



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

***Variação sazonal das propriedades antimicrobianas e antioxidantes das espécies Asparagopsis armata e Gelidium corneum,
S. Martinho do Porto, Portugal***

Mário Cavaco

2021

***Variação sazonal das propriedades antimicrobianas e antioxidantes das espécies Asparagopsis armata e Gelidium corneum,
S. Martinho do Porto, Portugal***

Mário Cavaco

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

Dissertação sobre a orientação da Doutora Teresa Mouga, Doutora Clélia Afonso e
Doutora Susana Bernardino

2021

Título: Variação sazonal das propriedades antimicrobianas e antioxidantes das espécies *Asparagopsis armata* e *Gelidium corneum*, S. Martinho do Porto, Portugal.

Copyright © Mário Manuel Palos Cavaco
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2021

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

É impossível agradecer devidamente a todas as pessoas que estiveram presentes neste ano atribulado. Mas cá vai:

Quero agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Teresa Mouga, Professora Doutora Susana Bernardino e Professora Doutora Clélia Afonso. Muito, muito obrigado pelo apoio constante, confiança e paciência para comigo. Sem a vossa orientação nunca teria tido acesso ao Programa Operacional MAR2020 que através do projeto MAR-04.03.01-FEAMP-0101-Limo do Cais tive a oportunidade de ter o primeiro trabalho na área.

Um grande obrigado aos que estiveram comigo nos bons e maus momentos. Beatriz, Diana, Madalena, Mafalda, Marco e Margarida, obrigado pelos risos, lágrimas e partilha de desespero comunal que apenas resultavam em mais gargalhadas. Estou ansioso para ver as vossas conquistas pessoais e profissionais. Nunca se esqueçam que o tio Mário também faz *baby-sitting*!

Aos meus colegas de condomínio, Patrícia, Jéssica, Maria, Filipe e Sara, que me ouviam a falar de forma jovial sobre o meu dia-a-dia no trabalho, mesmo que não percebessem nada! Hei de me relembrar com carinho dos inúmeros pores do sol pelos caminhos que após 5 anos em Peniche finalmente tive o prazer de conhecer, as conversas, os jantares e as festas (ui as festas). Estou ansioso para vos ver a brilhar no vosso futuro.

Não tenho palavras para exprimir a minha gratidão pela minha família. Especialmente à minha Mãe e Irmã. Podem existir mil e uma lombas pelo caminho, mas sei que cá estaremos para cada um dos solavancos.

Trabalho realizado no âmbito do mestrado de BRM, na UC de Dissertação, o qual foi suportado pelo projeto estratégico UIDB/04292/2020 dado Programa Operacional MAR2020 através do projeto MAR-04.03.01-FEAMP-0101-Limo do Cais, que conduziu aos seguintes outputs:

Comunicações:

- Mouga T, **Cavaco M**, Duarte A, Correia AP, Freitas MV, Bernardino S, Afonso C. New applications for *Gelidium corneum*: antimicrobial and antioxidante activity with a biorefinery concept. 12th International Phycological Congress - IPC2021, Chile, online conference, 22-26 March 2021. Phycologia.
- **Cavaco, M.**, Bernardino, S., Afonso, C., Mouga, T., 2021, Seasonal changes in the biochemical profile and antioxidant properties of *Gelidium corneum* from São Martinho do Porto, Portugal, NPA – Natural Products Applications: Health, Cosmetics and Food, Instituto Politécnico de Bragança, Online Edition, 4-5 fev [10.13140/RG.2.2.20720.79360](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20720.79360)

Artigos publicados:

- **M. Cavaco**, A. Duarte, S. Bernardino, C. Afonso, T. Mouga, 2021, Sustainable use of seaweeds from S. Martinho do Porto, Portugal – past, present and future perspective, in J. R. da Costa Sanches Galvão et al. (Eds.): Proceedings of the 1st International Conference on Water Energy Food and Sustainability (ICoWEFS 2021), pp. 1–11, 2021. [10.1007/978-3-030-75315-3_26](https://doi.org/10.1007/978-3-030-75315-3_26) ISBN: 978-3-030-75315-3.
- **Cavaco, M.**; Duarte, A.; Freitas, M.V.; Afonso, C.; Bernardino, S.; Pereira, L.; Martins, M.; Mouga, T. Seasonal Nutritional Profile of *Gelidium corneum* (Rhodophyta, Gelidiaceae) from the Center of Portugal. Foods 2021, 10, 2394. [10.3390/foods10102394](https://doi.org/10.3390/foods10102394)



Resumo

As algas marinhas têm sido utilizadas pela população portuguesa do litoral como alimento durante períodos de escassez e como fertilizante, desde há muitos séculos. Ambas as utilizações diminuíram drasticamente com a introdução da horticultura e dos fertilizantes químicos. Mesmo assim, nas últimas décadas, a globalização renovou o interesse na utilização destes organismos, e no seu potencial biotecnológico. *Gelidium corneum* e *Asparagopsis armata* são duas espécies que crescem em São Martinho do Porto. *G. corneum* é colhida sazonalmente porque produz agar, um ficocolóide de alta qualidade, que é utilizado na indústria alimentar como agente espessante ou gelificante. A *A. armata* é uma espécie invasora, conhecida pelo seu potencial biotecnológico, que pode ter aplicações inovadoras.

Ambas as espécies têm propriedades interessantes, tais como propriedades antioxidantes e antibacterianas que podem ser interessantes para a produção de componentes nutracêuticos. Para determinar o potencial biotecnológico destas espécies, é necessário determinar as variações sazonais destes compostos de interesse, e estabelecer o tempo ótimo de recolha para os diferentes compostos alvo. Assim, foram determinadas as variações sazonais de humidade, cinzas, proteínas, hidratos de carbono, agar, lípidos e os seus correspondentes ácidos gordos, além de contaminantes de metais pesados, e iodo. A atividade antioxidante foi também analisada através de ABTS, DPPH, QTP e FRAP e a atividade antimicrobiana através do método de difusão em disco. De todos estes, os teores de proteínas, hidratos de carbono, lípidos e humidade mostraram flutuações sazonais em ambas as espécies analisadas. Em *G. corneum*, foi também possível verificar diferenças sazonais no potencial antioxidante.

A biomassa de *G. corneum* é abundante durante todo o ano, principalmente no Verão, e tem propriedades nutricionais muito interessantes. Quanto a *A. armata*, embora a sua baixa disponibilidade sazonal dificulte a colheita da população selvagem durante todo o ano, mostra bioatividades de interesse biotecnológico.

Os resultados confirmam que estas duas espécies têm um valor biotecnológico que, se devidamente testado e aplicado, pode aumentar o seu valor comercial.

Abstract

Seaweed have been used by the littoral Portuguese population as food during periods of scarcity and as a fertilizer, for many centuries. Both uses have decreased drastically since the introduction of horticulture and chemical fertilizers. Even so, in the last decades, globalization has renewed the interest in the use of these organisms, and in their biotechnological potential. *Gelidium corneum* and *Asparagopsis armata* are two species that grow in São Martinho do Porto. *G. corneum* is seasonally harvested because it produces agar, a high quality phycocolloid, which is used in the food industry as a thickening or gelling agent. *A. armata* is an invasive species, known for its biotechnological potential, that may have promising applications.

Both species have interesting properties, such as antioxidant and antibacterial properties that can be used for the production of nutraceutical components. To determine the biotechnological potential of these species, it is necessary to determine the seasonal fluctuations of these compounds of interest, and to establish the optimal harvest time for the different target compounds. Therefore, the seasonal variations in moisture, ash, protein, carbohydrate, agar, lipids and their corresponding fatty acids, besides heavy metal contaminants, and iodine were determined. Antioxidant activity was also analyzed through ABTS, DPPH, QTP and FRAP and the antimicrobial activity through the disk diffusion assay. Out of all these, protein, carbohydrate, lipid, and moisture content showed seasonal fluctuations in both species and *G. corneum* also presented seasonal differences in the antioxidant potential.

The biomass of *G. corneum* is abundant locally year-round, mostly in the summer, and has very interesting nutritional properties. As to *A. armata*, although its low seasonal availability that may hinder the harvest of the wild population year-round, it shows biotechnologically relevant bioactivities.

The results confirm that these two species have biotechnological value that, if properly harvested and applied, can increase their commercial value.

Índice Geral

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract.....	vii
Introdução.....	1
<i>Gelidium corneum</i>	4
Propriedades do Agar	6
Outras propriedades e utilizações de <i>Gelidium</i> sp.	7
<i>Asparagopsis armata</i>	8
Propriedades e utilizações de <i>Asparagopsis armata</i>	9
Objetivos.....	10
Gerais	10
Específicos	10
Metodologia.....	12
Recolha e preparação da biomassa	12
Processo de secagem da biomassa	12
Extrações de <i>Gelidium corneum</i> e <i>Asparagopsis armata</i>	13
EA-PQ: Extração Aquosa obtida pelo processo a quente	13
EE-PTA: Extração Etanólica à temperatura ambiente	13
Determinação do Perfil Bioquímico da biomassa seca.....	14
Determinação da percentagem da Humidade, Peso Seco e Cinza	14
Quantificação de Proteína Bruta pelo método de Kjeldahl	15
Quantificação de Hidratos de Carbono Totais	17
Quantificação de Matéria Gorda Total.....	18
Metilação direta dos Ácidos Gordos	19
Determinação dos índices de qualidade nutricional.....	20
Determinação de Metais Pesados e Iodo.....	21
Extração de agar	21
Avaliação da Atividade Antioxidante.....	22
Quantificação Total de Polifenóis (QTP).....	22
Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	23
Capacidade de redução do radical ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).....	23
Poder de redução do Fe (III) (FRAP).....	24

Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	25
Revitalização de estirpes bacterianas	25
Método de Difusão em Disco.....	26
Concentração Mínima Inibitória (MIC)	26
Análise estatística	27
Resultados e discussão	28
Rendimentos de extração	28
Composição bioquímica.....	29
Ácidos gordos.....	33
Metais pesados e Iodo	38
Capacidade antioxidante	40
Capacidade antibacteriana.....	43
Conclusão	46
Referências Bibliográficas.....	48

Índice de Figuras:

Figura 1 - Gametófito de <i>Gelidium corneum</i>	5
Figura 2 - Estrutura química das unidades do agar (agarose e agarpectina); adaptado de AgarGel, 2003	7
Figura 3 - <i>Asparagopsis armata</i> nas diferentes fases do ciclo de vida, a) Tetraesporófito (fase <i>Falkenbergia rufulanosa</i>) e b) Gametófito; Retirado de <i>Asparagopsis armata</i> (<i>Falkenbergia</i>) - Harpoon Weed (Red seaweed images), 2020	9
Figura 4 - Variação da capacidade antioxidante do extrato liofilizado de <i>Gelidium corneum</i> , determinada através dos ensaios I - FRAP; II - QTP; III - ABTS; IV - DPPH. Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), Verão (b), Outono (c) e Inverno (d).....	41
Figura 5 - Variação da capacidade antioxidante do extrato liofilizado de <i>Asparagopsis armata</i> , determinada através dos ensaios I - FRAP; II - QTP; III - ABTS; IV - DPPH.	42

Índice de Tabelas:

Tabela 1 - Lista de bioatividades de <i>Gelidium</i> sp., Adaptada de Cavaco, et al. 2021.....	8
Tabela 2 - Lista de bioatividades de <i>Asparagopsis</i> sp., Adaptada de Cavaco, et al. 2021	10
Tabela 3 - Composição bioquímica de <i>Gelidium corneum</i> . Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3). Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), Verão (b), Outono (c) e Inverno (d).....	29
Tabela 4 - Composição bioquímica de <i>Asparagopsis armata</i> . Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3). Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a) e Verão (b).	29
Tabela 5 - Quantificação de ácidos gordos maioritários em <i>Gelidium corneum</i> (expresso em percentagem tendo em conta os ácidos gordos detetados); Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), Verão (b), Outono (c) e Inverno (d).....	34
Tabela 6 - Quantificação de ácidos gordos maioritários em <i>Asparagopsis armata</i> (expresso em percentagem tendo em conta os ácidos gordos detetados); Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as estações analisadas.	37
Tabela 7 - Concentração de metais pesados e iodo em <i>Gelidium corneum</i> . Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=2). Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), e Outono (c).	38
Tabela 8 - Concentração de metais pesados e iodo em <i>Asparagopsis armata</i> . Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=2). Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), e Verão (b).	38
Tabela 9 - Diâmetro de halos de inibição (mm) resultantes dos extratos etanólico de <i>Gelidium corneum</i> . Os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão (n=3)	44

Tabela 10 - Diâmetro de halos de inibição (mm) resultantes dos extratos etanólico de *Asparagopsis armata*. Os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão (n=3) 45

Lista de Abreviaturas:

n-3	Ómega-3
n-6	Ómega-6
ROS	Espécies reativas de oxigénio
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
QTP	Quantificação total de polifenóis
ABTS	2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid
MIC	Concentração mínima inibitória
EA-PQ	Extração aquosa obtida pelo processo a quente
EA-PTA	Extração aquosa obtida pelo processo a temperatura ambiente
EE-PTA	Extração etanólica obtida pelo processo a temperatura ambiente
GC	Cromatografia gasosa
FID	Detetor de ionização de chama
SFA	Ácidos gordos saturados
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
MAAs	Aminoácidos tipo micosporina

Introdução

O ambiente marinho alberga alguns dos ecossistemas mais ricos e complexos com organismos capazes de produzir moléculas que exibem uma vasta gama de bioatividades (Rocha et al., 2011). Nos ecossistemas terrestres, as plantas são os principais produtores primários e nos ecossistemas marinhos as algas microscópicas e macroscópicas apresentam a mesma função. Até hoje ainda não se consegue estimar o número de espécies de algas existentes, mas em 2012 estimava-se que o seu número fosse de 350 mil (Guiry, 2012). Estas estão presentes em zonas costeiras fornecendo um habitat e/ou fonte de alimentação para diversos organismos marinhos, desde zonas temperadas a tropicais até ao Ártico, podendo estar presentes desde a zona intertidal até aos 250 metros de profundidade (Fulton et al. 2014, Pal et al. 2014, Piñeiro-Corbeira et al. 2018, Rao et al. 2019; Wiencke, et al. 2014). As macroalgas classificam-se consoante o pigmento acessório predominante em macroalgas verdes (*Chlorophyta*), macroalgas castanhas (*Phaeophyceae*) e macroalgas vermelhas (*Rhodophyta*) (Ali & Gamal, 2010, Sasso et al. 2012), sendo os pigmentos predominantes, respetivamente, clorofila b, fucoxantina e ficoeritrina. Nas zonas temperadas as algas vermelhas são as predominantes.

As algas são seres vivos com estruturas vegetativas e reprodutivas simples que produzem a energia necessária para o seu metabolismo através da fotossíntese e armazenam a energia química produzida na forma de compostos orgânicos. Muitos destes exibem atividades biológicas particulares, sendo por isso denominados “compostos bioativos” (Burja et al 2001, Ariede et al. 2017). Existe uma vasta gama de compostos bioativos em diferentes organismos marinhos, pelo que já são utilizados em diversas indústrias, nomeadamente na cosmética, indústria alimentar e farmacêutica, entre outras. Recentemente o foco centra-se na farmacêutica, visando o desenvolvimento de novos fármacos benéficos para o tratamento de cancro, esquizofrenia e dores crónicas, entre outros (Kiuru et al. 2014).

No que se refere ao seu perfil nutricional, as algas vermelhas são constituídas por grandes quantidades de polissacarídeos, sendo que muitos destes apresentam o comportamento de fibras não solúveis, ou seja, são moléculas de cadeia longa não digeríveis pelo organismo humano, pelo que não exibem valor calórico. No entanto, em alguns casos, como muitas outras macroalgas, apresentam um alto teor de fibras solúveis (10-75%),

que promovem o trânsito intestinal e reduzem o risco de cancro do colon e a obesidade (Pereira, 2011). Apresentam, como a maioria das macroalgas, valores relativamente médios a baixos de proteína, havendo exceções onde o valor da mesma pode chegar até aos 47%, como na *Porphyra* sp./*Pyropia* sp. Embora nas algas as proteínas não estejam presentes em grandes quantidades, apresentam uma qualidade superior às proteínas derivadas de fontes vegetais como o arroz, trigo e feijão (Kolanjinathan et al. 2014, Mendes et al. 2007). A suplementação de algas na alimentação humana está associada ao crescimento e manutenção de uma flora intestinal benéfica, uma redução do risco de cancro colorretal e uma redução significativa de neoplastia mamária devido à alta biodisponibilidade de iodo dietético (Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

As algas marinhas são, também, ricas em ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) que são essenciais para a nutrição humana e animal, mais especificamente os Ómega-3 (n-3) e Ómega-6 (n-6) (Khotimchenko, et al. 2002). Estes ácidos gordos são considerados essenciais, pois o corpo humano não os consegue sintetizar naturalmente, sendo necessária uma suplementação dos mesmos na dieta. Os n-3 apresentam atividades anti-inflamatórias, estão relacionados com a diminuição da severidade de asma e também influenciam o processo da coagulação sanguínea e o desenvolvimento e bom funcionamento do cérebro e da retina (Covington, 2004; Hodge, et al. 1998; Wiktorowska-Owczarek, et al. 2015). Os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), miristoleico (C14:1), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 n9 cis) e linoleico (C18:2) são os ácidos gordos comuns presentes nas algas vermelhas e estas são, também, caracterizadas por ter concentrações elevadas dos ácidos araquidónico (C20:4 n-6) e eicosapentanoico (C20:5 n-3) o qual tem um papel de biorregulação de diversos processos celulares (Gressler, et al. 2010; Jayasankar, 1999).

As algas são consideradas um alimento saudável em diversas culturas, devido à sua composição nutricional à inexistência de toxinas endógenas (Lähtenmäki-Uutela, et al. 2021). Estas tendem, no entanto, a acumular do seu meio ambiente metais pesados, nomeadamente chumbo, cádmio e arsénio, entre outros minerais. Logo, a qualidade da água onde as algas estão presentes é um fator relevante para a determinação da qualidade da biomassa algal quando se tem em conta o seu potencial como alimento (Cardoso, et al. 2014).

Os fatores abióticos, e a sua variação, como a disponibilidade de nutrientes, radiação UV, temperatura e salinidade entre outros pode provocar stress ambiental que, consequentemente, pode desencadear alterações metabólicas que modulam a produção de metabolitos primários e secundários (Mimouni, et al. 2012). As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser produzidas durante estes processos bioquímicos. As ROS exibem um ou mais elétrons desemparelhados, sendo por isso altamente reativas com outras moléculas. A acumulação destes compostos pode levar a um desequilíbrio na capacidade do organismo de contrariar os efeitos nocivos causados por estes radicais livres (Finkel & Holbrook, 2000). Estes danos são conhecidos como stress oxidativo e a sua influência depende do equilíbrio de ROS e a produção de defesas antioxidantes. O mecanismo desta defesa baseia-se na remoção destes radicais livres e os seus precursores (Gilgun-Sherki, et al. 2001). Até hoje, antioxidantes sintéticos estão disponíveis comercialmente, mas o seu uso e aplicações são limitadas devido a possíveis efeitos secundários como problemas gastrointestinais, sendo assim interessante a procura de novos antioxidantes de fontes naturais e sustentáveis (Cornish & Garbary, 2010; Guerrero-Romero, et al. 2020). Ao longo dos anos foram elaborados diversos estudos relativamente à atividade antioxidante considerável de diversos compostos de macroalgas (Jiao, et al. 2011). Alguns exemplos destes compostos com atividade antioxidante são os polissacarídeos sulfatados, que exibem uma forte capacidade de atividade de *scavenging* de espécies reativas de OH• e DPPH• além de inibição de peroxidação lipídica (Sun, et al. 2014), o bromofenol, que inibe a produção de α -Glucosidase, uma enzima que catalisa a hidrólise de hidratos e outros compostos de armazenamento de energia, que tenham monómeros de glucose, em açúcares simples que, por sua vez, aumentam o nível de glucose no sangue, e os grupos funcionais fenólicos e os aminoácidos tipo micoesporinas (MAAs) que exibem atividades antiproliferativas, entre outros (Cornish & Garbary, 2010).

A crescente resistência a antibióticos por parte de bactérias patogénicas é uma ameaça global, devido à crescente ineficácia dos antibióticos em tratamentos de microrganismos multirresistentes. Estes podem adquirir esta resistência através de mutações ou de elementos genéticos móveis que possuem genes de resistência. A diversidade de componentes estruturais dos biofilmes, também conhecidos por substâncias extracelulares poliméricas, contribuem para esta resistência e os microrganismos presentes nestes biofilmes apresentam uma grande resistência a antimicrobianos (Roca, et al. 2015, Ali, et al.

2018). *Escherichia coli* e *Candida albicans* são um exemplo de organismos oportunistas formadores de biofilmes. *E. coli* é uma bactéria gram-negativa da microflora intestinal, presente na camada mucosa do cólon, e a causa de infecções urinárias recorrentes (Garmendia, et al. 2005). *C. albicans* é um patógeno fúngico que causa infecções sistêmicas, usualmente orais e/ou vaginais no hospedeiro e pode ser isolada em 50 a 60% das cavidades orais de adultos saudáveis (Thein, et al. 2006). *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria gram-positiva e uma das razões principais de infecções nosocomiais, ou hospitalares, devido à capacidade de criação de biofilmes em material hospitalar, como os cateteres (Vuong & Otto, 2002). *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura essencial na indústria alimentar, que tem vindo a apresentar um aumento de infecções em pacientes que se encontram em estados críticos e saudáveis, podendo resultar em pneumonia e peritonite, entre outras doenças (Muller, et al. 2011). O aumento da resistência global de bactérias patogénicas aos antibióticos tornou-se um problema de saúde mundial, o que levou à pesquisa de novos compostos antibacterianos eficientes de fontes naturais (Susilowati, et al. 2015).

Gelidium corneum

Embora o género *Gelidium* ainda não seja reconhecido como um alimento na União Europeia (Rahikainen & Yang, 2020) foi aceite para uso humano pela U.S. Food and Drug Administration (FDA Substance Registration System, 2021).

Gelidium corneum (Hudson) J.V. Lamouroux 1813 é uma espécie marinha que se encontra distribuída pelos oceanos Atlântico e Índico, bem como na costa do Japão, da China, da Coreia, da Indonésia e de Myanmar. Esta espécie apresentam um ciclo de vida, característico das Gelidiales, com três fases distintas: A fase tetraesporófito (diploide), a fase carposporófito (diploide) e a fase gametófito (haploide). Esta alga pode, também, apresentar reprodução vegetativa que consiste na emissão de novos eixos eretos a partir do sistema de eixos prostrados (Silva, 1998).

É uma alga vermelha, perene, pelo que pode sobreviver durante vários anos, sempre fixa a um substrato rochoso. Os talos pseudoparenquimatosos são relativamente

grandes e robustos, de cor vermelho-escuro e brilhante, apresentando uma consistência rígida e cartilaginosa. Estes encontram-se fixos ao substrato através de um disco de fixação e elevam-se formando eixos compridos através de ramificações secundárias e terciárias, habitualmente opostas. As ramificações são finas, achatadas e agudas, sendo esta espécie característica de zonas litorais, onde ocorre a pouca profundidade, em água frias e agitadas que garantem uma boa oxigenação e riqueza em nutrientes (Almeida, 2007; Lamouroux, 1813). A utilização tradicional deste tipo de macroalga em Portugal começou em meados do século XV por ordem de D. Dinis, sobretudo como fertilizante. A apanha de algas foi importante até início do século XX. Nos anos 40 as algas eram colhidas na praia, secas e exportadas sem processamento prévio. Contudo, esta exportação foi proibida, procurando reforçar o desenvolvimento da indústria portuguesa de produção de agar. A partir da década de 60 do século XX, o *G. corneum* era recolhido por mergulhadores tendo esta atividade sido regulamentada em 1967, o que limitou o número de colheitas, e por consequente o volume recolhido, e de barcos usados para a mesma, limitando o impacto humano na espécie de alga (Cavaco et al., 2021). A escassez de agar nos mercados internacionais resultou no desenvolvimento da indústria em Portugal devido à abundância de duas espécies agarófitas, que são as principais algas recolhidas em Portugal: *G. corneum* e *Pterocladia capillacea*. A primeira produz um agar de alta qualidade (Gaspar et al. 2019). O licenciamento para a operação das embarcações é, atualmente, concedido pela Direção Geral dos Recursos Marinhos e existe uma associação de Apanhadores de Algas, a APAASMP – Associação de Pesca e Apanha de Algas de São Martinho do Porto.



Figura 1 - Gametófito de *Gelidium corneum*.

Propriedades do Agar

Certas algas da zona litoral portuguesa são uma ótima fonte de polissacarídeos. Mais especificamente os ficocolóides, que são polissacarídeos coloidais reversíveis. Nestes incluem-se o agar, as carragenanas e o alginato. A aplicação de cada um destes compostos irá depender do número de grupos sulfato por dissacarídeos que apresenta uma relação direta com a capacidade espessante dos compostos (Pereira, 2004, Leandro & Pereira, 2020). O agar, é um hidrocolóide fortemente gelatinoso extraído de diversas espécies de algas marinhas vermelhas que consiste numa mistura heterogénea de agarose e de agarpectina. O agar foi o primeiro ficocolóide a ser utilizado como aditivo alimentar no oriente há mais de 300 anos. O agar, o alginato e a carragenana, são purificados industrialmente, sendo que ainda são usados agente gelificantes na forma de tiras e quadrados em, para confeccionar pratos tradicionais. O agar é constituído por dois componentes maioritários: a agarose e a agarpectina. A agarose é a fração gelificante do agar e é constituída por unidades alternadas de ligações β -D-galactose e 3-6,anhydro- α -L-galactose com poucas variações e um baixo conteúdo de ésteres sulfatados. A agarpectina tem uma estrutura similar à agarose, mas apresenta 5-10% ésteres sulfatados e outros resíduos como grupos metoxilo e ácido pirúvico, além das cadeias de polissacarídeos onde as unidades 3-6,anhydro- α -L-galactose são parcialmente substituídas por unidades α -L-galactose 6-sulfato. A capacidade gelificante do agar deve-se maioritariamente às ligações de hidrogénio formadas ao longo das cadeias de galactano. É chamado de *Kanten* no Japão que significa “céu congelado”, sendo este nome uma referência ao primeiro processo de fabrico que se baseava na congelação do agar extraído em campos abertos. Processo este que foi registado em 1658 por Tarazaemon Minoia que aproveitou a insolubilidade do agar, quando este é arrefecido, para otimizar o procedimento. Este é apenas um dos métodos usados atualmente para a extração do agar que potenciou um aumento de quase 10 vezes na concentração de agar dos extratos de algas obtidos. A água eluída contém sais, orgânicos e inorgânicos, proteínas, como as ficoeritrinas que produzem o pigmento rosa característico da

divisão Rhodophyta e esta pode ser removida através de força mecânica (Armisen & Gaiatas, 2009, Dyrby et al. 2004).

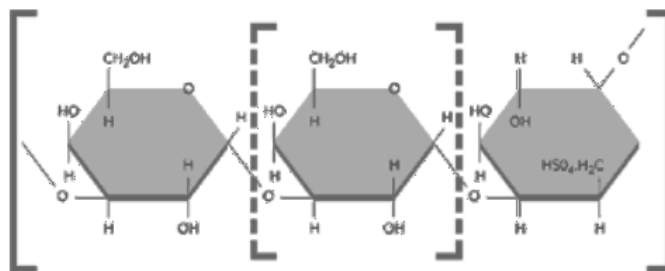


Figura 2 - Estrutura química das unidades do agar (agarose e agarpectina); adaptado de AgarGel, 2003

Apesar do agar poder ser extraído de diferentes espécies, o mercado mundial depende, quase exclusivamente, de espécies dos géneros *Gelidium* e a *Gracilaria*. O mercado de agar proveniente de *Gelidium* tem diminuído por diversas razões, mas, as causas prendem-se sobretudo, com a diminuição dos stocks selvagens destes organismos derivada da sua sobre-exploração (Bixler & Porse, 2011, Cavaco et al., 2021). Pelo contrário, o género *Gracilaria* é amplamente cultivada, mas produz um agar de pior qualidade.

Outras propriedades e utilizações de *Gelidium* sp.

Este género de macroalgas já foi usado para tratamento de úlceras e problemas estomacais, e os resultados positivos na microbiota intestinal foram reportados, não só para *Gelidium*, como para outras espécies de macroalgas (Almeida, 2007; De Jesus Raposo, et al. 2016). Os polissacarídeos solúveis, tal como os extratos da alga, podem ser usados como bio gel e apresentam atividades antioxidantes, antivirais, antiproliferativas e anti-inflamatórias, entre outras (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista de bioatividades de *Gelidium* sp., adaptada de Cavaco, et al. 2021

Taxa	Fração	Bioatividade	Referência
<i>Gelidium corneum</i>	Biofilme comestível	Antimicrobiana	Kanmani, et al. 2014
	Extratos metanólicos	Antifúngica	Boujaber, et al. 2016
	Extratos diclorometano-metanol		Sidi & Bem, 2014
	Aerogel à base de agar	Antioxidante	De Oliveira, et al. 2019
	Extratos etanol/água		Veja, et al. 2020
	Extratos clorofórmio		Metidji, et al. 2015
	Extratos aquosos de MAAs		De la Coba, et al. 2009
	Extratos etanólicos	Anti-inflamatória	Matos, et al. 2020
<i>Gelidium corneum</i>	Extratos aquosos	Antiproliferativa	Matos, et al. 2021
	Extratos diclorometano-metanol		Grozdanic, et al. 2012
<i>Gelidium corneum</i>	Oligossacarídeos	Fitoestimulante	Lebbar, 2018
	Biomassa não viva	Biorremediação	Trioui, et al. 2017
<i>Gelidium foliaceum</i>	Polissacarídeos	Antioxidante	Rengasamy, et al. 2015
<i>Gelidium amansii</i>	Extratos etil-acetato, acetona e metanólicos	Antioxidante	Yan, et al. 1998
	Extratos metanólicos	Antiproliferativa	Chen, et al. 2004
<i>Gelidium latifolium</i>	Frações etanólicas e Diclorometano	Antimicrobiana Anti incrustante	Hellio, et al. 2001
<i>Gelidium pulchellum</i> <i>Gelidium spinulosum</i>	Extratos aquosos	Antiviral	Rhimou, et al. 2010

Asparagopsis armata

Asparagopsis armata Harvey 1855 é uma espécie originária do Sul da Austrália e Nova Zelândia, da família Bonnemaisoniaceae, e é, atualmente, uma espécie invasora na Europa, registada pela primeira vez em Itália (1880) e na Argélia (1923), que atualmente está amplamente distribuída por todo o Oceano Atlântico. A *A. armata* exibe um ciclo de vida haplo-diplóide heteromórfico trifásico, como se pode observar pela Figura 3. Os gametófitos ocorrem de junho/julho a agosto/setembro e são conhecidos como erva-arpão devido à semelhança das suas ramificações inferiores em ramos espinhosos que se assemelham com um arpão ou um anzol vermelho arroxeadado. Quando são removidos rapidamente degeneram apresentando uma cor laranja. Exibem um eixo cilíndrico até 1mm de grossura, podendo chegar aos 200mm de comprimento com 4 filas de ramificações simples e curtas, alternando com ramificações mais longas. Os tetrasporófitos ocorrem assiduamente ao longo do ano, mas a sua presença é mais acentuada nos meses de outubro e março. Apresentam uma cor vermelha acastanhada sob a forma de um tufo de algodão até 15mm de diâmetro (Bonin & Hawkes, 1987, Harvey, 1855). Devido à razão

superfície-volume dos tetrasporófitos esta alga apresenta uma grande capacidade de captação de nutrientes, em comparação com outras algas, e tem a capacidade de cobrir outras espécies limitando, assim, a acessibilidade a fatores abióticos como a luz solar e nutrientes (Katsanevakis, et al. 2014).

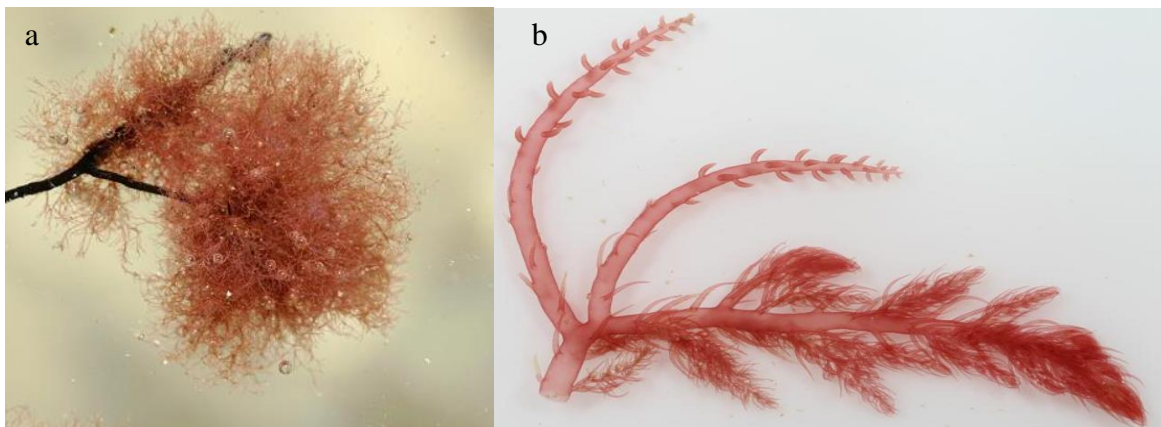


Figura 3 - *Asparagopsis armata* nas diferentes fases do ciclo de vida, a) Tetrasporófito (fase *Falkenbergia rufulanosa*) e b) Gametófito; Retirado de *Asparagopsis armata* (*Falkenbergia*) - Harpoon Weed (Red seaweed images), 2020

Propriedades e utilizações de *Asparagopsis armata*

As espécies de macroalgas vermelhas da família Bonnemaisoniaceae, como é o caso de *A. armata*, são reconhecidas como fontes de compostos halogenados com atividades antibacterianas, antivíricas, antifúngicas, antibióticas e anticancerígenas que podem ser usados em diversas indústrias (Pinteus, et al. 2015). Dado que a maioria destes compostos são tóxicos para as próprias macroalgas, estas apresentam estruturas de armazenamento glandulares especializadas (Paul, et al. 2006). Ensaio *in vitro* e *in vivo* demonstram a atividade citotóxica em linhas celulares cancerígenas humanas (Zubia, et al. 2009) sendo que os extratos metanólicos e de diclorometano apresentam a capacidade de inibir a proliferação de linhas celulares HepG2 (células cancerígenas de fígado), indicando o potencial antitumoral dos compostos desta alga (Pinteus, et al. 2018). Recentemente tem sido investigada a capacidade de redução de emissões de metano de gado bovino quando usada na ração para o mesmo (Vijn, et al., 2020). A alga exibe um forte odor característico que se deve à presença de bromofórmio e de outros compostos voláteis halogenados cuja atividade antimicrobiana contra diversas estirpes bacterianas, incluindo *Vibrio* spp. marinhos, já foi reportada por diversos autores (Paul & Pohnert, 2011, Pinteus, et al. 2020). Na Tabela 2 encontram-se diversas bioatividades reportadas previamente o género *Asparagopsis* sp.

Tabela 2 - Lista de bioatividades de *Asparagopsis* sp., adaptada de Cavaco, et al. 2021

Taxa	Fração	Bioatividade	Referência
<i>Asparagopsis armata</i>	Extratos etanólicos, metanólicos e brutos	Antimicrobiana	Salvador, et al. 2007 Pinteus, et al. 2020
	Extratos aquosos	Antiviral	Rhimou, et al. 2010
	Frações do extrato bruto	Anti incrustante	Pinteus, et al. 2020
	Biomassa	Metanogénese	Vijn, et al. 2020 Roque, et al. 2019
	Extratos diclorometano	Antitumoral	Pinteus, et al. 2017 Gutiérrez-Rodríguez, et al. 2018
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	Extratos metanólicos, clorofórmio, petróleo, acetato.	Antioxidante Antitumoral	Neethu, et al. 2017
	Extratos metanólicos	Anti incrustante	Jha, et al. 2013
	Biomassa	Metanogénese	Roque & Duarte, 2020

Como foi mencionado previamente, as algas produzem naturalmente compostos bioativos com potencial biotecnológico. No entanto, fatores abióticos como a carência de nutrientes, radiação UV e oscilações de temperatura, entre outros, podem desencadear alterações metabólicas. Estas alterações podem resultar em oscilações dos níveis de produção dos ditos compostos.

Objetivos

Gerais

Tendo em conta os aspetos mencionados, este estudo visa determinar o potencial biotecnológico dos recursos endógenos de São Martinho do Porto, Portugal, nomeadamente as algas vermelhas *Gelidium corneum* e *Asparagopsis armata* consoante as variações sazonais detetadas.

Específicos

1. Caracterização sazonal do perfil bioquímico das algas das algas *G. corneum* e *A. armata*. Para esse fim, foram realizadas 4 amostragens em São Martinho do Porto, uma por cada estação do ano, tendo esta biomassa sido analisada. Apenas foi possível obter biomassa de *A. armata* para as estações da Primavera e Verão.

Foi analisado o perfil bioquímico através de ensaios de determinação do conteúdo em humidade e cinza da alga seca, a extração e quantificação de agar, a quantificação de matéria gorda total e a metilação direta de ácidos gordos, a quantificação de hidratos de carbono totais e a quantificação de proteína bruta.

2. Avaliação da capacidade antioxidante das macroalgas *G. corneum* e *A. armata*.

Foram efetuados extratos aquosos e etanólicos das duas macroalgas. Ambos os solventes foram escolhidos por serem considerados solventes “verdes” e económicos. Usando estes solventes pode-se garantir a extração de diversos compostos polares e apolares. Sendo o objetivo do estudo a valorização da biomassa algal foi do nosso interesse extrair a maior variedade de compostos bioativos possíveis. A avaliação das atividades antioxidantes nos extratos de algas foi possível através de diversos ensaios que permitiram uma melhor caracterização da capacidade antioxidante destas macroalgas e registo de possíveis diferenças ao longo do ano. Recorreu-se a ensaios de capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e do radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), determinação do poder redutor do Ferro (III) (FRAP) e QTP (quantificação total de polifenóis) e os quais são métodos complementares, que permitem melhor compreender os mecanismos antioxidantes característicos de cada tipo de extrato.

3. Avaliação da capacidade antimicrobiana das macroalgas *G. corneum* e *A. armata*.

A capacidade antimicrobiana dos extratos de *G. corneum* e *A. armata* foram avaliados contra as estirpes *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Foram realizados antibiogramas e nos extratos que apresentaram inibição de crescimento bacteriano foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC).

Metodologia

Recolha e preparação da biomassa

As macroalgas *G. corneum* e *A. armata* foram recolhidas na costa rochosa de São Martinho do Porto, 39°30'38,8"N - 9°08'36,2"W, Leiria, Portugal, nos dias 17 de junho, 29 de agosto e 27 de novembro de 2019 e 22 de fevereiro de 2020. Posteriormente à sua identificação, a biomassa fresca foi transportada em caixas térmicas para o edifício Cete-mares, em Peniche. No laboratório, a biomassa recolhida, foi lavada em água salgada para remoção de epífitas, organismos invertebrados e outro material não desejado. Finda a triagem, foi removido o excesso de água superficial com papel absorvente e procedeu-se à pesagem da biomassa recolhida. As macroalgas foram armazenadas em sacos de congelação, previamente identificados, e congeladas a -20°C.

Processo de secagem da biomassa

Para realização dos diversos ensaios de determinação do perfil bioquímico e preparação dos extratos utilizou-se biomassa seca em pó a qual foi preparada da forma que a seguir se descreve. Após descongelação das algas a temperatura ambiente, estas foram dispostas uniformemente em tabuleiros perfurados, visando o aumento da eficácia da descongelação. Seguidamente, as algas foram colocadas na estufa ventilada FD115 (Binder, Tuttlingen, Alemanha) a 25°C e com viragem ao início da manhã (\approx 9h00) e ao fim da tarde (\approx 17h00). Quando a biomassa se encontrava seca e o seu peso estabilizado, foi triturada, recorrendo a uma liquidificadora (Krups, Solingen, Alemanha) e um moinho de café GVX 2 (Krups, Solingen, Alemanha), obtendo-se assim a biomassa seca na forma de pó que foi armazenada em sacos de congelação, previamente identificados, a -20°C até posterior utilização.

Extrações de *Gelidium corneum* e *Asparagopsis armata*

EA-PQ: Extração Aquosa obtida pelo processo a quente

Para a extração aquosa pelo processo a quente (EA-PQ) utilizou-se uma proporção alga:solvente de 1:50 (g/mL) no sistema Soxhlet durante 4 horas através do método de percolação adaptado de Fatima, e colaboradores (2016). Para tal, a alga foi distribuída uniformemente num papel absorvente (papel de laboratório) que foi dobrado ao meio e enrolado sobre si. O papel foi humidificado com água destilada e colocado dentro do corpo do Soxhlet. Adicionou-se ao balão o respetivo volume de água destilada e esferas de ebulição, que auxiliam o processo, mantendo o equilíbrio entre a formação e o reben-tamento das bolhas. Por fim, ligou-se a manta de aquecimento Fibroman-c (J.P Selecta EN, Barcelona, Espanha) na temperatura máxima (400°C). Quando a água no interior do balão atingiu o ponto de ebulição reduziu-se a temperatura da manta para o mínimo (200°C).

Findo o tempo de extração, o sistema Soxhlet foi desligado e recolheu-se todo o volume de extrato presente no balão. De seguida, o extrato foi filtrado com papel de filtro Whatman nº4 (Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América). Por fim, o extrato aquoso foi armazenado a -80°C, liofilizado e armazenado em tubo de plástico, à temperatura ambiente até a sua utilização.

EE-PTA: Extração Etanólica à temperatura ambiente

Para a extração etanólica à temperatura ambiente (EE-PTA) utilizou-se uma proporção alga:solvente de 1:10 (g/mL). Pesou-se a alga seca e de seguida colocou-se num gobelet juntamente com o respetivo volume de etanol absoluto, durante oito horas, em agitação constante e protegido da luz. No fim deste período, o extrato foi filtrado com papel de filtro Whatman nº4 e o volume do extrato foi reduzido por evaporação no rota-vapor (Heidolph, Schwabach, Alemanha). De seguida, o volume (cerca de 25 mL) do extrato foi evaporado até à secura no Speedvac (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América). Posteriormente, hidratou-se o extrato seco com água Milli-

Q e foi submetido ao processo de liofilização. Por fim, o recipiente com o extrato seco foi armazenado à temperatura ambiente até utilização posterior.

Determinação do Perfil Bioquímico da biomassa seca

A determinação do perfil bioquímico, de ambas as espécies de algas, foi feita para cada uma das amostras recolhidas durante as estações do ano amostradas, procurando definir o perfil sazonal de cada alga observando possíveis variações de acordo com as condições de cada estação, como a temperatura, a disponibilidade de nutrientes, de oxigénio e de luz, entre outros.

Determinação da percentagem da Humidade, Peso Seco e Cinza

Para obtenção de biomassa seca começou-se pela identificação, utilizando apenas grafite, e pesagem de cadinhos de porcelana, incluindo 3 réplicas por amostra.

Se a biomassa estiver congelada, procede-se ao descongelamento das amostras e secagem, com o auxílio de papel absorvente. O cadinho também foi seco, com o mesmo papel, de modo a não haver humidade que interferisse com os valores do peso. Posteriormente pesou-se o cadinho com a amostra respetiva e ao peso obtido retirou-se o valor do peso dos cadinhos vazios para determinar o peso da alga fresca. Posteriormente, os cadinhos com as amostras foram colocados na estufa a 105°C durante até haver estabilização do peso e secura total da biomassa. Findo o tempo de secagem as amostras foram colocadas num exsiccador até atingirem a temperatura ambiente e peso constante. Procedeu-se a múltiplas pesagens das amostras nos cadinhos respetivos, e se não for obtido um peso constante será necessário repetir os passos de secagem em estufa até o mesmo ser obtido.

Para determinação do conteúdo de cinza os cadinhos, com a amostra previamente seca e pesada, foram colocados na mufla (Nabertherm, Lilienthal, Alemanha) a 525°C. O equipamento foi programado para uma rampa de aquecimento durante 4h, seguida de um patamar a 525°C com duração de 5h. Posteriormente, as amostras foram colocadas a arrefecer num exsiccador até atingirem a temperatura ambiente e, conseqüentemente, peso constante. Por fim, as amostras foram pesadas, nos cadinhos respetivos, pelo menos

quatro vezes. O cálculo da percentagem de humidade, peso seco e cinza foi feito de acordo com as seguintes equações (AOAC, 2016).

$$\% \text{ Peso Seco} = \frac{\text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

$$\% \text{ Humidade} = 100 - \% \text{ Peso seco}$$

$$\% \text{ Cinza em Peso Seco} = \frac{\text{Peso incinerado}}{\text{Peso seco}} \times 100$$

Quantificação de Proteína Bruta pelo método de Kjeldahl

A quantificação de proteína bruta das duas algas em estudo foi feita através da quantificação de azoto pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2016). Este ensaio consiste na mineralização da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico na presença do catalisador formado por pastilhas *KjelTabs* (VWR CHEMICALS, Pensilvania, Estados Unidos da América), seguido da libertação do amoníaco em meio alcalino, destilação, recolha do meio ácido e, por fim, titulação com ácido clorídrico.

Para a realização deste ensaio foram preparadas as soluções necessárias de forma prévia. Nomeadamente a solução de hidróxido de sódio (VWR CHEMICALS, Pensilvânia, Estados Unidos da América) a 40% (m/v) a solução titulante de ácido clorídrico (VWR CHEMICALS, Pensilvânia, Estados Unidos da América) a 0,1M e a solução recetora. A solução recetora consiste numa solução de 1L de ácido bórico (VWR CHEMICALS, Pensilvânia, Estados Unidos da América) a 4% (m/v) com 7mL de vermelho metilo (VWR CHEMICALS, Pensilvania, América) e 10m de verde de bromocresol (Alfa Aesar, Massachusetts, Estados Unidos da América) que foi ajustada a um pH de 4,8.

Após identificação de cinco tubos de digestão por amostra (3 réplicas e 2 brancos) pesou-se 0,5g, de biomassa seca, registando o peso de forma rigorosa. As amostras pesadas foram colocadas nos respetivos tubos de digestão e em cada tubo, dentro da hotte, foram adicionadas duas pastilhas de catalisador e 25mL de ácido sulfúrico. O digestor (Foss, Hillerød, Dinamarca) foi colocado na hotte, e o tubo de arrefecimento do aparelho

foi preso à torneira de água da hotte. Após colocar os tubos dentro do digestor, a torneira de arrefecimento foi ligada e o aparelho foi programado para 220°C. Após ser atingida esta temperatura aguardaram-se 30 minutos e findo este tempo o digestor foi programado para 400°C e aguardaram-se mais 90 minutos. Findo o tempo de digestão foi necessário arrefecer as amostras, desligando o aparelho. Após arrefecimento das amostras foram adicionados 80mL de água destilada muito lentamente. Findo a transferência do volume de água destilada, passou-se para a etapa da destilação.

Foi realizada uma etapa de limpeza ao destilador, adicionando 80mL de água destilada a um tubo de digestão vazio no suporte esquerdo e um Erlenmeyer de 250mL vazio no suporte direito. Findo a limpeza foi possível passar à destilação das amostras em meio alcalino por adição de 100mL de NaOH a 40%, cujos ciclos duram 6 minutos. Em cada um dos Erlenmeyers foram colocados 30mL da solução recetora e colocados no suporte direito do destilador. Finda a destilação passou-se à etapa da titulação.

A bureta de 20mL foi preenchida com a solução titulante. A amostra destilada apresenta uma cor verde e foi titulada até se atingir o ponto de viragem que apresenta uma cor acinzentada. Ao atingir-se este ponto foi registado o valor de solução titulante utilizada e através da seguinte formula foi possível extrapolar a proteína em % de peso seco.

$$Proteina\ total\ \% = \frac{[(V_a - V_b) \times n \times 5 \times 0.014]}{m} \times 100$$

Sendo que, V_a corresponde ao volume de solução titulante usado na amostra (mL), V_b ao volume de solução titulante usado no branco (mL), n à concentração da solução titulante (0,1M), 5 ao fator de conversão das algas vermelhas (Angell, et al. 2016) e m à massa inicial da amostra.

Quantificação de Hidratos de Carbono Totais

A quantificação de hidratos de carbono presentes nas duas espécies de algas em estudo foi realizada através do método de Dubois (1956), aplicando uma solução de fenol-ácido sulfúrico. Para a realização deste ensaio foram previamente preparadas as soluções de ácido sulfúrico a 1M, fenol a 5% e glucose a 1 mg/mL previamente.

Inicialmente pesaram-se 15mg de biomassa seca para um tubo de vidro com tampa de rosca, em triplicado, e adicionaram-se 8mL de ácido sulfúrico a 1M. A mistura foi homogeneizada com o auxílio do vortex durante 1 minuto e finda a homogeneização os tubos foram colocados em banho-maria (Selecta, Cham, Suíça) a 90°C durante 60 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado usando uma pipeta de Pasteur com algodão, com o intuito de funcionar como coluna de filtração, o sobrenadante foi recolhido para um balão volumétrico de 10mL e o volume foi completado usando ácido sulfúrico a 1M. A curva padrão foi estabelecida com concentrações de glucose a 0,02, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,20 e 0,30 mg/mL em triplicados de volume final de 1mL e o branco foi de água. De cada amostra e padrão foram pipetados 200µL, para um novo tubo de microcentrífuga tipo eppendorf, e adicionados 500µL de ácido sulfúrico a 98%. Prosseguiu-se com a incubação das amostras a 90°C durante 15 minutos. Findo o tempo de incubação foram adicionados 100µL de fenol a 5% e, mantendo os tubos de microcentrífuga numa cuba com gel, as amostras foram arrefecidas durante 30 minutos. Por fim, foram transferidos 200µL de cada amostra para os poços da microplaca e a absorvância foi lida a 490nm com o auxílio do espectrofotómetro *Epoch*² (Biotek Instruments, Inc., Vermont, Estados Unidos da América). Os resultados foram obtidos em percentagem de peso seco através da seguinte equação:

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

Sendo que y corresponde à absorvância da amostra, b à ordenada na origem da curva de calibração, a ao declive da curva de calibração, m à massa de biomassa algal usada (mg) e V ao volume de hidrolisado usado na reação.

Quantificação de Matéria Gorda Total

A quantificação de matéria gorda total, a partir de biomassa seca das algas em estudo, foi realizada através do método de Folch (1957), aplicando uma solução de metanol (Chemlab, Zedelgem, Bélgica) e clorofórmio (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) na proporção 2:1 (v/v), denominada solução de Folch, para a extração de lípidos. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Inicialmente foi pesada 1g de amostra seca para um tubo de centrífuga previamente identificado. De seguida a amostra foi hidratada com 0,8mL de água destilada, adicionaram-se 5mL da solução de Folch e foram homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador portátil, durante 1 minuto. Findo este tempo, o pilão foi enxaguado com a solução de Folch para garantir que não se descartava/perdia amostra no equipamento usado. As amostras foram homogeneizadas no vortex durante 5 minutos, foram adicionados 1,2mL de NaCl a 0,8% e as amostras foram homogeneizadas novamente no vortex durante 1 minuto. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação a 4637g a 4°C, durante 10 minutos. Enquanto as amostras se encontravam na centrífuga foram feitas as colunas onde o centrifugado foi filtrado. Em pontas de micropipeta P5000 foi colocada uma porção de algodão, com cerca de 1cm de altura, e 2-3 colheres de sulfato de sódio anidro.

Após centrifugação, a fase inferior de clorofórmio foi extraída, cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta P1000, para a coluna, que se encontra sobre um frasco de vidro em forma de pera, previamente pesado. Após a filtração da fase de clorofórmio para o interior de peras de rotavapor, foram adicionados 2mL de clorofórmio à restante mistura no tubo de centrífuga e repetiu-se a centrifugação, seguida da filtração, de forma a aumentar o rendimento da extração. De seguida foi efetuada a evaporação em rotavapor (Heidolph, Schwabach, Alemanha) a 45°C até o solvente estar completamente evaporado. Findo a evaporação no rotavapor, as amostras foram envolvidas em alumínio e o solvente restante foi evaporado na estufa. Por fim, foram colocadas a arrefecer no exsiccador e foram realizadas várias pesagens até se atingir um peso constante. O conteúdo lipídico foi determinado gravimetricamente através da seguinte equação, segundo Folch (1957):

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

Sendo que m_1 é a massa da pera com gordura, m_0 é a massa da pera vazia e m_i é a massa inicial da alga.

Metilação direta dos Ácidos Gordos

A quantificação dos ácidos gordos foi realizada através do processo de metilação, aplicando uma solução de ácido sulfúrico a 2% (m/v) nas amostras em estudo, seguido de cromatografia gasosa (GC) no *Trace GC Ultra* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) adaptado de Lepage & Roy (1986).

Começou-se pela preparação da solução de ácido sulfúrico a 2% (m/v) em metanol. Foram usados 50mg de amostra seca em triplicado por cada espécie de alga e a sua respetiva recolha. Adicionaram-se 2mL de ácido sulfúrico a 2% (m/v) a cada um dos tubos e foram homogeneizados no vortex durante 30 segundos e, de seguida, foram colocados no banho-maria (Selecta, Cham, Suíça) a 80°C durante 2 horas. Findo este tempo, as amostras foram retiradas do banho-maria para arrefecer. Posteriormente, foi adicionado 1mL de água Milli-Q e 2mL de n-hexano e, de seguida, foram homogeneizados no vortex durante 1 minuto. Os tubos foram centrifugados a 129g, com o auxílio da centrífuga 5810 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) durante 1 minuto a 4°C. Deste modo, recolheram-se os sobrenadantes e foram colocados em *vials* de GC, protegidos da luz com papel de alumínio e cobertos com Parafilm®. As amostras foram conservadas a -20°C até serem analisadas.

Os perfis dos ácidos gordos das amostras foram obtidos por cromatografia gasosa com o auxílio do cromatógrafo equipado com uma coluna capilar Thermo TR-FRAME (60mm x 0,25mm ID, 0,25µm), um *autosampler* AS 300 e um detetor de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e do detetor, que trabalhavam em modo *Splitless*, encontravam-se nos 280°C e 250°C, respetivamente. O gradiente de temperatura do forno

foi de 100°C (1 min) com um incremento de 10°C/min até aos 150°C, um segundo incremento de 4°C/min até aos 200°C e um terceiro a 2°C/min até atingir uma temperatura de 235°C. O gás de transporte usado foi o hélio com um fluxo de 1,2mL/min e o FID foi suplementado com ar sintético e hidrogénio num fluxo de 350 e 35mL/min, respetivamente. Os resultados de ácidos gordos foram expressos em percentagem de área total de ácidos gordos detetados.

Determinação dos índices de qualidade nutricional

A partir dos dados obtidos da metilação dos ácidos gordos os seguintes índices foram calculados.

O índice aterogénico (AI) avalia o risco de aterosclerose a partir do ratio de ácidos gordos pro-aterogénicos e os ácidos gordos insaturados de acordo com a seguinte equação (Ulbricht, 1991):

$$AI = \frac{\sum(C12:0 + C14:0 + C16:0)}{\sum(n6 + n3) + \sum MUFA}$$

O índice de trombogénese (TI) é o índice mais usado para avaliar a influência de um produto na saúde cardiovascular e é calculado a partir da relação entre os ácidos gordos pro-trombogénicos (SFAs) e anti-trombogénicos (PUFAs), de acordo com a seguinte equação (Ulbricht, 1991):

$$TI = \frac{\sum(C14:0 + C16:0 + C18:0)}{0.5 \times MUFA + 0.5 \times n6 + 3 \times n3 + \frac{n3}{n6}}$$

O rácio n-6/n-3 avalia o ratio de precursores eicosanoides anti-inflamatórios (n-3) e pro-inflamatórios (n-6) (Soares, et al. 2021).

O rácio hipo- e hipercolesterolemico (h/H) foi desenvolvido como uma forma precisa de medir o efeito dos ácidos gordos no colesterol e foi calculado de acordo com a seguinte equação (Soares, et al. 2021):

$$\frac{h}{H} = \frac{C14:0 + C16:0}{MUFA + PUFA}$$

Determinação de Metais Pesados e Iodo

A determinação destes componentes foi efetuada pelo laboratório Tomaz, SA (Leiria, Portugal) através de espectrometria de massa por plasma induzido. Os resultados foram expressos em mg/kg de peso seco.

Extração de agar

A extração de agar foi efetuada através de um processo de congelação e descongelação das amostras adaptado de Martínez-Sanz, et al. (2019).

Para este ensaio foram pesados 2g de amostra, a qual foi hidratada num gobelet de 600mL, previamente identificado, com aproximadamente 1,5mL de água destilada tipo III. Posteriormente, por cada grama de amostra pesada, foram adicionados 150mL de água destilada tipo III e o gobelet foi colocado em banho-maria (Selecta, Cham, Suíça) a 80°C durante 4h. Findo este tempo, a água e a biomassa foram filtradas com o auxílio de um pano para frascos de 100mL e o filtrado foi congelado durante 8h. De seguida, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e o excesso de água foi descartado. A cada frasco foram adicionados 10mL de etanol a 96% e as amostras foram deixadas a repousar durante 24h. Por fim, os agregados contendo agar foram, cuidadosamente, retirados para placas de Petri, previamente pesadas e identificadas, e foram secos numa estufa (Binder, Tuttlingen, Alemanha) a 60°C. A quantidade de agar foi expressa em percentagem de peso seco.

Para amostras com menor biomassa disponível, o método foi adaptado para 1g de amostra inicial.

Avaliação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das algas corresponde à capacidade que alguns compostos bioativos apresentam de captura de radicais livres de oxigênio. Assim, esta bioatividade foi obtida através de ensaios complementares, que permitiram detetar a redução de diversos radicais livres pelos extratos das mesmas. Apesar de ser comum usarem-se solventes orgânicos como o diclorometano ou n-hexano foram efetuadas apenas extrações não poluentes e as mais naturais possíveis, tendo, portanto, sido realizadas com água destilada e etanol absoluto.

Quantificação Total de Polifenóis (QTP)

A quantificação Total de Polifenóis (QTP) foi feita através do método de *Folin-Ciocalteu* (Singleton & Rossi, 1965), usando, como padrão, o ácido gálico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Para a realização deste ensaio foi preparada uma solução de carbonato de sódio a 20% (m/v). Foram colocados 158 μ L de água Milli-Q, 2 μ L de amostra (5 mg/mL), ou ácido gálico para realizar a curva padrão, e 10 μ L de reagente Folin-Ciocalteu (AppliChem, Darmstadt, Alemanha) numa microplaca de 96 poços (Corning, Nova York, Estados Unidos da América). De seguida foram adicionados 30 μ L de carbonato de sódio a 20%. A microplaca foi incubada no escuro a temperatura ambiente durante 1h. Findo o tempo de reação foi lida a absorvância a 755nm no espectrofotómetro (Winooski, Vermont, Estados Unidos da América)

A curva padrão foi estabelecida com concentrações de ácido gálico a 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1 mg/mL. Com os valores da curva padrão os valores foram calculados como mgGAE (ácido gálico) por g de extrato usado.

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

A avaliação da redução do radical DPPH foi adaptado da metodologia de Brand-Williams, e colaboradores (1995). Para a realização deste ensaio foi necessário preparar previamente uma solução tampão fosfato com pH 5,5. O ensaio foi realizado em triplicados, em tubos de ensaio com rosca e a absorvância medida com o auxílio do espectrofotômetro Evolution 201 UV Visible em cuvetes de 3mL.

Inicialmente os extratos a analisar foram dissolvidos em tampão fosfato, preparado previamente, com a concentração de 0,6 mg/mL com o auxílio do equipamento de ultrassons (USC-TH, Göttingen, Alemanha). Após dissolução foram colocados, para as amostras, 1000µL de amostra, 500µL de tampão fosfato e 500µL de acetonitrilo. Para os controlos foram colocados 1500µL de tampão fosfato e 1500µL de acetonitrilo. Foi então preparada a solução de DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) a 0,1mg/mL com acetonitrilo e tendo a solução pronta foram, rapidamente, pipetados 1000µL da solução DPPH para cada tubo, os quais foram tapados e homogeneizados durante 2 segundos. Finalmente foram colocados durante 30 minutos no escuro e findo o tempo de reação a absorvância foi medida entre 400 e 700nm. Os resultados foram obtidos em percentagem de inibição através da seguinte equação:

$$\text{Percentagem de inibição (\%)} = \frac{Abs_{517\text{Controlo}} - Abs_{517\text{Amostra}}}{Abs_{517\text{Controlo}}} \times 100$$

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

A avaliação da redução do radical ABTS foi adaptada do método de Nenadis e colaboradores (2004). Para a realização deste ensaio foi necessário preparar previamente a solução de radical ABTS. Esta solução consiste em 0,188mg/mL de ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (C₁₈H₁₆N₄O₆S₄-(NH₄)₂) (Alfa Aesar, Massachusetts, Estados Unidos da América) e 0,0512mg/mL de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (Alfa Aesar, Massachusetts, Estados Unidos da América) dissolvidos em água destilada. Após dissolução dos dois compostos a solução foi colocada 12-16h no escuro. O ensaio

foi realizado em triplicado, em tubos de ensaio e a absorvância foi medida com o auxílio do espectrofotômetro *Evolution 201 UV-Visible* e cuvetes de quartzo de 3mL.

Inicialmente os extratos a analisar foram dissolvidos em água destilada, com a concentração de 0.6 mg/mL com o auxílio do equipamento de ultrassons. Após dissolução foram colocados 2000µL de reagente ABTS, 2000µL de amostra e 2000µL de água destilada. Para os controlos foram colocados 2000µL de reagente ABTS e 4000µL de água destilada. Cada réplicas foram preparadas individualmente pois a reação deu-se em 1 minuto e a absorvância foi medida de 500nm a 850nm. Os resultados foram obtidos em percentagem de inibição através da seguinte equação:

$$\text{Percentagem de inibição (\%)} = \frac{Abs_{734\text{Controlo}} - Abs_{734\text{Amostra}}}{Abs_{734\text{Controlo}}} \times 100$$

Poder de redução do Fe (III) (FRAP)

A avaliação da redução do radical Fe^{3+} foi executada através do ensaio FRAP adaptado de Berker e colaboradores (2007). O ensaio foi realizado em triplicado, em tubos de ensaio e a absorvância foi medida com o auxílio do espectrofotômetro *Evolution 201 UV-Visible* em cuvetes de quartzo de 3mL.

Inicialmente os extratos a analisar foram dissolvidos em água destilada com a concentração de 0,8 mg/mL com o auxílio do equipamento de ultrassons. Após dissolução foram colocados 1000µL de amostra, 1500µL de água destilada e 500µL de reagente Phen, 1,10-fenantrolina monoidratada ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América). Para o controlo foram colocados 2500µL de água destilada e 500µL de reagente Phen. As amostras foram então colocadas no escuro e após 30 minutos de reação foram adicionados 6mL de água destilada e mediu-se a absorvância entre 400 e 700nm.

A curva padrão foi estabelecida com concentrações de ácido ascórbico a 0,00260, 0,00195, 0,0130, 0,00065 e 0 mg/mL de uma solução mãe a 0.292 mg/mL. Os resultados

foram extrapolados em equivalentes de ácido ascórbico/mg extrato usado (Ehasc/mg) com base na absorvância a 510nm. Com os valores da curva padrão os valores foram calculados como mg AEE (ácido ascórbico) por g de extrato usado.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A capacidade antimicrobiana dos extratos das algas em estudo, foi avaliada procurando identificar atividades contra fungos e bactérias. Para tal utilizou-se a metodologia de difusão em disco e a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) Foram utilizadas as estirpes *Candida albicans* (DSM No.: 1386), *Saccharomyces cerevisiae* (DSM No.: 1333), *Staphylococcus epidermidis* (DSM No.: 1798), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM No.: 288) e *Bacillus subtilis* (DSM No.: 10).

Inicialmente, as estirpes *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus epidermidis* foram submetidas ao processo de revitalização, descrito pelo fabricante. Estas estirpes foram todas obtidas através da empresa *Leibniz Institute DSMZ* (Braunschweig, Alemanha) e as restantes já se encontravam em stock no laboratório.

Revitalização de estirpes bacterianas

Todo o processo de revitalização foi efetuado como indicado pelo fornecedor. A revitalização foi feita pela adição de 500µL do meio adequado para cada estirpe (indicado pela DSMZ), com 30 minutos de reidratação. Segundo as instruções do fabricante, *S. cerevisiae* e *C. albicans* foram hidratadas em *Universal 25édium for Yeasts* (meio 186, DSMZ), *S. epidermidis* em *Trypticase Soy Yeast extract 25édium* (meio 92, DSMZ) e *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *B. cereus* em *Nutrient Broth* (meio 1, DSMZ).

Findo o tempo de hidratação, as culturas foram incubadas à temperatura de crescimento ótima, durante 24h, com agitação a 140rpm. Os stocks foram feitos adicionando 850µL de cultura a criotubos, com 150µL de glicerol 98% estéril. Os criotubos foram armazenados a -80°C até posterior utilização.

Método de Difusão em Disco

As capacidades antimicrobianas dos extratos das macroalgas foram avaliadas através de antibiogramas segundo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Todo o material usado foi esterilizado previamente e todo o processo foi efetuado na câmara de fluxo laminar para garantir um ambiente asséptico. Para a realização deste ensaio foi preparado meio Mueller-Hinton Agar (Himedia, Mumbai, India).

Foram analisadas as capacidades antimicrobianas de dois extratos de cada recolha. As análises foram feitas em triplicado, tendo sido utilizado como controlo negativo água Milli-Q estéril e como controlos positivos, o Cloranfenicol (Clo,) e Fluconazol (Flu) a uma concentração de 30 mg/mL e 25 mg/mL, respetivamente. O pré-inóculo foi diluído até apresentar aproximadamente 10^8 CFU/mL em solução, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland, medido com o auxílio de um densitómetro, e espalhado com o auxílio de uma zaragatoa estéril na placa de Petri com o meio apropriado. Caso o inóculo apresentasse uma concentração maior ou menor que 0,5 adicionava-se mais soro ou mais inóculo respetivamente. Foram colocados 20µL dos extrato e controlos nos discos de antibiótico de 6mm respetivos (Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América) e após secagem a temperatura ambiente os discos foram dispostos na placa de Petri, com o auxílio de pinças estéreis, e as placas foram incubadas na estufa (Binder, Tuttlingen, Alemanha), à temperatura apropriada para cada uma das estirpes em estudo, durante 24h.

Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A avaliação da MIC, dos extratos em estudo, foi adaptada do método descrito por Lambert e Pearson (2000).

As culturas *over-night* foram diluídas em solução salina 0,85% para preparar um inóculo de aproximadamente 10^8 CFU/mL, correspondendo a 0.5 da escala McFarland. Os extratos foram diluídos a diversas concentrações (100, 75, 50, 25, 10, 5 e 1 mg/mL) com etanol absoluto. Em cada poço, da microplaca de 96 poços, foram pipetados 20 μ L das diluições respectivas dos extratos a analisar e 10 μ L do pré-inóculo diluído a 0,5 na escala McFarland e 170 μ L de Mueller-Hinton Broth (Himedia, Mumbai, Índia). As microplacas foram inoculadas à temperatura ótima de cada estirpe por 18h e findo o tempo de incubação tendo em conta o crescimento de cada poço, que foi analisado através da comparação da absorvância, com o auxílio do leitor de microplacas *Epoch*, dos poços das amostras com os poços dos controlos positivos, a concentração mais baixa que inibia o crescimento foi considerada a MIC.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por testes *ANOVA* de um fator. Após confirmação da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene, as diferenças estatisticamente significativas foram determinadas através do teste paramétrico de comparações múltiplas de Tukey. Quando os requisitos não eram cumpridos, realizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Games-Howell. Diferenças de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Toda a análise estatística foi feita com o auxílio do software IBM SPSS Statistics v.27.

Resultados e discussão

Rendimentos de extração

A preparação de amostras é vista como uma necessidade tendo em conta a impossibilidade de fazer análises diretamente nas mesmas devido a incompatibilidades com os instrumentos de análise, por exemplo. O processo de extração possibilita a passagem de moléculas alvo de uma fase sólida para uma fase líquida, sendo esta fase compatível com diversas análises posteriores (De Castro & Priego-Capote, 2010).

Como foi mencionado previamente os solventes água destilada e etanol absoluto foram usados por serem solventes verdes de baixo custo com a capacidade de extrair uma grande variedade de moléculas bioativas. No caso da água é possível obter extratos ricos em açúcares, proteínas, pigmentos e minerais entre outros compostos solúveis em água e em extratos etanólicos é possível obter compostos menos polares como lípidos polares, ácidos gordos, alguns compostos fenólicos e carotenoides, entre outros (Cikoš, et al. 2018; Trivedi, et al. 2016, Wahlström, et al. 2018).

Para *G. corneum* e *A. armata* o maior rendimento obtido das extrações aquosas foi de 26,70% e 17,90%, respetivamente, e o maior rendimento obtido das extrações etanólicas obtidas foram de 0,93% e 2,20%, respetivamente. Os valores obtidos nos extratos etanólicos foram, em ambas as algas, baixos quando comparados com os valores obtidos para *Crassiphycus changii* de 13,06% (Chan, et al. 2015) e *Agarophyton vermiculophyllum* de 6,5%, *Asparagopsis taxiformis* de 18,10% (Mellouk, et al. 2017) entre outras (Farvin & Jacobsen, 2013). Estes valores indicam que o procedimento executado para a extração etanólica deve ser otimizada.

O rendimento obtido da extração aquosa de *G. corneum* foi semelhante ao obtido por Rhimou e colaboradores (2010) para *Gelidium spinulosum* de 26,40% e superior ao maior rendimento obtido de *G. gracilis* a 70°C ($18,49 \pm 1,25\%$) (Afonso, et al. 2021). Das 6 espécies de *Gelidium* analisadas três foram submetidas a extração aquosa. Destas espécies, *G. spinulosum* apresentou o maior rendimento de extração quando usada água como solvente de 26.40% (Rhimou, et al. 2010). O rendimento obtido da extração aquosa de *A.*

armata foi próximo ao obtido por Mellouk e colaboradores (2017) para *A. taxiformis* de 24,00%, podendo esta extração ser otimizada tendo em conta diversos fatores como eficiência de ruptura membranar, o solvente a usar, o pH, a temperatura e o tempo de extração, entre outros.

Composição bioquímica

A biomassa de *G. corneum* e de *A. armata* foram analisadas tendo em conta a estação do ano em que foram recolhidas, tendo sido averiguados os conteúdos de cinza, proteína, lípidos, hidratos de carbono, agar e a percentagem de humidade. Estes valores encontram-se representados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Composição bioquímica de *Gelidium corneum*. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), Verão (b), Outono (c) e Inverno (d).

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Humidade (%)	52,53 \pm 1,99 ^{bc}	62,69 \pm 1,21 ^a	63,19 \pm 0,43 ^a	45,61 \pm 8,22
Cinza (%)	12,68 \pm 0,73	11,30 \pm 0,84 ^d	14,12 \pm 0,85	13,21 \pm 0,45 ^b
Proteína (%)	10,44 \pm 0,19 ^{bcd}	14,61 \pm 0,71 ^{acd}	16,25 \pm 0,33 ^{ab}	15,47 \pm 0,21 ^{ab}
Lípidos (%)	2,75 \pm 0,28 ^{bd}	2,16 \pm 0,10 ^{ad}	2,57 \pm 0,04 ^d	0,93 \pm 0,04 ^{abc}
Agar (%)	5,99 \pm 0,88	6,33 \pm 2,43	6,01 \pm 1,90	8,70 \pm 0,97
Hidratos de carbono (%)	39,50 \pm 3,29 ^c	29,78 \pm 1,60 ^d	24,84 \pm 5,06 ^{ad}	39,08 \pm 2,71 ^{bc}

Tabela 4 - Composição bioquímica de *Asparagopsis armata*. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a) e Verão (b).

	Primavera	Verão
Humidade (%)	75,72 \pm 0,58 ^b	85,51 \pm 0,60 ^a
Cinza (%)	30,99 \pm 0,65	38,70 \pm 0,60
Proteína (%)	11,44 \pm 0,12 ^b	15,68 \pm 0,21 ^a
Lípidos (%)	5,33 \pm 0,24 ^b	7,83 \pm 0,21 ^a
Hidratos de carbono (%)	7,13 \pm 1,96 ^b	10,77 \pm 2,65 ^a

Foi obtido um valor médio para a percentagem de humidade de 56,01 \pm 2,96% e 80,62 \pm 6,92% para *G. corneum* e *A. armata*, respetivamente. Estes valores de *G. corneum* foram mais elevados no Outono, havendo diferenças estatisticamente significativas nas estações do Verão e Outono. *A. armata* apresentou um valor mais elevado no Verão, havendo diferenças estatisticamente significativas da biomassa da Primavera.

A percentagem de humidade é um fator a considerar tendo em conta a qualidade e tempo de prateleira de um novo produto à base de algas (Rasyid, et al. 2019). *G. corneum* apresentou um máximo de $63,19 \pm 0,43\%$ em comparação com os valores de outras algas comestíveis e que são usadas na indústria alimentar como os de *Gelidiella acerosa* (8,71%) (Rasyid & Handayani, 2019) e *Palmaria palmata* (4%) (Wang, et al. 2010), é substancialmente mais elevado, mas em comparação com *Mastocarpus stellatus* (74,1%) (Barral-Martínez, et al. 2020), *G. corneum* exibe valores mais baixos. Os valores de *A. armata* estão próximos do esperado para macroalgas marinhas (90%).

Em *G. corneum* embora os valores da cinza fossem baixos em comparação com outra espécie de *Gelidium* como *Gelidium pusillum* (21,2%), os mesmos permanecem dentro dos valores expectáveis para algas vermelhas (5,8 – 46,2%) (Gamero-Veja, et al. 2020). Os valores da percentagem de cinza foram máximos no Outono com $14,12 \pm 0,85\%$ de peso seco, indicando uma pobreza em minerais quando comparado com *Agarophyton vermiculophyllum* e *Gelidium pusillum* (Afonso, et al. 2021; Gamero-Veja, et al. 2020). *A. armata* produziu valores de cinza mais elevados, havendo um máximo no Verão de $38,70 \pm 0,60\%$, sendo este valor semelhante ao obtido por *Asparagopsis taxiformis* ($44,4 \pm 0,1\%$) (Regal, et al. 2020). Isto indica uma elevada presença de minerais em *A. armata*, relativamente a *G. corneum*.

O maior rendimento da extração de agar foi obtido a partir da biomassa do Inverno, não havendo diferenças estatisticamente significativas de rendimento de extração de agar ao longo do ano. A comparação dos valores de rendimento de extração de agar com os valores existentes na literatura é muito complexa, devido à grande variedade de parâmetros de extração, como o tempo de extração, temperatura de extração e razão de alga-água usada. Dentro dos parâmetros referidos na literatura, foram reportados o tempo do banho-maria e a razão água-alga como sendo os fatores determinantes para o rendimento de extração. Foi possível obter rendimentos máximos com tempos de banho-maria entre 2 a 4 horas e razões de alga-água de 1:150 (Arvizu-Higuera et al. 2007; Kumar & Fotedar, 2009). Dentro da família Gelideaceae o maior rendimento de ficocolóides descrito corresponde à extração nas algas *Gelidium serrulatum* (33%) e *Gelidium floridanum* (31,7%) com tempos de extração de 3 horas (Lemus et al. 1991). Diferentes espécies de algas também podem apresentar rendimentos variáveis dependentes do tempo de banho-maria. Por exemplo, as espécies *Gracilaria corticata* e *Gracilaria cliftonii* com extrações

de 2 horas apresentaram um rendimento de 27% e 55%, respetivamente (Kumar & Fotedar, 2009; Yousefi et al. 2013). Martínez-Sanz et al. (2019) descrevem extrações de ficocolóides usando o auxílio de um sonicador e um tratamento prévio de hidróxido de sódio. O sonicador promove a extração de polissacarídeos não sulfatados. Sendo que a agarose se encontra nos polissacarídeos sulfatados não existe benefício no uso de um sonicador (Chew et al. 2018). O tratamento prévio de hidróxido de sódio, por outro lado, é interessante pelo facto de converter as ligações L-galactose-6-sulfato, que concedem uma pior qualidade ao agar, em ligações 3,6-anidro-L-galactose, que melhoram a capacidade de formação de géis (Freile-Pelegriñ & Robledo, 1997). Resumidamente, será interessante a otimização do processo de extração de ficocolóides em laboratório através do pré-tratamento com hidróxido de sódio.

As macroalgas são extensivamente estudadas devido ao seu conteúdo em lípidos, havendo um foco em algas castanhas e vermelhas (Chang, et al. 2008; Khotimchenko & Vasíkovsky, 2004). Os métodos baseados em sistemas de clorofórmio/metanol são usados como padrão, estando o método de Folch incluído nos mesmos (Kumari, et al. 2011). Foram obtidos níveis baixos de lípidos que estavam, no entanto, dentro do espectável para algas vermelhas (1-4%) (Kendel, et al. 2013) com um mínimo de $0,93 \pm 0,04\%$ no Inverno e um máximo de $2,75 \pm 0,28\%$ na Primavera, havendo diferenças estatisticamente significativas na biomassa recolhida no Inverno e no Verão, relativamente à biomassa de *G. corneum*. *A. armata* apresentou valores de lípidos de $5,33 \pm 0,24\%$ e $7,83 \pm 0,21\%$, na Primavera e Verão, respetivamente, havendo diferenças estatisticamente significativas entre as estações analisadas.

Os lípidos polares são predominantes e estão relacionados com a estrutura membranar apresentando uma grande variedade de funções biológicas. São, maioritariamente, glicerofosfolípidos (Liang & Wen, 2014) e, em certas espécies, podem corresponder a 90% dos lípidos polares totais (Nelson, et al. 2002). Os valores obtidos para *G. corneum* são similares aos valores descritos por outros autores relativamente a macroalgas vermelhas, que como vimos rondam os 1% a 4%, tendo apresentado valores mais elevados que *Palmaria* sp. ($1,8 \pm 0,14\%$), *Undaria pinnatifida* ($1,05 \pm 0,01\%$) e *Hypnea elongata* ($0,97 \pm 0,07\%$) (Sánchez-Machado, et al. 2004), que são algas comestíveis. *A. armata* ultrapassou os valores esperados no Verão ($7,83 \pm 0,21$) (Kendel, et al. 2013; Nelson, et al. 2002).

Existem, no entanto, diferenças nos picos de produção de matéria gorda entre as algas. Em Denis e colaboradores (2010) e Kendel e colaboradores (2013) *Gracilaria turururu* demonstrou um pico na produção de matéria gorda no Verão, tal como *A. armata*, sendo que não foi analisada biomassa das estações de Outono e Inverno. Em Nelson, et al. (2002) e Kumar, et al. (2015) foi possível verificar o pico de produção lipídica de *Chondracanthus canaliculatus* e *Kappaphycus alvarezii* no Inverno e *G. corneum* apresentou o pico na Primavera. Esta produção de lípidos reduzida no Inverno em *G. corneum* pode estar relacionada com o uso das reservas lipídicas para o crescimento da alga. Este crescimento nos finais de Inverno, começo de Primavera foi observado por Ngan & Price (1980).

Dentro dos vários constituintes das macroalgas, os hidratos de carbono são os mais abundantes e devido às suas propriedades físico-químicas são usados para a produção de biocombustíveis e procurados pela indústria da cosmética, entre outras (Cesário, et al. 2018, Kim, et al. 2018). Foi possível observar na biomassa de *G. corneum* uma produção máxima de hidratos de carbono na Primavera ($39,50 \pm 3,29\%$) e uma produção mínima no Outono ($24,84 \pm 5,06\%$), havendo diferenças estatisticamente significativas na biomassa do Outono e Inverno. Em *A. armata* foi possível observar uma produção de hidratos de carbono superior no Verão ($10,77 \pm 2,65\%$), havendo diferenças estatisticamente significativas entre as duas estações analisadas.

G. corneum, apresentou valores de hidratos de carbono superiores a diversas algas vermelhas, como *Palmaria palmata* ($\% < 25\%$) (Rødde, et al. 2004) e *Crassiphycus corneus* ($\% < 36\%$) (Robledo & Freile-Peregrin, 1997) e a alga verde *Ulva rigida* ($\% < 18$) (Foster & Hodgson, 1998), mas inferiores às algas castanhas *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* e *Alaria esculenta* que apresentam valores entre os 65% e 72% (Schiener, et al. 2015). Os picos de produção de hidratos de carbono em algas castanhas, que são um grupo de foco para a produção de biocombustíveis, são comuns no Outono, podendo assim haver acumulação de nutrientes que serão usados no Inverno para síntese de proteínas, reprodução e crescimento (Kraan, 2013). Estes picos variam com cada espécie devido aos diferentes ciclos de vida e as oscilações de fatores abióticos (Santelices, 1991) e, segundo os valores obtidos, pode-se afirmar que *G. corneum* tende a acumular hidratos de carbono no Inverno com intuito de reprodução e crescimento nas estações seguintes, como é característico de diversas espécies de *Gelidium*

observadas por Santelices (1991). Os valores de *A. armata* foram similares aos valores reportados por McDermid & Stuercke (2003) para *A. taxiformis* (9,2%) sendo valores bastante baixos no contexto das macroalgas.

No que se refere à proteína, foi possível observar, em *G. corneum*, diferenças estatisticamente significativas ao longo das estações com uma produção máxima da mesma na biomassa do Outono ($16,25 \pm 0,33\%$) e mínima na biomassa da Primavera ($10,44 \pm 0,19\%$). Em *A. armata* foi possível observar um valor superior de proteína no Verão ($15,68 \pm 0,21\%$) havendo diferenças estatisticamente significativas entre as duas estações analisadas.

Estes valores de *G. corneum* são superiores à proteína obtida na alga vermelha *Gelidium microdon* ($\% < 15\%$) que é tradicionalmente usada na indústria do agar (Paiva, et al. 2017) e ambas as algas analisadas apresentam valores superiores às algas castanhas *Cytoseira abies-marina* ($\% < 6,8\%$) e *Fucus spiralis* ($\% < 11\%$) que são usadas para produção de florotaninos (Cérantola, et al. 2006; Sánchez-Camargo, et al. 2016). São, no entanto, inferiores às algas vermelhas *Osmundea pinnatifida* ($\% \approx 20$), *Porphyra* sp. ($\% \approx 25$) e *Pterocladia capillacea* ($\% \approx 20$) que são usadas maioritariamente pela indústria alimentar (Patarra, et al. 2011, Patarra, et al. 2019, Silva & Pereira, 2020).

Esta variação de proteína com um máximo no Outono/Inverno e um mínimo na Primavera, em *G. corneum*, é similar aos valores reportados na alga vermelha *Palmaria palmata* (Martínez & Rico, 2002). Os dados obtidos são concordantes com Martínez & Rico (2002) que afirmam que a acumulação de proteína está associada com o desenvolvimento e maturação de estruturas reprodutivas. Além disso, as diferenças do conteúdo de proteína no verão podem ser explicadas devido à destruição de ficobiliproteínas no Verão e à menor disponibilidade de nutrientes (Galland-Irmouli, et al. 1999)

Ácidos gordos

Como mencionado previamente, as algas não apresentam uma concentração elevada de lípidos, estando a mesma abaixo dos 5%, com exceções como a alga *Bellotia eriophorum* (Schmidt, et al. 2018) e, como verificado, a biomassa de verão de *A. armata* que exhibe uma concentração de $7,83 \pm 0,21\%$. De entre estes, o ácido palmítico, oleico e

os ômega-3, são os habitualmente mais abundantes, podendo variar entre os 34% e 74% do conteúdo total de ácidos gordos (Pasquale, 2009). Dado que têm vindo a ser reconhecidos pelos seus efeitos benéficos na saúde humana (Jung, et al. 2008; Palomer, et al. 2018) é relevante saber as oscilações na produção destes ácidos gordos nas algas em estudo.

Os ácidos gordos foram determinados através da comparação com o padrão *Su-pelco 37 Component FAME Mix* (Sigma-Aldrich, Montana, Estados Unidos da América)

Para *G. corneum*, os ácidos gordos mais abundantes foram o mirístico, palmítico e oleico, araquidónico e eicosapentanoico (14:0, 16:0, 18:1 n9 cis, 20:4 e 20:5 respetivamente). O ácido mirístico apresentou uma produção máxima de $8,49 \pm 0,16\%$ no Inverno, o palmítico de $63,33 \pm 0,99\%$ no Inverno, o oleico de $7,56 \pm 0,24\%$ no Outono, o araquidónico de $18,87 \pm 0,81\%$ no Verão e o eicosapentanoico de $22,68 \pm 0,51\%$ no Verão. Houve um máximo de produção de Ómega-3 e Ómega-6 no Verão, apresentado valores de $22,68 \pm 0,51\%$ e $19,88 \pm 0,61$ respetivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Quantificação de ácidos gordos maioritários em *Gelidium corneum* (expresso em percentagem tendo em conta os ácidos gordos detetados); Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), Verão (b), Outono (c) e Inverno (d).

		Primavera	Verão	Outono	Inverno
Ácido tridecíclico	C13:0	$0,55 \pm 0,18$	$0,60 \pm 0,16$	$0,87 \pm 0,28$	$0,67 \pm 0,09$
Ácido mirístico	C14:0	$5,86 \pm 0,24^{bd}$	$4,13 \pm 0,13^{acd}$	$6,33 \pm 0,14^b$	$8,49 \pm 0,17^{abc}$
Ácido palmítico	C16:0	$45,97 \pm 0,53^{bcd}$	$42,79 \pm 0,33^{acd}$	$56,07 \pm 0,93^{abd}$	$63,33 \pm 0,99^{abc}$
Ácido esteárico	C18:0	$2,26 \pm 1,26$	$1,47 \pm 1,00$	$1,46 \pm 0,03$	$2,03 \pm 0,18$
Σ SFA %		$55,05 \pm 1,14^{bcd}$	$49,36 \pm 0,70^{acd}$	$64,46 \pm 0,90^{abd}$	$75,12 \pm 0,67^{abc}$
Ácido miristoleico	C14:1	$0,37 \pm 0,13$	$0,44 \pm 0,07$	$0,85 \pm 0,00$	$0,52 \pm 0,03$
Ácido palmitoléico	C16:1 n-7	$1,46 \pm 0,01^b$	$0,90 \pm 0,08^{acd}$	$1,08 \pm 0,23^b$	$1,42 \pm 0,12^b$
Ácido oleico	C18:1 n-9 cis	$7,23 \pm 0,55^b$	$5,47 \pm 0,06^{acd}$	$7,56 \pm 0,28^b$	$7,48 \pm 0,14^b$
Σ MUFA %		$11,03 \pm 0,27^b$	$8,08 \pm 0,34^{acd}$	$11,06 \pm 1,17^b$	$11,05 \pm 0,67^b$
Ácido linoleico	C18:2 n-6	$0,94 \pm 0,38$	$0,75 \pm 0,23$	$0,71 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,04$
Ácido araquidónico	C20:4 n-6	$14,68 \pm 1,48^{bcd}$	$18,87 \pm 0,81^{acd}$	$10,98 \pm 0,78^{abd}$	$5,95 \pm 0,18^{abc}$
Ácido eicosapentanoico	C20:5 n-3	$17,64 \pm 0,14^{bcd}$	$22,68 \pm 0,51^{acd}$	$9,49 \pm 0,28^{abd}$	$6,87 \pm 0,29^{abc}$
Σ PUFA %		$33,92 \pm 1,18^{bcd}$	$42,56 \pm 1,04^{acd}$	$21,18 \pm 1,07^{abd}$	$13,83 \pm 0,36^{abc}$
Índices Nutricionais					
Σ n-3		$17,91 \pm 0,13^{bcd}$	$22,68 \pm 0,51^{acd}$	$9,49 \pm 0,28^{abd}$	$7,08 \pm 0,23^{abc}$
Σ n-6		$16,01 \pm 1,07^{bcd}$	$19,88 \pm 0,61^{acd}$	$11,9 \pm 0,79^{abd}$	$6,74 \pm 0,16^{abc}$
Índice AI		$1,15 \pm 0,02^{bcd}$	$0,93 \pm 0,01^{acd}$	$1,94 \pm 0,10^{abd}$	$2,89 \pm 0,09^{abc}$
Índice TI		$0,82 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,01$	$1,64 \pm 0,10$	$2,54 \pm 0,05$
Razão n-6/n-3		$0,89 \pm 0,05^c$	$0,88 \pm 0,02^c$	$1,23 \pm 0,05^{abd}$	$0,95 \pm 0,02^c$
Razão h/H		$0,87 \pm 0,01^{bcd}$	$1,08 \pm 0,01^{acd}$	$0,52 \pm 0,02^{abd}$	$0,35 \pm 0,01^{abc}$

Os índices de TI e AI são usados regularmente para avaliar os efeitos de biomassa algal em doenças coronárias. Relativamente ao índice AI, as algas apresentam valores entre 0,03 e 3,58 (Chen & Liu, 2020) e as algas vermelhas apresentam os maiores valores podendo estes ir desde 0,38 a 2,87 (Kumar, et al. 2011). Estes valores são consistentes aos resultados obtidos para a biomassa de *G. corneum*. Foi reportado um valor de 1,61 para *Gelidium sp.* (Kumar, et al. 2011), sendo este similar ao valor obtido para a biomassa do Outono (1,94), mas os resultados das estações das restantes estações variam consideravelmente (1,15, 0,93 e 2,89 para a Primavera, Verão e Inverno, respetivamente).

O mesmo padrão foi detetado para o índice TI. Kumar e colaboradores apresentam valores de 1,83 para *G. corneum*, que é similar ao valor obtido no Outono (1,57), e, tal como o índice de AI, no Verão é inferior (0,58) e no Inverno superior (2,36). Quanto à razão n-6/n-3, que avalia os níveis de precursores pro-inflamatórios/anti-inflamatórios, foram obtidos valores similares aos valores reportados por Kumar e colaboradores (1,02) (Kumar, et al. 2015). Kumar e colaboradores apresentam valores de 1,83 para *G. corneum*, que é similar ao valor obtido no Outono (1,57), e tal como o índice de AI este no verão é muito inferior (0,58) e um valor muito superior no inverno (2,36). Quanto à razão n-6/n-3, que avalia os níveis de precursores pro-inflamatórios/anti-inflamatórios, foram obtidos valores similares aos valores reportados por Kumar e colaboradores (1,02) (Kumar, et al. 2015).

A Organização Mundial de Saúde recomenda uma dieta com uma razão n-6/n-3 inferior a 10 para prevenir patologias inflamatórias, cardiovasculares e neuronais. *G. corneum* apresenta valores inferiores a este estipulado com variação sazonal evidente no outono e no inverno (0,88 a 1,23), estando esta razão sempre próxima de 1 (Van Ginneken, et al. 2011) O índice h/H mede os efeitos da composição de ácidos gordos no colesterol. A biomassa correspondente ao Verão apresenta o valor mais elevado (1,08). A sazonalidade é, novamente, um fator importante a ter em conta pois este índice apresenta valores entre 0,35, no Inverno, a 1,08, no Verão. Estes valores são similares aos da alga *Porphyra sp.* (1,1-1,3), *Agarophyton vermiculophyllum* (0,63 – 2,02), *Gracilaria gracilis* (2,1 – 2,6), e *Chondrus crispus* (8,4 – 9,2) (Soares, et al. 2021; Afonso, et al. 2021). Logo, as condições ambientais apresentam um impacto evidente na produção de diferentes ácidos gordos, sendo os PUFAs produzidos maioritariamente no Verão e os SFAs no Inverno. Esta variação sazonal já foi reportada anteriormente (Soares, et al. 2021; Afonso, et al.

2021; Francavilla, et al. 2013), mas com um aumento de PUFAs no verão. As temperaturas amenas registadas no centro de Portugal podem ter um menor impacto na produção de PUFAs, juntamente com outras condições ambientais como disponibilidade de nutrientes, salinidade, o estado fisiológico do talo ou até o estágio do ciclo de vida da própria espécie podem influenciar a produção destes metabolitos primários (Finkel & Holbrook, 2000; Hafting, et al. 2015). Tendo em conta os parâmetros analisados, pode-se afirmar, apenas tendo em conta a composição lipídica, que o Verão é a estação mais saudável para se usar a biomassa de *G. corneum* para fins alimentares.

Os valores dos ácidos gordos obtidos de *A. armata* foram similares aos valores descritos por Ragonese e colaboradores (2014) com valores ligeiramente superiores nos ácidos láurico, trideciclico e esteárico (12:0, 13:0 e 18:0, respetivamente), n-3 e n-6. A maior diferença foi observada nos valores do ácido palmítico (16:0) que foram 10% superiores e esta diferença, juntamente com o mencionado previamente, resultaram numa soma de ácidos gordos 30% superior ao mencionado por Rangonese e colaboradores (2014). Sendo estes valores de ácidos gordos saturados muito elevados não seria benéfico o consumo desta biomassa tendo em conta os efeitos que esta teria na produção de colesterol no corpo humano (Siri-Tarino, et al. 2010).

Para *A. armata*, os ácidos gordos mais abundantes foram o mirístico, palmítico e elaidico (14:0, 16:0 e 18:1 n-9 cis respetivamente). O ácido mirístico apresentou uma produção máxima de $19,27 \pm 0,90\%$ na Primavera, o palmítico de $57,55 \pm 1,55\%$ na Primavera e o elaidico de $5,80 \pm 0,23\%$ no Verão. Houve um máximo de produção de Ómega-3 e Ómega-6 no Verão, apresentado valores de $1,83 \pm 1,53\%$ e $1,96 \pm 0,55\%$ respetivamente (Tabela 6).

Como foi dito previamente as algas vermelhas apresentam os maiores valores do índice AI como se pode averiguar com os valores de *A. armata*. Na Primavera foi possível observar um valor superior ao expectável para as algas vermelhas (0,03 - 3,58%) de $3,96 \pm 0,05\%$ principalmente devido à abundância de ácidos gordos saturados. Ambos os valores das estações analisadas são muito superiores aos obtidos para outras algas vermelhas como a *Gracilaria gracilis* (0,6%), *Palmaria palmata* (0,8%) e *Porphyra dioica* (1,1%) (Lopes, et al. 2020).

Das diversas macroalgas analisadas por Kumari e colaboradores (2013) apenas *Gracilaria salicornia* apresentou um valor superior aos obtidos de *A. armata* ($11,9 \pm$

1,0%). Estes valores devem-se novamente à presença de uma grande quantidade de ácidos gordos saturados em comparação com n-3 e n-6. Ambos os índices indicam que o consumo desta alga iria aumentar o risco de doenças cardiovasculares (Lopes, et al. 2020).

Tabela 6 - Quantificação de ácidos gordos maioritários em *Asparagopsis armata* (expresso em percentagem tendo em conta os ácidos gordos detetados); Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as estações analisadas.

		Primavera	Verão
Ácido decanóico	C10:0	1,83 ± 0,23	1,92 ± 0,10
Ácido láurico	C12:0	2,33 ± 0,75	2,61 ± 0,47
Ácido tridecíclico	C13:0	0,58 ± 0,05	0,68 ± 0,07
Ácido mirístico	C14:0	19,27 ± 0,90	19,00 ± 0,58
Ácido pentadecanóico	C15:0	0,43 ± 0,06	0,47 ± 0,03
Ácido palmítico	C16:0	57,55 ± 1,55	52,47 ± 3,47
Ácido esteárico	C18:0	2,90 ± 1,29	3,40 ± 1,14
Σ SFA %		84,74 ± 0,16	80,55 ± 4,35
Ácido miristoleico	C14:1	0,60 ± 0,02	0,79 ± 0,18
Ácido cis-pentadecanóico	C15:1 n-5	0,71 ± 0,02	0,97 ± 0,24
Ácido palmitoleico	C16:1 n-7	1,70 ± 0,11	3,79 ± 1,95
Ácido oleico	C18:1 n-9 cis	3,15 ± 0,14	2,16 ± 0,75
Ácido elaidico	C18:1 n-9	5,40 ± 0,31	5,80 ± 0,23
Ácido vacénico	C18:1 n-7	1,13 ± 0,05	1,02 ± 0,07
Ácido oleico	C22:1 n-9	0,31 ± 0,02	1,45 ± 1,77
Σ MUFA %		13,00 ± 0,08	15,65 ± 3,36
Ácido linoleico	C18:2 n-6	0,54 ± 0,31	1,05 ± 0,36
Ácido araquidónico	C20:4 n-6	0,61 ± 0,09	0,91 ± 0,72
Ácido eicosapentanóico	C20:5 n-3	1,11 ± 0,18	1,83 ± 1,53
Σ PUFA %		2,26 ± 0,13	3,80 ± 2,04
Índices Nutricionais			
Σ n-3		1,11 ± 0,18	1,83 ± 1,53
Σ n-6		1,15 ± 0,25	1,96 ± 0,55
Índice AI		3,96 ± 0,05	2,63 ± 0,06
Índice TI		8,45 ± 0,03	5,60 ± 0,07
Razão n-6/n-3		1,04 ± 0,40	1,07 ± 0,65
Razão h/H		5,03 ± 0,07	3,67 ± 0,06

A bibliografia existente a respeito do uso de *A. armata* como alimento é limitada devido aos vários compostos halogenados que esta possui. Embora o uso de *A. taxiformis* em rações seja usada para reduzir as emissões de metano em gado bovino devido à presença de bromofórmio, o próprio estudo de Muizelaar e colaboradores (2021) refere os danos inflamatórios da parede do rúmen dos animais estudados.

Metais pesados e Iodo

As concentrações de metais pesados e iodo estão dispostas na Tabela 7 e 8. Estes compostos estão presentes em baixas concentrações sendo o arsénico o metal pesado mais abundante com $1,60 \pm 0,28$ mg/kg e $1,65 \pm 0,78$ mg/kg na biomassa do outono, sendo estes valores inferiores ao nível de arsénio inorgânico estipulado para alimentos pelo *Regulamento da Comissão (EU) 2015/1006*. Os valores correspondentes ao cádmio e o chumbo não foram significativamente elevados. Os dados não podem ser comparados diretamente com as diretivas pois as unidades das mesmas encontram-se em mg/kg peso fresco (12% humidade). Mercúrio e estanho foram os dois contaminantes que foram detetados em níveis mínimos. Os valores de iodo foram sempre elevados. Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as duas estações analisadas nas concentrações de chumbo e iodo em *G. corneum*. *A. armata* não apresentou diferenças estatisticamente significativas nas estações analisadas.

Tabela 7 - Concentração de metais pesados e iodo em *Gelidium corneum*. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=2$). Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), e Outono (c).

Iodo e contaminantes (mg/kg dw)	Primavera	Outono
Chumbo	$0,24 \pm 0,12^c$	$0,52 \pm 0,16^a$
Arsénio	$1,50 \pm 0,1$	$1,60 \pm 0,28$
Cádmio	$0,18 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,04$
Mercúrio	$<0,007$	$<0,007$
Estanho	$<0,5$	$<0,5$
Iodo	$236,67 \pm 0,12^c$	$150,00 \pm 0,16^a$

Tabela 8 - Concentração de metais pesados e iodo em *Asparagopsis armata*. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=2$). Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), e Verão (b).

Iodo e contaminantes (mg/kg dw)	Primavera	Verão
Chumbo	$0,35 \pm 0,07$	$0,23 \pm 0,06$
Arsénio	$1,35 \pm 0,21$	$1,65 \pm 0,78$
Cádmio	$0,04 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,02$
Mercúrio	$<0,007$	$<0,007$
Estanho	$<0,5$	$<0,5$
Iodo	$155,00 \pm 0,06$	$140,00 \pm 0,06$

Os metais pesados presentes no ambiente devem-se a origens antropogénicas e naturais. A sua concentração no ambiente varia dependendo das características da região e qualidade da água. Podem ser acumulados pelas algas e não existe nenhum mecanismo conhecido de remoção ou processamento de metais pesados no corpo humano, logo a ingestão desta biomassa algal pode provocar efeitos nocivos como doenças neuronais e/ou oncológicas (Mahurpawar, 2015). Como mencionado previamente as concentrações de chumbo, cádmio e mercúrio não podem ser comparadas diretamente com os valores estipulados pela União Europeia no entanto o máximo dos mesmos encontram-se no 3, 3 e 0,1 mg/kg peso fresco, respetivamente (EU, 2015). Relativamente ao estanho não existe nenhum limite especificado para biomassa algal, mas o nível máximo deste contaminante para outros alimentos é de 50 a 200 mg/kg peso fresco, um valor, que embora não se encontre nas mesmas unidades, aparenta ser muito superior ao detetado na biomassa analisada (EC, 2006). O arsénico é regulado pela diretiva 2002/32/EC, que estabelece o limite máximo de arsénico inorgânico a 2mg/kg 12% humidade (EU, 2002; Lähteenmäki-Uutela, 2021). Este é o metal pesado predominante nas amostras analisadas. No entanto, este parâmetro não é demonstrativo dos riscos de saúde associados à acumulação de arsénico pois a grande maioria do arsénico presente em macroalgas é assimilado a moléculas orgânicas, como os arseno-açúcares, que são menos nocivos em comparação com as formas inorgânicas do arsénico (Lähteenmäki-Uutela, 2021). As algas são conhecidas como ótimas fontes de iodo, que é um composto necessário ao longo do desenvolvimento do ser humano estando interligado com um desenvolvimento cognitivo saudável nas crianças. *G. corneum* apresenta uma concentração de iodo superior ao Nori (*Porphyra* sp./*Pyropia* sp.), uma alga vermelha tradicionalmente comestível. A biomassa de *A. armata*, juntamente com a biomassa de *G. corneum* no outono apresentam valores inferiores a outras algas comestíveis como o Kombu (*Laminaria* sp.) e Wakame (*Undaria pinnatifida*) (Yeh, et al. 2014). O limite estabelecido pela EU 2018/464 de iodo ingerido encontra-se nos 600µg/dia para adultos e 200µg/dia para crianças entre os 1 e 3 anos (EC, 2018). O consumo de *A. armata* pode revelar-se perigoso tendo em conta a quantidade de compostos halogenados que ela possui. A toxicidade destes compostos deve-se ao poder destes compostos de produção de espécies reativas de oxigénio e do seu papel de agentes alquilantes, que são compostos altamente reativos que unem certos grupos químicos, podendo influenciar alterações no DNA e RNA das células (Dring, 2005; Silva, et al. 2021).

Para evitar o consumo de alimentos com aditivos químicos, as algas apresentam-se como uma fonte de alimentação natural e saudável. Além disso, já foram reportadas digestões *in vitro* mais elevada das proteínas de algas vermelhas, em comparação com algas castanhas e verdes, sendo estes valores de digestão *in vitro* (83%-87%) comparáveis com os valores de digestão de leguminosas (72%-92%), fruta (72%-92%) e diversos outros vegetais (68%-80%) (Sappati, et al. 2019). O consumo de macroalgas como alimento, concretamente de *G. corneum*, parece ser, pois, adequado do ponto de vista nutricional e da sua digestibilidade.

Capacidade antioxidante

As espécies reativas de oxigénio são produzidas naturalmente através do metabolismo aeróbico e estes radicais livres são inativados ou removidos do organismo pelos compostos com capacidade antioxidante (Benzie & Strain, 1996). Os testes que medem a capacidade antioxidante permitem a compreensão do potencial antioxidante de um composto, neste caso, dos extratos liofilizados das algas em estudo.

O ensaio de DPPH depende da capacidade de captação de radicais dos diversos compostos antioxidantes cujos resultados foram determinados tendo em conta o decréscimo da absorvância induzido pelos compostos antioxidantes presentes nas amostras (Hwang & Thi, 2014). O ensaio de ABTS parte do mesmo princípio do ensaio de DPPH, mas tem a capacidade de analisar a capacidade antioxidante de compostos tanto polares como apolares presentes nas amostras (Nenadis, et al. 2004). O ensaio de FRAP baseia-se na redução do ião Fe^{3+} por compostos antioxidantes biológicos e redutores químicos (Griffin & Bhagooli, 2004). O conteúdo total de polifenóis (QTP) foi determinado através do ensaio de Folin-Ciocalteu que se baseia na reação entre os agentes oxidantes e a tirosina/triptofano cuja reação resulta na produção da cor azul cuja intensidade é proporcional à concentração de polifenóis na amostra (Sánchez-Rangel, et al. 2013). Os ensaios usados são complementares.

Os extratos aquosos liofilizados de *G. corneum* correspondentes à biomassa da Primavera, Verão, Outono e Inverno no ensaio de DPPH apresentaram taxas de inibição de $7,61 \pm 2,46\%$, $10,89 \pm 1,46\%$, $5,57 \pm 0,62\%$ e $9,92 \pm 0,72\%$, respetivamente (Figura 4). No ensaio de Folin-Ciocalteu apresentaram valores de $6,02 \pm 0,78$ mgGAE/g, $6,82 \pm 0,26$ mgGAE/g, $6,70 \pm 0,19$ mgGAE/g e $4,59 \pm 0,37$ mgGAE/g, respetivamente. No ensaio de FRAP apresentaram valores de $0,91 \pm 0,22$ mgAAE/g, $0,77 \pm 0,02$ mgAAE/g, $0,78 \pm 0,05$ mgAAE/g e $0,40 \pm 0,02$ mgAAE/g, respetivamente. No ensaio de ABTS apresentaram taxas de inibição de $10,93 \pm 1,26\%$, $13,90 \pm 1,54\%$, $10,85 \pm 1,25\%$ e $13,55 \pm 1,50\%$.

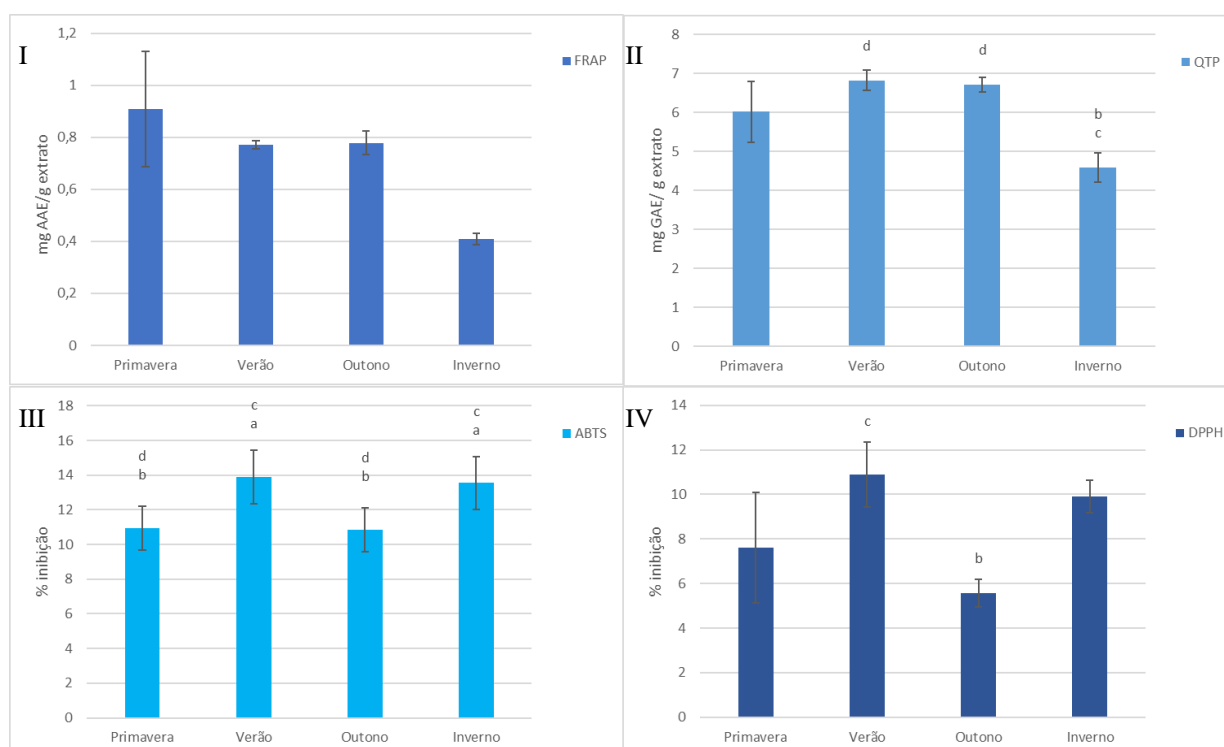


Figura 4 - Variação da capacidade antioxidante do extrato liofilizado de *Gelidium corneum*, determinada através dos ensaios I - FRAP; II - QTP; III - ABTS; IV - DPPH. Diferenças significativas estão indicadas pelas letras que representam a estação da Primavera (a), Verão (b), Outono (c) e Inverno (d).

Os extratos liofilizados de *G. corneum* não apresentaram atividade antioxidante significativa quando comparada com os valores de outras algas vermelhas como *Porphyra tenera*, *Scinaia okamurae*, *Gelidium amansii* e *Litophyllum okamurae*, entre outras, cuja taxa de inibição do ensaio de DPPH estão entre os 20% a 30%, sendo estes valores o triplo da maior taxa de inibição obtida, que corresponde à biomassa do Verão (10,8%) (Heo, et al. 2006). Contudo, apresentam valores superiores aos obtidos pelos extratos aquosos das algas castanhas *Cecropia peltata*, *Gelidiella acerosa*, *Padina gymnospora* e *Sargassum wightii* com taxas de inibição inferiores a 8% (Murugan & Iyer, 2013). O conteúdo total de polifenóis é similar a diversas algas vermelhas registadas por

Heo e colaboradores (2006), sendo estes valores inferiores a 10 mgGAE/g de extrato. Os valores obtidos no ensaio de FRAP foram inferiores aos obtidos pelos extratos metanólicos das algas castanhas *Turbinaria ornata*, *Hydroclathrus clathratus* e *Sargassum echinocarpum*, das algas verdes *Gayralia oxysperma* e *Chaetomorpha antennina* e das algas vermelhas *Polysiphonia howei*, *Ahnfeltiopsis concinna* e *Pterocladia capillacea* cujo valor mais elevado foi registado pela alga castanha *T. ornata* (10,27 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$) (Kelman, et al. 2012).

Os extratos aquosos liofilizados de *A. armata* correspondentes à biomassa da Primavera e Verão no ensaio de DPPH apresentaram taxas de inibição de $2,28 \pm 0,80\%$ e $1,40 \pm 0,52\%$, respetivamente. No ensaio de Folin-Ciocalteu apresentaram valores de $2,10 \pm 0,09$ GAE/g e $2,01 \pm 0,03$ GAE/g, respetivamente. No ensaio de FRAP apresentaram valores de $0,47 \pm 0,03$ AAE/g e $0,43 \pm 0,04$ AAE/g respetivamente. No ensaio de ABTS apresentaram taxas de inibição de $6,44 \pm 0,38\%$ e $5,95 \pm 1,05\%$, respetivamente (Figura 5). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum destes ensaios.

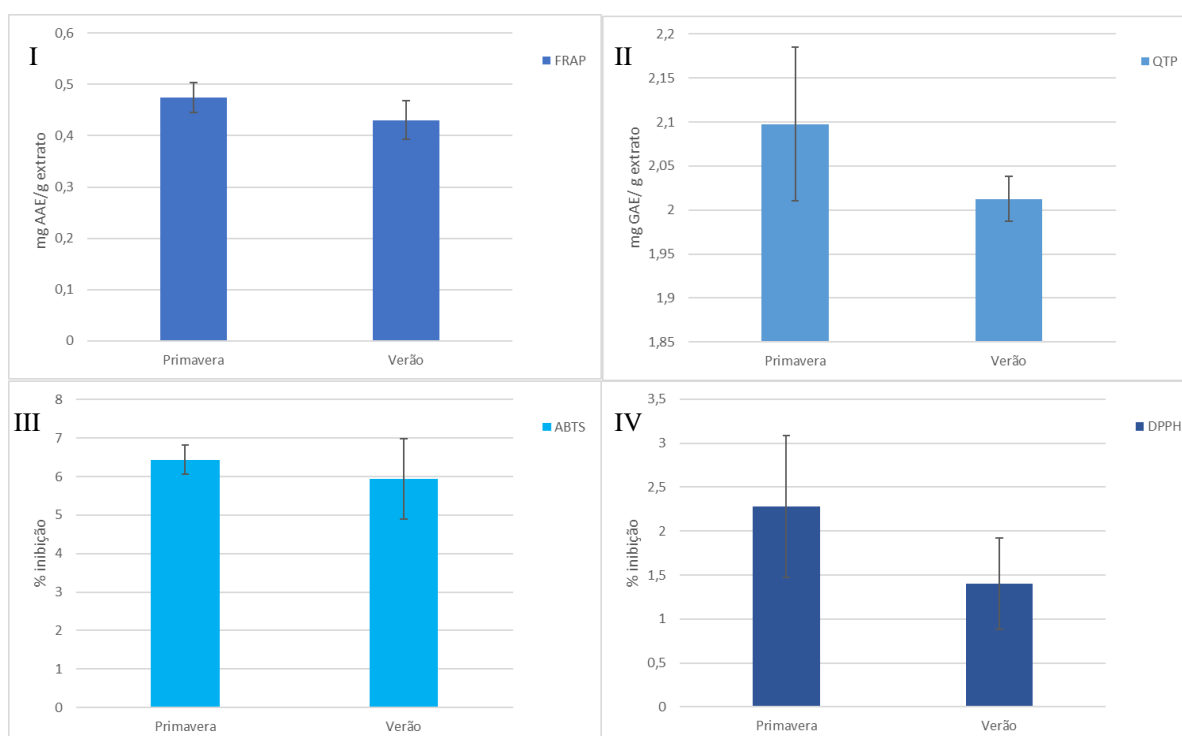


Figura 5 - Variação da capacidade antioxidante do extrato liofilizado de *Asparagopsis armata*, determinada através dos ensaios I - FRAP; II - QTP; III - ABTS; IV - DPPH.

Pode-se afirmar, segundo os valores obtidos, que os extratos aquosos liofilizados de *A. armata* não apresentam atividade antioxidante significativa quando comparado com

os valores obtidos por Vinayak e colaboradores (2010) onde os valores de QTP e DPPH de *A. taxiformis* foram de $8,52 \pm 0,28$ GAE/g extrato, que é aproximadamente quatro vezes superior ao valor mais elevado obtido, e aproximadamente 20% de inibição, que é aproximadamente dez vezes superior ao valor mais elevado obtido, respetivamente. No entanto, os valores previamente mencionados são provenientes de extratos metanólicos, cujo solvente (metanol) é extensivamente usado para a extração eficaz de fenóis e outros compostos bioativos de plantas (Hassim, et al. 2014; Truong, et al. 2019).

Pode-se afirmar que os extratos aquosos de *G. corneum* e *A. armata* não apresentam uma atividade antioxidante muito elevada, no entanto, em *G. corneum* é possível observar diferenças significativas entre os extratos de estações diferentes. Esta variação poderá ser justificada em parte pela produção de aminoácidos tipo micoesporinas (MAAs) que são produzidos por cianobactérias e algas vermelhas, sintetizados para proteger o DNA de danos por radiação UV com atividade antioxidante. A sua concentração pode variar com a sazonalidade e o meio ambiente onde se encontram os organismos (Nishida, et al. 2020; Rastogi, et al. 2014). A identificação futura destes compostos poderá corroborar esta hipótese.

Capacidade antibacteriana

Os resultados dos antibiogramas estão expostos nas Tabelas 9 e 10 e referem-se aos etanólicos de *G. corneum* e *A. armata*, respetivamente. Os extratos aquosos de ambas as macroalgas analisadas não apresentaram atividade antibacteriana para as estirpes analisadas. Não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os extratos das diferentes estações analisadas. Os extratos de *G. corneum* apresentaram atividade antibacteriana apenas para a estirpe Gram-positiva *B. subtilis* e os extratos de *A. armata* apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* e, as Gram-positivas *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* e o fungo *C. albicans*.

As atividades antibacterianas registadas de *G. corneum* e *A. armata* são concordantes com a literatura (Manilal, et al. 2010; Parsaeimehr & Chen, 2013; Salvador, et al. 2007).

No estudo de Salvador e colaboradores (2007) com *Gelidium spinosum*, um holótipo de *G. corneum*, não registou nenhuma atividade antibacteriana contra nenhuma das estirpes usadas, mencionadas previamente. Esta atividade de *G. corneum* poderá ser

justificada pela presença de ácidos gordos como o C18 e C18:1n-9, que também foram reportados em frações com bioatividades de *A. armata* (Manilal, et al. 2015).

Tabela 9 - Diâmetro de halos de inibição (mm) resultantes dos extratos etanólico de *Gelidium corneum*. Os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão (n=3)

Extrato	<i>Bacillus subtilis</i>
Primavera	14,67 \pm 1,15
Verão	14,67 \pm 0,58
Outono	14,33 \pm 0,58
Inverno	14,33 \pm 1,15

Os extratos etanólico de *G. corneum* apresentaram MICs de 75mg/mL contra *B. subtilis*. A literatura que incida sobre a atividade antibacteriana de extratos de *G. corneum* não é abundante, contudo o estudo de Öztürk e colaboradores (2019) reportou MICs de 0,51 μ g/mL e 0,26 μ g/mL contra *C. albicans* e *E. coli*, respetivamente, de nanopartículas de prata sintetizadas com extrato de *G. corneum*. Sendo a prata um agente antibacteriano já reconhecido (Jung, et al. 2008; Ouay & Stellacci, 2015; Yin, et al. 2020) não se pode afirmar que esta atividade é proveniente, diretamente, do extrato de *G. corneum*.

As atividades antibacterianas registadas de *G. corneum* e *A. armata* são concordes com a literatura (Manilal, et al. 2010; Parsaeimehr & Chen, 2013; Salvador, et al. 2007). Esta atividade antibacteriana deve-se, no caso de *A. armata*, aos inúmeros metabólitos halogenados que possuem uma grande variabilidade de volatilidade e solubilidade cuja toxicidade deve-se, maioritariamente, à capacidade alquilante dos compostos ou à sua capacidade de produção de espécies reativas de oxigénio. Um exemplo de compostos com atividades alquilantes são as haloacetonas, encontradas em *A. armata*, que são inibidores enzimáticos (McConnel & Fenical, 1997). Não foi possível observar nenhuma variação significativa sazonal de atividade antibacteriana. Esta ausência de variação sazonal foi, também, reportada por Salvador e colaboradores (2007). A atividade antibacteriana de *A. armata* além de já ser considerada para aplicações antibacterianas na farmacêutica também é possível associar esta atividade a uma atividade *antifouling* contra microrganismos e microalgas habitualmente presentes em biofilmes e pólipos de medusas que se encontrem na fase bentónica. Estas soluções *antifouling* apresentam uma capacidade de inibição de aderência por parte destes organismos sem apresentar uma taxa de mortalidade elevada (Pinteus, et al. 2020; Pinteus, et al. 2021).

Tabela 10 - Diâmetro de halos de inibição (mm) resultantes dos extratos etanólico de *Asparagopsis armata*. Os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão (n=3)

	Primavera	Verão
<i>E. coli</i>	6,67 \pm 0,58	6,5 \pm 0,5
<i>C. albicans</i>	8,67 \pm 1,55	8,83 \pm 1,04
<i>S. epidermidis</i>	13,33 \pm 1,55	13,67 \pm 0,58
<i>P. aeruginosa</i>	7,66 \pm 1,15	7,66 \pm 0,58
<i>B. subtilis</i>	14,00 \pm 2,00	13,67 \pm 0,58

Os extratos etanólico liofilizados de *A. armata* apresentaram MICs de 50 mg/mL contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* e 5 mg/mL contra *S. epidermidis*, *C. albicans* e *B. subtilis*. No estudo de Manilal e colaboradores (2010) os extratos metanólicos de *A. taxiformis* resultaram em MICs com valores inferiores aos obtidos, sendo que contra *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* foi possível observar valores de 1,250 mg/mL e contra *B. subtilis* valores de 0,5 mg/mL. Além das estirpes analisadas, já foi reportada a atividade inibitória dos extratos de *A. taxiformis* em diversas estirpes patogênicas de aquacultura como *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* e *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* (Parsaeimehr & Chen, 2013).

Conclusão

Os resultados obtidos do presente estudo comprovam a variação sazonal de proteína, hidratos de carbono e lípidos em *G. corneum*. Isto indica que a biomassa da mesma, especialmente no verão, apresenta potencial para aplicação na indústria alimentar, visto ser uma fonte de diversos compostos nutricionais. Esta consideração é também suportada tendo em conta que as baixas concentrações de metais pesados e medianas de iodo presentes na biomassa, cujos valores máximos não ultrapassam os estipulados para produtos alimentares. Seria interessante, futuramente, efetuar uma análise nutricional mais detalhada, bem como efetuar análises de digestibilidade para comprovar o potencial alimentar desta macroalga. Além disso tendo em conta os resultados obtidos da atividade antioxidante dos extratos liofilizados da mesma, a otimização do procedimento de extração é pertinente pois poderão ser detetadas atividades significativas futuramente. A análise das propriedades têxteis e formação de compósitos da biomassa algal de *G. corneum* poderá também apresentar potencial para aplicação industrial.

A análise a *A. armata* não é suficiente para afirmar que existe variação sazonal ao longo do ano dos diversos parâmetros analisados. No entanto, é possível verificar uma variação entre as duas estações analisadas na produção de lípidos, hidratos de carbono e proteína. Logo, os resultados desta macroalga podem ser considerados preliminares para futuras análises à biomassa do Outono e Inverno, se esta vier a estar disponível. Neste estudo também foi averiguada a já reconhecida capacidade antimicrobiana desta alga, sendo que foi possível observar inibição de crescimento em todas as estirpes analisadas em ambas as estações em que a biomassa foi recolhida, confirmando-se assim resultados de autores anteriores.

Tendo em conta o presente estudo a biomassa algal de São Martinho do Porto não está a ser bem aproveitada. Como foi mencionado ao longo deste trabalho existem diversas indústrias que poderiam usufruir da biomassa e dos componentes presentes em ambas macroalgas analisadas, uma vez que atualmente apenas o *G. corneum* é usado na indústria de agar. Considerando o caráter invasor da *A. armata* o aproveitamento e recolha desta espécie seria vantajoso não só para a indústria na procura de novas formas de aplicação, mas também para o ambiente marinho pois estar-se-ia a reduzir uma espécie invasora do mesmo.

Quanto à utilização do *G. corneum* para outras aplicações, deve ter-se em conta a disponibilidade e sustentabilidade do recurso, uma vez que esta é uma espécie não cultivada, cuja biomassa é colhida diretamente da natureza.

Referências Bibliográficas

- 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>
- AgarGel, Agar-Agar (2021) AgarGel. Retrieved 20 October 2020, from <http://agargel.com.br/agar-agar/#especificacoes>
- Ali, A., & El Gamal. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 1-25, <https://doi.org/10.1016/j.jpsps.2009.12.001>
- Ali, K., Ahmed, B., Khan, M. S., & Musarrat, J. (2018). Differential surface contact killing of pristine and low EPS *Pseudomonas aeruginosa* with Aloe vera capped hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 188, 146-158, <https://doi.org/10.1016/j.jphoto-biol.2018.09.017>
- Almeida, A. R. G. S. (2007). Guia de Campo das algas do Intertidal da Praia da Vigia. *Faculdade de Ciências do Mar e do ambiente. Universidade do Algarve*.
- 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, [10.1007/s10811-015-0650-1](https://doi.org/10.1007/s10811-015-0650-1)
- AOAC, G. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International. Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5
- Ariede, M. B., Candido, T. M., Jacome, A. L. M., Velasco, M. V. R., de Carvalho, J. C. M., & Baby, A. R. (2017). Cosmetic attributes of algae-A review. *Algal Research*, 25, 483-487, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.019>
- Armisen, R., & Gaiatas, F. (2009). Agar. In *Handbook of hydrocolloids* (pp. 82-107). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.82>
- Arvizu-Higuera, D. L., Rodríguez-Montesinos, Y. E., Murillo-Álvarez, J. I., Muñoz-Ochoa, M., & Hernández-Carmona, G. (2007). Effect of alkali treatment time and extraction time on agar from *Gracilaria vermiculophylla*. In *Nineteenth International Seaweed Symposium* (pp. 65-69). Springer, Dordrecht, https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9619-8_9
- Asparagopsis armata (Falkenbergia) - Harpoon Weed (Red seaweed images). (2020). Retrieved 18 October 2020, from https://www.aphotomarine.com/red_seaweed_harpoon_weed_asparagopsis_armata.html
- Barral-Martínez, M., Flórez-Fernández, N., Domínguez, H., & Torres, M. D. (2020). Tailoring hybrid carrageenans from *Mastocarpus stellatus* red seaweed using microwave hydrodiffusion and gravity. *Carbohydrate Polymers*, 248, 116830, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116830>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76, <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157-1165, [10.1016/j.talanta.2007.01.019](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019)
- Bixler, H. J., & Porse, H. (2011). A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 321-335, <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9529-3>
- Bonin, D. R., & Hawkes, M. W. (1987). Systematics and life histories of New Zealand Bonnemaisoniaceae (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): I. The genus *Asparagopsis*. *New Zealand Journal of Botany*, 25(4), 577-590, <https://doi.org/10.1080/0028825X.1987.10410088>

- Boujaber, N., Oumaskour, K., Hassou, N., Lakhdar, F., Assobhei, O., & Etahiri, S. (2016). Antimicrobial effect of two marine algae *Gelidium sesquipedale* and *Laminaria ochroleuca* collected from the coast of El Jadida-Morocco. *Journal of Bio Innovation*, 5(1), 16-23.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (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)
- Burja, A. M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J. G., & Wright, P. C. (2001). Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57(46), 9347-9377, [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00931-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00931-0)
- Cardoso, M., Carvalho, G., Silva, J., Rodrigues, S., Pereira, R., & Pereira, L. (2014). Bioproducts from seaweeds: A review with special focus on the Iberian Peninsula. *Current Organic Chemistry*, 18(7), 896-917, [10.2174/138527281807140515154116](https://doi.org/10.2174/138527281807140515154116)
- De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383-2389, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- Cavaco, M., Duarte, A., Bernardino, S., Afonso, C., & Mouga, T. (2021, May). Sustainable Use of Seaweeds from S. Martinho do Porto, Portugal—Past, Present, and Future Perspective. In *International Conference on Water Energy Food and Sustainability* (pp. 216-226). Springer, Cham, https://doi.org/10.1007/978-3-030-75315-3_26
- Cérantola, S., Breton, F., Gall, E. A., & Deslandes, E. (2006). Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Botanica Marina*, 49(4), 347-351, <https://doi.org/10.1515/BOT.2006.042>
- Cesário, M. T., da Fonseca, M. M. R., Marques, M. M., & de Almeida, M. C. M. (2018). Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnology Advances*, 36(3), 798-817, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.006>
- Chang, H. W., Jang, K. H., Lee, D., Kang, H. R., Kim, T. Y., Lee, B. H., Choi, B. W., Kim, S., & Shin, J. (2008). Monoglycerides from the brown alga *Sargassum sagamianum*: Isolation, synthesis, and biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(12), 3589-3592, [10.1016/j.bmcl.2008.05.008](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.008)
- Chan, P. T., Matanjun, P., Yasir, S. M., & Tan, T. S. (2015). Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2377-2386, <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0493-1>
- Chen, H., Zhou, D., Luo, G., Zhang, S., & Chen, J. (2015). Macroalgae for biofuels production: progress and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 427-437, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.086>
- Chen, J., & Liu, H. (2020). Nutritional indices for assessing fatty acids: A mini-review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5695, <https://doi.org/10.3390/ijms21165695>
- Chen, Y. H., Tu, C. J., & Wu, H. T. (2004). Growth-inhibitory effects of the red alga *Gelidium amansii* on cultured cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(2), 180-184, <https://doi.org/10.1248/bpb.27.180>
- Chew, K. W., Show, P. L., Yap, Y. J., Juan, J. C., Phang, S. M., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018). Sonication and grinding pre-treatments on *Gelidium amansii* seaweed for the extraction and characterization of Agarose. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 12(4), 2, <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1040-044>
- Cikoš, A. M., Jokić, S., Šubarić, D., & Jerković, I. (2018). Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, 16(10), 348, [10.3390/md16100348](https://doi.org/10.3390/md16100348)
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. *CLSI document M02-A11*, ISBN: 1-56238-834-7
- De la Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F. L., De Gálvez, M. V., & Herrera, E. (2009). Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 161-169, <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9345-1>
- Cornish, M. L., & Garbary, D. J. (2010). Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *Algae*, 25(4), 155-171, <https://doi.org/10.4490/algae.2010.25.4.155>

- Covington, M. (2004). Omega-3 fatty acids. *American Family Physician*, 70(1), 133-140, <https://www.aafp.org/afp/2004/0701/p133.html>
- Denis, C., Morançais, M., Li, M., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Collin, G., Barnathan, G., Jaouen, P. & Fleurence, J. (2010). Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chemistry*, 119(3), 913-917, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.047>
- Deveau, A. M., Miller-Hope, Z., Lloyd, E., Williams, B. S., Bolduc, C., Meader, J. M., Weiss, F. & Burkholder, K. M. (2016). Antimicrobial activity of extracts from macroalgae *Ulva lactuca* against clinically important Staphylococci is impacted by lunar phase of macroalgae harvest. *Letters in Applied Microbiology*, 62(5), 363-371, <https://doi.org/10.1111/lam.12563>
- Dyrby, M.; Petersen, R.; Larsen, J.; Rudolf B.; Norgaard, L. & Engelsen, S.B. (2004). Towards on-line monitoring of the composition of commercial carrageenan powders. *Carbohydrate Polymers*, 57(3), 337-348, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.05.015>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (US). (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eleventh Edition, 9-13
- Directive, E. C. (2002). Directive of The European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed 2002/32. *Official Journal of the European communities*, L140, 30, 5, 10-22.
- Dring, M. J. (2005). Stress resistance and disease resistance in seaweeds: the role of reactive oxygen metabolism. *Advances in Botanical Research*, 43, 175-207, [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(05\)43004-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)43004-9)
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356, <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 364(365–324).
- European Commission. (2018). Commission Recommendation (EU) 2018/464 of 19 March 2018 on the monitoring of metals and iodine in seaweed, halophytes and products based on seaweed. *Official Journal of the European Union*, 78(396), 16-18.
- Farvin, K. S., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1670-1681, [10.1016/j.foodchem.2012.10.078](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078)
- Fatima, M. R., Dinesh, S., Mekata, T., Itami, T., & Sudhakaran, R. (2016). Therapeutic efficiency of *Portieria hornemannii* (Rhodophyta) against *Vibrio parahaemolyticus* in experimentally infected *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 450, 369-374, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.010>
- FDA, Food and Drug Administration, (2021) National Institutes of Health, Health and Human Services, <https://fdasis.nlm.nih.gov/srs/auto/gelidium%20corneum>, accessed in 21st of June
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247, [10.1038/35041687](https://doi.org/10.1038/35041687)
- Floreto, E. A. T., Hirata, H., Ando, S., & Yamasaki, S. (1993). Fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta) and *Gracilaria incurvata* Okamura (Rhodophyta) in Japanese coastal waters, <https://doi.org/10.1515/botm.1993.36.3.217>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781/>
- Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D. (1997). Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, 9(6), 533, [10.1023/A:1007989931915](https://doi.org/10.1023/A:1007989931915)
- Foster, G. G., & Hodgson, A. N. (1998). Consumption and apparent dry matter digestibility of six intertidal macroalgae by *Turbo sarmaticus* (Mollusca: Vetigastropoda: Turbinidae). *Aquaculture*, 167(3-4), 211-227, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00315-9)
- Fulton, C. J., Depczynski, M., Holmes, T. H., Noble, M. M., Radford, B., Wernberg, T., & Wilson, S. K. (2014). Sea temperature shapes seasonal fluctuations in seaweed biomass within the Ningaloo coral reef ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 59(1), 156-166. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.1.01564>

- Galland-Irmouli, A. V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J.P., Villaume, C. & Guéant, J. L. (1999). Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(6), 353-359, [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00014-5)
- Gamero-Vega, G., Palacios-Palacios, M., & Quitral, V. (2020). Nutritional Composition and Bioactive Compounds of Red Seaweed: A Mini-Review. *Journal of Food and Nutrition Research*. 8(8), 431-440, [10.12691/jfnr-8-8-7](https://doi.org/10.12691/jfnr-8-8-7)
- Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*, 73(5), 2573-2585, [10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005)
- Gaspar, R., Pereira, L., & Sousa-Pinto, I. (2019). The seaweed resources of Portugal. *Botanica Marina*, 62(5), 499–525. <https://doi.org/10.1515/bot-2019-0012>
- Genovese, G., Tedone, L., Hamann, M. T., & Morabito, M. (2009). The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: a source of compounds against Leishmania. *Marine drugs*, 7(3), 361-366, [10.3390/md7030361](https://doi.org/10.3390/md7030361)
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), 959-975, [10.1016/s0028-3908\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00019-3)
- Gosch, B. J., Magnusson, M., Paul, N. A., & de Nys, R. (2012). Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *Gcb Bioenergy*, 4(6), 919-930, <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2012.01175.x>
- Gressler, V., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Colepicolo, P., Mancini Filho, J., Torres, R. P., & Pinto, E. (2010). Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry*, 120(2), 585-590, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.028>
- Griffin, S. P., & Bhagooli, R. (2004). Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 201-211, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.10.008>
- Grozdanic, N., Stanojkovic, T. P., Kljajic, Z., Etahiri, S., Assobhei, O., Konic-Ristic, A., Srdic-Rajic, T., Nardum, K. & Backovic, S. (2012). 105 in vitro evaluation of antioxidant and antitumoral activities of marine algae *Gelidium Sesquipedale* and *Fucus Spiralis*. *European Journal of Cancer*, 48, S26, [10.1016/S0959-8049\(12\)70809-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(12)70809-2)
- Guerrero-Romero, F., Simental-Mendía, L. E., Martínez-Aguilar, G., Sánchez-Meraz, M. A., & Gamboa-Gómez, C. I. (2020). Hypoglycemic and antioxidant effects of five commercial turmeric (*Curcuma longa*) supplements. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13389, [10.1111/jfbc.13389](https://doi.org/10.1111/jfbc.13389)
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of phycology*, 48(5), 1057-1063, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 600-609, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.004>
- Gutiérrez-Rodríguez, A. G., Juárez-Portilla, C., Olivares-Bañuelos, T., & Zepeda, R. C. (2018). Anticancer activity of seaweeds. *Drug Discovery Today*, 23(2), 434-447, [10.1016/j.drudis.2017.10.019](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.10.019)
- Hafting, J. T., Craigie, J. S., Stengel, D. B., Loureiro, R. R., Buschmann, A. H., Yarish, C., Edwards, M., D., & Critchley, A. T. (2015). Prospects and challenges for industrial production of seaweed bioactives. *Journal of Phycology*, 51(5), 821-837, <https://doi.org/10.1111/jpy.12326>
- Harvey, W. (1855). *Asparagopsis armata*: Algaebase. Retrieved 20 November 2020, from https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=6
- Hassim, N., Markom, M., Anuar, N., & Baharum, S. N. (2014). Solvent selection in extraction of essential oil and bioactive compounds from *Polygonum minus*. *Journal of Applied Sciences*, 14(13), 1440-1444, [10.3923/jas.2014.1440.1444](https://doi.org/10.3923/jas.2014.1440.1444)
- Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y., & Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research*, 52(3), 231-247, [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(01\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00092-7)

- 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>
- Hodge, L., Salome, C. M., Hughes, J. M., Liu-Brennan, D., Rimmer, J., Allman, M., Pang, D., Armour, C., & Woolcock, A. J. (1998). Effect of dietary intake of omega-3 and omega-6 fatty acids on severity of asthma in children. *European Respiratory Journal*, 11(2), 361-365, [10.1183/09031936.98.11020361](https://doi.org/10.1183/09031936.98.11020361).
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597, <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
- Hwang, E. S., & Do Thi, N. (2014). Effects of extraction and processing methods on antioxidant compound contents and radical scavenging activities of laver (*Porphyra tenera*). *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(1), 40, [10.3746/pnf.2014.19.1.040](https://doi.org/10.3746/pnf.2014.19.1.040)
- Jayasankar, R., & Kulandaivelu, G. (1999). Fatty acid profiles of marine red alga *Gracilaria* spp (Rhodophyta, Gigartinales), <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/25622>
- de Jesus Raposo, M. F., De Moraes, A. M. M. B., & De Moraes, R. M. S. C. (2016). Emergent sources of prebiotics: seaweeds and microalgae. *Marine drugs*, 14(2), 27, [10.3390/md14020027](https://doi.org/10.3390/md14020027)
- Jha, B., Kavita, K., Westphal, J., Hartmann, A., & Schmitt-Kopplin, P. (2013). Quorum sensing inhibition by *Asparagopsis taxiformis*, a marine macro alga: separation of the compound that interrupts bacterial communication. *Marine Drugs*, 11(1), 253-265, [10.3390/md11010253](https://doi.org/10.3390/md11010253)
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9(2), 196-223, [10.3390/md9020196](https://doi.org/10.3390/md9020196)
- Julião, D. R., Afonso, C., Gomes-Bispo, A., Bandarra, N. M., & Cardoso, C. (2021). The effect of drying on undervalued brown and red seaweed species: Bioactivity alterations. *Phycological Research*, 69(4), 246-257, <https://doi.org/10.1111/pre.12465>
- Jung, U. J., Torrejon, C., Tighe, A. P., & Deckelbaum, R. J. (2008). n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: mechanisms underlying beneficial effects. *The American journal of clinical nutrition*, 87(6), 2003S-2009S, [10.1093/ajcn/87.6.2003S](https://doi.org/10.1093/ajcn/87.6.2003S)
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., & Park, Y. H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2171-2178, <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers*, 102, 708-716, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.099>
- Katsanevakis, S., Wallentinus, I., Zenetos, A., Leppäkoski, E., Çinar, M., Oztürk, B., Grabowski, M., Golani, D. & Cardoso, A. (2014). Impacts of invasive alien marine species on ecosystem services and biodiversity: a pan-European review. *Aquatic Invasions*. 9. 391-423, <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2014.9.4.01>
- Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R., & Wright, A. D. (2012). Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Marine Drugs*, 10(2), 403-416, <https://doi.org/10.3390/md10020403>
- Kendel, M., Couzinet-Mossion, A., Viau, M., Fleurence, J., Barnathan, G., & Wielgosz-Collin, G. (2013). Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 425-432, <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9876-3>
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J. & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399, <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Khotimchenko, S. V., Vaskovsky, V. E., & Titlyanova, T. V. (2002). Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California. *Biology*, 45(1), 17-22, <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.003>
- Khotimchenko, S. V., & Vas'kovsky, V. E. (2004). An inositol-containing sphingolipid from the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 30(2), 168-171, [10.1023/B:RUBI.0000023103.14189.27](https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000023103.14189.27)

- Kim, J. H., Lee, J. E., Kim, K. H., & Kang, N. J. (2018). Beneficial effects of marine algae-derived carbohydrates for skin health. *Marine Drugs*, 16(11), 459, <https://doi.org/10.3390/md16110459>
- Kiuru, P., D'Auria, M. V., Muller, C. D., Tammela, P., Vuorela, H., & Yli-Kauhaluoma, J. (2014). Exploring marine resources for bioactive compounds. *Planta Medica*, 80(14), 1234-1246, [10.1055/s-0034-1383001](https://doi.org/10.1055/s-0034-1383001)
- Kraan, S. (2013). Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), 27-46, <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9275-5>
- Kolanjinathan, K., Ganesh, P., & Saranraj, P. (2014). Pharmacological importance of seaweeds: a review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 6(1), 1-15, [10.5829/idosi.wjfm.2014.06.01.76195](https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2014.06.01.76195)
- Kumar, K. S., Ganesan, K., & Rao, P. S. (2015). Seasonal variation in nutritional composition of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty—an edible seaweed. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2751-2760, <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1372-0>
- Kumar, M., Kumari, P., Trivedi, N., Shukla, M. K., Gupta, V., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2011). Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *Journal of Applied Phycology*, 23(5), 797-810, <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9578-7>
- Kumar, V., & Fotedar, R. (2009). Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii*. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 813-819, [10.1016/j.carbpol.2009.07.001](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.001)
- Kumari, P., Bijo, A. J., Mantri, V. A., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2013). Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry*, 86, 44-56, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.015>
- Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2011). Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Analytical Biochemistry*, 415(2), 134-144, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.010>
- Lähteenmäki-Uutela, A., Rahikainen, M., Camarena-Gómez, M. T., Piiparinen, J., Spilling, K., & Yang, B. (2021). European Union legislation on macroalgae products. *Aquaculture International*, 29(2), 487-509, <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00633-x>
- 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>
- Lamouroux, J. (1813). *Gelidium corneum* (Hudson) J.V.Lamouroux: Algaebase, Retrieved November 17, 2020, from https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=377
- Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. (2020). Diverse applications of marine macroalgae. *Marine Drugs*, 18(1), 17, <https://doi.org/10.3390/md18010017>
- Lebbar, S. (2018). Valorisation biologique de co-produits de l'extraction de l'agar issu du *Gelidium sesquipedale*. Doctoral dissertation, Limoges.
- Lemus, A., Bird, K., Kapraun, D. F., & Koehn, F. (1991). Agar yield, quality and standing crop biomass of *Gelidium serrulatum*, *Gelidium floridanum* and *Pterocladia capillacea* in Venezuela. *Food Hydrocolloids*, 5(5), 469-479. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80105-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80105-7)
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, 27(1), 114-120, [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38861-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38861-1)
- Liang, Y., & Wen, Z. (2014). Bio-based nutraceuticals from biorefining. In *Advances in Biorefineries* (pp. 596-623). Woodhead Publishing.
- Lopes, D., Melo, T., Rey, F., Meneses, J., Monteiro, F. L., Helguero, L. A., Abreu, M. H., Lillebø, A. I., Calado, R. & Domingues, M. R. (2020). Valuing bioactive lipids from green, red and brown macroalgae from aquaculture, to foster functionality and biotechnological applications. *Molecules*, 25(17), 3883, <https://doi.org/10.3390/molecules25173883>
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination - Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor 1. *Crop Science*, 2(2), 176-177, <https://doi.org/10.1533/9780857097385.2.596>

- Mahurpawar, M. (2015). Effects of heavy metals on human health. *International Journal of Research-Granthaalayah*, 3(9SE), 1-7, <https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v3.i9SE.2015.3282>
- Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G. S., Shakir, C., & Lipton, A. P. (2010). Antimicrobial potential of marine organisms collected from the southwest coast of India against multiresistant human and shrimp pathogens. *Scientia Marina*, 74(2), 287-296, [10.3989/scimar.2010.74n2287](https://doi.org/10.3989/scimar.2010.74n2287)
- Martínez, B., & Rico, J. M. (2002). Seasonal variation of p content and major n pools in *Palmaria palmata* (Rhodophyta) *Journal of Phycology*, 38(6), 1082-1089, <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01217.x>
- Martínez-Sanz, M., Gómez-Mascaraque, L. G., Ballester, A. R., Martínez-Abad, A., Brodkorb, A., & López-Rubio, A. (2019). Production of unpurified agar-based extracts from red seaweed *Gelidium sesquipedale* by means of simplified extraction protocols. *Algal Research*, 38, 101420. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101420>
- Matos, J., Gomes, A., Cardoso, C., Afonso, C., Campos, A. M., Gomes, R., Falé, P., Delgado, I., Coelho, I., Castanheira, I. & Bandarra, N. M. (2020). Commercial Red Seaweed in Portugal (*Gelidium sesquipedale* and *Pterocladia capillacea*, Florideophyceae): going beyond a single-purpose product approach by valorizing bioactivity. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 36(1), 213-224, <https://doi.org/10.1007/s41208-019-00181-z>
- McConnell, O., & Fenical, W. (1977). Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. *Phytochemistry*, 16(3), 367-374, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(77\)80067-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(77)80067-8)
- McDermid, K. J., & Stuercke, B. (2003). Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 15(6), 513-524, <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000004345.31686.7f>
- Mendes, A., Lopes da Silva, T., & Reis, A. (2007). DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization and urea complexation. *Food technology and biotechnology*, 45(1), 38-44, <https://hrcak.srce.hr/30434>
- Metidji, H., Dob, T., Toumi, M., Krimat, S., Ksouri, A., & Nouasri, A. (2015). In vitro screening of secondary metabolites and evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of *Gelidium sesquipedale* Thuret et Bornet red seaweed from Algeria. *J. Mater. Environmental Sciences*, 6(11), 3184-3196.
- Michalak, I., Chojnacka, K., Dmytryk, A., Wilk, R., Gramza, M., & Rój, E. (2016). Evaluation of supercritical extracts of algae as biostimulants of plant growth in field trials. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1591, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01591>
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret, J., Morant-Manceau, A. & Schoefs, B. (2012). The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(15), 2733-2750, <https://doi.org/10.2174/138920112804724828>
- Mellouk, Z., Benammar, I., Krouf, D., Goudjil, M., Okbi, M., & Malaisse, W. (2017). Antioxidant properties of the red alga *Asparagopsis taxiformis* collected on the North West Algerian coast. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(6), 3281-3290, <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4413>
- Muizelaar, W., Groot, M., van Duinkerken, G., Peters, R., & Dijkstra, J. (2021). Safety and transfer study: Transfer of bromoform present in *Asparagopsis taxiformis* to milk and urine of lactating dairy cows. *Foods*, 10(3), 584, <https://doi.org/10.3390/foods10030584>
- Muller, L. A., Lucas, J. E., Georgianna, D. R., & McCusker, J. H. (2011). Genome-wide association analysis of clinical vs. nonclinical origin provides insights into *Saccharomyces cerevisiae* pathogenesis. *Molecular Ecology*, 20(19), 4085-4097, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05225.x>
- Murugan, K., & Iyer, V. V. (2013). Differential growth inhibition of cancer cell lines and antioxidant activity of extracts of red, brown, and green marine algae. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 49(5), 324-334, [10.1007/s11626-013-9603-7](https://doi.org/10.1007/s11626-013-9603-7)
- Neethu, P. V., Suthindhiran, K., & Jayasri, M. A. (2017). Antioxidant and antiproliferative activity of *Asparagopsis taxiformis*. *Pharmacognosy Research*, 9(3), 238, [10.4103/pr.pr_128_16](https://doi.org/10.4103/pr.pr_128_16)
- Nelson, M. M., Phleger, C. F., & Nichols, P. D. (2002). Seasonal lipid composition in macroalgae of the northeastern Pacific Ocean. *Botanica Marina*, 45(1), 58-65, <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.007>
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669-4674, <https://doi.org/10.1021/jf0400056>

- Nešić, A., Cabrera-Barjas, G., Dimitrijević-Branković, S., Davidović, S., Radovanović, N., & Delattre, C. (2020). Prospect of Polysaccharide-Based Materials as Advanced Food Packaging. *Molecules*, 25(1), 135, <https://doi.org/10.3390/molecules25010135>
- Ngan, Y., & Price, I. R. (1980). Seasonal growth and reproduction of intertidal algae in the Townsville region (Queensland, Australia). *Aquatic Botany*, 9, 117-134, [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(80\)90013-3](https://doi.org/10.1016/0304-3770(80)90013-3)
- Nishida, Y., Kumagai, Y., Michiba, S., Yasui, H., & Kishimura, H. (2020). Efficient extraction and antioxidant capacity of mycosporine-like amino acids from red alga Dulse *Palmaria palmata* in Japan. *Marine Drugs*, 18(10), 502, <https://doi.org/10.3390/md18100502>
- de Oliveira, J. P., Bruni, G. P., Fabra, M. J., da Rosa Zavareze, E., López-Rubio, A., & Martínez-Sanz, M. (2019). Development of food packaging bioactive aerogels through the valorization of *Gelidium sesquipedale* seaweed. *Food, Hydrocolloids*, 89, 337-350, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.047>
- Le Ouay, B., & Stellacci, F. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles: a surface science insight. *Nano Today*, 10(3), 339-354, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>
- Paiva, L., Lima, E., Neto, A. I., Marccone, M., & Baptista, J. (2017). Nutritional and functional bioactivity value of selected Azorean macroalgae: *Ulva compressa*, *Ulva rigida*, *Gelidium microdon*, and *Pterocladella capillacea*. *Journal of Food Science*, 82(7), 1757-1764, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13778>
- Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive compounds and properties of seaweeds—A review. *Open Access Library Journal*, 1(4), 1-17, [10.4236/oalib.1100752](https://doi.org/10.4236/oalib.1100752),
- Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. (2018). Palmitic and oleic acid: the yin and yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(3), 178-190, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>
- Parsaeimehr, A., & Chen, Y. F. (2013). Algal bioactive diversities against pathogenic microbes. *Microbiol Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, 796-803, ISBN: 978-84-942134-0-3
- Di Pasquale, M. G. (2009). The essentials of essential fatty acids. *Journal of dietary supplements*, 6(2), 143-161, [10.1080/19390210902861841](https://doi.org/10.1080/19390210902861841)
- Patarra, R. F., Iha, C., Pereira, L., & Neto, A. I. (2020). Concise review of the species *Pterocladella capillacea* (SG Gmelin) Santelices & Hommersand. *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 787-808, [10.1007/s10811-019-02009-y](https://doi.org/10.1007/s10811-019-02009-y)
- 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>
- Paul, N. A., Cole, L., De Nys, R., & Steinberg, P. D. (2006). Ultrastructure of the gland cells of the red alga *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniaceae). *Journal of Phycology*, 42(3), 637-645, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00226.x>
- Paul, C., & Pohnert, G. (2011). Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae. *Natural Product Reports*, 28(2), 186-195, [10.1039/C0NP00043D](https://doi.org/10.1039/C0NP00043D)
- Pereira, L. (2004). Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa—aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos. FCTUC, University of Coimbra, <http://hdl.handle.net/10316/10017>
- Pereira, L. (2011). A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. *Seaweed: Ecology, nutrient composition and medicinal uses*, 15-47, Retrieved November 17, 2020, from https://www.researchgate.net/publication/235767788_A_review_of_the_nutrient_composition_of_selected_edible_seaweeds
- Piñeiro-Corbeira, C., Barreiro, R., Cremades, J., & Arenas, F. (2018). Seaweed assemblages under a climate change scenario: Functional responses to temperature of eight intertidal seaweeds match recent abundance shifts. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31357-x>
- 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 and Biotechnology*, 31(3), 445-451, <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1797-2>

- Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Horta, A., Fino, N., Rodrigues, A. I., Mendes, S. & Pedrosa, R. (2017). Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). *Food Chemistry*, 218, 591-599, [10.1016/j.foodchem.2016.09.067](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.067)
- Pinteus, S., Lemos, M. F., Alves, C., Neugebauer, A., Silva, J., Thomas, O. P., Botana, L. M., Gaspar, H., & Pedrosa, R. (2018). Marine invasive macroalgae: Turning a real threat into a major opportunity-the biotechnological potential of *Sargassum muticum* and *Asparagopsis armata*. *Algal Research*, 34, 217-234, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.018>
- Pinteus, S., Lemos, M. F., Alves, C., Silva, J., & Pedrosa, R. (2020). The marine invasive seaweeds *Asparagopsis armata* and *Sargassum muticum* as targets for greener antifouling solutions. *Science of The Total Environment*, 750, 141372, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141372>
- Ragonese, C., Tedone, L., Beccaria, M., Torre, G., Cichello, F., Cacciola, F., Dugo, P. & Mondello, L. (2014). Characterisation of lipid fraction of marine macroalgae by means of chromatography techniques coupled to mass spectrometry. *Food Chemistry*, 145, 932-940, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.130>
- Rahikainen, M., & Yang, B. (2020). Macroalgae as food and feed ingredients in the Baltic Sea region—regulation by the European Union. *Report of the Interreg project Growing Algae Sustainably in the Baltic Sea (GRASS) - WP 3.4 Unlocking the potential of using macroalgae for food purposes*. p. 1-20.
- Rao, P. S., Periyasamy, C., Kumar, K. S., Rao, A.S., & Anantharaman, P. (2019). Seaweeds: Distribution, Production and Uses. *Bioprospecting of Algae*, 6, 59-78.
- Rastogi, R. P., Singh, S. P., Incharoensakdi, A., Häder, D. P., & Sinha, R. P. (2014). Ultraviolet radiation-induced generation of reactive oxygen species, DNA damage and induction of UV-absorbing compounds in the cyanobacterium *Rivularia* sp. HKAR-4. *South African Journal of Botany*, 90, 163-169, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.11.006>
- Rasyid, A., Ardiansyah, A., & Pangestuti, R. (2019). Nutrient composition of dried seaweed *Gracilaria gracilis*. *Indones J Mar Sci*, 24, 1-6, [10.14710/ik.ijms.24.1.1-6](https://doi.org/10.14710/ik.ijms.24.1.1-6)
- Rasyid, A., & Handayani, T. (2019). Evaluation of the biochemical composition of tropical red seaweeds *Galaxaura rugosa* and *Gelidiella acerosa* from Ujung Genteng waters, Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 12(2), 601-609.
- Regal, A. L., Alves, V., Gomes, R., Matos, J., Bandarra, N. M., Afonso, C., & Cardoso, C. (2020). Drying process, storage conditions, and time alter the biochemical composition and bioactivity of the anti-greenhouse seaweed *Asparagopsis taxiformis*. *European Food Research and Technology*, 246(4), 781-793, [10.1007/s00217-020-03445-8](https://doi.org/10.1007/s00217-020-03445-8)
- Rengasamy, K. R., Amoo, S. O., Aremu, A. O., Stirk, W. A., Gruz, J., Šubrtová, M., Doležal, K. & Van Staden, J. (2015). Phenolic profiles, antioxidant capacity, and acetylcholinesterase inhibitory activity of eight South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1599-1605, <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0438-8>
- Rhimou, B., Hassane, R., & Nathalie, B. (2010). Antiviral activity of the extracts of Rhodophyceae from Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 9(46), 7968-7975.
- Robledo, D., & Freile-Pelegrin, Y. (1997). Chemical and mineral composition of six potentially edible seaweed species of Yucatan. *Botanica Marina*, 40(4), 301-306, <https://doi.org/10.1515/botm.1997.40.1-6.301>
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heur, O.E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Bano, J., Rolain, J.-M., Segovia, C., Sigauque, B., Tacconelli, E., Wellington, E., & Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes and New Infections*, 6, 22-29, <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N., & Calado, R. (2011). Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds—An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs*, 9(10), 1860-1886, <https://doi.org/10.3390/md9101860>
- Roque, B. M., Salwen, J. K., Kinley, R., & Kebreab, E. (2019). Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. *Journal of Cleaner Production*, 234, 132-138, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.193>

- Roque, B. M., Venegas, M., Kinley, R. D., de Nys, R., Duarte, T. L., Yang, X., & Kebreab, E. (2021). Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. *Plos one*, 16(3), e0247820, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247820>
- Rødde, R. S. H., Vårum, K. M., Larsen, B. A., & Mykkestad, S. M. (2004). Seasonal and geographical variation in the chemical composition of the red alga *Palmaria palmata* (L.) Kuntze. *Botanica Marina*, 47(2), 125-133, <https://doi.org/10.1515/BOT.2004.012>
- Saleem, S., Ahmed, B., Khan, M. S., Al-Shaeri, M., & Musarrat, J. (2017). Inhibition of growth and biofilm formation of clinical bacterial isolates by NiO nanoparticles synthesized from *Eucalyptus globulus* plants. *Microbial Pathogenesis*, 111, 375-387, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.019>
- Salvador, N., Garreta, A. G., Lavelli, L., & Ribera, M. A. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*, 71(1), 101-114, <https://doi.org/10.3989/scimar.2007.71n1101>
- Sánchez-Camargo, A. P., Montero, L., Cifuentes, A., Herrero, M., & Ibáñez, E. (2016). Application of Hansen solubility approach for the subcritical and supercritical selective extraction of phlorotannins from *Cystoseira abies-marina*. *RSC advances*, 6(97), 94884-94895, <https://doi.org/10.1039/C6RA16862K>
- Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Lopez-Hernandez, J., & Paseiro-Losada, P. (2004). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*, 85(3), 439-444, [10.1016/j.foodchem.2003.08.001](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.001)
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999, <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>
- Santelices, B. (1991). Production ecology of *Gelidium*. In *International Workshop on Gelidium* (pp. 31-44). Springer, Dordrecht, https://doi.org/10.1007/978-94-011-3610-5_3
- Sappati, P. K., Nayak, B., VanWalsum, G. P., & Mulrey, O. T. (2019). Combined effects of seasonal variation and drying methods on the physicochemical properties and antioxidant activity of sugar kelp (*Saccharina latissima*). *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1311-1332, <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1596-x>
- Sasso, S., Pohnert, G., Lohr, M., Mittag, M., & Hertweck, C. (2012). Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 761-785.
- Schiener, P., Black, K. D., Stanley, M. S., & Green, D. H. (2015). The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 363-373, <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0327-1>
- Schmid, M., Kraft, L. G., van der Loos, L. M., Kraft, G. T., Virtue, P., Nichols, P. D., & Hurd, C. L. (2018). Southern Australian seaweeds: a promising resource for omega-3 fatty acids. *Food Chemistry*, 265, 70-77, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.060>
- Sidi, O.A & Ben, M. (2014) Preparation of an antifungal soap from *Gelidium sesquipedale* waste. *Bothalia J.* 44, 9–16.
- Silva, C. O., Simões, T., Félix, R., Soares, A. M., Barata, C., Novais, S. C., & Lemos, M. F. (2021). *Asparagopsis armata* exudate cocktail: the quest for the mechanisms of toxic action of an invasive seaweed on marine invertebrates. *Biology*, 10(3), 223, <https://doi.org/10.3390/biology10030223>
- Silva, J. M. S. D. (1998). Ecofisiologia de *Gelidium sesquipedale*: efeitos da temperatura e intensidade luminosa na fotossíntese, Doctoral dissertation, University of Algarve, Portugal. <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/7824>
- Silva, P., & Pereira, L. (2020). Concise review of *Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 2761-2771, <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02183-4>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144.article-info>
- Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B., & Krauss, R. M. (2010). Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. *Current Atherosclerosis Reports*, 12(6), 384-390, <https://doi.org/10.1007/s11883-010-0131-6>

- Soares, C., Sousa, S., Machado, S., Vieira, E., Carvalho, A. P., Ramalhosa, M. J., Morais, S., Correia, M., Oliva-Teles, T., Domingues, V., & Delerue-Matos, C. (2021). Bioactive Lipids of Seaweeds from the Portuguese North Coast: Health Benefits versus Potential Contamination. *Foods*, 10(6), 1366, <https://doi.org/10.3390/foods10061366>
- Sun, L., Wang, L., Li, J., & Liu, H. (2014). Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from two marine *Chrysophyta*. *Food Chemistry*, 160, 1-7, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.067>
- Susilowati, R., Sabdono, A., & Widowati, I. (2015). Isolation and characterization of bacteria associated with brown algae *Sargassum* spp. from Panjang Island and their antibacterial activities. *Procedia Environmental Science*, 23, 240-246, <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.01.036>
- Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H., & Samaranayake, L. P. (2006). Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 51(8), 672-680, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.02.005>
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., & Lall, S. P. (2016). Nutritional quality of some wild and cultivated seaweeds: Nutrient composition, total phenolic content and in vitro digestibility. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3575-3585, <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0863-y>
- Trioui, L., Byoud, F., Channaoui, S., Belghmi, K., Azzi, M., & Blaghen, M. (2017). Study of Chromium Biosorption by Four Atlantic Algae: *Gelidium sesquipedale*, *Gelidium corneum*, *Corallina officinalis*, and *Ulva lactuca*. *Am. J. Eng. Res.*, 6(6), 103-108.
- Trivedi, N., Baghel, R. S., Bothwell, J., Gupta, V., Reddy, C. R. K., Lali, A. M., & Jha, B. (2016). An integrated process for the extraction of fuel and chemicals from marine macroalgal biomass. *Scientific Reports*, 6(1), 1-8, <https://doi.org/10.1038/srep30728>
- Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 2019, <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985-992, [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
- Union, E. Commission Regulation (EU) 2015/1006 of 25 June 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of inorganic arsenic in foodstuffs. *European Union*.
- Van Ginneken, V. J., Helsper, J. P., de Visser, W., van Keulen, H., & Brandenburg, W. A. (2011). Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), [10.1186/1476-511X-10-104](https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-104)
- Vega, J., Bonomi-Barufi, J., Gómez-Pinchetti, J. L., & Figueroa, F. L. (2020). Cyanobacteria and Red Macroalgae as Potential Sources of Antioxidants and UV Radiation-Absorbing Compounds for Cosmeceutical Applications. *Marine Drugs*, 18(12), 659, <https://doi.org/10.3390/md18120659>
- Vijn, S., Compart, D. P., Dutta, N., Foukis, A., Hess, M., Hristov, A. N., Kalscheur, K.F., Kebreab, E., Nuzhdin, S. V., Price, N. N., Sun, Y., Tricarico, J. M., Turzillo, A., Weisbjerg, M. R., Yarish, C. & Kurt, T. D. (2020). Key Considerations for the Use of Seaweed to Reduce Enteric Methane Emissions from Cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1135, <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597430>
- Vuong, C., & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481-489, [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01563-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01563-0)
- Wahlström, N., Harrysson, H., Undeland, I., & Edlund, U. (2018). A Strategy for the Sequential Recovery of Biomacromolecules from Red Macroalgae *Porphyra umbilicalis* Kützinger. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 57(1), 42-53, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b03768>
- 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-Food Science and Technology*, 43(9), 1387-1393, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.010>
- Wiencke, C., Amsler, C. D., & Clayton, M. N. (2014). Macroalgae. In *Biogeographic Atlas of the Southern Ocean*. (pp. 66-73). *Scientific Committee on Antarctic Research*, [10013/epic.49964](https://doi.org/10.10013/epic.49964)
- Wiktorowska-Owczarek, A., Berezinska, M., & Nowak, J. Z. (2015). PUFAs: structures, metabolism and functions. *Adv Clin Exp Med*, 24(6), 931-941, [10.17219/acem/31243](https://doi.org/10.17219/acem/31243)

- Yan, X., Nagata, T., & Fan, X. (1998). Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52(3), 253-262, <https://doi.org/10.1023/A:1008007014659>
- Yeh, T. S., Hung, N. H., & Lin, T. C. (2014). Analysis of iodine content in seaweed by GC-ECD and estimation of iodine intake. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(2), 189-196, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.014>
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International journal of nanomedicine*, 15, 2555, [10.2147/IJN.S246764](https://doi.org/10.2147/IJN.S246764)
- Yousefi, M. K., Islami, H. R., & Filizadeh, Y. (2013). Effect of extraction process on agar properties of *Gracilaria corticata* (Rhodophyta) collected from the Persian Gulf. *Phycologia*, 52(6), 481-487, [10.2216/13-165.1](https://doi.org/10.2216/13-165.1)
- Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). *Botanica Marina*, 52(3), 268-277, <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.037>