



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

Biomassa de algas vermelhas – Caracterização química e bioatividades

Leonardo Daniel Garcia Inácio

2023

Biomassa de algas vermelhas – caracterização química e bioatividades

Leonardo Daniel Garcia Inácio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação realizada sob a orientação da Doutora Teresa Margarida Lopes da Silva Mouga e
coorientação da Doutora Clélia Paulete Correia Neves Afonso

2023

Título: Biomassa de algas vermelhas – caracterização de química e bioatividades

Copyright © Leonardo Daniel Garcia Inácio

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2023

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar tenho de agradecer aos meus pais, pela oportunidade de prosseguir os meus estudos, assim como por todo o apoio que sempre me deram. Ao meu irmão que sempre me apoiou e incentivou, perguntando o que estava a fazer no laboratório e interessado em saber mais sobre o meu trabalho. Também tenho de deixar um agradecimento especial à minha avó que me aturou quando chegava a casa chateado, porque as coisas não corriam bem no laboratório e me fazia rir e ultrapassar os obstáculos.

Aos amigos que Peniche me deu, por todo o apoio e maluquices que fizemos. Em especial um agradecimento ao Grupo Pi, o melhor grupo de laboratório que podia ter escolhido. Mesmo nesta fase, quando estávamos afastados, continuámos unidos a ouvir os desabafos sobre o trabalho de cada um. É preciso agradecer também à Luz, Mónica e Lucinda, que sempre apoiaram e ouviram os problemas que tinha, quando nos cruzávamos nos corredores do Cetemares.

Aos meus colegas de Laboratório que me acompanharam ao longo deste trabalho. A Marta Freitas que sempre me ensinou e ajudou, e conseguiu ter paciência para me aturar este tempo todo. Ao Mendelson que animava todo o laboratório enquanto fazíamos os protocolos. Um agradecimento especial à Doménica, Ariana, Isabela, Henrique e Ana, por todo o apoio e companhia que fizeram durante grande parte do trabalho.

Agradeço também ao David, Flávio e Manuel, que a cada café que tomávamos perguntavam como ia a escrita e sempre que incentivaram a concluir este trabalho. Assim como às psicólogas de serviço Marisa e Marta, que ouviram os meus desabafos sempre com uma palavra amiga e de incentivo. E a todos os aqueles que não mencionei, mas faziam as perguntas clássicas: “Então como vai a tese? Já acabaste isso?”

Por fim, um agradecimento muito especial às minhas orientadoras Doutora Teresa Mouga e a Doutora Clélia Afonso, que acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram e ajudaram ao longo de todo o trabalho. Muito obrigado, Professoras, sem vocês não teria conseguido.

A todos o meu Muito Obrigado.

Trabalho realizado no âmbito do mestrado de BRM, na UC de Dissertação, que conduziu aos seguintes outputs:

Comunicações:

- Inácio, L. G., Caracterização química e bioatividades de duas algas vermelhas. 1.º Info Day de Ciência Azul, ESTM – Politécnico de Leiria, Portugal, 02 junho de 2022.
- Inácio, L. G., Caracterização química e bioatividades de duas algas vermelhas. 32º Seminário Coastwatch 2022 “Emergência Oceano”, Portugal, 14, 15 e 16 julho de 2022.

Publicações:

- Freitas, M. V., Inácio, L. G., Martins, M., Afonso, C., Pereira, L., & Mouga, T. (2022). Primary Composition and Pigments of 11 Red Seaweed Species from the Center of Portugal. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(9), 1168. <https://doi.org/10.3390/jmse10091168>
- Freitas, M. V., Inácio, L. G., Ruas, A., Silva, I. A., Mouga, T., Pereira, L., & Afonso, C. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Selected Red Seaweeds from Central Portugal. *Applied Sciences*, 13(1), 157. <https://doi.org/10.3390/app13010157>

Resumo

O ambiente marinho apresenta uma grande diversidade de organismos e condições abióticas. Dentro dos organismos marinhos com maior distribuição e diversidade, encontram-se as algas. Estas apresentam diversas características que as tornam interessantes do ponto de vista económico, sendo tradicionalmente utilizadas como alimento, incorporadas em ração para animais e fertilizante. Estes usos tradicionais despertaram o interesse da comunidade científica que, cada vez mais se dedica ao estudo destes organismos. Dentro das algas, as algas vermelhas (Rhodophyta) apresentam um grande número de espécies e estão presentes em diversos tipos de ecossistemas sobretudo marinhos, sendo conhecidas por produzirem ficobiliproteínas responsáveis pela sua cor avermelhada. Dentro das Rhodophyta, o *Sphaerococcus coronopifolius* (ordem Gigartinales) e a *Jania rubens* (ordem Corallinales) são duas algas muito abundantes na costa portuguesa, cujo conhecimento é, ainda, relativamente limitado.

Quanto à caracterização do seu perfil nutricional, o *S. coronopifolius* apresentou maior teor de humidade, proteína, matéria gorda e hidratos de carbono, e a *J. rubens* apresentou o maior conteúdo de cinzas, 79,79% peso seco (DW), em parte devido ao seu revestimento calcário. Neste campo é de destacar o baixo conteúdo em matéria gorda apresentado pelas duas espécies, assim como o elevado conteúdo em hidratos de carbono, 40,23 % DW do *Sphaerococcus coronopifolius*. Relativamente aos pigmentos, o *S. coronopifolius*, em geral, apresentou maior conteúdo em ficobilinas, sendo o melhor processo/solvente de extração variável consoante a espécie. Já no caso da clorofila *a* e dos carotenoides, o destaque positivo vai para a *Jania rubens*.

Ambas as espécies apresentam diferentes rendimentos de extração para cada solvente, sendo que a extração aquosa apresentou o maior rendimento nos dois casos. Ao analisar as bioatividades dos extratos aquosos verificou-se um maior potencial de redução do radical DPPH pelo extrato de *S. coronopifolius*, contudo, o grande destaque vai para a *Jania rubens* com 99,65 % de inibição do radical ABTS. Já nos polifenóis totais, o extrato aquoso do *S. coronopifolius* apresentou maior quantidade (0,67 mg GAE.g⁻¹). Foi detetado potencial antimicrobiano contra *B. subtilis*, no entanto, não houve atividade contra *E. coli* nem *S. cerevisiae*, para nenhuma das duas espécies.

Os resultados conseguidos neste trabalho permitem melhorar o conhecimento destas espécies que ainda é escasso, especialmente quanto ao perfil nutricional. Pode ainda despertar

o interesse de estudos mais aprofundados, e interesse industrial na aplicação destas espécies na área alimentar e farmacêutica.

Palavras-Chave: Gigartinales; Corallinales; Perfil Nutricional; Ficobiliproteínas; Capacidade Antioxidante; Capacidade Antimicrobiana.

Abstract

The marine environment presents a great diversity of organisms and abiotic conditions. Within the marine organisms with greater distribution and diversity are algae. These have several characteristics that make them interesting from the economic point of view, being traditionally used as food, incorporated into animal feed, and fertilizer. These traditional uses have aroused the interest of the scientific community, which is increasingly dedicated itself to the study of these organisms. Among the algae, the red seaweed (Rhodophyta) have a large number of species and are present in various types of ecosystems, being known for producing phycobiliproteins responsible for their reddish color. Within the Rhodophyta, *Sphaerococcus coronopifolius* (order Gigartinales) and *Jania rubens* (order Corallinales) are algae two very abundant on the Portuguese coast, whose knowledge is still relatively limited.

As for the characterization of their nutritional profile, *S. coronopifolius* showed the highest content of moisture, protein, fat, and carbohydrates, and *J. rubens* showed the highest ash content, 79.79% DW, partly due to its calcareous coating. In this field, the low-fat content presented by the two species, as well as the high carbohydrate content, 40.23% DW of *Sphaerococcus coronopifolius*, should be highlighted. In terms of pigments, *S. coronopifolius* generally had a higher content in phycobilin, and it was not possible to identify the best solvent for both species. In the case of chlorophyll *a* and carotenoids, the positive highlight goes to *Jania rubens*.

Both species present different extraction yields for each solvent, with the aqueous extraction presenting the highest yields in both cases. When analyzing the bioactivities of the aqueous extracts, it was verified a higher potential of the reduction of the DPPH radical, by the extract of *S. coronopifolius*, however, the great highlight goes to *Jania rubens* with 99.65% of inhibition of the ABTS radical. As for total phenols, the aqueous extract of *S. coronopifolius* showed the highest amount (0,67 mg GAE.g⁻¹). Antimicrobial potential was detected against *B. subtilis*, however, there was no activity against *E. coli* and *S. cerevisiae*, for both species.

The results obtained in this work allow us to improve the knowledge of these species, which is still scarce, especially regarding their nutritional profile. It may also awaken the interest of further studies, and industrial interest in the application of these species in the food and pharmaceutical areas.

Keywords: Gigartinales; Corallines; Nutritional Profile; Phycobiliproteins; Antioxidant; Antimicrobial.

Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract	viii
1. Introdução.....	1
1.1 <i>Jania rubens</i>	8
1.2 <i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	9
1.3 Objetivos.....	10
2. Materiais e Métodos	12
2.1 Colheita e processamento da biomassa	12
2.2 Determinação do Perfil Bioquímico da biomassa seca	12
2.2.1 Quantificação de Humidade e Cinza.....	12
2.2.2 Quantificação de Proteína Total.....	13
2.2.3 Quantificação de Matéria Gorda Total	14
2.2.4 Quantificação de Hidratos de Carbono	15
2.3 Extração e Quantificação de Pigmentos	16
2.3.1 Quantificação de Ficobiliproteínas	16
2.3.2 Quantificação de Clorofila e Carotenoides	17
2.4 Preparação de extratos brutos de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> e <i>Jania rubens</i>	17
2.5 Avaliação da Atividade Antioxidante.....	18
2.5.1 Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	18
2.5.2 Capacidade de redução do radical ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)).....	19
2.5.3 Quantificação Total de Polifenóis (QTP)	20
2.6 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	21
2.6.1 Revitalização de Estirpes Bacterianas	21
2.6.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	22

2.7 Análise estatística	23
3. Resultados e Discussão	24
3.1 Perfil Bioquímico:	24
3.2 Extração e Quantificação de Pigmentos	28
3.2.1 Quantificação de Ficobiliproteínas	28
3.2.2 Quantificação Clorofila e Carotenoides	34
3.2.3 Considerações gerais da Extração e Quantificação de Pigmentos	36
3.3 Extrações de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> e <i>Jania rubens</i>	37
3.4 Avaliação da Atividade Antioxidante.....	41
3.4.1 Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	41
3.4.2 Capacidade de redução do radical ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS)).....	44
3.4.3 Quantificação Total de Polifenóis (QTP)	47
3.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	48
3.5.1 Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	49
4. Conclusão	51
Referências Bibliográficas	53

Índice de Figuras

Figura 1- Concentração de Ficoeritrina em <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> em mg.mL ⁻¹ , utilizando diferentes solventes de extração e utilizando recipientes de vidro ou plástico. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	29
Figura 2 - Concentração de Ficocianina de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> em mg.mL ⁻¹ , utilizando diferentes solventes de extração e utilizando recipientes de vidro ou plástico. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). As letras minúsculas (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas no teste HSD de Tukey.....	30
Figura 3 - Concentração de Ficoeritrina de <i>Jania rubens</i> em mg.mL ⁻¹ , utilizando diferentes solventes de extração e utilizando recipientes de vidro ou plástico. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). As letras minúsculas (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas no teste HSD de Tukey.....	31
Figura 4 - Concentração de Ficocianina de <i>Jania rubens</i> em mg.mL ⁻¹ , utilizando diferentes solventes de extração e utilizando recipientes de vidro ou plástico. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). Os asteriscos (*) representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor mais pequeno (Água Ultrapura Plástico) e os restantes solventes.....	32
Figura 5 – Rendimento da extração de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> com diferentes solventes. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=9 para a extração com água; n=3 para os restantes solventes). As letras minúsculas (a, b e c) representam diferenças estatisticamente significativas no teste HSD de Tukey.....	37
Figura 6 - Extratos de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> ; a) extrato aquoso; b) extrato de acetona.	38
Figura 7 - Rendimento da extração de <i>Jania rubens</i> com diferentes solventes. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=9 para a extração com água; n=3 para os restantes solventes). As letras minúsculas (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas no teste HSD de Tukey.....	39
Figura 8 - Extratos de <i>Jania rubens</i> ; a) extrato aquoso; b) extrato etanólico.....	40
Figura 9 - Capacidade de inibição do radical DPPH do extrato aquoso de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> em percentagem. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	43

Figura 10 - Capacidade de inibição do radical DPPH do extrato aquoso de <i>Jania rubens</i> em percentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).....	44
Figura 11 - Capacidade de inibição do radical ABTS do extrato aquoso de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> em percentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).....	45
Figura 12 - Capacidade de inibição do radical ABTS do extrato aquoso de <i>Jania rubens</i> em percentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).....	46

Índice de Tabelas

Tabela I - Perfil bioquímico de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> e <i>Jania rubens</i> . Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4, para a Humidade e Cinza; e n=3 para Proteína, Matéria Gorda Total e Hidratos de Carbono).....	24
Tabela II – Concentração de clorofila a e carotenoides de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> e <i>Jania rubens</i> expressa em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).....	35
Tabela III – Valor de EC50 da inibição do radical ABTS para os extratos aquosos de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> e <i>Jania rubens</i> expressos em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).....	47
Tabela IV – Polifenóis totais dos extratos aquosos de <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> e <i>Jania rubens</i> expressos em $\text{mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$, onde GAE significa equivalente de ácido gálico. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).....	47

Lista de Abreviaturas

DW- Peso seco

PE- Ficoeritrina

PC- Ficocianina

APC- Aloficocianina

R-PE- Ficoeritrina presente nas Rhodophyta à exceção das Bangiales

R-PC- Ficocianina presente nas Rhodophyta

Psu- Unidade de Salinidade Prática (Practical Salinity Unit)

Abs- Absorvância

DPPH- 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate

ABTS- 2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid

QTP- Quantificação total de polifenóis

MIC- Concentração mínima inibitória (Minimal Inhibitory Concentration)

FW- Peso fresco

GAE- Equivalente de ácido gálico

BHT- Hidroxitolueno butilado

1. Introdução

Os ecossistemas marinhos são muito diversificados e apresentam diversos tipos de organismos. Destes organismos, as algas assumem a função de produtores primários, tendo a clorofila *a* como o seu pigmento principal, sendo capazes de produzir matéria orgânica a partir da energia solar, dióxido de carbono e água (Lee, 2018). Apesar de estarem associados ao ambiente marinho, as algas estão também presentes em ambientes de água doce e salobra (Barsanti & Gualtieri, 2014; Lee, 2018). É ainda possível encontrar estes organismos em montanhas cobertas de neve, em fontes termais e desertos (Azúa-Bustos et al., 2010; Barsanti & Gualtieri, 2014; Lee, 2018).

As algas são usadas como alimento, incorporadas em rações, como fertilizantes agrícolas e em medicina tradicional, desde há muito tempo (Jose & Xavier, 2020). Apesar da sua ampla distribuição, a sua utilização é mais frequente nos países asiáticos (Afonso, et al., 2021; Cavaco et al., 2021). Os usos tradicionais despertaram o interesse da comunidade científica, que estabeleceu estes organismos como uma fonte renovável de diversos compostos bioativos com grande interesse para a área farmacêutica, alimentar e cosmética, entre outros (Afonso, et al., 2021; Cavaco et al., 2021; Jose & Xavier, 2020).

Do ponto de vista taxonómico, as macroalgas podem ser divididas de acordo com o pigmento acessório predominante, sendo a clorofila *b*, o pigmento das algas verdes (Chlorophyta), a fucoxantina o das algas castanhas (Phaeophyceae) e as ficobiliproteínas, com destaque para a ficoeritrina, os das algas vermelhas (Rhodophyta) (Lee, 2018).

As Rhodophyta são também conhecidas por não possuírem células flageladas e exibirem o amido florídeo como substância de reserva (Barsanti & Gualtieri, 2014; Lee, 2018). São organismos bentónicos, maioritariamente multicelulares, macroscópicos e marinhos, que incluem a maioria das espécies de macroalgas com mais de 4000 já identificadas. Apesar de estar presente em todas as latitudes, é nas zonas temperada e nos trópicos que esta divisão apresenta maior abundância, contudo, de uma forma geral, os indivíduos atingem maior dimensão em águas mais frias. Apresentam ainda a capacidade de crescer a profundidades até mais de 200m, em parte devido aos pigmentos acessórios que auxiliam no processo de fotossíntese, mesmo quando a intensidade luminosa é reduzida (Barsanti & Gualtieri, 2014; Lee, 2018).

Dentro das algas vermelhas, todas as espécies da classe Corallinales, e algumas das espécies da classe Nemaliales, apresentam grandes depósitos extracelulares de carbonato de cálcio (Lee, 2018). Este processo ocorre através da assimilação de magnésio e cálcio da água, sendo que o rácio Mg/Ca pode variar consoante a sua disponibilidade no meio. Estas algas são particularmente abundantes em zonas rochosas, com forte agitação marítima e profundidades inferiores a 20 metros (Lee, 2018). Além disso, as algas com maior taxa de fotossíntese são as que apresentam a maior taxa de calcificação, sendo o processo de calcificação mais eficiente durante a exposição à luz (Goreau, 1963). Contudo, em geral, o processo de calcificação e a sua importância ecológica continuam a ser alvo de debate (Lee, 2018).

Atualmente as propriedades nutricionais dos alimentos são aferidas com base nos teores de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, fibras, vitaminas e cinzas (El-Sheekh et al., 2021; Ismail et al., 2017; Khairy & El-Shafay, 2013). Destes compostos, há um particular interesse nos ácidos gordos polinsaturados (PUFA), terpenos e carotenoides (Ahmed et al., 2011; Cavaco et al., 2021; Chakraborty et al., 2015). Diversos estudos mostram que o teor de proteínas nas algas pode variar entre 6 e 47% do peso seco (DW), enquanto os hidratos de carbono podem representar até 50% DW, e os lípidos, em regra, 1 a 3% DW (Ismail et al., 2017; Jose & Xavier, 2020; Khairy & El-Shafay, 2013). Quando olhamos apenas para as algas vermelhas, o teor de proteína normalmente encontra-se entre os 10 e os 30% DW (Khairy & El-Shafay, 2013). Quanto aos lípidos, as algas, incluindo as vermelhas, apresentam na sua componente lipídica, predominantemente ácidos gordos ómega-3 (n-3) e ómega-6 (n-6) (Cavaco et al., 2021). Algumas espécies são, ainda, fonte considerável de vitamina C e vitamina A (Barsanti & Gualtieri, 2014), bem como de vitaminas do complexo B e vitamina E (Carpena et al., 2022). Outro fator de destaque na composição química das macroalgas é o seu conteúdo em minerais, que são considerados micronutrientes inorgânicos (Carpena et al., 2022). Espécies como a *Palmaria palmata* apresentam elevadas quantidades de ferro e iodo, enquanto outras algas apresentam elevadas concentrações de zinco, manganês, potássio, cálcio, sódio e cobalto (Carpena et al., 2022; Cotas et al., 2020; Kumar et al., 2021). Contudo, a quantidade destes minerais é variável, estando a acumulação dos mesmos dependente da sua abundância na água do mar (Carpena et al., 2022; Cotas et al., 2020). Além disso, foi já detetada a presença de arsénio e outros elementos tóxicos para os humanos em diversas algas (Kumar et al., 2021).

Tendo em conta o perfil nutricional e, genericamente, a ausência de toxinas endógenas, as algas vermelhas são consideradas comestíveis, sendo que o seu consumo pode trazer benefícios para a saúde. Porém, como outros grupos de organismos, a composição química das algas vermelhas varia entre as diversas espécies, mas também de acordo com as condições do ambiente onde estas se encontram (Jose & Xavier, 2020; Khairy & El-Shafay, 2013).

As algas vermelhas são muito usadas para alimentação humana, como é o caso da espécie *Phorphyra/Pyropia* spp., e têm vindo a ser classificados como importantes fontes de metabolitos bioativos (Afonso, Correia, Freitas, Mouga, et al., 2021; Barsanti & Gualtieri, 2014; Chakraborty et al., 2015). Dentro das suas aplicações, destaca-se a extração de dois tipos de polissacarídeos, o agar e a carragenana (Lee, 2018). O agar é principalmente obtido através dos géneros *Gelidium* e *Gracilaria*. Os seus usos vão desde a área alimentar, como gelificante e espessante de alimentos, até à área farmacêutica e tecnológica, onde é utilizado como gelificante em meios de cultura e como agente transportador em medicamentos de ação lenta (Lee, 2018). A carragenana, por sua vez, é obtida em especial dos géneros *Chondrus* e *Gigartina*. Os seus usos são semelhantes ao agar, contudo, devido ao facto de ter menor poder gelificante é usada como estabilizador em emulsões de tintas, cosméticos ou farmacêuticos. Na área alimentar, o uso das carragenana, é centrado na produção de derivados do leite, especialmente gelados (Lee, 2018).

Além dos compostos já mencionados, as macroalgas apresentam ainda diversos outros compostos primários e secundários que lhes conferem diversas características e bioatividades (Carpena et al., 2022).

Como referido anteriormente, uma das características distintivas das Rhodophyta é a presença de ficobilinas, sendo responsáveis pela cor avermelhada destas algas (Cotas et al., 2020; Dumay et al., 2014; Freitas et al., 2021). As ficobilinas são pigmentos acessórios que auxiliam no processo da fotossíntese e apenas estão presentes nas Rhodophyta, nas Cyanobacteria e Cryptophyta. Estes compostos são essenciais para a sobrevivência e proliferação das algas vermelhas em locais mais profundos onde apenas chega luz verde e azul (Cotas et al., 2020; Dumay et al., 2014; Freitas et al., 2021). Outras das funções das ficobilinas é a fotoproteção em casos de elevada exposição à luz. São, ainda, uma importante fonte de nutriente em caso de insuficiência de nitrogénio e fósforo (Freitas et al., 2021). Assim, estes pigmentos são os maiores coletores de luz do Fotossistema II, nas Rhodophyta,

assim como o único pigmento solúvel em água. Em algumas espécies, as ficobilinas representam cerca de 50% das proteínas solúveis em água e cerca de 20% DW total (Dumay et al., 2014). Dentro das ficobilinas existem diferentes famílias, classificadas de acordo com as suas propriedades de absorção. Destas, nas algas vermelhas, estão presentes a ficoeritrina (PE), a ficocianina (PC) e a aloficocianina (APC) (Cotas et al., 2020; Dumay et al., 2014; Freitas et al., 2021). A ficoeritrina é ainda diferenciada em B-ficoeritrina (B-PE), exclusiva das Bangiales, e a R-ficoeritrina (R-PE), sendo a última a ficobilina presente em maior quantidade nas algas vermelhas, designadamente nas Florideophyceae (Dumay et al., 2014).

Estes pigmentos despertam grande interesse, especialmente devido à sua cor. A ficocianina é comercializada com pigmento azul, estando presente em gomas, sorvetes, doces, bebidas e laticínios. Contudo, apesar de ser resistente ao pH e à luz, é sensível à temperatura (Dumay et al., 2014). Quanto à ficoeritrina, os seus usos são também como corante avermelhado, em diversos produtos alimentares, médicos e cosméticos, mas pode ser utilizado também como marcador devido à sua fluorescência (Cotas et al., 2020; Dumay et al., 2014). No entanto, nos últimos anos, têm surgido diversos estudos que apontam para diversas bioatividades destes compostos, com aplicações na área da medicina. Entre as bioatividades destaca-se a capacidade antitumoral, antioxidante, antialérgica, antidiabética, anti-inflamatória e nutracêutica, estimulando o sistema imunitário e promovendo a regeneração de células (Cotas et al., 2020; Dumay et al., 2014; Freitas et al., 2021).

Além das ficobilinas, outra família de pigmentos presentes nas Rhodophyta é a dos carotenoides, classificados em dois tipos: os carotenos e as xantofilas. Dos carotenos as algas vermelhas apresentam essencialmente α e β -caroteno, sendo que das xantofilas é possível encontrar luteína, zeaxantina e violaxantina (Cotas et al., 2020; Freitas et al., 2021). Apesar do α e β -caroteno surgirem em maior quantidade, não é possível definir um perfil de carotenoides característico das algas vermelhas, havendo grande diversidade entre e dentro das classes (Cikoš et al., 2022). Contudo, é possível notar que as Gigartinales apresentam mais luteína e as Corallinales mais anteraxantina (Cotas et al., 2020; Freitas et al., 2021).

Devido ao facto de serem pigmentos presentes em diversos organismos, o seu estudo e uso estende-se a diversos campos. Atualmente já são aplicados como corantes e aditivos a laticínios, rações de animais, produtos cosméticos e farmacêuticos (Cotas et al., 2020; Freitas et al., 2021). No campo da cosmética, são conhecidos como protetores da radiação UV, na farmacêutica apresentam como antioxidantes atuando juntamente com outras

moléculas. Além disso, o seu consumo está relacionado com a diminuição de doenças inflamatórias, cardiovasculares e oftalmológicas. Apresenta, ainda, propriedades anticancerígenas e promove o desenvolvimento mental saudável durante a gravidez e nos primeiros anos de vida (Cotas et al., 2020; Freitas et al., 2021).

Em comum com todos os outros organismos fotossintéticos, finalmente, as algas vermelhas têm clorofila *a*, sendo este pigmento a base da sua capacidade fotossintética. A clorofila é um pigmento verde, existindo outras clorofilas: clorofila *b*, *c1*, *c2*, e clorofila *d*, *e* e *f* (Freitas et al., 2021; Schagerl & Donabaum, 2003). Estes pigmentos desempenham um papel fundamental na produção de energia permitindo, assim, o desenvolvimento dos organismos fotossintéticos. No caso das algas vermelhas, no processo de captura de luz a clorofila *a* é auxiliada pelas ficobilinas em casos de menor intensidade de luz, ou elevada profundidade (Dumay et al., 2014; Freitas et al., 2021). Quanto aos tipos de clorofila presentes nas algas vermelhas, não existe um consenso. Os primeiros estudos sugerem a presença de clorofila *a* e também de clorofila *d* (Schagerl & Donabaum, 2003). Contudo, estudos mais recentes, afirmam que, nas Rhodophyta, apenas está presente a clorofila *a* (Freitas et al., 2021).

Tal como nos pigmentos referidos anteriormente, um dos principais usos das clorofilas é a aplicação como corante em produtos alimentares, cosméticos e também na indústria têxtil. Além disso, já foi demonstrada uma grande capacidade antioxidante e anti-obesidade (Freitas et al., 2021).

Como vem sendo referido, os metabolitos secundários presentes nas algas apresentam diversas bioatividades. Este facto tem suscitado um grande interesse no estudo e identificação destas propriedades, o que leva ao surgimento de inúmeros compostos com aplicações (Wang et al., 2014). Destas bioatividades, as Rhodophyta, apresentam destaque nas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, entre outras.

Os compostos antioxidantes são moléculas que apresentam capacidade de capturar espécies reativas de oxigénio e radicais livres, combatendo assim o stress oxidativos dos organismos (Kumar et al., 2021). Os compostos antioxidantes presentes nas algas, agem como mecanismos endógenos de proteção contra o stress oxidativo resultante das condições ambientais extremas (Ismail et al., 2017). Nos últimos anos, diversos compostos têm sido apontados como os principais responsáveis pela capacidade antioxidantes das algas, em

especial os polifenóis, pigmentos, vitaminas, polissacarídeos sulfatados, e as micosporinas (micosporin like aminoacids - MAAs) (Afonso et al., 2021; Carpena et al., 2022; Ismail et al., 2017; Wang et al., 2014). Destes compostos, as MAAs, são conhecidas pela sua proteção contra a radiação UV. Além disso, as algas vermelhas apresentam quantidades significativas destes compostos. Algumas MAAs, apresentam ainda capacidade de captura de espécies reativas de oxigênio, tendo grande capacidade protetora contra stress oxidativo (Wang et al., 2014). A descobertas da presença destes compostos, e da sua respetiva capacidade antioxidante, é importante na determinação dos benefícios nutricionais e farmacêuticos que as algas podem apresentar. Para a determinação do potencial antioxidante de extratos de algas são utilizados diversos testes que podem ser direcionados para diferentes compostos (Carpena et al., 2022).

O stress oxidativo provoca danos em diversas macromoléculas como DNA e proteínas, podendo levar a doenças como cancro, diabetes, Alzheimer e doenças cardiovasculares (Ismail et al., 2017; Kumar et al., 2021). Assim, os antioxidantes desempenham um papel importante na prevenção destas doenças, tornando-se muito procurados (Chakraborty et al., 2015). A este fator, junta-se o facto de, recentemente, muitos dos antioxidantes sintéticos mais utilizados se revelarem tóxicos, aumentando assim a procura por antioxidantes de origem natural (Khairy & El-Sheikh, 2015). Atualmente, os antioxidantes provenientes de algas são principalmente utilizados em cosméticos, na indústria alimentar, farmacêutica e em aplicações biomédicas. Contudo, a sua aplicação na agricultura e em rações para animais ainda não é muito explorada, sendo um ponto com grande potencial de crescimento (Michalak et al., 2022).

Os antimicrobianos são compostos que retardam ou inibem o crescimento de microrganismos. Os compostos antibacterianos afetam bactérias e os antifúngicos os fungos (Kumar et al., 2021). Estas substâncias normalmente atuam destruindo a parede celular, degradando enzimas ou destruindo o material genético dos microrganismos, levando à sua destruição (Ismail et al., 2020; Kumar et al., 2021). Dos vários compostos produzidos pelas algas, os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana são os compostos fenólicos, os pigmentos, as proteínas, os glicosídeos e os ácidos gordos, entre outros (Afonso et al., 2021; Cabral et al., 2021; Ismail et al., 2020). Contudo, devido à complexidade destas moléculas, e ao facto de a sua presença nas algas ser variável ao longo do ano, a maioria dos

estudos incide sobre o potencial antimicrobiano *in vitro* de extratos, obtidos com diferentes solventes (Cabral et al., 2021; Ismail et al., 2020; Pérez et al., 2016).

Num estudo de Padmakumar & Ayyakkannu (1997) em que foram analisadas 80 espécies de macroalgas do sul da Índia, 70% mostrou atividade antibacteriana e apenas 27,5% atividade antifúngica. Quando analisamos os diferentes tipos de algas, as Rhodophyta apresentaram 80% de atividade antibacteriana, tendo uma atividade superior às Chlorophyta (62.5%) e às Phaeophyceae (61.9%). No que toca à atividade antifúngica, as algas vermelhas de novo demonstraram exibir maior atividade, com 37%, seguidas das algas castanhas com 33,3% e das verdes com apenas 8,3%. Dos diversos compostos isolados de algas vermelhas, alguns polissacarídeos e compostos fenólicos apresentam atividade contra bactérias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, e os géneros *Staphylococcus* e *Vibrio* (Kumar et al., 2021). Além destes, também diversos compostos halogenados, como terpenos, apresentam marcada atividade antimicrobiana e também antiviral (Pérez et al., 2016). Contudo, apesar de haver diversos estudos que comprovam o potencial antimicrobiano das algas vermelhas, a sua aplicação a nível alimentar e farmacêutico ainda não é representativa (Cabral et al., 2021).

Dos diversos testes para a caracterização da atividade antimicrobiana, a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC), permite aferir a atividade de diversas concentrações de extratos no crescimento de microrganismos. Assim, um meio de cultura líquido com os microrganismos em análise é adicionado em diluições sucessivas e conhecidas do extrato. O ponto onde não for observado crescimento microbiano, após incubação, é considerado a MIC (Cabral et al., 2021; Pérez et al., 2016).

Alguns autores detetam alguma sazonalidade no potencial antimicrobiano e antioxidante das macroalgas. Diversos estudos apontam para uma maior atividade antimicrobiana durante a primavera e o verão, enquanto o pico de atividade antioxidante ocorre no final do inverno, concomitante com uma maior quantidade de compostos fenólicos (Pérez et al., 2016).

1.1 *Jania rubens*

A *Jania rubens* (Linnaeus) J.V. Lamouroux, 1816, é uma alga vermelha da ordem Corallinales, que atinge um tamanho máximo de 9 a 10 cm. Como as restantes espécies desta classe, é uma alga calcária, apresentando um revestimento composto sobretudo por carbonato de cálcio (Johansen, 2018; Lee, 2018; Neto, 2000). Está presente na costa do Oceano Atlântico e no Mar Mediterrâneo, ocorrendo especialmente em águas com temperatura entre 10 e 30°C (Couteau & Coiffard, 2020; Ismail et al., 2017; Johansen, 2018; Navarro & Stortz, 2008; Neto, 2000). Esta alga desempenha uma função importante a nível ecológico, ao promover a fixação de outros organismos bentónicos, produzindo carbonatos, e auxiliando, ainda, a estabilização de recifes (Johansen, 2018; Porzio, et al., 2018).

Devido ao seu revestimento calcário, as algas da ordem Corallinales encontram-se entre os organismos mais sensíveis a variações nas condições ambientais (Porzio, et al., 2018). Com a perceção da crescente acidificação dos oceanos, diversos estudos têm sido efetuados, mostrando que as diferentes espécies reagem de maneira distinta. Este processo de diminuição do pH da água do mar, não afeta de forma significativa o revestimento destes organismos, contudo, há uma diminuição acentuada de pigmentos como clorofila, carotenoides e ficobilinas, afetando gravemente a atividade fotossintética (Porzio, et al., 2018). Com estes resultados, pensa-se que a estrutura do carbonato poderá não ser afetada pelo pH baixo, ou que a alga mantém a capacidade de deposição do mesmo de forma mais ativa, ajustando o restante metabolismo em resposta às alterações de pH.

A *Jania rubens*, assim como as restantes algas vermelhas, tem vindo a ser considerada como uma importante fonte de compostos bioativos, nomeadamente vitaminas, flavonoides e ácidos gordos. Estes produtos podem ter uma aplicação alargada como aditivos alimentares, suplementos e cosméticos (Maghraby et al., 2021). Devido ao seu alto conteúdo em cinzas, a *Jania rubens* pode ser uma boa fonte de compostos inorgânicos, e apresenta ainda quantidades consideráveis de lípidos, proteínas e hidratos de carbono (Ahmed et al., 2011; El-Sheekh et al., 2021; Ismail et al., 2017; Jose & Xavier, 2020; Khairy & El-Shafay, 2013). Quando comparada com outras espécies, a *J. rubens*, apresenta, ainda, um valor elevado de ácidos gordos polinsaturados (Khairy & El-Shafay, 2013). Apesar de existir um número considerável de estudos sobre o perfil nutricional desta alga, os resultados obtidos

são muito dispare, confirmando a grande volatilidade da composição bioquímica. Além disso, esta espécie é pouco estudada na costa portuguesa, sendo a maioria dos trabalhos publicados pertencentes à região Mediterrânea. Saleh & Al - Mariri (2017) analisaram extratos de diferentes solventes, e verificaram que os extratos aquosos e etanólicos de *Jania rubens* continham composições químicas semelhantes.

Das bioatividades já registadas para esta espécies, destaca-se uma elevada atividade antitumoral, em especial de extratos metanólico. Esta atividade, parece estar relacionada com a presença de quantidades significativas de esteroides e terpenoides (Ahmed et al., 2011). Também foi detetada capacidade antioxidante de alguns pigmentos e proteínas bem como dos extratos metanólicos e etanólicos desta alga (Ahmed et al., 2011; Mohy El-Din & El-Ahwany, 2016). Além disso, o estudo de Ismail et al. (2020) aponta para atividade antimicrobiana contra bactérias multirresistentes, por parte de ácidos gordos saturados de cadeia longa isolados de *Jania rubens*.

Contudo, o estudo desta espécie é ainda limitado, sendo necessário aprofundá-lo. É interessante estudar o perfil químico destas algas, provenientes da costa portuguesa para comparar com os resultados obtidos na região do Mar Mediterrâneo. Há ainda um grande potencial quando olhamos para as bioatividades já descobertas nesta alga. Os estudos disponíveis apresentam um foco em extratos obtidos com solventes diversos, no entanto, existe pouca bibliografia que utilize solventes verdes como água e etanol. Desta forma, utilizando estes solventes é possível compreender o potencial industrial desta espécie.

1.2 *Sphaerococcus coronopifolius*

O *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse, 1797 é uma alga vermelha da ordem Gigartinales, que habita a zona subtidal, e que pode ser encontrada na costa leste do Atlântico Norte e no mar Mediterrâneo (Abdelahad et al., 2016; Neto, 2000). É uma alga cartilaginosa que pode atingir até 25 a 30 cm de comprimento, formando tufo robustos de ramificação irregular (Abdelahad et al., 2016; Neto, 2000; Tomić, 2015). Em Portugal é possível encontrá-la em toda a costa, mas é mais comum nos arquipélagos dos Açores e da Madeira (Neto, 2000).

O potencial desta espécie começou a ser estudado no final da década de 1970 e nos anos 80, contudo, poucos estudos foram feitos (Abdelahad et al., 2016). Além disso, o perfil nutricional do *Sphaerococcus coronopifolius* ainda não é totalmente conhecido, com apenas alguns estudos sobre o teor de proteína (Patarra et al., 2011).

Grande parte dos estudos efetuados com esta alga vermelha focam num tipo específico de compostos, os terpenos (Pinteus et al., 2015; Quémener et al., 2021; Smyrniotopoulos et al., 2009). Estes compostos apresentam diversas bioatividades, nomeadamente potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, além de efeito citotóxico contra células cancerígenas (Ismail et al., 2020). Estes compostos são normalmente extraídos com solventes orgânicos como metanol e diclorometano, sendo posteriormente isolados. Desde a primeira análise química nesta alga, já foram isolados um grande número de diterpenos bromados, muitos deles com atividade marcada contra bactérias Gram-positivas, e efeito citotóxico contra células de cancro do pulmão (Rodrigues et al., 2015).

O desconhecimento do perfil químico e das bioatividades de diferentes extratos tornam o *Sphaerococcus coronopifolius* uma espécie muito interessante de estudar. Os poucos estudos existentes demonstram um grande potencial na atividade antimicrobiana e antioxidante. Além disso o perfil químico desta espécie pode revelar possíveis aplicações alimentares.

1.3 Objetivos

Tendo em conta que estas duas espécies são muito comuns em toda a costa portuguesa, é importante haver um maior conhecimento das mesmas de forma a avaliar a possibilidade da introdução destas espécies na área alimentar, farmacêutica e cosmética. Assim o objetivo deste trabalho é fazer a caracterização nutricional destas duas espécies, bem com a avaliação das suas bioatividades, nomeadamente através da:

1. Quantificação da humidade, da cinza, da proteína total, os lípidos totais e os hidratos de carbono, tanto da *Jania rubens*, como do *Sphaerococcus coronopifolius*.

2. Quantificação dos pigmentos, com determinação de clorofila *a*, carotenoides e ficobilinas.
3. Otimização da extração de ficoeritrina e ficocianina.
4. Determinação do rendimento de extração de diferentes solventes.
5. Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos extratos aquosos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Colheita e processamento da biomassa

A biomassa fresca de *Sphaerococcus coronopifolius* foi colhida em Julho de 2021 na praia do Quebrado, Peniche, Portugal, (39°22'13.28"N, 9°22'25.64"W), durante a maré baixa. A temperatura da água estava nos 17,7 °C, a salinidade nos 35 psu.

A biomassa fresca de *Jania rubens* foi colhida em Março de 2021 na praia de São Marcos, Peniche Portugal, (39°19'10.34"N, 9°21'24.27"W), durante a maré baixa, sendo a temperatura da água 14,9 °C, a salinidade 35 psu.

Após a recolha, e ainda na praia, as algas foram mantidas em caixas térmicas com placas refrigeradoras de modo a manter a temperatura baixa, sendo transportadas para o laboratório com a maior brevidade possível. Uma vez no laboratório, a biomassa fresca foi colocada em tabuleiros com água salgada onde foram identificadas e separadas as diferentes espécies, e foram retirados os organismos epífitos presentes na biomassa. Após a limpeza, as algas foram congeladas a -20 °C até à sua utilização. Para os protocolos que necessitavam de biomassa seca, a alga foi colocada a 25 °C por 48 horas, em estufa ventilada (FD115, Binder, Alemanha) (Afonso, Correia, Freitas, Mouga, et al., 2021) e moída num processador de alimentos (VBL120X Personal Active Pro, Austrália) até se obter um pó fino, com partículas inferiores a 200µm (Afonso, Correia, Freitas, Mouga, et al., 2021) A biomassa moída foi armazenada a -20 °C em tubos de plástico, selados, para evitar a absorção de humidade.

2.2 Determinação do Perfil Bioquímico da biomassa seca

2.2.1 Quantificação de Humidade e Cinza

De forma a determinar o teor de humidade e cinzas presentes nas algas, foi pesado 1g de biomassa fresca para um cadinho previamente tarado, sendo realizados triplicados. De seguida, os cadinhos foram colocados em estufa (FD115, Binder, Alemanha) a 105 °C durante 48h, sendo depois colocados a arrefecer no exsiccador e pesados novamente. Para

calcular a percentagem de humidade presente na alga fresca foi utilizada a seguinte equação (AOAC, 2016):

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{W_f - W_d}{W_f} \times 100$$

W_f = Peso da amostra fresca (g)

W_d = Peso da amostra seca (g)

A mesma biomassa foi colocada em mufla (B170, Nabertherm, Alemanha) com uma rampa de aquecimento de 4h e um patamar de 5h a 525°C. Quando a mufla arrefeceu, os cadinhos foram retirados e colocados em exsiccador até atingirem a temperatura ambiente. Após o arrefecimento, os cadinhos foram pesados e a quantidade de cinza (como % de peso seco) foi calculada segundo a fórmula seguinte (AOAC, 2016):

$$\text{Cinza (\% peso seco)} = \frac{W_a}{W_d} \times 100$$

W_a = Peso da cinza (g)

W_f = Peso da amostra fresca (g)

W_d = Peso da amostra seca (g)

2.2.2 Quantificação de Proteína Total

Para a quantificação da proteína foi utilizado o método de Kjeldahl (AOAC, 2016). Para isso foi usada biomassa seca (0,5g) que foi submetida a uma digestão em aparelho digestor (Tecator Digestor, Foss, Suíça). Para tal foi adicionado ácido sulfúrico e catalisador em pastilhas *KjelTabs* (VWR Chemicals, Estados Unidos da América) e a temperatura foi colocada a 220°C por 30 min seguido de 90 min a 400°C. Além dos triplicados com amostra foram ainda realizados brancos em duplicado, onde não foi adicionada amostra. Terminado o tempo de digestão e após os tubos estarem frios, foi adicionada água destilada e feita uma destilação com adição de NaOH no destilador (2100 Kjeltex Distillation Unit, Foss, Suíça). Adicionou-se ácido bórico ao produto destilado e foi efetuada uma titulação com HCl até a amostra apresentar uma cor cinzenta, sendo registado o volume de HCl adicionado.

De forma a determinar a quantidade de proteína, em % de peso seco, foi utilizada a seguinte fórmula, sendo utilizado o valor do fator de conversão de 5, específico para algas vermelhas (Angell et al., 2016):

$$\text{Proteína Total (\% peso seco)} = \frac{[(V_a - V_b) \times n \times cf \times 0,014]}{m} \times 100$$

V_a = Volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL)

V_b = Volume de HCl gasto na titulação do branco (mL)

n = Concentração do HCl gasto na titulação (0,1 mol.L⁻¹)

m = Massa inicial da amostra (g)

cf= fator de conversão

2.2.3 Quantificação de Matéria Gorda Total

Para quantificar a matéria gorda total foi utilizado o Método de Folch (1957). Para isso, 1 g de alga seca foi hidratada a 80 %, com água ultrapura, e de seguida foi adicionado o Reagente Folch (clorofórmio: metanol, 2:1) e a amostra foi homogeneizada no vórtex durante 6 min, sendo realizados triplicados. Após este tempo, foi adicionado NaCl 0,8%, sendo as amostras novamente agitadas por 1 min. Para facilitar a separação das diferentes camadas, a amostra foi centrifugada a 4 025 g, a 4°C por 10 min, e de seguida foi recolhida a camada com o clorofórmio e a matéria gorda, que apresentava uma cor verde-escura. A fração recolhida foi filtrada numa coluna com algodão hidrofóbico e hidróxido de sódio para remover partículas em suspensão e resíduos de água. O *pellet* e as restantes camadas foram novamente extraídos com clorofórmio e repetidos todos os passos a partir da centrifugação, para recuperar toda a fração lipídica em maior extensão

As frações de clorofórmio foram transferidas para peras, previamente pesadas, e as amostras foram evaporadas no rotavapor (Laborota 4000, Heidolph, Alemanha) a 40°C. Após evaporação, as peras foram colocadas no exsiccador para arrefecer e por fim foram pesadas.

O teor de matéria gorda total em % peso seco, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Matéria Gorda (\% peso seco)} = \frac{m_1 - m_0}{m_i} \times 100$$

m_i = massa inicial de alga

m_1 = massa da pera com gordura

m_0 = massa da pera vazia

2.2.4 Quantificação de Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono presentes nas algas foram quantificados pelo método de Dubois (1956). Foram pesados 5 mg de biomassa seca, em triplicado, e adicionados a cada amostra, 4 mL de ácido sulfúrico (1M), sendo os tubos de ensaio colocados no banho-maria a 90°C por 1h (Precistern 6000387, Selecta, Espanha). De seguida, os tubos foram centrifugados a 1 005 g durante 2 minutos e retirados 1 mL para dois tubos diferentes, tendo cuidado para não transferir o *pellet*. Num dos tubos foram adicionados 500µL de fenol (5%). Em todos os tubos foram colocado 3 mL de ácido sulfúrico (96%), e a solução foi homogeneizada, realizando movimentos *up and down* com a micropipeta. Após o arrefecimento dos tubos, adicionaram-se 6 mL de água ultrapura. Para ler a absorvância foi efetuado um varrimento entre 400 e 550 nm, em espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific, USA).

Foi efetuada uma curva padrão de galactose com concentrações entre 0 e 1 (v/v), que seguiu os mesmos passos das amostras, após a centrifugação. A equação da curva padrão utilizada para o cálculo dos hidratos de carbono foi a seguinte (DuBois et al., 1956):

$$\text{Hidratos de Carbono (\% peso seco)} = \frac{y - \frac{a}{b} \times \text{FD}}{m} \times 100$$

y = ABS_{485nm} (tubo c/ fenol) – ABS_{485nm} (tubo s/ fenol)

b = ordenada na origem da curva padrão

a = declive da curva padrão

m = massa de biomassa (mg)

FD = volume ácido sulfúrico (96%) adicionado

2.3 Extração e Quantificação de Pigmentos

2.3.1 Quantificação de Ficobiliproteínas

Para a quantificação de ficoeritrina e ficocianina nas amostras, foi pesado 1 g de alga fresca, previamente congelada, em triplicado. Às amostras congeladas foi adicionado solvente à razão de 1/20 (biomassa/solvente), sendo testados 4 solventes diferentes (água ultrapura, água salgada, tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e EDTA 0,1M pH 7,0). Para preservar os pigmentos, os solventes encontravam-se todos a -20°C, no início do procedimento. A amostra com solvente foi colocada num processador alimentar (VBL120X Personal Active Pro, Breville, Jarden Consumer Solutions) de forma a fragmentar a biomassa o máximo possível. A biomassa foi depois macerada por 10 min num almofariz gelado, mantido em gelo, para atingir uma temperatura o mais baixa possível. Após a maceração, a alga moída e o solvente foram transferidos para um gobelet numa tina com gelo e as amostras foram colocadas em agitação por 30 min, no escuro. Passados os 30 min, a amostra foi centrifugada a 12 500 g, a 4 °C por 20 min, sendo recolhida a fração líquida. Por fim foi realizada a leitura da absorvância, com um varrimento entre 300 e 800 nm, em espectrofotómetro (Epoch 2, BioTek, USA).

Para calcular a concentração de R-ficoeritrina (R-PE) e R-ficocianina (R-PC) foram usadas as seguintes fórmulas (Beattie et al., 2018; Beer & Eshel, 1985):

$$\begin{aligned} \text{Concentração de R - PE } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \\ = [(\text{Abs}565 - \text{Abs}592) - (\text{Abs}455 - \text{Abs}592) \times 0.2] \times 0.12 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Concentração de R - PC } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \\ = [(\text{Abs}618 - \text{Abs}645) - (\text{Abs}592 - \text{Abs}645) \times 0.51] \times 0.15 \end{aligned}$$

2.3.2 Quantificação de Clorofila e Carotenoides

Para a quantificação de carotenoides nas amostras, foi pesado 1g de alga fresca congelada, em triplicado. Às amostras congeladas foi adicionada acetona (90%) à razão de 1:20 (biomassa:solvente). De seguida a amostra com solvente foi colocada num processador alimentar (VBL120X Personal Active Pro, Breville, Jarden Consumer Solutions) de forma a fragmentar a biomassa o máximo possível, sendo depois a amostra macerada manualmente por 10 min num almofariz. Após a maceração, as amostras foram colocadas em agitação por 30 min, no escuro. Passados os 30 min, a amostra foi centrifugada a 8,000 g por 20 min, sendo recolhida a fração líquida. Por fim foi realizada a leitura da absorvância, com um varrimento entre 300 e 800nm em espectrofotómetro (Epoch 2, BioTek, USA).

Para calcular a concentração de clorofila e carotenoides foram usadas as seguintes equações (Kirk & Allen, 1965; Osório et al., 2020):

Chl *a* (µg/mL)

$$\begin{aligned} &= -0,3319 \times (\text{Abs}_{630\text{nm}} - \text{Abs}_{750\text{nm}}) \\ &- 1,7485 \times (\text{Abs}_{647\text{nm}} - \text{Abs}_{750\text{nm}}) \\ &+ 11,9442 \times (\text{Abs}_{664\text{nm}} - \text{Abs}_{750\text{nm}}) - 1,4306 \times (\text{Abs}_{691\text{nm}} \\ &- \text{Abs}_{750\text{nm}}) (\pm 0,0020) \end{aligned}$$

$$\text{Carotenoides Totais } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right): \text{Abs}_{480\text{nm}} + 0,114 \times \text{Abs}_{663\text{nm}} - 0,638 \times \text{Abs}_{645\text{nm}}$$

2.4 Preparação de extratos brutos de *Sphaerococcus coronopifolius* e *Jania rubens*

A biomassa seca das duas espécies de algas, foi sujeita a um processo de extração sequencial, com um ratio biomassa:solvente numa razão de 1:10, baseado no processo descrito por Afonso et. al (2021). Foram testados três solventes orgânicos, etanol, acetona e

heptano, além de água ultrapura, sendo a biomassa extraída primeiro com água e depois com um solvente orgânico.

Para isso, foram misturados 3 g de biomassa em 30 mL de água ultrapura, ficando a mistura sob agitação num gobelet, por uma hora à temperatura ambiente, protegida da luz. De seguida a mistura foi centrifugada a 8000 g, durante 10 min, à temperatura ambiente, o sobrenadante foi filtrado (GF/C, Whatman), e a biomassa foi sujeita a uma segunda extração com 10 mL água ultrapura, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade, e com o mesmo processo de centrifugação e filtragem. Estes dois passos foram depois repetidos com a mesma biomassa, usando desta vez um solvente orgânico. O extrato aquoso foi liofilizado, enquanto os extratos orgânicos foram evaporados no rotavapor (Laborota 4000, Heidolph, Alemanha) a 40°C, sendo liofilizados de seguida. Após pesagem e cálculo do rendimento de cada extração, os extratos foram armazenados a -20 °C.

Para os ensaios seguintes, os extratos aquosos liofilizados foram dissolvidos em água ultrapura numa concentração de 100 mg·mL⁻¹, sendo estes os que foram analisados nos ensaios de determinação de atividade antioxidante e antimicrobiana, por serem aqueles que mostraram rendimentos mais elevados.

2.5 Avaliação da Atividade Antioxidante

2.5.1 Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

A capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), foi medida seguindo o método de Brand-Williams et. al (1995) com algumas alterações devidas às características destas espécies. Para isso foi preparada uma solução stock do radical DPPH a 0,1 mM em etanol, com uma absorvância obrigatória de 0.9 ± 0.1 a 517nm. Os extratos aquosos foram diluídos em diferentes concentrações, designadamente 20, 40, 60 e 80 mg·mL⁻¹.

A reação foi adaptada para microescala, sendo efetuada numa placa de 96 poços (738-0168, Avantor/Greiner, Áustria) com 2 µL de extrato aquoso (nas concentrações de 20,

40, 60, 80 e 100 mg·mL⁻¹) e 198 µL de DPPH. Foram ainda preparados poços com 2 µL água ultrapura e com 198 µL de DPPH, que serviram de controlo negativo, assim como controlo positivo com ácido ascórbico (10 mg·mL⁻¹) e ainda poços com 2 µL de extrato aquoso (nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg·mL⁻¹) e 198 µL de água ultrapura que serviram de branco, uma vez que os extratos apresentavam coloração. As condições descritas foram feitas em quadruplicado. A placa foi preparada num espaço com reduzida luminosidade. De seguida, a placa foi incubada no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente, sendo a absorvância medida a 517 nm espectrofotómetro (Epoch 2, BioTek, USA).

O cálculo da capacidade de redução do radical DPPH foi calculado através da seguinte equação (Dudonné et al., 2009):

$$\text{Redução do Radical DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs } c - (\text{Abs } s - \text{Abs } b)}{\text{Abs } c} \times 100$$

Abs *c* é a absorvância do controlo negativo (água ultrapura e DPPH);

Abs *s* é a absorvância da amostra (extrato e DPPH);

Abs *b* é a absorvância do branco (amostra e água ultrapura).

2.5.2 Capacidade de redução do radical ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

A capacidade de redução do radical 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), foi medida seguindo o método de Meng et al. (2022) com algumas alterações devidas às características destas espécies. Para isso foi preparada uma solução stock do radical ABTS, misturando uma solução 7 mM de ABTS em água ultrapura e uma solução de 2,45 mM de Persulfato de Potássio em água ultrapura, em partes iguais. Esta solução stock ficou cerca de 16h em repouso, à temperatura ambiente e num local escuro. De seguida esta solução foi dissolvida com água ultrapura até atingir uma absorvância de $0,72 \pm 0,02$ a

734 nm, sendo esta a solução utilizada nos ensaios. Os estratos aquosos foram diluídos em diferentes concentrações, nomeadamente de 20, 40, 60 e 80 mg·mL⁻¹.

A reação foi adaptada para microescala, sendo efetuada numa placa de 96 poços (738-0168, Avantor/Greiner, Áustria) com 2 µL de extrato aquoso (nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg·mL⁻¹) e 198 µL de ABTS. Foram ainda criados poços com 2 µL água ultrapura e 198 µL de ABTS, que serviram de controlo negativo, assim como controlo positivo com ácido ascórbico (10 mg·mL⁻¹) e ainda poços com 2 µL de extrato aquoso (nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg·mL⁻¹) e 198 µL de água Ultrapura que serviram de branco uma vez que as amostras tinham cor. As condições descritas foram feitas em quadruplicado. A placa foi preparada num espaço com a menor luminosidade possível e de seguida foi incubada no escuro por 6 minutos, à temperatura ambiente, sendo a absorvância medida a 734 nm, espectrofotómetro (Epoch 2, BioTek, USA). O cálculo da capacidade de redução do radical ABTS foi feito através da seguinte equação (Dudonné et al., 2009):

$$\text{Redução do Radical ABTS (\%)} = \frac{\text{Abs } c - (\text{Abs } s - \text{Abs } b)}{\text{Abs } c} \times 100$$

Abs *c* é a absorvância do controlo negativo (água ultrapura e ABTS);

Abs *s* é a absorvância da amostra (extrato e ABTS);

Abs *b* é a absorvância do branco (amostra e água ultrapura).

Da percentagem de redução obtida através da equação anterior, foi calculado o valor de EC50, que pode ser definido como a concentração da amostra onde se obtém metade da resposta máxima. Assim os resultados foram interpretados tendo em conta que quanto menor o EC 50, maior a atividade antioxidante do extrato.

2.5.3 Quantificação Total de Polifenóis (QTP)

A quantificação total de polifenóis foi efetuada através da adaptação do método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Foi preparada uma solução de Carbonato de Sódio a 1,89 M (Na_2CO_3) em água ultrapura.

O método foi adaptado para microplacas de 96 poços (738-0168, Avantor/Greiner, Áustria) que continham 2 μL de extrato, 158 μL de água ultrapura, 10 μL de reagente de Folin-Ciocalteu, sendo adicionado 30 μL da solução de carbonato de sódio após 2 minutos. Foram ainda realizados brancos para a amostra, sem o reagente e controlos em que foi adicionada água ultrapura em vez de amostra.

De seguida as placas incubaram no escuro durante uma hora a temperatura ambiente, sendo lido a absorvância a 755nm, espectrofotómetro (Epoch2, Biotek Instruments). Foi efetuada uma curva padrão com ácido Gálico e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg GAE.g^{-1} extrato).

2.6 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

2.6.1 Revitalização de Estirpes Bacterianas

De forma a testar o potencial antimicrobiano dos extratos aquosos foram escolhidos três microrganismos, sendo eles a *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e a *Saccharomyces cerevisiae* (DSM 70449), estando assim representadas as bactérias Gram-, Gram+ e uma levedura, respetivamente.

Estes microrganismos estavam criopreservados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ e foram revitalizados antes de prosseguir com os ensaios. Para a revitalização da *E. coli* e do *Bacillus subtilis* foi utilizado o meio Luria Bertani (LB), ao qual se adicionou 15 g.L^{-1} de Agar Bacteriológico, sendo as placas incubadas a 37°C por 24h. Já para a *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado o meio *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) e as placas foram incubadas por 72 h a 28°C . Após os tempos de incubação as placas com os riscados foram armazenadas a 4°C até serem utilizadas.

De forma a efetuar as suspensões, utilizadas no método seguinte, foi selecionada uma colónia típica do microrganismo, que foi repicada para um tubo de ensaio com meio

Muller Hinton líquido (MHB, Muller-Hinton Broth). De seguida, o tubo foi colocado à temperatura ótima de crescimento da respetiva espécie, sendo finalmente a turbidez ajustada a 0,5 na escala de McFarland (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2003), com uma solução salina a 0,85%. Desta forma todos os ensaios estavam em condições semelhantes. Este passo foi igual para cada uma das três espécies descritas previamente, sendo apenas diferentes as temperaturas e o tempo de incubação. Os ensaios descritos de seguida foram feitos imediatamente após o ajuste da turbidez da suspensão (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2003).

2.6.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A determinação da Concentração Mínima Inibitória é uma técnica muito comum que permite avaliar a capacidade antimicrobiana (Wiegand et al., 2008). Para a realização desta técnica foi adaptado o protocolo de Lambert & Pearson (2000), implementando o método das microdiluições em caldo, em microplacas (82.1582.001, Sarstedt, Alemanha).

Foi efetuado um estudo preliminar para testar a concentração máxima de extrato e verificar se havia alguma inibição do crescimento de algum dos três microrganismos. Para isso foram colocados 145 µL de meio MH líquido, 50 µL de extrato aquoso e 5 µL de suspensão (correspondendo a uma concentração final de 25 mg·mL⁻¹ de extrato de alga). Foram ainda efetuados controlos contendo apenas 195 µL de meio MH líquido e 5 µL de suspensão, como controlo positivo, e apenas 200 µL MH líquido, como controlo negativo. De forma a validar as leituras visuais, foi lida a absorvância por espectrofotometria a 600 nm (SynergyH1, Biotek, USA), logo após a inoculação e após 24h de incubação, sendo que as placas com *E. coli* e *B. subtilis* foram mantidas a 37°C e *S. cerevisiae* a 27°C.

Após 24h de incubação as placas que apresentavam crescimento no controlo negativo, ou ausência de crescimento no controlo positivo era imediatamente descartadas e o ensaio repetido. Nas restantes placas, os poços com extrato foram analisados. Aqueles que apresentaram inibição de crescimento, verificada por leitura visual e absorvância, foram repetidos, com recurso a micro-diluições.

Para as micro-diluições foram preparadas placas que começavam com um poço que continha 145 μL de MH líquido, 50 μL de extrato aquoso, e de seguida, foi feita uma sequência decrescente de diluições. Foram efetuadas no total de 11 concentrações entre 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0.02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo a concentração de cada poço metade da concentração do poço anterior. Por fim, foram adicionados 5 μL da suspensão, assim como os mesmos controlos das placas do estudo preliminar. Estas placas seguiram o mesmo esquema de leituras, tempo e temperatura de incubação referido anteriormente. O valor da MIC foi considerado no poço com a concentração mais baixa onde era visível uma turbidez menor assim como menos depósito bacteriano, quando comparado com o controlo positivo. O crescimento microbiano foi calculado segundo a equação seguinte:

$$\text{Crescimento microbiano (\%)} = \frac{\text{Abs } e \text{ (t1)} - \text{Abs } e \text{ (t0)}}{\text{Abs } c \text{ (t1)} - \text{Abs } c \text{ (t0)}} \times 100$$

Abs *e* é a absorvância do extrato, a 600nm, no momento da inoculação(t0) e ao fim de 24h (t1)

Abs *c* é a absorvância do controlo positivo, a 600nm, no momento da inoculação(t0) e ao fim de 24h (t1)

2.7 Análise estatística

Todos os testes foram efetuados em triplicado ($n=3$), no mínimo. A análise estatística foi realizada por testes ANOVA de um fator ou testes T, após confirmação da normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias. Quando os requisitos não foram cumpridos, realizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney. Diferenças de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. O cálculo do EC50 no caso da capacidade de redução do radical ABTS foi efetuado no software GraphPad Prism 9.0.0. Toda a análise estatística foi feita com o auxílio do software IBM SPSS Statistics 28.0 (IBM Corporation, New York, USA).

3. Resultados e Discussão

3.1 Perfil Bioquímico:

A biomassa de *S. coronopifolius* e de *J. rubens* foi analisada quanto à percentagem de humidade e o conteúdo de humidade, cinza, proteína, matéria gorda total e hidratos de carbono. Os resultados revelam diferenças entre as duas espécies, indo de encontro com dados já publicados que atestam a elevada diversidade da composição química das algas vermelhas. Os valores obtidos na análise do perfil bioquímico estão presentes na Tabela I.

Tabela I - Perfil bioquímico de *Sphaerococcus coronopifolius* e *Jania rubens*. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$, para a Humidade e Cinza; e $n=3$ para Proteína, Matéria Gorda Total e Hidratos de Carbono).

	<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	<i>Jania rubens</i>
Humidade (% de FW)	71,86 \pm 2,05	38,61 \pm 2,36
Cinza (% de DW)	29,76 \pm 2,23	79,79 \pm 0,83
Proteína (% de DW)	12,65 \pm 0,17	4,70 \pm 0,21
Matéria Gorda Total (% de DW)	0,92 \pm 0,05	0,29 \pm 0,06
Hidratos de Carbono (% de DW)	40,23 \pm 1,87	7,72 \pm 0,42

Tendo em conta a percentagem de humidade, a alga *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou o valor mais elevado com 71,86% FW. Já a *Jania rubens* apresentou um teor de humidade de apenas 38,61% FW. A diferença estatística entre estes valores foi confirmada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($U = 16,00$, $p = 0,029$). Como seria expectável, quando olhamos para o conteúdo de cinza verificamos uma inversão dos valores com a *Jania rubens* com 79,79% DW e o *S. coronopifolius* com apenas 29,76% DW, havendo uma notória diferença entre as espécies, confirmada estatisticamente pelo Teste T ($t(6)=62,281$, $p<0,001$).

Ao analisarmos os resultados já publicados, verificamos que os valores de humidade obtidos para a *Jania rubens* estão abaixo dos 53,29% FW obtidos por Ismail et al. (2017). Contudo, há ainda estudos que quantificam a humidade desta espécie entre 2 e 5% FW (Jose & Xavier, 2020; Khairy & El-Shafay, 2013), valores muito abaixo do obtido no presente estudo. Há ainda autores que indicam valores de humidade semelhantes aos obtidos para esta espécie (Polat & Ozogul, 2013). Além disso, estes autores analisaram a variação do teor de humidade ao longo do ano, tendo sido registada pouca variação sazonal. Quanto ao conteúdo de cinzas verificamos novamente uma discrepância entre os estudos já publicados, com variações entre 20 e 50% DW (Ismail et al., 2017; Khairy & El-Shafay, 2013). Já o estudo de Jose et al. (2020) apresenta um conteúdo de cinzas de 86,66% DW, próximo ao valor obtido neste trabalho. No entanto, é de ressaltar que todos os estudos apresentados analisam biomassa recolhida na zona do mar Mediterrâneo, onde as condições ambientais são diferentes da costa de Peniche, onde foi recolhida a biomassa em análise.

Quando olhamos para o *Sphaerococcus coronopifolius*, verificamos que quase não existem estudos relativamente à humidade e cinzas nesta espécie. O trabalho de Patarra et al. (2011), apresenta um valor de 85,91% FW de humidade. A alga *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*, apresenta 86,52% FW de humidade (Pacheco et al., 2021), sendo que, esta espécie pertence à mesma ordem (Gigartinales) que o *S. coronopifolius*. Outros estudos quantificam a humidade de outras Gigartinales entre 72 e 89% FW, o que indica elevada percentagem de humidades nestas algas (Olsson et al., 2020; Yanshin et al., 2021). Quanto ao conteúdo de cinzas, algas como a *Chondrus crispus* e a *Dilsea carnosa* apresentam um conteúdo de cinzas entre 24 e 28% DW, com algumas Gigartinales a chegarem a 38% DW (Olsson et al., 2020). Também a alga *C. teedei* var. *lusitanicus* apresenta valores próximos a 30% DW (Pacheco et al., 2021) valores muito próximos do encontrado no presente estudo.

Assim, como foi possível verificar nos estudos mencionados, o conteúdo de humidade e cinza apresentam uma relação inversa, ou seja, quando a humidade é elevada o conteúdo de cinzas é mais baixo e vice-versa. A análise do conteúdo de cinzas mede a componente mineral total presente na biomassa. Tendo em conta que as algas são conhecidas como fontes significativas de diversos minerais, a percentagem de cinzas é normalmente maior quando comparada com outros organismos, como as plantas terrestres (Pereira, 2018). Quando analisamos algas da ordem Corallinales observamos um valor elevado no conteúdo em cinzas, devido ao facto de estas apresentarem depósitos minerais, que revestem toda a

alga. É este o caso da *Jania rubens*, que apresenta um conteúdo em cinza mais elevado, quando comparado com uma alga cartilaginosa, como o *Sphaerococcus coronopifolius*, ou outras Gigartinales.

O conteúdo de proteínas foi mais elevado em *S. coronopifolius*, 12,65 % DW, em comparação com a *J. rubens*, com 4,70% DW. Esta diferença era expectável pois, como as Corallinales apresentam elevado conteúdo em cinza, os macronutrientes em análise apresentam concentrações mais baixas que outras algas, tendo o facto sido confirmado pelo Teste T ($t(4)=-50,745$, $p<0,001$). Além disso, os resultados obtidos para as duas espécies, estão longe de se destacar dentro das algas vermelhas, pois dentro do filo há registo de espécies que atingem 47% DW de proteína (Fleurence, 1999; Ismail et al., 2017).

O valor obtido para o *S. coronopifolius*, está um pouco abaixo de valores já registado para a mesma espécie, que se encontrava entre 19 e 20% DW (Patarra et al., 2011). Contudo, quando olhamos para algas como *C. teedei* var. *lusitanicus*, *C. crispus* e *Polyides rotunda*, verificamos que os valores obtidos para o *S. coronopifolius* são superiores.

O teor de proteína registado para a *J. rubens* encontra-se próximo dos valores publicados por Polat & Ozogul (2013), entre 1,6 e 3,8% DW e de El-Sheekh et al. (2021), com 5,1% DW. Já outros autores apontam para valores de proteína entre 9 e 28% (Ismail et al., 2017; Khairy & El-Shafay, 2013).

Como referido anteriormente, estas diferenças dever-se-ão essencialmente às diferentes condições ambientais onde a biomassa foi recolhida. Além disso, a variação do conteúdo de proteína ao longo do ano apresenta uma maior variação quando comparada com outros macronutrientes (Polat & Ozogul, 2013).

Tal como esperado, o conteúdo em matéria gorda total apresenta valores muito baixos. As algas vermelhas são conhecidas por apresentar quantidades baixas de lípidos, que são compatíveis com uma dieta saudável, e que não apresentam potencial energético (Lordan et al., 2011). Não houve diferenças significativas, segundo o teste de Mann-Whitney, ($U = 9,00$, $p > 0,05$), entre os valores obtidos para o *Sphaerococcus coronopifolius*, com 0,92% DW, e a *Jania rubens*, com 0,29% DW.

Quando comparamos com dados já publicados observamos que os valores obtidos para o *Sphaerococcus coronopifolius* estão ligeiramente abaixo dos registados para a alga

Chondracanthus teedei var. *lusitanicus* (Pacheco et al., 2021). Contudo, nas análises bioquímicas realizadas por outros autores, ao *S. coronopifolius* e outras Gigartinales, o conteúdo de matéria gorda não foi alvo de análise (Olsson et al., 2020; Patarra et al., 2011; Yanshin et al., 2021).

No caso da *Jania rubens*, os artigos publicados apresentam valores diversos, que variam entre 1,4 e 2,4% DW (El-Sheekh et al., 2021; Ismail et al., 2017; Khairy & El-Shafay, 2013). Já os dados de Polat & Ozogul (2013), apresentam valores de matéria gorda total que se assemelham aos obtidos.

Quanto ao conteúdo em hidratos de carbono, a alga *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou um valor elevado, de 40,23% DW, quando comparado com a *Jania rubens* que apenas tinha 7,72% DW. Esta grande diferença significativa entre as duas espécies foi confirmada estatisticamente pelos Testes T ($t(4)=-29,384$, $p<0,001$). As algas vermelhas são conhecidas por produzirem grandes quantidades destes compostos, sendo normal registarem-se valores elevados. Dentro dos compostos com maior interesse comercial encontram-se o agar e a carragenana. Os valores já anteriormente obtidos para os hidratos de carbono em *S. coronopifolius* são semelhantes ao obtidos no presente estudo (Patarra et al., 2011). Contudo, outras Gigartinales apresentam valores que chegam a 53% e 56% (Pacheco et al., 2021; Yanshin et al., 2021), apesar de o valor mais comum para esta ordem rondar os 30 a 40% (Olsson et al., 2020; Yanshin et al., 2021). Uma análise mais aprofundada do conteúdo de hidratos de carbono do *S. coronopifolius*, seria de grande interesse pois permitiria classificar quais os tipos presentes nesta alga. Esta análise poderia revelar um maior potencial desta espécie, tornando-a alvo de maior pesquisa.

No caso da *Jania rubens*, os resultados obtidos apresentam um valor baixo, o que vai de encontro dos valores registados para algumas Corallinales (El-Sheekh et al., 2021). No entanto, alguns autores registaram valores muito mais elevados, entre 34 e 42% (Khairy & El-Shafay, 2013), sendo que Ismail et al. (2017) obtiveram valores de 72% de hidratos de carbono totais.

A grande discrepância entre os resultados de diferentes autores, prende-se com o facto de a composição bioquímica estar fortemente condicionada por fatores abióticos, como variações de temperatura, pH e luminosidade. Estudos que analisam a variação do perfil bioquímico ao longo do ano comprovam estas variações, com os diferentes macronutrientes

a variarem de forma diferente em cada uma das estações (Afonso, et al., 2021; Fleurence, 1999; Olsson et al., 2020; Pereira, 2018; Polat & Ozogul, 2013; Yanshin et al., 2021). Além disso, alguns autores sugerem também que a fase de crescimento dos organismos, apresenta uma marcada influência nas quantidades de macronutrientes presentes na biomassa. Outro ponto que influencia os resultados é a metodologia escolhida para a quantificação destes macronutrientes (Patarra et al., 2011).

De uma forma geral, os dados do perfil bioquímico destas duas espécies, não apresentam em grandes diferenças, quanto aos valores já conhecidos para as duas espécies. Contudo, tendo em conta a espécie *Sphaerococcus coronopifolius*, os resultados obtidos mostram-se de especial importância, pois não há muitos trabalhos na bibliografia que abordem estes aspetos. Já no caso da *Jania rubens*, os valores conseguidos apresentam algumas semelhanças com valores já publicados. Apesar disso, em todos os macronutrientes analisados há alguma bibliografia que apresenta dados muito discrepantes.

3.2 Extração e Quantificação de Pigmentos

Sendo algas vermelhas, as duas espécies em análise produzem ficobiliproteínas, uma família de pigmentos característicos das Rhodophyta. Dentro desta família são de destacar a ficoeritrina (R-PE) e a ficocianina (R-PC). Além destes pigmentos é ainda possível encontrar carotenoides, assim como a clorofila *a*. A quantificação destes pigmentos ajuda a determinar o potencial biotecnológico destas algas, uma vez que os pigmentos são responsáveis por algumas bioatividades de interesse em diversas áreas, nomeadamente alimentar e cosmética.

3.2.1 Quantificação de Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são pigmentos acessórios responsáveis pela cor avermelhadas das Rhodophyta, que desempenham um papel fundamental na captura de luz para a fotossíntese. Sendo proteínas hidrossolúveis, grande parte dos métodos de extração utilizam solventes à base de água. Apesar disso, atualmente existem diversos métodos de extração

destes pigmentos, que envolvem extração sólido-líquido com água ou tampão fosfato, ou então métodos mais complexos como processamento enzimáticos e extrações ultrassônicas ou com micro-ondas (Ramu Ganesan et al., 2022). Também as metodologias de quantificação são variáveis, com diversos estudos a utilizar espectrofotômetros UV-VIS, e outros que utilizam técnicas cromatográficas (Dumay et al., 2014; Nguyen et al., 2020).

Tendo em conta a simplificação do processo de extração e quantificação, foi decidido seguir um procedimento de maceração e extração sólido-líquido, como descrito anteriormente. De seguida, tendo em vista a otimização deste passo, foram escolhidos diversos solventes de forma a avaliar qual deles teria o melhor desempenho. Foi também analisada a influência do material da cuvete no momento da leitura no espectrofotómetro, sendo utilizadas cuvetes de plástico e de vidro.

Deste modo, os resultados da extração e quantificação de ficoeritrina e ficocianina das algas *Sphaerococcus coronopifolius* e *Jania rubens*, estão representados nas Figuras de 1 a 4.

Quanto à quantificação de ficoeritrina em *Sphaerococcus coronopifolius* (Figura 1), a água ultrapura apresenta o valor mais elevado, de $0,061 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as cuvetes de plástico e $0,063 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as cuvetes de vidro. Já o valor mais baixo foi obtido com a água

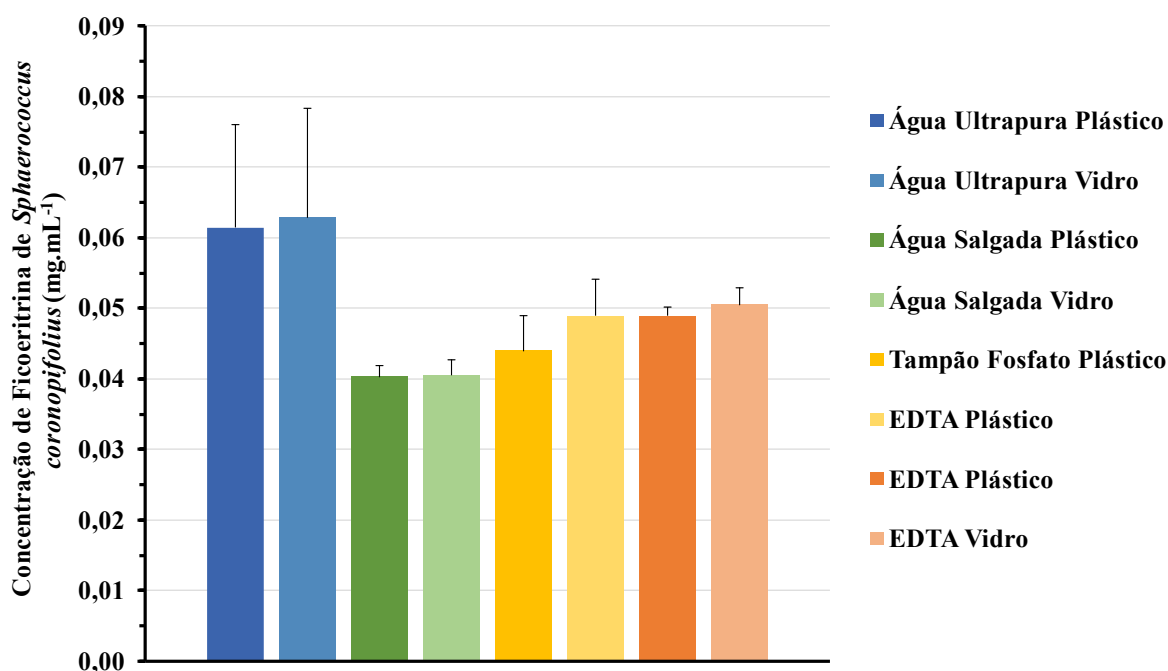


Figura 1- Concentração de Ficoeritrina em *Sphaerococcus coronopifolius* em mg.mL^{-1} , utilizando diferentes solventes de extração e utilizando recipientes de vidro ou plástico. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

salgada com $0,040 \text{ mg.mL}^{-1}$ para recipientes de plástico e vidro. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os solventes utilizados, determinada pela ANOVA unidirecional ($F(7,23) = 3,568, p = 0,017$), contudo, o teste HSD de Tukey revelou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,052$).

No entanto, se olharmos para as diferenças entre a utilização de plástico e vidro, apesar da utilização de vidro revelar valores ligeiramente superiores, verificamos que não há diferenças estatisticamente significativas segundo a ANOVA unidirecional ($F(7,23) = 0,099, p > 0,05$). Também a interação entre o solvente e o material da cuvete não apresentou diferenças por ANOVA unidirecional ($F(7,23) = 0,009, p > 0,05$).

A quantificação de ficocianina desta mesma espécie (Figura 2), apresenta resultados diferentes. Para este pigmento, o EDTA revelou ser o melhor solvente de extração com $0,0029 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,0035 \text{ mg.mL}^{-1}$, para plástico e vidro respectivamente, destacando-se significativamente em relação aos demais solventes, como comprova a ANOVA unidirecional ($F(7,23) = 3,568, p < 0,001$), havendo diferenças entre os grupos do teste HSD de Tukey, representadas pelas letras minúsculas diferentes.

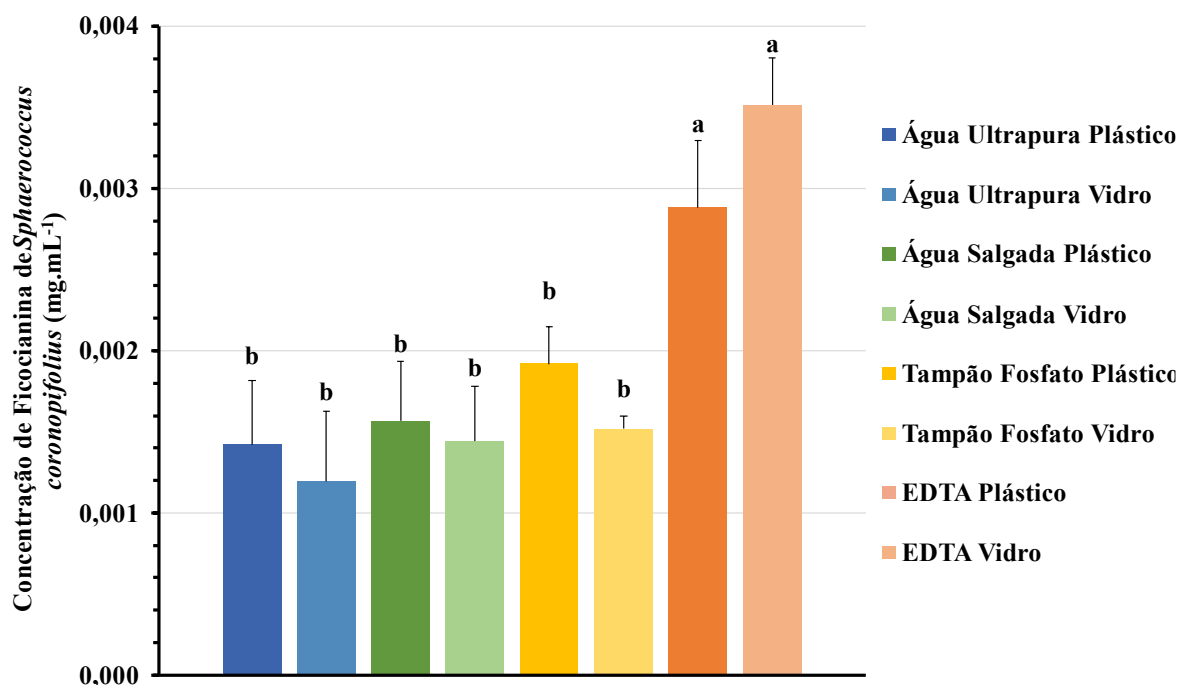


Figura 2 - Concentração de Ficocianina de *Sphaerococcus coronopifolius* em mg.mL^{-1} , utilizando diferentes solventes de extração e utilizando recipientes de vidro ou plástico. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). As letras minúsculas (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas no teste HSD de Tukey.

Contudo, mais uma vez, quando analisada a influência entre a utilização de plástico ou vidro, não há diferenças na ANOVA unidirecional ($F(7,23) = 0,042, p > 0,05$). Do mesmo modo, a interação entre o solvente e o material da cuvete não apresentou diferenças na ANOVA unidirecional ($F(7,23) = 2,762, p > 0,05$).

Tendo em conta os resultados obtidos para *Sphaerococcus coronopifolius*, verificamos que a água ultrapura é o melhor solvente para a extração de ficoeritrina. Contudo este é o solvente com pior resultado na extração de ficocianina. Além disso, apesar de se registarem algumas diferenças entre a utilização de vidro ou de plástico, a análise estatística mostra que não são significativas.

Deste modo, a escolha do solvente de extração deve ser ajustada consoante o objetivo final da extração, sendo a água ultrapura o mais indicado para a obtenção de ficoeritrina, e o EDTA para a ficocianina. Quanto ao material das cuvetes, a escolha não apresenta grandes diferenças, contudo, de modo geral, e para os melhores solventes, os recipientes de vidro apresentaram resultados mais elevados.

A quantificação de ficoeritrina da *Jania rubens* (Figura 3), apresenta resultados diferentes do *Sphaerococcus coronopifolius*. O melhor solvente foi o EDTA com 0,052 e

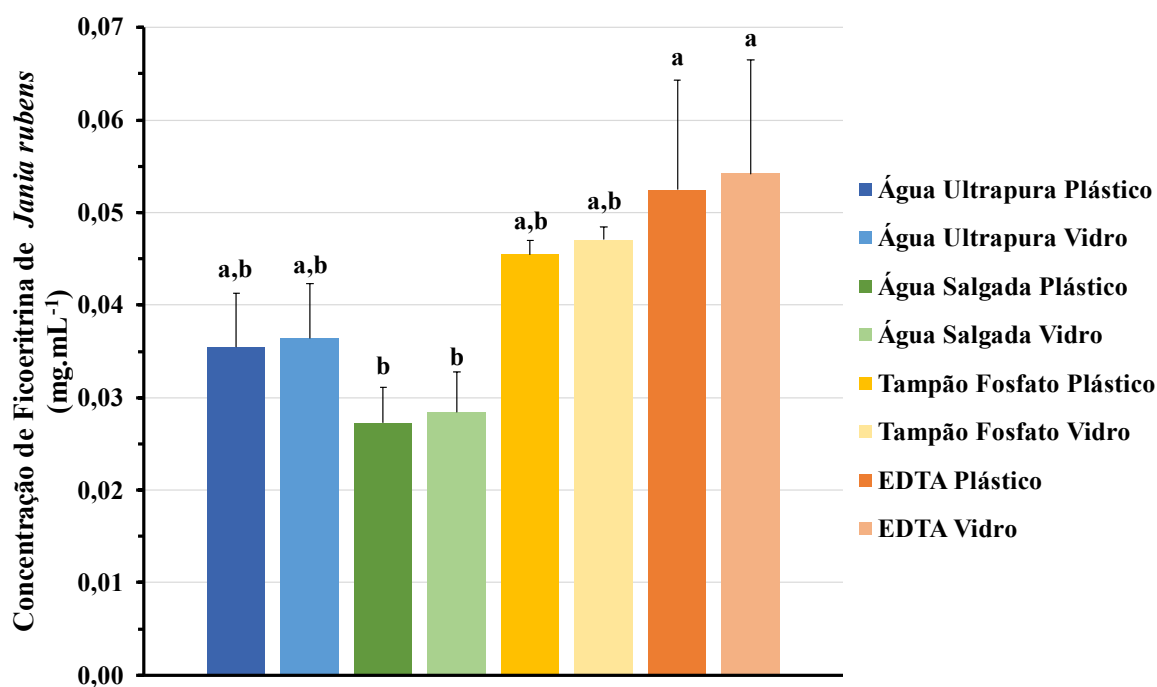


Figura 3 - Concentração de Ficoeritrina de *Jania rubens* em mg.mL^{-1} , utilizando diferentes solventes de extração e utilizando recipientes de vidro ou plástico. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). As letras minúsculas (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas no teste HSD de Tukey.

0,054 mg.mL⁻¹, para o plástico e o vidro, respetivamente. Sendo a água salgada, novamente o solvente com menor desempenho, com 0,027 e 0,028 mg.mL⁻¹, para o plástico e o vidro, respetivamente. Estas diferenças são comprovadas pela ANOVA unidirecional (F(7,23) = 6,502, p <0,001), havendo diferenças entre os grupos do teste HSD de Tukey, representadas pelas letras minúsculas diferentes. Sendo que a água ultrapura e o tampão fosfato apresentam valores intermédios relativamente a estes dois grupos.

Também aqui o material das cuvetes não originou diferenças significativas na ANOVA unidirecional (F(7,23) = 0,220, p >0,05), nem a interação entre o solvente e o material da cuvete (F(7,23) = 0,003, p >0,05).

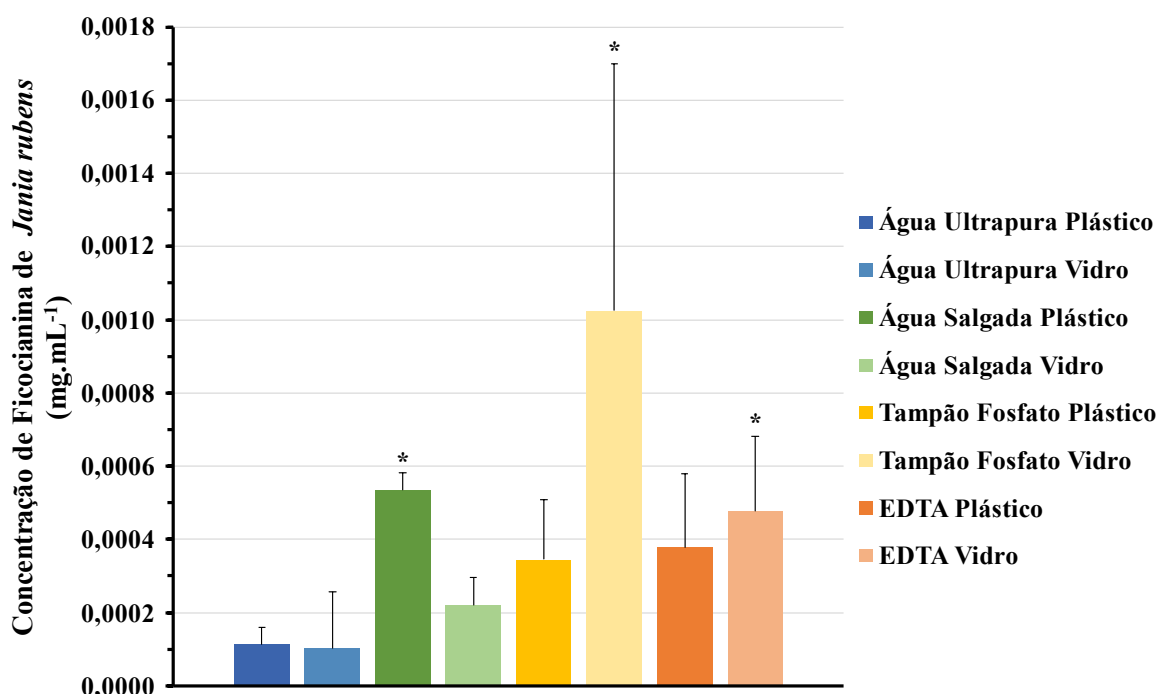


Figura 4 - Concentração de Ficocianina de *Jania rubens* em mg.mL⁻¹, utilizando diferentes solventes de extração e utilizando recipientes de vidro ou plástico. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). Os asteriscos (*) representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao valor mais pequeno (Água Ultrapura Plástico) e os restantes solventes.

No caso da quantificação da ficocianina em *Jania rubens* (Figura 4), os valores obtidos fogem do padrão obtido até agora. Neste pigmento verificamos que o melhor resultado foi obtido com tampão fosfato como solvente, e recipientes de vidro, com 0,0010 mg.mL⁻¹. Além deste, o teor de ficocianina, extraída com água salgada em cuvete de plástico ou em EDTA em cuvete de vidro, apresenta diferenças estatisticamente significativas, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($\chi^2(7) = 17,484$, p = 0,015), estando representadas na

figura por um asterisco (*). Os restantes solventes apresentam valores mais baixos, sendo a água ultrapura o que apresenta os valores menores, com apenas 0,0001 mg.mL⁻¹, para o plástico e vidro.

Quanto ao material utilizado não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas segundo a ANOVA unidirecional ($F(7,23) = 1,196$, $p > 0,05$). Contudo, a interação entre o solvente e o material da cuvete, apresenta diferenças estatisticamente significativas na ANOVA unidirecional ($F(7,23) = 3,599$, $p < 0,05$).

Como no caso da espécie analisada anteriormente, também na *Jania rubens* a escolha do solvente vai estar dependente do objetivo, sendo o EDTA a melhor escolha para a extração de ficoeritrina. Além disso, o material das cuvetes voltou a não mostrar grande relevância nos rendimentos de extração, contudo, a utilização de vidro voltou a resultar em valores ligeiramente superiores.

Enquanto nos dois pigmentos analisados na alga *Sphaerococcus coronopifolius*, e a ficoeritrina na *Jania rubens*, os valores apresentavam um padrão semelhante, com os dados para cuvetes diferentes a serem semelhantes em cada solvente, no caso da ficocianina da *J. rubens* esse padrão não foi observável. Apesar do valor obtido com o tampão fosfato e vidro ser muito superior aos restantes, foi também o que apresentou maior erro associado. Tendo em conta que a quantidade obtida para todos os solventes é baixa, há uma maior probabilidade de erros, quer na leitura das amostras, quer nos passos de extração. Deste modo, e tendo em conta das barras de erro destes valores não é possível afirmar que o tampão fosfato em conjunto com as cuvetes de vidro serão a melhor opção para a extração de ficoeritrina, no caso da *J. rubens*.

Quando comparamos as duas espécies verificamos que os solventes que apresentam um melhor desempenho na extração de ficoeritrina são diferentes. Assim, não é possível definir um protocolo de extração de ficoeritrina otimizado para as algas vermelhas, como se pretendia. Deste modo, será sempre necessário testar, de forma a avaliar qual o melhor solvente em função de cada espécie, sendo que o mesmo é aplicável no caso da ficocianina. Apesar dos resultados obtidos para a *Jania rubens* não permitirem uma determinação do melhor solvente, verificamos que a água ultrapura e o EDTA apresentam um comportamento semelhante entre as espécies, mas com resultados diferentes, reforçando a necessidade de testes preliminares para determinação do melhor solvente, também no caso da ficocianina.

Quanto ao tipo de cuvetes a utilizar para a medição em espectrofotómetro, é possível verificar que, apesar de não haver diferenças significativas entre plástico e de vidro, quando são utilizadas cuvetes de vidro, geralmente, os resultados são melhores.

Devido ao facto de haver diversos métodos já testados para a extração destes pigmentos, os resultados são apresentados de formas distintas, o que torna difícil a comparação direta dos valores obtidos nos diferentes estudos. No entanto, através dos trabalhos já publicados é possível verificar que em geral as Gigartinales apresentam maior conteúdo de ficobilinas quando comparadas com as Corallinales (Ismail & Osman, 2016; Rossano et al., 2003; Yanshin et al., 2021). Este facto é visível nos resultados obtidos para a ficoeritrina com o *Sphaerococcus coronopifolius* a apresentar valor em geral mais elevados que a *Jania rubens*. Contudo, esta diferença já não é visível na ficocianina, com as duas espécies em análise a produzirem resultados semelhantes. Além disso, mesmo dentro das Gigartinales há grande diferença entre as espécies, com algumas espécies como a *Euthora cristata* a apresentar cerca de 20 mg.g⁻¹ DW e a *Polyides rotunda* com apenas cerca de 7,5 mg.g⁻¹ DW (Yanshin et al., 2021).

Tendo, ainda, em conta que estes pigmentos são proteínas, era previsível que o *Sphaerococcus coronopifolius*, ao apresentar maior conteúdo em proteínas, tivesse também um conteúdo superior em ficobilinas, uma vez que estas podem representar até 50% das proteínas hidrossolúveis e cerca de 20% DW total (Dumay et al., 2014).

É ainda importante de ressaltar que, apesar de serem pigmentos característicos das algas vermelhas, não existem muitos estudos sobre a quantificação de ficoeritrina e ficocianina nestas espécies. Desta forma, os resultados conseguidos, permitem um maior conhecimento das duas espécies.

3.2.2 Quantificação Clorofila e Carotenoides

Os resultados obtidos na extração e quantificação de clorofila *a* e carotenoides estão presentes na Tabela II. Quando observamos os valores obtidos, verificamos que nas duas espécies a clorofila apresenta valores maiores quando comparada com os carotenoides. Tendo em conta que a clorofila *a* é um pigmento essencial ao processo de fotossíntese, é

normal que esteja presente em maior quantidade quando comparado com os carotenoides que são pigmentos acessórios. Além disso, os valores obtidos, que estão apresentado em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, mostram que estão presentes em menor quantidade que a ficoeritrina.

Tabela II – Concentração de clorofila a e carotenoides de Sphaerococcus coronopifolius e Jania rubens expressa em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

	<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	<i>Jania rubens</i>
Clorofila a ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	20,96 \pm 2,07	38,41 \pm 2,84
Carotenoides ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	0,69 \pm 0,07	1,87 \pm 0,10

Quanto aos resultados obtidos na quantificação de clorofila, verificamos que a *Jania rubens* apresenta uma concentração maior, 38,41 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW que o *Sphaerococcus coronopifolius*, sendo que os Testes T confirmaram que há diferenças estatisticamente significativas ($t(4)=8,596$, $p<0,001$), entre as duas espécies. No entanto, ao olharmos para os valores já publicados para a *J. rubens* verificamos que alguns autores detetaram valores muito superiores, entre 150 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (Ismail et al., 2017; Ismail & Osman, 2016; Mohy El-Din & El-Ahwany, 2016), sendo estes valores semelhantes aos reportados noutras Corallinales, como a *Ellisolandia elongata*. Por outro lado, ainda não foram encontrados valores publicados de clorofila a para o *S. coronopifolius*. Contudo, alguns resultados de outras Gigartinales mostram uma grande diferença entre espécies, que apresentam valores entre 1 e 5 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW (Yanshin et al., 2021). É preciso ressaltar que estes dados são apresentados tendo em conta o peso seco, tornando difícil a comparação direta com os valores obtidos, que têm por base o peso fresco.

Também no caso dos carotenoides a *Jania rubens* voltou a ter resultados superiores, de 1,87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, com diferenças registadas nos Testes T ($t(4)=16,732$, $p<0,001$). Estes valores vão de encontro aos dados publicados por Ahmed et al. (2011). Porém, os estudos já publicados não são muito vastos, não tendo sido encontrados valores para o *Sphaerococcus coronopifolius* ou outras Gigartinales.

Dos trabalhos já publicados sobre a identificação dos diferentes tipos de carotenoides presentes, são detetadas variações entre as diferentes taxa das Rhodophyta. Deste modo, as

Corallinales em geral apresentam maior conteúdo de anteraxantina e as Gigartinales têm a luteína como carotenoides principal (Esteban et al., 2009). No entanto, tendo em conta as metodologias utilizadas neste trabalho não foi possível quantificar os diferentes tipos de carotenoides.

3.2.3 Considerações gerais da Extração e Quantificação de Pigmentos

Os resultados obtidos na quantificação dos três tipos de pigmentos, permitem preencher uma lacuna do conhecimento para estas espécies e, em especial, para o *Sphaerococcus coronopifolius*. Grande parte dos estudos existentes sobre estes temas apresentam resultados muito discrepantes, não só devido aos diferentes métodos utilizados, mas também devido ao facto de os estudos utilizarem biomassa de diferentes regiões e recolhida em diferentes épocas do ano.

Quanto à variedade de estudos, há uma dificuldade de comparação de resultados que são apresentados com unidades diferentes, sem possibilidade de conversão na maioria dos casos. Além disso, apesar destes compostos serem conhecidos pela grande sensibilidade à luz e temperatura, muitos autores optam por utilizar biomassa seca em vez de fresca. Deste modo, seria interessante estudar as diferenças entre a quantidade dos diferentes pigmentos extraídos, tendo em conta biomassa fresca e seca de forma a avaliar qual deles é mais eficiente.

Outro ponto que é necessário destacar é que durante o processamento da biomassa o passo da maceração foi muito mais fácil e eficiente na *Jania rubens* do que no *Sphaerococcus coronopifolius*. Isto deve-se ao facto da *J. rubens* apresentar um revestimento calcário que facilita o processo, enquanto o *S. coronopifolius* tem uma textura cartilaginosa que dificulta o processamento. Além disso, sendo uma Gigartinales, o *S. coronopifolius*, produz carragenanas, que podem dificultar o processo de extração dos diversos compostos. Assim, de forma a minimizar o erro humano no passo de maceração, seria interessante encontrar uma forma mais eficiente de homogeneizar a biomassa e o solvente, tendo em conta a maior extração de pigmentos.

3.3 Extrações de *Sphaerococcus coronopifolius* e *Jania rubens*

De forma a estudar os rendimentos de extração foram utilizados diferentes solventes nas extrações sólido-líquido das duas espécies. Além disso, tendo em vista a otimização da utilização da biomassa e depois de realizar diferentes testes, foi decidido realizar extrações sequenciais, sendo o primeiro solvente a água ultrapura, e de seguida solventes com diferentes polaridades, sendo eles o etanol, a acetona e o heptano. A escolha e a ordem da extração foram apoiadas no trabalho de Afonso et. al (2021), que verificou que efetuar a extração aquosa antes da extração com etanol, resultava em rendimentos e bioatividades mais elevados.

Desta forma, os rendimentos de extração para cada um dos solventes nas duas espécies são apresentados nas Figuras 5 e 6, sendo que os diferentes solventes estão apresentados por ordem decrescente de polaridade.

Tendo em conta os resultados obtido para o *Sphaerococcus coronopifolius* (Figura 5), verificamos que existem diferenças significativas entre os diferentes solventes,

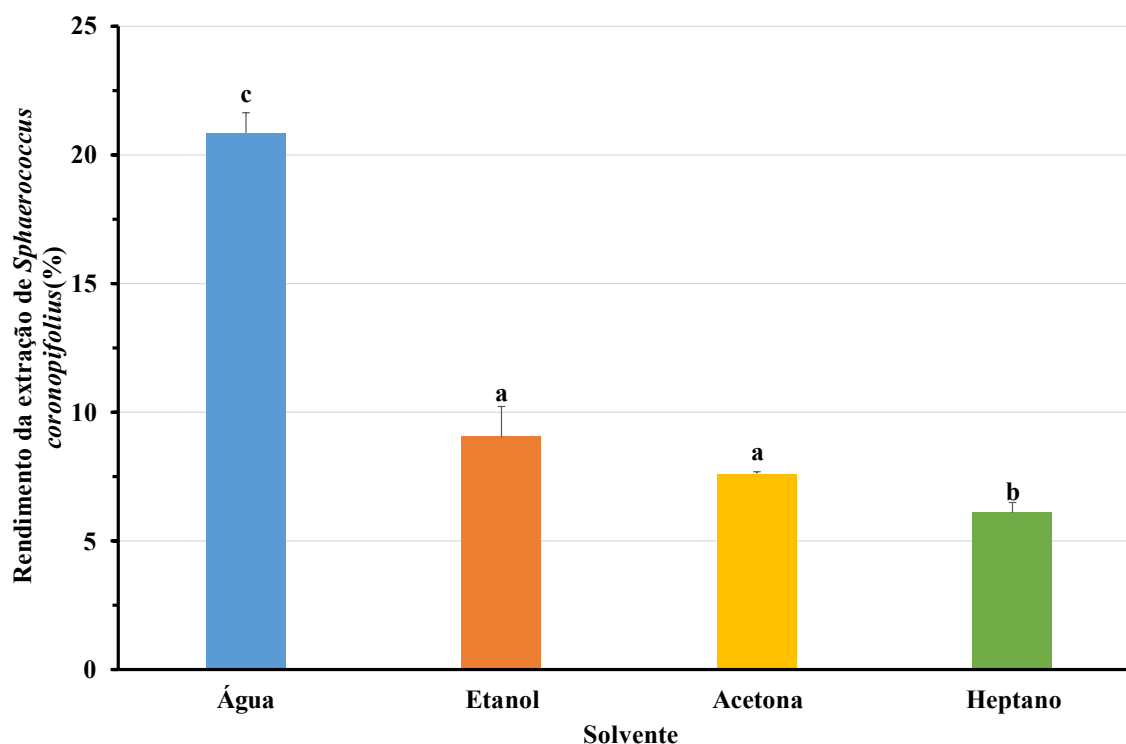


Figura 5 – Rendimento da extração de *Sphaerococcus coronopifolius* com diferentes solventes. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=9$ para a extração com água; $n=3$ para os restantes solventes). As letras minúsculas (a, b e c) representam diferenças estatisticamente significativas no teste HSD de Tukey.

confirmadas pela ANOVA unidirecional ($F(3,15) = 175,193$, $p < 0,001$), estando os diferentes grupos do teste HSD de Tukey representados por letras diferentes.

Através dos resultados é visível que o rendimento diminuiu, à medida que a polaridade diminuiu. Esta relação já foi verificada por outros autores, o que leva a crer que grande parte dos compostos presentes na biomassa das algas vermelhas apresenta maior polaridade (El-Sheekh et al., 2021). Estes compostos são solúveis em solventes com maior polaridade, como a água, aumentando o rendimento de extração com este solvente. Assim o maior rendimento foi obtido na extração aquosa, com 20,8 % DW, e o menor com o heptano com 6,0 % DW.

Quanto analisamos a coloração dos extratos, também é possível registar diferenças entre os solventes. O extrato aquoso (Figura 6a) apresentou uma coloração avermelhada, levando a crer que tinha uma concentração elevada de ficobilinas, tendo uma consistência mais espessa, possivelmente devido à presença de polissacarídeos, nomeadamente carragenanas, entre outros compostos. Já os extratos de etanol e os de acetona (Figura 6b), apresentavam uma coloração verde muito forte, que demonstra a elevada concentração de clorofila *a* e também de carotenoides, visto a acetona ser um dos solventes utilizados para a extração destes compostos. Por fim, os extratos de heptano apresentavam uma coloração amarela muito suave, indicando que não houve grande extração de pigmentos, podendo apenas estar presentes alguns carotenoides de cor amarela, entre outros compostos.

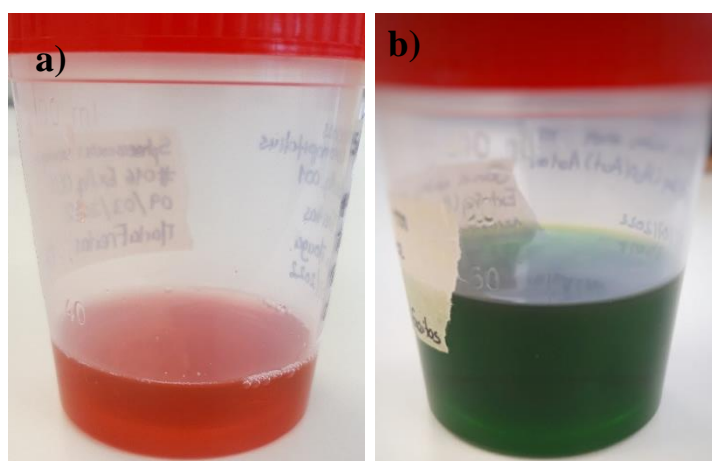


Figura 6 - Extratos de *Sphaerococcus coronopifolius*; a) extrato aquoso; b) extrato de acetona.

Relativamente aos dados das extrações já publicados, não foi possível encontrar resultados para esta alga. Em parte, isto deve-se ao facto de os passos de extração serem

apenas um processo intermédio de análises mais complexas, não sendo os valores de rendimentos publicados. Contudo, é de ressaltar que a maioria dos extratos de *Sphaerococcus coronopifolius* são efetuados com solventes orgânicos como metanol, hexano e diclorometano (Paiva et al., 2011; Pinteus et al., 2015; Rodrigues et al., 2015). O uso destes solventes deve-se ao facto de serem os responsáveis por extrair terpenos, muito estudados nesta espécie.

Nos rendimentos das extrações da *Jania rubens* (Figura 7), verificamos um padrão semelhante ao de *Sphaerococcus coronopifolius*, com diferenças entre os solventes confirmadas pela ANOVA unidirecional ($F(3,15) = 100,327$, $p < 0,001$), sendo os diferentes grupos do teste HSD de Tukey representados pelas letras a e b. No entanto, neste caso apenas a extração com água se destaca dos outros solventes.

O padrão entre a polaridade e o rendimento observado nas extrações do *Sphaerococcus coronopifolius*, foi novamente observado com a *Jania rubens*, reforçando a ideia de uma maior quantidade de compostos polares nas algas vermelhas. Assim a extração aquosa apresentou o maior rendimento, com 7,2 % DW, e o heptano o menor com apenas

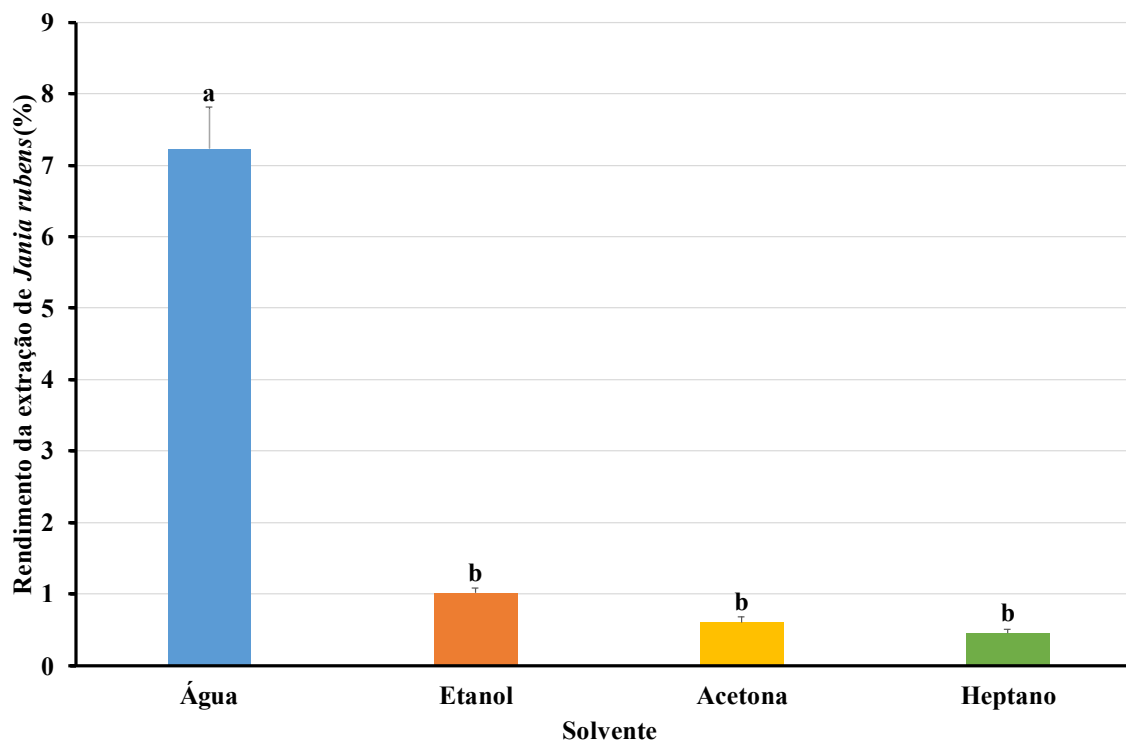


Figura 7 - Rendimento da extração de *Jania rubens* com diferentes solventes. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=9$ para a extração com água; $n=3$ para os restantes solventes). As letras minúsculas (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas no teste HSD de Tukey.

0,5 % DW. Em geral os valores obtidos para a *J. rubens* foram muito inferiores aos rendimentos do *S. coronopifolius*.

Quanto à coloração dos extratos da *Jania rubens* (Figura 8), as cores apresentadas foram semelhantes às dos extratos do *Sphaerococcus coronopifolius*. Contudo, a coloração avermelhada do extrato aquoso não era tão forte no caso da *J. rubens*, nem a cor amarelada do extrato de heptano. Além disso, o extrato aquoso da *J. rubens* não apresentava uma consistência mais espessa. A coloração dos extratos de etanol e acetona não apresentavam diferenças visíveis entre as algas.

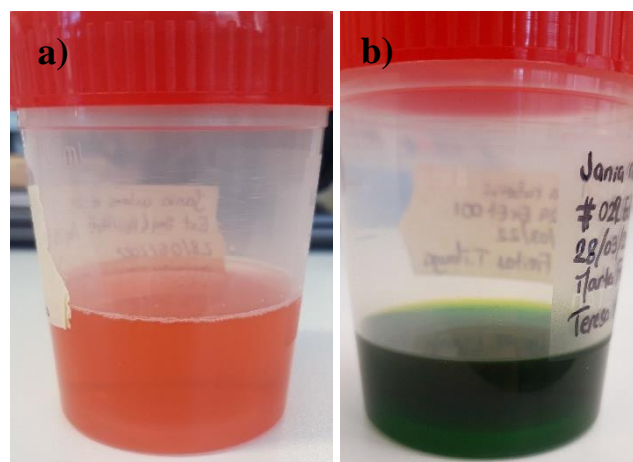


Figura 8 - Extratos de *Jania rubens*; a) extrato aquoso; b) extrato etanólico.

No caso de rendimentos de extrações da *Jania rubens* já publicados é possível encontrar alguns trabalhos que apresentam resultados de extrações individuais e comparações entre diferentes solventes. O trabalho de El-Sheekh et al. (2021), apresenta uma comparação entre diferentes solventes, nomeadamente água, etanol, metanol e heptano. Neste estudo, o rendimento do extrato aquoso foi um pouco menor, 5 % DW, assim como o extrato com heptano, 0,2 % DW, contudo o valor do extrato etanólico foi superior, 2,0 % DW. Já os valores registados para a espécie *Ellisolandia elongata* (no artigo como *Corallina elongata*), são semelhantes aos obtidos para a *Jania rubens*, mostrando a tendência de rendimentos mais baixos para as Corallinales. Outros autores obtiveram ainda extratos metanólicos, que apresentam rendimentos semelhantes ao obtido neste trabalho, para o extrato aquoso (Ahmed et al., 2011; Chakraborty et al., 2015). No entanto, o procedimento de extração adotado, com estes rendimentos mais elevados, apresenta grandes diferenças em relação ao escolhido para este trabalho.

Quanto á composição dos extratos obtidos, tirando o facto de ser possível distinguir alguns compostos pela coloração, não foram realizados testes com vista à sua determinação, devendo isso ser feito futuramente. No entanto, o trabalho de Saleh & Al - Mariri (2017), analisou diferentes extratos de *Jania rubens* e verificou que os extratos aquosos, etanólicos e metanólicos, apresentavam uma maior diversidade de compostos quando comparados com extratos de clorofórmio, acetona, acetato de etilo e hexano. Além disso, os dois primeiros apresentavam uma composição muito semelhante. De forma, a melhorar o conhecimento sobre os extratos desta espécie, seria interessante determinar a sua composição de forma a comparar com alguns dados já publicados.

Tendo em conta os rendimentos muito baixos conseguidos para os extratos etanólicos, de acetona e heptano, aliado ao facto de não haver muita biomassa disponível, foi decidido que apenas seriam analisados os extratos aquosos, estudando o seu potencial antioxidante e antimicrobiano. Para isso, depois de testar a concentração que apresentava atividade, os extratos liofilizados foram ressuspensos com água ultrapura a uma concentração de 100 mg.mL⁻¹.

3.4 Avaliação da Atividade Antioxidante

De forma a avaliar o potencial antioxidante dos extratos aquosos das duas espécies foram realizados três testes diferentes. Dois destes testes avaliam a capacidade de captura de radicais livres, em específico o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e o radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico (ABTS), além da Quantificação dos Polifenóis Totais. Os radicais DPPH e ABTS são amplamente utilizados para a avaliação do potencial antioxidante de compostos e extratos *in vitro* (Bibi Sadeer et al., 2020; Shahidi & Zhong, 2015). Já a Quantificação dos Polifenóis Totais é um método muito utilizado, devido à sua simplicidade e reprodutibilidade, que quantifica o conteúdo de polifenóis, estando estes compostos relacionados com a capacidade antioxidante (Shahidi & Zhong, 2015).

3.4.1 Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

A capacidade de redução do radical DPPH para as duas espécies, está representada nas Figuras 9 e 10. Contudo, na realização destes ensaios ocorreram diversos problemas com as amostras. Por um lado, e uma vez que a solução do radical DPPH é preparada com etanol, e as amostras resultavam de extrações aquosas, ao juntar a amostra ao poço da placa, não havia uma homogeneização total. Esta homogeneização incompleta resultava na formação de precipitados, originando erros na leitura no espectrofotómetro. Este problema foi mais persistente nos extratos de *Sphaerococcus coronopifolius*, podendo dever-se, em parte, ao facto desta espécie apresentar um extrato mais espesso, com possível presença de carragenanas. Além disso, uma vez que os extratos aquosos apresentam uma grande presença de ficobilinas, ao entrar em contacto com o etanol, estas proteínas podem desnaturar e originar precipitados. Por este motivo, os resultados da capacidade de redução do DPPH, devem ser analisados com cuidado pois podem não representar o real poder de redução, ficando abaixo do seu potencial.

Ao analisarmos os resultados de redução do radical DPPH dos extratos aquosos do *Sphaerococcus coronopifolius* (Figura 9), verificamos que, como era de esperar, à medida que a concentração de extrato aumenta a capacidade de redução também é maior. Assim, os resultados variam entre 24,3 % para a concentração de 20 mg.mL⁻¹, e 58,5 % na concentração de 100 mg.mL⁻¹.

Apesar desta espécie ser conhecida por ter algum potencial antioxidante, não existem muitos estudos que avaliem esse potencial tendo em conta os extratos brutos, focando-se no potencial antioxidante de compostos isolados, nomeadamente, terpenos. Assim, apenas foi possível encontrar um estudo onde o extrato metanólico apresentou menor atividade de captura de radicais livres, de todas as espécies em estudo, e apenas um quarto da atividade apresentada pelo hidroxitolueno butilado (BHT) (Paiva et al., 2011). Já o extrato aquoso da alga *Chondrus crispus*, com uma concentração de 2 mg.mL⁻¹, apresentou uma capacidade de inibição de 19,12% (Heo et al., 2006).

Quanto à capacidade de redução do radical DPPH do extrato aquoso de *Jania rubens* (Figura 10), verificamos que de forma geral apresenta menor inibição comparada com o *Sphaerococcus coronopifolius*. Sendo que a concentração mais baixa, 20 mg.mL⁻¹, apresenta uma inibição de 13,1 % e a mais elevada, 100 mg.mL⁻¹, uma capacidade de inibição de 23,1 %, continuando a apresentar o mesmo comportamento ascendente, como seria de esperar.

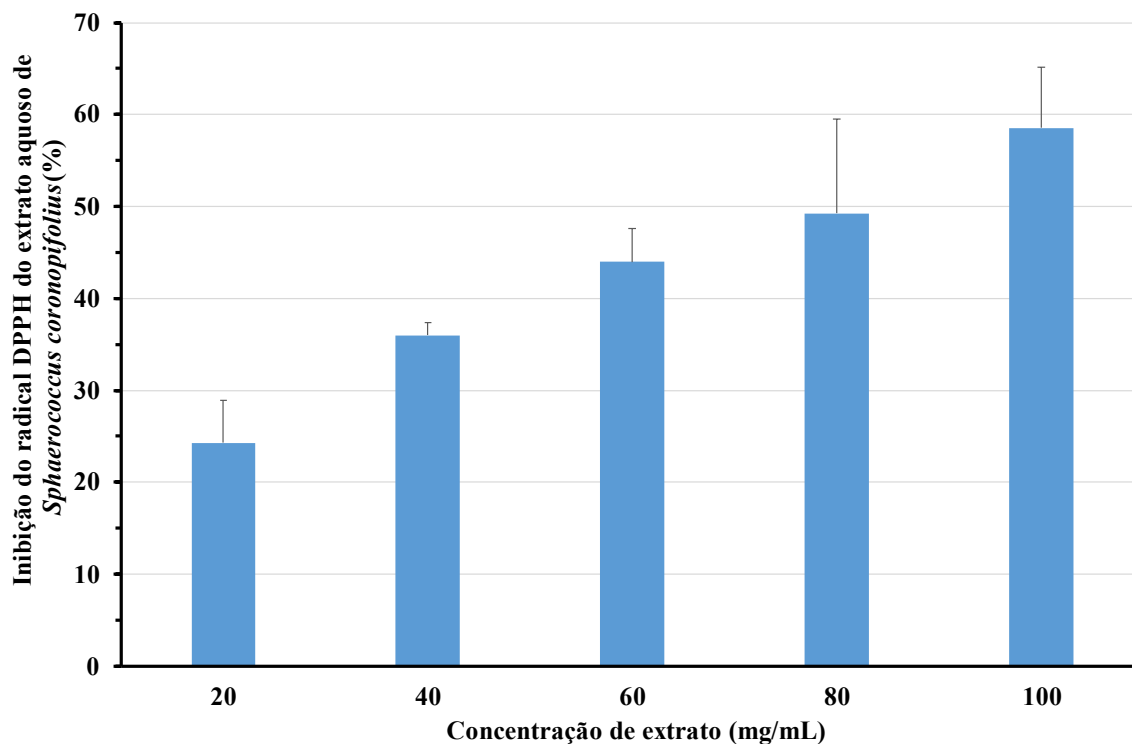


Figura 9 - Capacidade de inibição do radical DPPH do extrato aquoso de *Sphaerococcus coronopifolius* em percentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

O potencial antioxidante da *Jania rubens* já foi alvo de diversos estudos, contudo, grande parte destes trabalhos utilizam extratos de solventes orgânicos, como metanol, acetato de etilo e éter dietílico (Chakraborty et al., 2015; Chakraborty & Raola, 2018; Khairy & El-Sheikh, 2015; Shafay et al., 2022). Os resultados publicados nestes estudos demonstram um grande potencial antioxidante, com concentrações de extratos cerca de 1000 vezes mais baixas. Isto indica que os compostos extraídos com solventes mais apolares, têm tendência a apresentar maior capacidade antioxidante, quando comparados com os compostos polares extraídos com água. Contudo, os solventes utilizados por estes estudos, apesar dos bons resultados, apresentam muitas restrições ao seu uso, em especial na União Europeia, em ingredientes, aditivos e produtos alimentares definidos pelas legislações dos países membros, que tem por base a Diretiva 2009/32/CE alterada pela última vez em 27 de janeiro de 2023 (Parlamento Europeu & Concelho Europeu, 2009).

Além disso, apesar deste método ser um bom começo da determinação do potencial antioxidante dos extratos, não é representativo da capacidade de captura de radicais em organismos vivos ou alimentos (Shahidi & Zhong, 2015).

Uma das formas utilizadas para a comparação dos diferentes resultados obtidos do potencial antioxidante é o cálculo do EC50. O EC50 é definido como a concentração da amostra para o qual é atingida metade da resposta máxima. Neste caso, o EC50 é a concentração de extrato onde ocorre 50% de inibição do radical DPPH. Tendo em conta os resultados obtidos apenas é possível calcular este parâmetro para o *Sphaerococcus coronopifolius* sendo o valor de $74,33 \pm 15,67 \text{ mg.mL}^{-1}$. Este valor é muito mais elevado quando comparado com o valor de um extrato metanólico da mesma espécie, $0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Rhimou, 2013) e com o extrato aquoso de outra alga vermelha, *Palmaria palmata*, que apresentou um EC50 de $1,9 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Wang et al., 2010). Do mesmo modo, o extrato metanólico de *Kappaphycus alvarezzi*, Gigartinales, apresentou metade da resposta máxima a uma concentração de $11,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Chew et al., 2008). Quanto à *Jania rubens*, o trabalho de Aydin (2022), determinou o EC50 de extratos metanólicos em cerca de 4 mg.mL^{-1} .

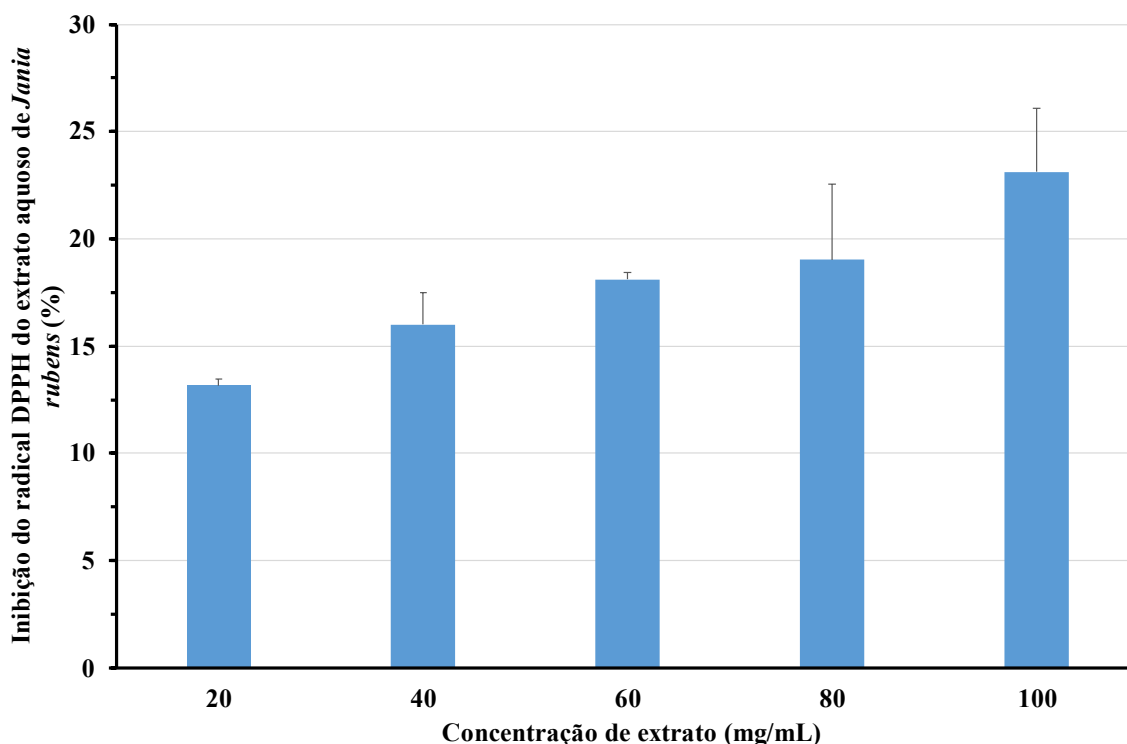


Figura 10 - Capacidade de inibição do radical DPPH do extrato aquoso de *Jania rubens* em percentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

3.4.2 Capacidade de redução do radical ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

A capacidade de redução do radical ABTS para as duas espécies, está representada nas Figuras 11 e 12. A realização deste teste não apresentou os problemas enfrentados no

ensaio com o radical DPPH, uma vez que a solução do radical ABTS é preparada com água ultrapura.

Ao analisarmos os resultados obtidos para a capacidade de redução do radical ABTS do extrato aquoso de *Sphaerococcus coronopifolius* (Figura 11), verificamos que o potencial de redução é superior ao conseguido no ensaio com o DPPH. No entanto, o padrão mantém-se, como expectável, com a capacidade de inibição a aumentar com a concentração, sendo a concentração de 100 mg.mL⁻¹ a que apresenta o valor maior, de 68,25 %.

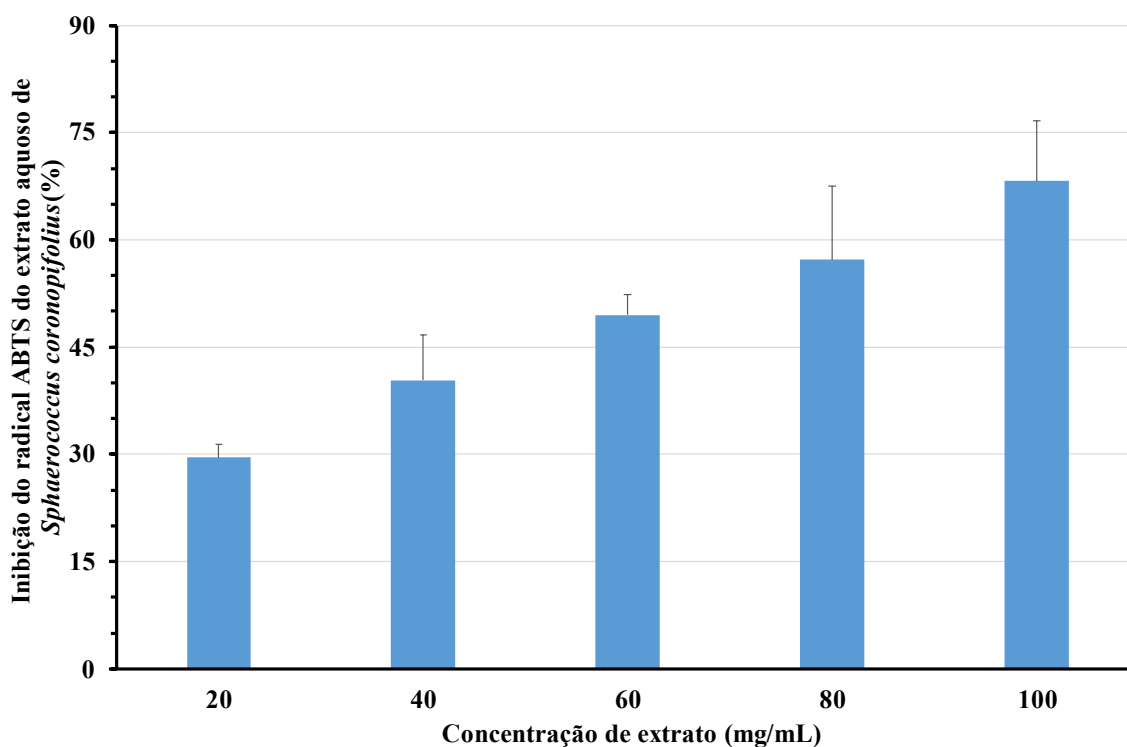


Figura 11 - Capacidade de inibição do radical ABTS do extrato aquoso de *Sphaerococcus coronopifolius* em percentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Como acontecia no caso do DPPH, também tendo em conta este radical, não foram encontrados resultados já publicados da capacidade de redução do ABTS.

Quanto à capacidade de inibição do radical ABTS do extrato aquoso de *Jania rubens* (Figura 12), verificamos que esta alga apresentou uma elevada capacidade de inibição com a concentração de 100 mg.mL⁻¹, apresentando uma inibição de 99,65 %. Este valor mostra um maior potencial de redução quando comparado com o *Sphaerococcus coronopifolius*, indo de encontro ao potencial antioxidante encontrado na bibliografia publicada (Aydin, 2022; Chakraborty et al., 2015; Shafay et al., 2022). A percentagem de inibição apresentada

neste ensaio é muito maior quando comparada com os 42,99 % de inibição conseguidos com um extrato metanólico por Chakraborty et al. (2015).

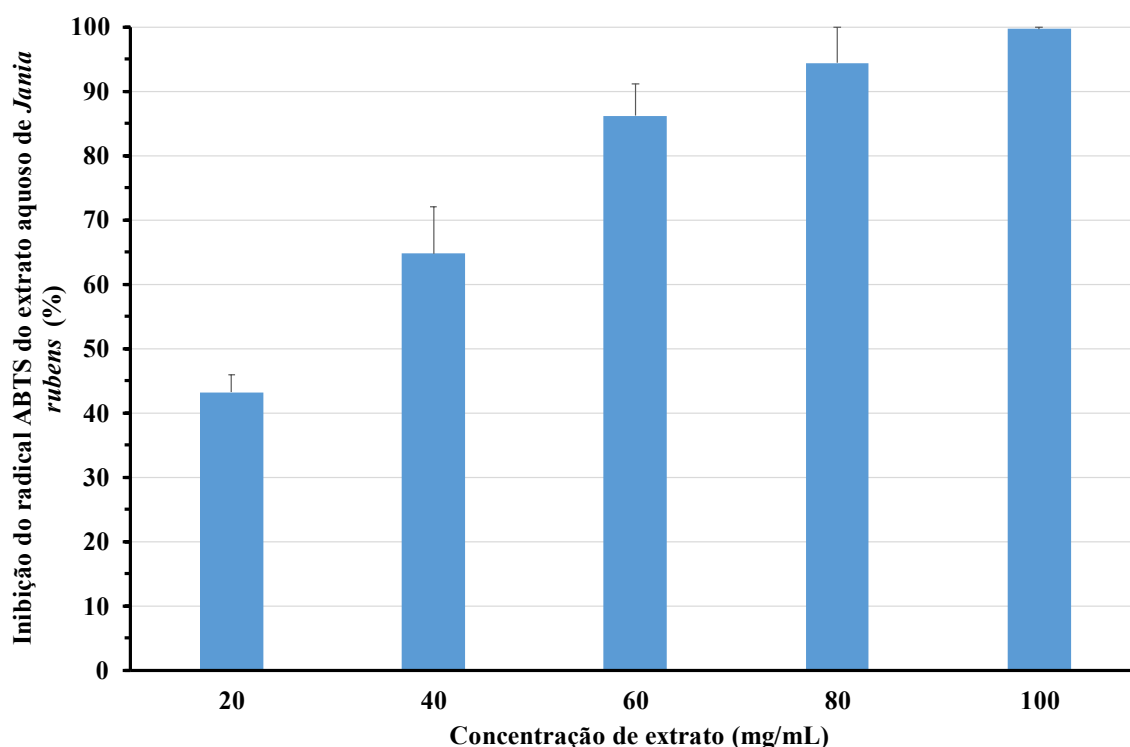


Figura 12 - Capacidade de inibição do radical ABTS do extrato aquoso de *Jania rubens* em porcentagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Contudo, tal como referido para os resultados do DPPH, a capacidade de inibição do radical ABTS, pode não ser representativa do potencial de captura de radicais em alimentos ou *in vivo* (Bibi Sadeer et al., 2020; Shahidi & Zhong, 2015).

Os valores de EC50 da capacidade de redução do radical ABTS para as duas espécies estão representados na Tabela III. Como era esperado, tendo em conta a capacidade de redução apresentada nas figuras 11 e 12, o valor de EC50 da *Jania rubens* é muito inferior ao do *Sphaerococcus coronopifolius*, sendo que quanto menor o valor, maior a capacidade de redução da amostra. Apesar desta diferença, o teste de Mann-Whitney não revelou diferenças estatisticamente significativas ($U = 9,00$, $p = 0,05$).

Tendo em conta a bibliografia já publicada para estas espécies, não foi possível encontrar valores publicados de EC50 da espécie *Sphaerococcus coronopifolius*. Contudo, o maior poder antioxidante da *Jania rubens* era esperado, pois em geral as Corallinales apresentam diversas bioatividades, entre elas um elevado poder antioxidante (Johansen, 2018; Wang et al., 2014). Chakraborty et al. (2015) obteve uma inibição do radical ABTS

de 8.78 %, com um extrato metanólico de apenas 0,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo a concentração onde se obteve a máxima resposta determinada em 3 mg.mL^{-1} . Os resultados já publicados levam a crer que o potencial antioxidante destas algas se encontra nas frações extraídas por compostos com menor polaridade como o metanol, acetato de etilo e hexano, e não na fração aquosa.

Tabela III – Valor de EC50 da inibição do radical ABTS para os extratos aquosos de Sphaerococcus coronopifolius e Jania rubens expressos em mg.mL^{-1} . Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

	<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	<i>Jania rubens</i>
EC50 (mg.mL^{-1})	62,82 \pm 4,22	24,28 \pm 1,98

3.4.3 Quantificação Total de Polifenóis (QTP)

A quantificação dos polifenóis totais é um método simples que permite avaliar o potencial antioxidante de uma amostra, uma vez que estes compostos estão ligados com a ação antioxidante (Bibi Sadeer et al., 2020; Shahidi & Zhong, 2015).

Os resultados obtidos para a quantificação total de polifenóis para as duas espécies estão apresentados na Tabela IV. É possível verificar que o *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou um valor superior, havendo diferenças estatisticamente significativas, confirmadas pelos Testes T ($t(4)=-3,636$, $p=0,021$). Esta diferença entre as espécies mostra que os polifenóis podem ser responsáveis pela maior atividade contra o radical DPPH por parte do *S. coronopifolius*. Contudo, os polifenóis não devem ser responsáveis pela atividade do extrato da *Jania rubens* contra o radical ABTS, que foi muito superior.

Tabela IV – Polifenóis totais dos extratos aquosos de Sphaerococcus coronopifolius e Jania rubens expressos em mg GAE.g^{-1} , onde GAE significa equivalente de ácido gálico. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

	<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	<i>Jania rubens</i>
Polifenóis Totais (mg GAE.g^{-1})	0,67 \pm 0,04	0,56 \pm 0,02

Este método é muitas vezes associado com a determinação da capacidade antioxidante total, sendo que os polifenóis totais da *Jania rubens* já foram estudados, sobretudo nos extratos metanólicos. Neste aspeto, Chakraborty et al. (2015), apresentou uma quantificação de polifenóis ligeiramente mais elevada à obtida neste trabalho, 0,99 mg GAE.g⁻¹. Já outros estudos apontam para valores muito mais elevados, situando-se entre 17,82 e 176,7 mg GAE.g⁻¹. Estas diferenças, pode dever-se às diferentes concentrações de extrato analisadas, bem como ao solvente utilizado para a extração da biomassa. Por outro lado, o conteúdo de polifenóis, assim como outros compostos das algas, está sujeito a grandes variações, dependendo da estação do ano, condição da biomassa e condições ambientais (Cho et al., 2010). Também nas Gigartinales, há uma grande discrepância, com a espécie *Kappaphycus alvarezzi* com 115 mg GAE.g⁻¹ (Chew et al., 2008), também neste caso, os extratos analisados foram efetuados com metanol. Já para o *Chondrus crispus*, foram detetadas diferenças entre o extrato metanólico, com 27,23 mg GAE.g⁻¹, e o extrato aquoso que obteve uma quantidade maior, com 39,27 mg GAE.g⁻¹ (Heo et al., 2006).

Estas diferenças não permitem estabelecer uma relação entre a quantidade de polifenóis totais e o solvente utilizado na extração, devido à grande variação existente nos resultados já publicados. Contudo, é de salientar que tanto o solvente, como os diferentes métodos de extração têm grande influência nos resultados. Assim, é interessante estudar a influência que estes aspetos têm no conteúdo de polifenóis, as variações entre as diferentes algas, bem como as condições ambientais.

3.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

De forma a avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de *Sphaerococcus coronopifolius* e *Jania rubens*, foi efetuada a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC). Através deste teste é possível avaliar a capacidade de inibição de diferentes concentrações da amostra, além de determinar qual a concentração capaz de inibir o crescimento total dos microrganismos. A escolha dos microrganismos a analisar teve em conta a testagem com o maior espetro possível, sendo assim escolhidas duas bactérias, uma Gram + (*Bacillus subtilis*) e uma Gram – (*Escherichia coli*), e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

3.5.1 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Apesar de serem testadas diferentes concentrações dos extratos de ambas espécies, não foi detetada inibição do crescimento da *Escherichia coli* nem da *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que em algumas concentrações dos extratos, os resultados das leituras do espectrofotómetro demonstravam maior crescimento que no controlo positivo. Assim não foi possível determinar a MIC para estes dois microrganismos, pelo que os resultados apresentados dizem apenas respeito aos testes com *Bacillus subtilis*.

Quanto à inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, quando em contacto com o extrato aquoso de *Sphaerococcus coronopifolius*, o *B. subtilis* apresentou um crescimento de $80,82 \% \pm 3,63$, sendo que no extrato aquoso de *Jania rubens* obteve-se um crescimento de $67,59 \pm 1,42\%$, comparativamente ao controlo. Desta forma, em geral, os extratos aquosos de *J. rubens* apresentam maior capacidade de inibição, quando comparados com os resultados de *S. coronopifolius*. Estas diferenças foram confirmadas pelos Testes T ($t(4) = -4,143$, $p = 0,014$). Os valores de crescimento microbiano apresentados são calculados com base nas leituras no espectrofotómetro às 0 h e após 24 h de incubação. Contudo, devido aos extratos apresentarem cor e terem concentrações elevadas, por vezes havia formação de depósitos no fundo dos poços que pode ter influenciado os resultados.

Os resultados já publicados mostram que, no caso do *Sphaerococcus coronopifolius*, os extratos metanólicos também apresentam fraca atividade contra a *E. coli* e *Candida albicans*, contudo apresentam resultados promissores contra *Staphylococcus aureus* (Rodrigues et al., 2015). Os extratos de hexano apresentam alguma atividade contra *B. subtilis*, contudo quando comparado com outras espécies a atividade é baixa, e não são eficazes contra *E. coli* (Pinteus et al., 2015). Já extratos de diclorometano apresentam baixa atividade contra *S. cerevisiae* (Pinteus et al., 2015).

No caso da *Jania rubens* os extratos de acetato de etilo e etanol apresentam maior inibição quando comparados com outros extratos (Saleh & Al - Mariri, 2017). Foi ainda detetado efeito antibacteriano contra *Vibrio fluvialis* (Mohy El-Din & El-Ahwany, 2016) e efeito antifúngico contra *Cephalosporium maydis* (Doleib et al., 2021).

Para a identificação dos valores da MIC foram utilizadas leituras visuais dos depósitos e turbidez dos poços após 24 h. Desta forma foi possível determinar a Concentração Mínima Inibitória, sendo o *Sphaerococcus coronopifolius* a que apresentou uma MIC mais baixa, $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, seguida dos extratos aquosos de *Jania rubens*, com $6,25 \text{ mg.mL}^{-1}$. Assim, contrariamente aos resultados da inibição do crescimento, o *S. coronopifolius* apresenta uma maior atividade, pois é necessária uma concentração mais baixa para inibir o crescimento deste microrganismo.

Contudo, estas leituras apresentam grande subjetividade, variando consoante o operador, sendo uma possível fonte de erro. Porém, ao realizar as leituras visuais foi possível comparar os depósitos formados nos controlos e nos poços de testagem, assim como a turbidez do meio de cultura. Quando se comparavam os poços de controlo positivo (meio de cultura e microrganismo) estes apresentavam grande turbidez e poucos depósitos, em comparação os poços de controlo negativo (apenas meio de cultura), não havendo turbidez. Já quando verificávamos os poços de testagem (meio de cultura + extrato + microrganismo), as concentrações mais baixas apresentavam turbidez, que ia diminuindo com o aumentar da concentração de extrato. Sendo que a concentração de extrato onde a turbidez desaparecia era diferente entre extratos de espécies diferentes.

Seria interessante realizar métodos diferentes como os testes da difusão em discos, bem como comparar as atividades destes extratos com alguns antibióticos já utilizados no mercado. Desta forma, o potencial antimicrobiano poderia ser confirmado, uma vez que nestes testes os erros na análise são menores. No entanto, os resultados permitem confirmar o potencial antimicrobiano já referido na bibliografia, sendo *Sphaerococcus coronopifolius* uma espécie candidata ao aprofundamento dos estudos neste campo.

4. Conclusão

Em geral, os resultados obtidos mostram o grande potencial biotecnológico que o *Sphaerococcus coronopifolius* e a *Jania rubens* apresentam. Apesar dos resultados obtidos para o perfil químico das duas espécies não apresentar nenhum valor que destaque, este estudo permitiu preencher uma lacuna no conhecimento das mesmas, utilizando biomassa proveniente da costa portuguesa. Além disso, no caso do *Sphaerococcus coronopifolius*, permitiu o conhecimento da sua composição bioquímica, que até agora era ainda pouco estudada. Os resultados obtidos confirmaram o baixo teor de matéria gorda total de ambas as espécies e mostraram um conteúdo interessante em hidratos de carbono do *S. coronopifolius*.

Quanto à quantificação de pigmentos são também notórias diferenças entre as duas espécies. Enquanto de forma geral, o *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou maior conteúdo de ficobiliproteínas, a *Jania rubens* apresentou maior conteúdo de clorofila *a* e carotenoides. Dos diferentes solventes utilizados para otimizar o processo de extração de ficobilinas, não foi possível selecionar um solvente, que se destaque para as duas espécies, demonstrando que é necessário adequar o solvente a cada espécie. Relativamente ao material das cuvetes, o vidro apresentou resultados ligeiramente superiores, mas sem diferenças significativas. A eficácia do passo da maceração está muito dependente da espécie e do operador, sendo uma possível fonte de variação.

As diferentes extrações mostraram um padrão de rendimento semelhante entre o *Sphaerococcus coronopifolius* e a *Jania rubens*. A primeira espécie apresentou rendimentos em geral superiores, contudo, os extratos apresentavam coloração semelhante entre as espécies.

As duas espécies demonstraram potencial antioxidante, sendo de destacar a capacidade de inibição do radical ABTS do extrato aquoso da *Jania rubens*. Já o *S. coronopifolius* apresentou maior inibição do radical DPPH, contudo, durante a elaboração do teste foram detetados alguns problemas que podem ter influenciado os resultados. Já em relação à quantificação dos polifenóis totais o *Sphaerococcus coronopifolius* voltou a

apresentar um valor mais elevado, podendo este facto estar relacionado com a inibição do DPPH.

As duas algas apresentaram ainda algum potencial antimicrobiano contra *Bacillus subtilis*, contudo, não apresentaram qualquer efeito inibitório para a *Escherichia coli*, nem para a *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos com as leituras visuais e as leituras do espectrofotómetro permitem abrir a porta a outras investigações. É importante a realização de outros testes antibacterianos alargando o leque de espécies testadas.

Assim, este trabalho permite preencher algumas lacunas de conhecimento base destas espécies, em especial da biomassa selvagem da costa central portuguesa. Contudo, há ainda muito a estudar de forma a caracterizar estas algas. Como passos futuros a ser dados quanto ao perfil nutricional, é de destacar a análise do perfil da matéria gorda das duas espécies, assim como a análise dos hidratos de carbono do *Sphaerococcus coronopifolius*. Além disso, seria interessante explorar novas formas de homogeneização da biomassa, de forma a minimizar esse erro na quantificação de pigmentos. Outro ponto que necessita de futura análise é a utilização de biomassa seca, em vez de fresca para avaliar as diferenças na extração de pigmento, assim como a identificação dos carotenoides presentes nestas espécies. Será ainda de grande interesse avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano dos restantes extratos assim como determinar composição dos extratos efetuados de forma a identificar compostos de alto interesse biotecnológico.

Referências Bibliográficas

- Abdelahad, N., Barbato, F., O’Heir, S., Fratini, F., Valletta, A., Ninivaggi, L., & Alfinito, S. (2016). Reproduction of *Sphaerococcus coronopifolius* (Gigartinales, Rhodophyta) in Natural Populations of the Lazio Coasts (Central Italy) and in Culture. *Cryptogamie, Algologie*, 37(4), 265–272. <https://doi.org/10.7872/crya/v37.iss4.2016.265>
- Afonso, C., Correia, A. P., Freitas, M. V., Baptista, T., Neves, M., & Mouga, T. (2021). Seasonal Changes in the Nutritional Composition of *Agarophyton vermiculophyllum* (Rhodophyta, Gracilariales) from the Center of Portugal. *Foods*, 10(5), 1145. <https://doi.org/10.3390/foods10051145>
- Afonso, C., Correia, A. P., Freitas, M. V., Mouga, T., & Baptista, T. (2021). In Vitro Evaluation of the Antibacterial and Antioxidant Activities of Extracts of *Gracilaria gracilis* with a View into Its Potential Use as an Additive in Fish Feed. *Applied Sciences*, 11(14), 6642. <https://doi.org/10.3390/app11146642>
- Ahmed, H. H., Hegazi, M. M., Abd-Allac, H. I., Eskander, E. F., & Ellithey, M. S. (2011). Antitumour and Antioxidant Activity of Some Red Sea Seaweeds in Ehrlich Ascites Carcinoma in vivo. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 66(7–8), 367–376. <https://doi.org/10.1515/znc-2011-7-808>
- Angell, A. R., Mata, L., de Nys, R., & Paul, N. A. (2016). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 511–524. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0650-1>
- AOAC, G. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International.
- Aydin, B. (2022). Antioxidant properties of some macroalgae harvested from the Iskenderun Bay Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(02), 2145–2152.
- Azúa-Bustos, A., González-Silva, C., Salas, L., Palma, R. E., & Vicuña, R. (2010). A novel subaerial *Dunaliella* species growing on cave spiderwebs in the Atacama Desert. *Extremophiles*, 14(5), 443–452. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0322-7>

- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae* (2nd ed.). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/b16544>
- Beattie, S. W., Morançais, M., Déléris, P., Fleurence, J., & Dumay, J. (2018). Extraction of phycoerythrin and phycoerythrin pigments. Em B. Charrier, T. Wichard, & C. R. K. Reddy (Eds.), *Protocols for Macroalgae Research* (pp. 249–265). CRC Press.
- Beer, S., & Eshel, A. (1985). Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Marine and Freshwater Research*, 36(6), 785.
<https://doi.org/10.1071/MF9850785>
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
<https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cabral, E. M., Oliveira, M., Mondala, J. R. M., Curtin, J., Tiwari, B. K., & Garcia-Vaquero, M. (2021). Antimicrobials from Seaweeds for Food Applications. *Marine Drugs* 2021, Vol. 19, Page 211, 19(4), 211. <https://doi.org/10.3390/MD19040211>
- Carpena, M., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Chamorro, F., Otero, P., Lourenço-Lopes, C., Cao, H., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2022). Biological properties and potential of compounds extracted from red seaweeds. *Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. <https://doi.org/10.1007/S11101-022-09826-Z>
- Cavaco, M., Duarte, A., Freitas, M. v., Afonso, C., Bernardino, S., Pereira, L., Martins, M., & Mouga, T. (2021). Seasonal Nutritional Profile of *Gelidium corneum* (Rhodophyta, Gelidiaceae) from the Center of Portugal. *Foods*, 10(10), 2394.
<https://doi.org/10.3390/foods10102394>
- Chakraborty, K., Joseph, D., & Praveen, N. K. (2015). Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of

- Mannar of Peninsular India. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1924–1935. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1189-2>
- Chakraborty, K., & Raola, V. K. (2018). *In vitro* bioactive analysis and antioxidant activity of two species of seaweeds from the Gulf of Mannar. *Natural Product Research*, 32(22), 2729–2734. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1375923>
- Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., & Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT*, 41(6), 1067–1072. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2007.06.013>
- Cho, M., Kang, I.-J., Won, M.-H., Lee, H.-S., & You, S. (2010). The Antioxidant Properties of Ethanol Extracts and Their Solvent-Partitioned Fractions from Various Green Seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, 13(5), 1232–1239. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1124>
- Cikoš, A. M., Šubarić, D., Roje, M., Babić, J., Jerković, I., & Jokić, S. (2022). Recent advances on macroalgal pigments and their biological activities (2016–2021). *Algal Research*, 65. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102748>
- Cotas, J., Leandro, A., Pacheco, D., Gonçalves, A. M. M., & Pereira, L. (2020). A Comprehensive Review of the Nutraceutical and Therapeutic Applications of Red Seaweeds (Rhodophyta). *Life*, 10(3), 19. <https://doi.org/10.3390/life10030019>
- Couteau, C., & Coiffard, L. (2020). Phycocosmetics and Other Marine Cosmetics, Specific Cosmetics Formulated Using Marine Resources. *Marine Drugs*, 18(6), 322. <https://doi.org/10.3390/md18060322>
- Doleib, N. M., Farfour, S. A., Al-Shakankery, F. M., Ammar, M., & Hamouda, R. A. (2021). Antifungal activities of cyanobacteria and some marine algae against *Cephalosporium maydis*, the cause of Maize Late Wilt disease In Vitro. *Bioscience Research*, 18(1), 536–543. www.isisn.org
- DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768–1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Dumay, J., Morançais, M., Munier, M., Le Guillard, C., & Fleurence, J. (2014). Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 71, pp. 321–343). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00011-1>
- El-Sheekh, M. M., El-Shenody, R. A. E. K., Bases, E. A., & El Shafay, S. M. (2021). Comparative assessment of antioxidant activity and biochemical composition of four seaweeds, Rocky Bay of Abu Qir in Alexandria, Egypt. *Food Science and Technology*, 41(suppl 1), 29–40. <https://doi.org/10.1590/fst.06120>
- Esteban, R., Martínez, B., Fernández-Marín, B., María Becerril, J., & García-Plazaola, J. I. (2009). Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. *European Journal of Phycology*, 44(2), 221–230. <https://doi.org/10.1080/09670260802439109>
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), ix–xv. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science and Technology*, 10(1), 25–28. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00015-1)
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 497–509. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781>
- Freitas, M. V., Pacheco, D., Cotas, J., Mouga, T., Afonso, C., & Pereira, L. (2021). Red Seaweed Pigments from a Biotechnological Perspective. *Phycology*, 2(1), 1–29. <https://doi.org/10.3390/phyco2010001>

- Goreau, T. F. (1963). Calcium carbonate deposition by coralline algae and corals in relation to their roles as reef-builders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 109(1), 127–167. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1963.tb13465.x>
- Heo, S.-J., Cha, S.-H., Lee, K.-W., & Jeon, Y.-J. (2006). Antioxidant Activities of Red Algae from Jeju Island. *ALGAE*, 21(1), 149–156. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2006.21.1.149>
- Ismail, M. M., Alotaibi, B. S., & EL-Sheekh, M. M. (2020). Therapeutic Uses of Red Macroalgae. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 4411, 25(19), 4411. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25194411>
- Ismail, M. M., El Zokm, G. M., & El-Sayed, A. A. M. (2017). Variation in biochemical constituents and master elements in common seaweeds from Alexandria Coast, Egypt, with special reference to their antioxidant activity and potential food uses: prospective equations. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(12), 648. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6366-8>
- Ismail, M. M., & Osman, M. E. H. (2016). Seasonal fluctuation of photosynthetic pigments of most common red seaweeds species collected from Abu Qir, Alexandria, Egypt. *Revista de biología marina y oceanografía*, 51(3), 515–525. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000300004>
- Johansen, H. W. (2018). *Coralline Algae, A First Synthesis*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351070928>
- Jose, J., & Xavier, J. (2020). Study of mineral and nutritional composition of some seaweeds found along the coast of Gulf of Mannar, India. *Plant Science Today*, 7(4), 631–637. <https://doi.org/10.14719/PST.2020.7.4.912>
- Khairy, H. M., & El-Shafay, S. M. (2013). Seasonal variations in the biochemical composition of some common seaweed species from the coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egypt. *Oceanologia*, 55(2), 435–452. <https://doi.org/10.5697/oc.55-2.435>
- Khairy, H. M., & El-Sheikh, M. A. (2015). Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.010>

- Kirk, J. T. O., & Allen, R. L. (1965). Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: effect of actidione. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 21(6).
- Kumar, Y., Tarafdar, A., & Badgujar, P. C. (2021). Seaweed as a Source of Natural Antioxidants: Therapeutic Activity and Food Applications. *Journal of Food Quality*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5753391>
- Lambert, R. J. W., & Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of applied microbiology*, 88(5), 784–790. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2000.01017.X>
- Lee, R. E. (2018). *Phycology* (5th Edition). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316407219>
- Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs* 2011, Vol. 9, Pages 1056-1100, 9(6), 1056–1100. <https://doi.org/10.3390/MD9061056>
- Maghraby, Y. R., Farag, M. A., & Ramadan, A. R. (2021). Protective Action of *Jania rubens* Nanoencapsulated Algal Extract in Controlling Vegetable Oils' Rancidity. *ACS Omega*, 6(8), 5642–5652. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c06069>
- Meng, W., Mu, T., Sun, H., & Garcia-Vaquero, M. (2022). Evaluation of the chemical composition and nutritional potential of brown macroalgae commercialised in China. *Algal Research*, 64, 102683. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102683>
- Michalak, I., Tiwari, R., Dhawan, M., Alagawany, M., Farag, M. R., Sharun, K., Emran, T. Bin, & Dhama, K. (2022). Antioxidant effects of seaweeds and their active compounds on animal health and production—a review. *Veterinary Quarterly*, 42(1), 48–67. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2061744>
- Mohy El-Din, S. M., & El-Ahwany, A. M. D. (2016). Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 471–484. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.06.004>

- Navarro, D. A., & Stortz, C. A. (2008). The system of xylogalactans from the red seaweed *Jania rubens* (Corallinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, 343(15), 2613–2622. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.06.015>
- Neto, A. I. (2000). Observations on the Biology and Ecology of Selected Macroalgae from the Littoral of São Miguel (Azores). *Botanica Marina*, 43(5), 483–498. <https://doi.org/10.1515/BOT.2000.049>
- Nguyen, H. P. T., Moranças, M., Déléris, P., Fleurence, J., Nguyen-Le, C. T., Vo, K. H., & Dumay, J. (2020). Purification of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Gracilaria gracilis* by anion-exchange chromatography. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 553–561. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01947-x>
- Olsson, J., Toth, G. B., & Albers, E. (2020). Biochemical composition of red, green and brown seaweeds on the Swedish west coast. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3305–3317. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02145-w>
- Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F. B., C. Alves, R., & Oliveira, M. B. P. P. (2020). Pigments Content (Chlorophylls, Fucoxanthin and Phycobiliproteins) of Different Commercial Dried Algae. *Separations*, 7(2), 33. <https://doi.org/10.3390/separations7020033>
- Pacheco, D., Cotas, J., Domingues, A., Ressurreição, S., Bahcevandziev, K., & Pereira, L. (2021). *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: The Nutraceutical Potential of an Unexploited Marine Resource. *Marine Drugs*, 19(10), 570. <https://doi.org/10.3390/md19100570>
- Padmakumar, K., & Ayyakkannu, K. (1997). Seasonal Variation of Antibacterial and Antifungal Activities of the Extracts of Marine Algae from Southern Coasts of India. *Botanica Marina*, 40(1–6), 507–515. <https://doi.org/10.1515/botm.1997.40.1-6.507>
- Paiva, L. S., Patarra, R. F., Neto, A. I., Lima, E. M. C., Baptista Paiva, J. A. B., Baptista, J. A. B., Lima, E. M. C., & Baptista, J. A. B. (2011). Antioxidant activity of macroalgae from the Azores. *Arquipélago - Life and Marine Sciences*, 29, 1–6.
- Parlamento Europeu, & Concelho Europeu. (2009). Diretiva 2009/32/CE. *Jornal Oficial da União Europeia*, 52(3), 3–12. https://doi.org/10.3000/17252601.L_2009.141.por

- Patarra, R. F., Paiva, L., Neto, A. I., Lima, E., & Baptista, J. (2011). Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 23(2), 205–208. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9556-0>
- Pereira, L. (2018). *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315152844>
- Pérez, M. J., Falqué, E., & Domínguez, H. (2016). Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs* 2016, Vol. 14, Page 52, 14(3), 52. <https://doi.org/10.3390/MD14030052>
- Pinteus, S., Alves, C., Monteiro, H., Araújo, E., Horta, A., & Pedrosa, R. (2015). *Asparagopsis armata* and *Sphaerococcus coronopifolius* as a natural source of antimicrobial compounds. *World journal of microbiology & biotechnology*, 31(3), 445–451. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1797-2>
- Polat, S., & Ozogul, Y. (2013). Seasonal proximate and fatty acid variations of some seaweeds from the northeastern Mediterranean coast. *Oceanologia*, 55(2), 375–391. <https://doi.org/10.5697/OC.55-2.375>
- Porzio, L., Buia, M. C., Ferretti, V., Lorenti, M., Rossi, M., Trifuoggi, M., Vergara, A., & Arena, C. (2018). Photosynthesis and mineralogy of *Jania rubens* at low pH/high pCO₂: A future perspective. *Science of The Total Environment*, 628–629, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.065>
- Porzio, L., Buia, M. C., Lorenti, M., Vitale, E., Amitrano, C., & Arena, C. (2018). Ecophysiological response of *Jania rubens* (Corallinaceae) to ocean acidification. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 29(3), 543–546. <https://doi.org/10.1007/s12210-018-0719-2>
- Quémener, M., Kikionis, S., Fauchon, M., Toueix, Y., Aulanier, F., Makris, A. M., Roussis, V., Ioannou, E., & Hellio, C. (2021). Antifouling Activity of Halogenated Compounds Derived from the Red Alga *Sphaerococcus coronopifolius*: Potential for the Development of Environmentally Friendly Solutions. *Marine Drugs*, 20(1), 32. <https://doi.org/10.3390/md20010032>

- Ramu Ganesan, A., Kannan, M., Karthick Rajan, D., Pillay, A. A., Shanmugam, M., Sathishkumar, P., Johansen, J., & Tiwari, B. K. (2022). Phycoerythrin: a pink pigment from red sources (rhodophyta) for a greener biorefining approach to food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2081962>
- Rhimou, B. (2013). Antioxidant activity of Rhodophyceae extracts from Atlantic and Mediterranean Coasts of Morocco. *African Journal of Plant Science*, 7(3), 110–117. <https://doi.org/10.5897/AJPS12.048>
- Rodrigues, D., Alves, C., Horta, A., Pinteus, S., Silva, J., Culioli, G., Thomas, O. P., & Pedrosa, R. (2015). Antitumor and Antimicrobial Potential of Bromoditerpenes Isolated from the Red Alga, *Sphaerococcus coronopifolius*. *Marine Drugs* 2015, Vol. 13, Pages 713-726, 13(2), 713–726. <https://doi.org/10.3390/MD13020713>
- Rossano, R., Ungaro, N., D’Ambrosio, A., Liuzzi, G. M., & Riccio, P. (2003). Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. *Journal of Biotechnology*, 101(3), 289–293. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00002-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00002-6)
- Saleh, B., & Al - Mariri, A. (2017). Antimicrobial Activity of the Marine Algal Extracts against Selected Pathogens. *Em J. Agr. Sci. Tech* (Vol. 19). <http://hdl.handle.net/123456789/3590>
- Schagerl, M., & Donabaum, K. (2003). Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 1. Cyanoprokaryota, Rhodophyta and Cryptophyta. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 39(1), 35–47. <https://doi.org/10.1051/LIMN/2003003>
- Shafay, S. EL, Ee-Sheehk, M., Bases, E., & El-Shenody, R. (2022). Antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and anticancer potential of some seaweed extracts. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.20521>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdc-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3).
- Smyrniotopoulos, V., Vagias, C., & Roussis, V. (2009). Sphaeroane and Neodolabellane Diterpenes from the Red Alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Marine Drugs*, 7(2), 184–195. <https://doi.org/10.3390/md7020184>
- Tomić, A. (2015). *Isolation of bioactive metabolites from the red alga Sphaerococcus coronopifolius* [University of Zagreb]. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:765070>
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., Hreggvidsson, G. O., Jónsson, J. Ó., Thorkelsson, G., & Ólafsdóttir, G. (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *LWT*, 43(9), 1387–1393. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2010.05.010>
- Wang, T., Jonsdottir, R., Olafsdottir, G., & Kristinsson, H. G. (2014). Antioxidant properties of marine macroalgae. In *Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods* (pp. 283–317). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118855102.ch10>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 2008 3:2, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Yanshin, N., Kushnareva, A., Lemesheva, V., Birkemeyer, C., & Tarakhovskaya, E. (2021). Chemical Composition and Potential Practical Application of 15 Red Algal Species from the White Sea Coast (the Arctic Ocean). *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 2489, 26(9), 2489. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26092489>