elevados níveis de iodo, compostos fenólicos e fibras, pelo que a sua adição em alimentos como por exemplo snacks pode contribuir para elevar o seu valor nutricional e ajudar a mitigar o problema da deficiência de iodo em várias regiões do planeta.

5 Bibliografía

- Agregán, R., Munekata, P. E., Domínguez, R., Carballo, J., Franco, D., & Lorenzo, J. M. (2017). Proximate composition, phenolic content and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. *Food Research International*, 99, 986–994. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.009>
- Amachi, S. (2008). Microbial contribution to global iodine cycling: Volatilization, accumulation, reduction, oxidation, and sorption of iodine. In *Microbes and Environments* (Vol. 23, Issue 4, pp. 269–276). <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME08548>
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 11, Issue 11). [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9)
- Arvizu-Higuera, D. L., Hernández-Carmona, G., & Rodríguez-Montesinos, Y. E. (1996). Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción en el proceso de obtención de alginato de sodio a partir de *Macrocystis pyrifera*. *Ciencias Marinas*, 22(4), 511–521. <https://doi.org/10.7773/cm.v22i4.867>
- Boeing, J. S., Barizão, É. O., e Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V., & Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: Application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0048-1>
- Bravo, L. (1998). *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/56/11/317/1901722>
- Bringloe, T. T., Starko, S., Wade, R. M., Vieira, C., Kawai, H., De Clerck, O., Cock, J. M., Coelho, S. M., Destombe, C., Valero, M., Neiva, J., Pearson, G. A., Faugeron, S., Serrão, E. A., & Verbruggen, H. (2020). Phylogeny and evolution of the brown algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(4), 281–321. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1787679>
- Brownlee, I. A., Allen, A., Pearson, J. P., Dettmar, P. W., Havler, M. E., Atherton, M. R., & Onsøyen, E. (2005). Alginate as a source of dietary fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 497–510. <https://doi.org/10.1080/10408390500285673>
- Cao, J., Peng, L. Q., Xu, J. J., Du, L. J., & Zhang, Q. D. (2016). Simultaneous microextraction of inorganic iodine and iodinated amino acids by miniaturized matrix solid-phase dispersion with molecular sieves and ionic liquids. *Journal of Chromatography A*, 1477, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.053>
- Catarino, M. D., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2018). Phycochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. In *Marine Drugs* (Vol. 16, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/md16080249>
- Chaker, L., Razvi, S., Bensenor, I. M., Azizi, F., Pearce, E. N., & Peeters, R. P. (2022). Hypothyroidism. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 8, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00357-7>

- Chen, Z. P., & Hetzel, B. S. (2010). Cretinism revisited. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 24, Issue 1, pp. 39–50). <https://doi.org/10.1016/j.beem.2009.08.014>
- Cock, J., Peters, A., & Coelho, S. (2011). Brown algae. *Current Biology*, 21(15), R573–R575.
- Cofrades, S., López-López, I., Solas, M. T., Bravo, L., & Jiménez-Colmenero, F. (2008). Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Science*, 79(4), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.11.010>
- Coimbra, M. A., Delgadillo, I., Waldron, K. W., & Selvendran, R. R. (1996). *Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp*.
- Cox, S., & Abu-Ghannam, N. (2013). Enhancement of the phytochemical and fibre content of beef patties with *Himanthalia elongata* seaweed. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(11), 2239–2249. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12210>
- Devic, E., Guyot, S., Daudin, J. D., & Bonazzi, C. (2010). Kinetics of polyphenol losses during soaking and drying of cider apples. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 867–877. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0361-1>
- Dissanayake, C. B., Chandrajith, R., & Tobschall, H. J. (1999). The iodine cycle in the tropical environment - Implications on iodine deficiency disorders. *International Journal of Environmental Studies*, 56(3), 357–372. <https://doi.org/10.1080/00207239908711210>
- Djendoubi Mrad, N., Boudhrioua, N., Kechaou, N., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2012). Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.11.009>
- El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 18, Issue 1, pp. 1–25). <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>
- European Committee For Standardization. (2007). *Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of iodine by ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry)*.
- Fecher, P. A., Goldmann, I., & Nagengast, A. (1998). Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction †. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13, 977–982.
- Ferreira, R. M., Ribeiro, A. R., Patinha, C., Silva, A. M. S., Cardoso, S. M., & Costa, R. (2019). Water extraction kinetics of bioactive compounds of *Fucus vesiculosus*. *Molecules*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/molecules24183408>
- Gaitan, E. (1988). 9 Goitrogens. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2(3). [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(88\)80060-0](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(88)80060-0)
- Garicano Vilar, E., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P., & Kilcawley, K. N. (2020). Volatile compounds of six species of edible seaweed: A review. In *Algal Research* (Vol. 45). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101740>

- Gray, P. J., & Todorov, T. I. (2017). Elemental Analysis Manual for Food and Related Products 4.13 Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry Determination of Iodine in Food Using Tetramethyl Ammonium Hydroxide Extraction. *Elemental Analysis Manual for Food and Related Products*.
- Greenish Noodles*. (n.d.). Retrieved October 29, 2023, from <https://www.fnri.dost.gov.ph/index.php/publications/writers-pool-corner/57-food-and-nutrition/90-greenish-noodles>
- Gressler, V., Colepicolo, P., & Pinto, E. (2010). Useful strategies for algal volatile analysis. *Current Analytical Chemistry*, 5(3), 271–292. <https://doi.org/10.2174/157341109788680255>
- Hatch-McChesney, A., & Lieberman, H. R. (2022). Iodine and iodine deficiency: A comprehensive review of a re-emerging issue. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu14173474>
- Hazell, T. (1985). Minerals in foods: dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability. In *World review of nutrition and dietetics* (Vol. 46). <https://doi.org/10.1159/000411649>
- He, M. L., Hollwich, W., & Rambeck, W. A. (2002). Supplementation of algae to the diet of pigs: A new possibility to improve the iodine content in the meat. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 86(3–4), 97–104. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2002.00363.x>
- Heffernan, N., Smyth, T. J., Soler-Villa, A., Fitzgerald, R. J., & Brunton, N. P. (2015). Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (*Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis* and *Codium fragile*). *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 519–530. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0291-9>
- Hetzel, B., & Clugston, G. (1999). Iodine. In M. Shils, J. Olson, M. Shike, & C. Ross (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease* (Vol. 9).
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 23, Issue 3, pp. 543–597). <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
- Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients. (2001). *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc : a report of the Panel on Micronutrients ... and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine*. National Academy Press.
- Iodine deficiency*. (n.d.). Retrieved December 27, 2023, from <https://www.who.int/data/nutrition/nlis/info/iodine-deficiency>
- Ismail, M. M., El Zokm, G. M., & Miranda Lopez, J. M. (2023). Nutritional, bioactive compounds content, and antioxidant activity of brown seaweeds from the Red Sea. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1210934>
- Ittermann, T., Albrecht, D., Arohonka, P., Bilek, R., de Castro, J. J., Dahl, L., Filipsson Nystrom, H., Gaberscek, S., Garcia-Fuentes, E., Gheorghiu, M. L., Hubalewska-Dydejczyk, A., Hunziker, S., Jukic, T., Karanfilski, B., Koskinen, S., Kusic, Z., Majstorov, V., Makris, K. C., Markou, K. B., ... Völzke, H. (2020). Standardized Map of Iodine Status in Europe. *Thyroid*, 30(9), 1346–1354. <https://doi.org/10.1089/thy.2019.0353>

- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2015). Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *International Journal of Food Science and Technology*, *50*(1), 24–31. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12692>
- Khandelwal, D., & Tandon, N. (2012). *Overt and subclinical hypothyroidism who to treat and how*.
- Kılınç, B., Cirik, s., Turan, G., Tekogul, H., & Koru, E. (2013). Seaweeds for food and industrial applications. In *Food Industry* (pp. 735–748).
- Küpper, F. C., Carpenter, L. J., Mcfiggans, G. B., Palmer, C. J., Waite, T. J., Boneberg, E.-M., Woitsch, S., Weiller, M., Abela, R., Grolimund, D., Potin, P., Butler, A., Iii, G. W. L., Kroneck, P. M. H., Meyer-Klaucke, W., & Feiters, M. C. (2008). *Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Küpper, F. C., & Carrano, C. J. (2019). Key aspects of the iodine metabolism in brown algae: A brief critical review. In *Metallomics* (Vol. 11, Issue 4, pp. 756–764). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8mt00327k>
- Küpper, F. C., Schweigert, N., Ar Gall, E., Legendre, J. M., Vilter, H., & Kloareg, B. (1998). Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta*, *207*(2). <https://doi.org/10.1007/s004250050469>
- Kusuma Damayanti, P., Ari Budhiyanti, S., & Husni, A. (2021). Antioxidant activity and consumer preference of brown algae *Sargassum hystrix* juice as a functional drink. *AgriTECH*, *41*(3), 231–237. <https://doi.org/10.22146//agritech.26665>
- Leblanc, C., Colin, C., Cosse, A., Delage, L., La Barre, S., Morin, P., Fiévet, B., Voiseux, C., Ambroise, Y., Verhaeghe, E., Amouroux, D., Donard, O., Tessier, E., & Potin, P. (2006). Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimie*, *88*(11), 1773–1785. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.001>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 37, Issue 1, pp. 106–126). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Leung, A. M., & Braverman, L. E. (2014). Consequences of excess iodine. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 136–142). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.251>
- Li, S., Hu, M., Tong, Y., Xia, Z., Tong, Y., Sun, Y., Cao, J., Zhang, J., Liu, J., Zhao, S., & He, P. (2023). A review of volatile compounds in edible macroalgae. In *Food Research International* (Vol. 165). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112559>
- Li, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Wang, P., Imre, B., Wong, A. C. Y., Hsieh, Y. S. Y., & Wang, D. (2021). Brown algae carbohydrates: Structures, pharmaceutical properties, and research challenges. In *Marine Drugs* (Vol. 19, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md19110620>
- Limbert, E., Prazeres, S., São Pedro, M., Madureira, D., Miranda, A., Ribeiro, M., de Castro, J. J., Carrilho, F., Oliveira, M. J., Reguengo, H., & Borges, F. (2010). Iodine intake in Portuguese pregnant women: Results of a countrywide study. *European Journal of Endocrinology*, *163*(4), 631–635. <https://doi.org/10.1530/EJE-10-0449>

- Lomartire, S., Marques, J. C., & Gonçalves, A. M. M. (2021). An overview to the health benefits of seaweeds consumption. In *Marine Drugs* (Vol. 19, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md19060341>
- López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science*, 83(1), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.04.014>
- López-Pérez, O., Picon, A., & Nuñez, M. (2017). Volatile compounds and odour characteristics of seven species of dehydrated edible seaweeds. *Food Research International*, 99, 1002–1010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.013>
- Malta, L. G., & Liu, R. H. (2014). Analyses of total phenolics, total flavonoids, and total antioxidant activities in foods and dietary supplements. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 305–314). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00058-9>
- Mariani, G., Tonacchera, M., Grosso, M., Fiore, E., Falcetta, P., Montanelli, L., Bagattini, B., Vitti, P., & Strauss, H. W. (2021). The role of nuclear medicine in the clinical management of benign thyroid disorders, part 2: Nodular goiter, hypothyroidism, and subacute thyroiditis. *Journal of Nuclear Medicine*, 62(7), 886–895. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.251504>
- Mekinić, I. G., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Perković, Z. P. (2019). Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. In *Biomolecules* (Vol. 9, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom9060244>
- Mensah, E. O., Kanwugu, O. N., Panda, P. K., & Adadi, P. (2023). Marine fucoidans: Structural, extraction, biological activities and their applications in the food industry. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 142). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108784>
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 14, Issue 6, pp. 581–591). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400139>
- Milinic, J., Rodrigues, C., Diniz, M., & Noronha, J. P. (2021). Determination of total iodine content in edible seaweeds: Application of inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy. *Algal Research*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102149>
- Miller', N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. 1, Gopinathan', V., & Milner', A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. In *Clinical Science* (Vol. 84).
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Murai, U., Yamagishi, K., Kishida, R., & Iso, H. (2021). Impact of seaweed intake on health. In *European Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 75, Issue 6, pp. 877–889). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-00739-8>
- Narain, N. (2018). Volatile components in seaweeds. *Examines in Marine Biology & Oceanography*, 2(2). <https://doi.org/10.31031/eimbo.2018.02.000535>

- Nitschke, U., Dixneuf, S., Ruth, A. A., Schmid, M., & Stengel, D. B. (2013). Molecular iodine (I₂) emission from two *Laminaria* species (Phaeophyceae) and impact of irradiance and temperature on I₂ emission into air and iodide release into seawater from *Laminaria digitata*. *Marine Environmental Research*, 92, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.006>
- Nitschke, U., & Stengel, D. B. (2015). A new HPLC method for the detection of iodine applied to natural samples of edible seaweeds and commercial seaweed food products. *Food Chemistry*, 172, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.030>
- Nitschke, U., & Stengel, D. B. (2016). Quantification of iodine loss in edible Irish seaweeds during processing. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3527–3533. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0868-6>
- Nitschke, U., Walsh, P., McDaid, J., & Stengel, D. B. (2018). Variability in iodine in temperate seaweeds and iodine accumulation kinetics of *Fucus vesiculosus* and *Laminaria digitata* (Phaeophyceae, Ochrophyta). *Journal of Phycology*, 54(1), 114–125. <https://doi.org/10.1111/jpy.12606>
- Nunes, N., Valente, S., Ferraz, S., Barreto, M. C., & Pinheiro De Carvalho, M. A. A. (2018). Nutraceutical potential of *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan extracts and assessment of a downstream purification strategy. *Heliyon*, 4, e00957. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018>
- O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'Grady, M. N., Waldron, D. S., Smyth, T. J., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2014). An examination of the potential of seaweed extracts as functional ingredients in milk. *International Journal of Dairy Technology*, 67(2), 182–193. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12121>
- Palmer, C. J., Anders, T. L., Carpenter, L. J., Küpper, F. C., & McFiggans, G. B. (2005). Iodine and halocarbon response of *Laminaria digitata* to oxidative stress and links to atmospheric new particle production. *Environmental Chemistry*, 2(4), 282–290. <https://doi.org/10.1071/EN05078>
- Pearce, E. N., Lazarus, J. H., Moreno-Reyes, R., & Zimmermann, M. B. (2016). Consequences of iodine deficiency and excess in pregnant women: an overview of current knowns and unknowns. *American Journal of Clinical Nutrition*, 104, 918S–923S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.110429>
- Pereira, L., & Neto, J. M. (2014). Marine algae: Biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology. In *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1201/b17540>
- Platel, K., & Srinivasan, K. (2016). Bioavailability of micronutrients from plant foods: An update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1608–1619. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.781011>
- Pradhan, R. N., Tamrakar, K., & Manandhar, R. (2018). *Synthesis of thyroid hormones - Bioscience notes*. <https://www.biosciencenotes.com/synthesis-of-thyroid-hormones/>

- Ptak, S. H., Christensen, K. V., Meichßner, R., & Fretté, X. (2019). Improving fucoidan yield from fucus brown algae by microwave extraction. *Chemical Engineering Transactions*, 74, 109–114. <https://doi.org/10.3303/CET1974019>
- Qin, Y. (2018a). Applications of bioactive seaweed substances in functional food products. In *Bioactive Seaweeds for Food Applications: Natural Ingredients for Healthy Diets* (pp. 111–134). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00006-6>
- Qin, Y. (2018b). Seaweed hydrocolloids as thickening, gelling, and emulsifying agents in functional food products. In *Bioactive Seaweeds for Food Applications: Natural Ingredients for Healthy Diets* (pp. 135–152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00007-8>
- Rizvi, N. B., Fatima, A., Busquets, R., Khan, M. R., Ashraf, S., Khan, M. S., & Oz, F. (2023). Effect of the media in the Folin-Ciocalteu assay for the analysis of the total phenolic content of olive products. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-023-02527-z>
- Roleda, M. Y., Skjermo, J., Marfaing, H., Jónsdóttir, R., Rebours, C., Gietl, A., Stengel, D. B., & Nitschke, U. (2018). Iodine content in bulk biomass of wild-harvested and cultivated edible seaweeds: Inherent variations determine species-specific daily allowable consumption. *Food Chemistry*, 254, 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.024>
- Romarís-Hortas, V., Bermejo-Barrera, P., & Moreda-Piñeiro, A. (2013). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis for iodinated amino acid extraction from edible seaweed before reversed-phase high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1309, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.022>
- Romarís-Hortas, V., Moreda-Piñeiro, A., & Bermejo-Barrera, P. (2009). Microwave assisted extraction of iodine and bromine from edible seaweed for inductively coupled plasma-mass spectrometry determination. *Talanta*, 79(3), 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.05.036>
- Sabeena Farvin, K. H., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078>
- Sang, Z., Wang, P. P., Yao, Z., Shen, J., Halfyard, B., Tan, L., Zhao, N., Wu, Y., Gao, S., Tan, J., Liu, J., Chen, Z., & Zhang, W. (2012). Exploration of the safe upper level of iodine intake in euthyroid Chinese adults: A randomized double-blind trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95(2), 367–373. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.028001>
- Schnitzler, I., Pohnert, G., Hay, M., & Boland, W. (2001). Chemical defense of brown algae (*Dictyopterus* spp.) against the herbivorous amphipod *Ampithoe longimana*. *Oecologia*, 126(4), 515–521. <https://doi.org/10.1007/s004420000546>
- Shi, X., Han, C., Li, C., Mao, J., Wang, W., Xie, X., Li, C., Xu, B., Meng, T., Du, J., Zhang, S., Gao, Z., Zhang, X., Fan, C., Shan, Z., & Teng, W. (2015). Optimal and safe upper limits of iodine intake for early pregnancy in iodine-sufficient regions: A cross-sectional study of 7190 pregnant women in China. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(4), 1630–1638. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3704>

- Silva, A., Rodrigues, C., Garcia-Oliveira, P., Lourenço-Lopes, C., Silva, S. A., Garcia-Perez, P., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Barroso, M. F., Delerue-Matos, C., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Screening of bioactive properties in brown algae from the northwest iberian peninsula. *Foods*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/foods10081915>
- Smyth, P. P. A. (2021). Iodine, seaweed, and the thyroid. In *European Thyroid Journal* (Vol. 10, Issue 2, pp. 101–108). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000512971>
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, *81*(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Stévant, P., Indergård, E., Ólafsdóttir, A., Marfaing, H., Larssen, W. E., Fleurence, J., Roleda, M. Y., Rustad, T., Slizyte, R., & Nordtvedt, T. S. (2018). Effects of drying on the nutrient content and physico-chemical and sensory characteristics of the edible kelp *Saccharina latissima*. *Journal of Applied Phycology*, *30*(4), 2587–2599. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1451-0>
- Sun, J., Wang, D., Cheng, H., Liu, J., Wang, Y., & Xu, Z. (2015). Use of ion-pairing reagent for improving iodine speciation analysis in seaweed by pressure-driven capillary electrophoresis and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, *1379*, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.056>
- Tagliapietra, B. L., & Clerici, M. T. P. S. (2023). Brown algae and their multiple applications as functional ingredient in food production. In *Food Research International* (Vol. 167). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112655>
- Teas, J., Pino, S., Critchley, A., & Braverman, L. E. (2004). Variability of iodine content in common commercially available edible seaweeds. In *THYROID* (Vol. 14, Issue 10). www.liebertpub.com
- Triggiani, V., Tafaro, E., Giagulli, V. A., Sabbà, C., Resta, F., Licchelli, B., & Guastamacchia, E. (2009). Role of iodine, selenium and other micronutrients in thyroid function and disorders. In *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets* (Vol. 9).
- Van Netten, C., Cann, S. A. H., Morley, D. R., & Van Netten, J. P. (2000). Elemental and radioactive analysis of commercially available seaweed. In *The Science of the Total Environment* (Vol. 255).
- van Weelden, G., Bobi, M., Okla, K., van Weelden, W. J., Romano, A., & Pijnenborg, J. M. A. (2019). Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. *Marine Drugs*, *17*(1). <https://doi.org/10.3390/md17010032>
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Liu, H., Gu, L., Kristinsson, H. G., Raghavan, S., & Ólafsdóttir, G. (2012). Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(23), 5874–5883. <https://doi.org/10.1021/jf3003653>
- Wehr, J. D. (2015). Brown algae. In *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (pp. 851–871). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00019-0>
- Wolff, J., & Chaikoff, I. L. (1948). Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *The Journal of Biological Chemistry*, *174*(2), 555–564. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)57335-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)57335-x)

- Wren, J. C., Glows, G. A., & Ball, J. M. (2000). IMOD, a containment iodine behaviour model Model Description and Simulation of RTF Tests. In *Severe Accident Symposium*. Korean Nuclear Society Conference KAERI.
- Xu, J. J., Chang, Y. xu, Hao, J., An, M., Tan, Z., Yang, R., Cao, J., & Peng, L. Q. (2016). Separation and stacking of iodine species from seafood using surfactant-coated multiwalled carbon nanotubes as a pseudo-stationary phase in capillary electrophoresis. *Microchimica Acta*, 183(8), 2441–2447. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1892-6>
- Zimmermann, M. B. (2008). Research on iodine deficiency and goiter in the 19th and early 20th centuries 1,2. In *J. Nutr* (Vol. 138). <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/138/11/2060/4669997>
- Zimmermann, M. B. (2009). Iodine deficiency. In *Endocrine Reviews* (Vol. 30, Issue 4, pp. 376–408). <https://doi.org/10.1210/er.2009-0011>
- Zimmermann, M. B., & Boelaert, K. (2015). Iodine deficiency and thyroid disorders. In *The Lancet Diabetes and Endocrinology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 286–295). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70225-6](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70225-6)
- Zimmermann, M. B., Jooste, P. L., & Pandav, C. S. (2008). Iodine-deficiency disorders. *Www.TheLancet.Com*, 372, 1251. <https://doi.org/10.1016/S0140>
- Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Lann, K. Le, Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116(3), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.025>