

***Estudo comparativo da amostra de Kelps selvagens e de cultivo,  
para obtenção de bioprodutos de elevado valor***

**Henrique Silva Ferreira**

2024



**POLITÉCNICO  
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR  
DE TURISMO E  
TECNOLOGIA DO MAR

***Estudo comparativo da amostra de Kelps selvagens e de cultivo,  
para obtenção de bioprodutos de elevado valor***

**Henrique Silva Ferreira**

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

Dissertação realizada sob a orientação da Doutora Teresa Margarida Lopes da Silva Mouga,  
coorientação da Doutora Clélia Neves Afonso e da Doutora Sílvia Alexandra Pereira Lourenço

2024

Título: Estudo comparativo da amostra de *Kelps* selvagens e de cultivo, para obtenção de bioprodutos de elevado valor

Copyright © Henrique Silva Ferreira

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2024

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**

Esta etapa, como todas as outras, só foi possível graças ao apoio de diversas pessoas. Se não fosse o seu apoio, os seus conselhos e os seus sermões ao longo desta dissertação, esta jamais veria a luz do dia. Assim, cada uma das pessoas que se seguem, merece o meu mais sincero agradecimento:

Em primeiro lugar, tenho de agradecer aos meus pais e avós, pela oportunidade de prosseguir os meus estudos, assim como por todo o apoio e carinho que sempre me deram. À minha irmã pelas suas fofocas e as implicâncias com o Kiko que me faziam espiaçar a cabeça e que tanto me faziam rir. Também tenho de deixar um agradecimento ao senhor Luís Paulo, à Betinha e à Dona Ana Maria que me aturaram quando as coisas não corriam bem no laboratório.

Um agradecimento especial a ti Margarida, pela força que me deste, pela paciência por ouvires os meus três milhões de pensamentos para com os resultados desta dissertação, pelos mil milhões de abre-olhos, pelas horas em que trocaste o sono para me ajudares, pelo apoio e coragem que me deste ao longo deste caminho, principalmente quando as coisas se tornavam mais complicadas.

Aos meus melhores amigos, Jorge, Petra, Bernardo, Filipa, Margarida Silva, Uriel e Rafael, que mesmo perto ou longe (sejam por 100 km ou por um oceano de distância) sempre me apoiaram, me ouviram e, principalmente, faziam com que eu me mantivesse atualizado de todas as fofocas de última hora.

Às Professoras Teresa Mouga, Clélia Afonso e Sílvia Lourenço, por me terem proposto um desafio deveras interessante, e por todos os valiosos ensinamentos, supervisão, orientação, paciência e amizade oferecidos ao longo do caminho, sem falar das diversas sessões de psicologia para amenizar o meu “sofrer por antecipação”.

A todos os meus colegas de biotecnologia de Recursos Marinhos, em especial ao meu “irmão gémeo” Miguel Oliveira e às três meninas que me acompanham ao longo deste 5 aninhos: a Andreia, a Victoria e a Joana. Agradecimento especial à Ana Gomes, Édina Blasi, Marta Freitas, Madalena Antunes e ao Leonardo Inácio por terem tido tanta paciência para me aturar durante este tempo todo, pelas valiosas ajudas, partilha de conhecimento e pelos bons momentos.

E também em homenagem aos meus bisavós e à minha avó paterna.

## Resumo

O objetivo principal desta dissertação foi comparar as amostras de macroalgas castanhas selvagens (*Laminaria ochroleuca* e *Saccorhiza polyschides*) e de cultivo (*Macrocystis pyrifera*), assim como a fração não solúvel resultante da extração aquosa de *Macrocystis pyrifera*, denominada como resíduo de extração aquosa. A intenção foi caracterizar as diferentes amostras, visando a produção de bioprodutos de elevado valor, explorando assim o potencial bioquímico e as bioatividades.

Em termos gerais e tal como esperado, tanto o resíduo como as macroalgas, apresentam uma baixa percentagem de lípidos. O valor mais baixo de matéria gorda total foi registado em *Macrocystis pyrifera* (1,3%), enquanto as restantes amostras tiveram valores superiores: o resíduo apresentou teor lipídico de 2,4%, a *Laminaria ochroleuca* de 2,8% e a *Saccorhiza polyschides* apresentou um valor de 3,3%.

É de salientar a proporção de vários ácidos gordos como o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1n9 cis), ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, C18:3) e ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5). O rácio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 foi superior a 1 em todas as macroalgas, exceto no resíduo. O teor proteico das amostras foi de aproximadamente 9% DW.

Quanto à quantificação elementar, foram detetados vários minerais essenciais como o fósforo, potássio e cálcio. O elemento dominante nesse ensaio foi o potássio, quantificado em maior proporção na *Macrocystis pyrifera* e no resíduo de extração aquosa, com valores de 67,72 e 56,07 mg.g<sup>-1</sup>, respetivamente. Destaca-se a deteção de arsénio, um metal pesado.

Os extratos hidroetanólicos das mesmas amostras, não apresentaram capacidade para redução significativa do radical DPPH. Relativamente à redução do ião Fe<sup>3+</sup>, todas as amostras testadas apresentaram atividade. O resíduo de extração e a *Saccorhiza polyschides* apresentaram o conteúdo mais elevado de polifenóis (4,86 e 4,94 mg GAE.g<sup>-1</sup> extrato, respetivamente). Nenhuma das amostras apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*.

Palavras-Chave: Análise elementar, Potencial biotecnológico, *Laminaria ochroleuca*, *Macrocystis pyrifera*, *Saccorhiza polyschides*;

## Abstract

The main objective of this work was to compare the biomasses of wild (*Laminaria ochroleuca* and *Saccorhiza polyschides*) and cultivated (*Macrocystis pyrifera*) brown macroalgae, as well as the insoluble fraction obtained from an aqueous extraction of *Macrocystis pyrifera*, known as the aqueous extraction residue. The aim was to characterize the different biomasses with a view to producing high value bioproducts, thus exploring their biochemical potential and bioactivities. In general, and as expected, both the residue and the macroalgae had a low lipid content. The lowest total lipid content was found in *Macrocystis pyrifera* (1.3%). The other samples had a higher percentage of lipids: the residue had a lipid content of 2.4%, *Laminaria ochroleuca* 2.8% and *Saccorhiza polyschides* 3.3%. Of note are the proportions of various fatty acids such as palmitic acid (C16), oleic acid (C18:1n9 cis), alpha-linolenic acid (ALA - C18:3) and eicosapentaenoic acid (EPA - C20:5). The omega 6/omega-3 ratio was greater than 1 in all macroalgae, except for the residue, which had a ratio of less than 1. The protein content of the samples was approximately 9% DW.

In terms of elemental quantification, several essential minerals were detected, such as phosphorus, potassium, chlorine and calcium. The dominant element in this test was potassium, which was quantified to a great extent in *Macrocystis pyrifera* and in the aqueous extraction residue, with values of 67.72 and 56.07 mg.g<sup>-1</sup>, respectively. The presence of a heavy metal such as arsenic has also been identified.

The hydroethanolic extracts of the same biomasses showed no significant ability to reduce the DPPH radical. With regard to the reduction of Fe<sup>3+</sup> ions, all the extracts tested showed activity.

The extract residue and *Saccorhiza polyschides* had the highest polyphenol content with 4.86 and 4.94 mg GAE.g<sup>-1</sup> extract, respectively. None of the samples showed no antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*.

Keywords: Biotechnological potential; Elemental analysis, *Saccorhiza polyschides*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria ochroleuca*.

<b>Índice</b>	
Agradecimentos.....	iv
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas .....	xi
1.Introdução.....	1
1.1.Composição Bioquímica das Macroalgas Castanhas.....	1
1.2.Aquacultura de Macroalgas .....	5
1.3. <i>Kelps</i> e Florestas Marinhas.....	6
1.4.Ciclo de Vida.....	8
1.5.Macroalgas em Estudo .....	9
1.5.1. <i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C.Agardh 1820.....	9
1.5.2. <i>Laminaria ochroleuca</i> Bachelot de la Pylaie 1824 .....	10
1.5.3. <i>Saccorhiza polyschides</i> (Lightfoot) Batters 1902.....	11
1.6.Objetivos.....	13
2.Materiais e Métodos.....	14
2.1.Recolha e Processamento da Biomassa Algal .....	14
2.2.Determinação do Perfil Bioquímico .....	16
2.2.1.Teor de Humidade.....	16
2.2.2.Teor de Cinzas .....	16
2.2.3.Conteúdo Proteico Total .....	16
2.2.4.Matéria Gorda Total.....	17
2.2.5.Teor e Perfil de Ácidos gordos.....	18
2.2.6.Quantificação do Conteúdo em Hidratos de Carbono .....	18
2.2.7.Quantificação Elementar por XRF .....	19
2.3.Extração e Caraterização de Alginatos .....	19
2.4.Extração e Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos.....	20
2.5.Preparação de Extratos brutos Hidroetanólicos .....	21
2.6.Avaliação da Atividade Antioxidante .....	22
2.6.1.Quantificação Total de Polifenóis(QTP).....	22
2.6.2.Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	23
2.6.3.Potencial de Redução do Poder do Ião Ferro (III)(FRAP).....	24
2.7.Atividade Antimicrobiana .....	24

2.7.1.Estirpes Microbianas .....	24
2.7.2.Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....	25
2.8.Análise estatística .....	26
3.Resultados .....	27
3.1.Teor de Humidade e Cinzas .....	27
3.2.Conteúdo Proteico, Matéria Gorda total e Hidratos de Carbono.....	28
3.3.Teor e Perfil de Ácidos gordos .....	29
3.4.Quantificação Elementar por XRF .....	31
3.5.Extração e Caraterização de Alginatos .....	32
3.6.Extração e Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos .....	35
3.7. Avaliação da Atividade Antioxidante .....	37
3.7.1.Quantificação Total de Polifenóis(QTP).....	37
3.7.2.Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	38
3.7.3.Potencial de Redução do Poder do Ião Ferro (III)(FRAP).....	39
3.8. Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....	40
4.Discussão .....	41
4.1.Teor de Humidade e Cinzas .....	41
4.2.Conteúdo Proteico, Matéria Gorda total e Hidratos de Carbono.....	43
4.3.Teor e Perfil de Ácidos gordos .....	46
4.4.Quantificação Elementar por XRF .....	49
4.5.Extração e Caraterização de Alginatos .....	51
4.6.Extração e Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos .....	53
4.7. Avaliação da Atividade Antioxidante .....	54
4.7.1.Quantificação Total de Polifenóis(QTP).....	54
4.7.2.Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	55
4.7.3.Potencial de Redução do Poder do Ião Ferro (III)(FRAP).....	56
4.8. Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....	57
5.Conclusão .....	58
6.Bibliografia .....	60

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos alginatos de macroalgas castanhas: a) monómeros dos alginatos ácido $\beta$ -D-manurónico (M) e ácido $\alpha$ -L-gulurónico (G), b) estrutura da cadeia dos alginatos e c) composição de blocos de alginato com alternância entre blocos M, blocos G e MG (Fonte: Rhee & Steinbuchel, 2005) .....	3
<b>Figura 2.</b> Distribuição global de florestas de kelps por géneros (Eger & Wenberg, 2022) .....	7
<b>Figura 3.</b> Morfologia dos talos dos kelps (Fonte: Eger et al., 2022) .....	8
<b>Figura 4.</b> Esquema ilustrativo do ciclo de vida de um kelp (Fonte: Assis et al., 2011) ....	9
<b>Figura 5.</b> Cultivo de <i>Macrocystis pyrifera</i> em mar aberto (Fonte: Kelp Forest Foundation) .....	10
<b>Figura 6.</b> <i>Laminaria ochroleuca</i> (Fonte: A. Gallego@MARE-IPL).....	11
<b>Figura 7.</b> <i>Saccorhiza polyschides</i> , Praia das Pedras Muitas (Casais do Baleal - Peniche).....	12
<b>Figura 8.</b> Fluxograma resumo das análises realizadas (criado com Biorender.com) ....	15
<b>Figura 9.</b> Espetros de FTIR do alginato de sódio das diferentes amostras extraídos a diferentes temperaturas: A - <i>Laminaria ochroleuca</i> , B - <i>Macrocystis pyrifera</i> , C - Resíduo extração aquosa, D - <i>Saccorhiza polyschides</i> .....	34
<b>Figura 10.</b> Polifenóis totais dos extratos expressos em mg GAE.g <sup>-1</sup> , onde GAE significa equivalente de ácido gálico. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3) Os sobrescritos <sup>a, b, c</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas entre extratos hidroetanólicos das 4 amostras testadas (p < 0,05).....	37
<b>Figura 11.</b> EC50 (mg.mL) observado nos extratos hidroetanólicos das 4 amostras testadas. Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).....	38
<b>Figura 12.</b> Capacidade de redução do ião ferro, pelos extratos hidroetanólicos (mmol eq Fe/g de extrato) das 4 amostras testadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Os sobrescritos <sup>a, b, c</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes extratos hidroetanólicos (p < 0,05) .....	39
<b>Figura 13.</b> Observação a microscópio ótico de A - <i>Macrocystis pyrifera</i> e B - Resíduo extração aquosa de <i>Macrocystis pyrifera</i> (Ampliação total 400 $\times$ ) .....	49

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I.</b> Lista das espécies estudadas, ordem taxonómica, época e local de colheita	15
<b>Tabela II.</b> Temperaturas e meios de referência para a revitalização das estirpes bacterianas	25
<b>Tabela III.</b> Teor de humidade e cinzas das macroalgas frescas. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 4).	27
<b>Tabela IV.</b> Teor de cinzas das macroalgas secas e do resíduo resultante de uma extração aquosa. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 4).	27
<b>Tabela V.</b> Proporção do conteúdo proteico, matéria gorda total e hidratos de carbono das amostras, em percentagem em peso seco (%DW). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).	28
<b>Tabela VI.</b> Teor e perfil de ácidos gordos totais extraídos das amostras analisadas. Os resultados são apresentados como (média $\pm$ desvio padrão, n = 3)	30
<b>Tabela VII.</b> Quantidade de macronutrientes e micronutrientes expressos em $\text{mg.g}^{-1}$ das amostras em estudo. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).	32
<b>Tabela VIII.</b> Rendimento de extração de alginatos e temperatura de extração alcalina. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).	33
<b>Tabela IX.</b> Concentração de fucoxantina, clorofila a e clorofila c ( $\text{mg.g}^{-1}$ DW) entre as diferentes amostras frescas de <i>Laminaria ochroleuca</i> e <i>Saccorhiza polyschides</i> . Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).	35
<b>Tabela X.</b> Concentração de fucoxantina, clorofila a e clorofila c ( $\text{mg.g}^{-1}$ DW) nas diferentes amostras secas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3)	36
<b>Tabela XI.</b> Valores referência nutricional de cada elemento químico: VRN	51

## Lista de Abreviaturas

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

%W/W – Concentração em peso

°C – Graus Celsius

$\mu\text{g.g}$  – Micrograma por grama

$\mu\text{L}$  – Microlitros

$\mu\text{m}$  – Micrómetros

ALA – Ácido  $\alpha$ -Linolénico

ARA – Ácido Araquidónico

BHT – Hidroxitolueno butilado (*Butylated Hydroxytoluene*)

DHA – Ácido docosa-hexaenóico

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate)

DW – Peso Seco (*Dry Weight*)

DW – Peso Seco (*Dry Weight*)

EC50 – Concentração Máxima Efetiva Média

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

EtOH – Etanol

EU – União Europeia

EUA – Estados Unidos da América

FA – Ácidos gordos (*Fatty Acids*)

FRAP – Poder Antioxidante de Redução do Ião Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*)

FW – Peso Fresco (*Fresh Weight*)

g – Gramas

GC – Cromatografia Gasosa

h – Horas

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido Sulfúrico

HCl – Ácido Clorídrico

L – Litros

m – Metro

M – Molar (mol/L)

mg – Miligramas

mg.g<sup>-1</sup> – Miligrama por grama

MH – Meio Muller Hinton

MIC – Concentração Mínima Inibitória (*Minimal Inhibitory Concentration*)

mL – Mililitro

mm – Milímetro

Mmol-Milimol

MUFA – Ácidos Gordos Monoinsaturados

n3 – Ômega-3

n6 – Ômega-6

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de Sódio

nm – Nanómetro

PDE – Exposição Diária Permitida

PUFA – Ácidos Gordos Polinsaturados

QTP – Quantificação de Polifenóis Totais (QTP)

SFA – Ácidos Gordos Saturados

VRN – Valores de Referência do Nutriente

XRF – Fluorescência de Raio X (*X-ray Fluorescence*)

## 1. Introdução

O planeta Terra tem a sua superfície coberta em mais de 70% por água, sendo que 96,5% corresponde aos oceanos e mares (Barbero et al., 2017).

Dentro dos recursos marinhos mais conhecidos e explorados, destacam-se as macroalgas. São organismos eucarióticos fotossintéticos, com cerca de 12 650 espécies descritas (Guiry & Guiry, 2024). Crescem em diversos ambientes e, na sua grande maioria, são organismos sésseis (Pereira, 2021). Podem-se considerar três grandes divisões de macroalgas marinhas: algas verdes (Chlorophyta), algas vermelhas (Rhodophyta) e algas castanhas (Ochrophyta). De acordo com Lee (2018), as macroalgas são divididas em três divisões devido à predominância de certos pigmentos. Os pigmentos naturais são diversos, podendo-se dividir três grupos diferentes: clorofilas, ficobiliproteínas e carotenoides. As algas verdes (Chlorophyta) recebem esse nome devido à predominância de clorofila *a* e *b*, as algas vermelhas (Rhodophyta) pela presença de ficobiliproteínas, como a ficoeritrina, e as algas castanhas (Phaeophyceae), devido à fucoxantina e clorofila *c*.

A divisão Ochrophyta é constituída por várias classes, das quais a classe mais conhecida é a classe Phaeophyceae. A classe evoluiu ao longo de mais de 450 milhões de anos (Choi et al., 2024), e, atualmente, engloba cerca de 300 géneros e aproximadamente 2000 espécies marinhas pluricelulares (Guiry & Guiry, 2024).

### 1.1. Composição Bioquímica das Macroalgas Castanhas

Desde há muitos séculos que a colheita e a utilização das macroalgas, se tornou a história e tradição dos povos asiáticos, sendo usadas como fonte nutricional e recurso medicinal (Freitas et al., 2022a). Com o avanço da ciência e da tecnologia, descobriu-se que é possível extrair compostos naturais de elevado valor a partir das algas marinhas, particularmente de macroalgas. A maioria das macroalgas são organismos sésseis, encontram-se fixas a um substrato e estão expostas a diversos fatores abióticos e bióticos. Como forma de proteção, as macroalgas moldam o seu metabolismo, resultando na produção de uma ampla gama de biocompostos. O perfil bioquímico das macroalgas, incluindo das macroalgas castanhas, depende de muitos fatores tais como: espécies, localização geográfica, altura do ano em que foi realizada a colheita, condições de cultivo, fase do ciclo de vida e métodos de processamento das mesmas (Bocanegra et al., 2009; Circuncisão et al., 2018).

Entre os biocompostos presentes nas macroalgas, destacam-se as proteínas; polissacáridos, lípidos, ácidos gordos, minerais, pigmentos e compostos fenólicos, os quais podem ser extraídos e aplicados em matrizes alimentares, bem como em produtos cosméticos, nutracêuticos e farmacêuticos (Pereira, 2016).

Apesar dessa diversidade de compostos bioativos, o perfil nutricional das macroalgas castanhas apresenta um teor proteico relativamente baixo, variando entre 3% e 15% do peso seco (DW). Em contraste, as macroalgas vermelhas e verdes contêm teores proteicos mais elevados, situando-se entre 10% e 47% DW (Lordan et al., 2011).

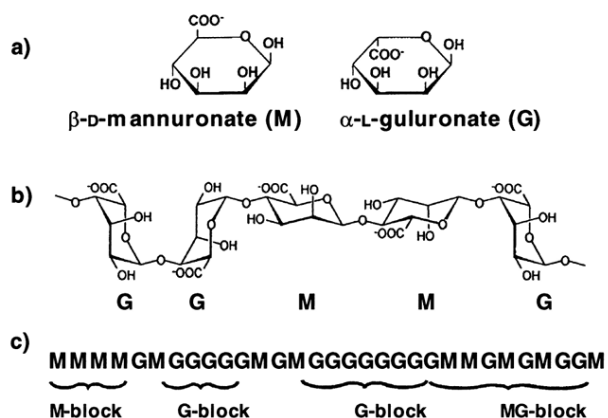
O teor lipídico das macroalgas castanhas é geralmente baixo, podendo variar entre 1 e 5% DW (Lordan et al., 2011). Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) representam uma grande parte da fração lipídica, sob a forma de ácidos gordos ómega-3 (n3) e ómega-6 (n6). Dentro dos ácidos gordos ómega-3, destaca-se o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n3), o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n3) e o ácido araquidónico (ARA, 20:4 n6), que são essenciais para a nutrição humana e animal (Khotimchenko et al., 2002). Além disso, estes ácidos gordos ómega-3 (n3), podem ser importantes para o funcionamento cerebral, além de terem um efeito supressor em doenças cardiovasculares, cancro, doenças mentais, asma, obesidade, entre outros (Bocanegra et al., 2009; Hodge et al., 1998; Miyashita et al., 2013; Schmid et al., 2014).

Os hidratos de carbono, como os polissacáridos, são o principal componente das algas castanhas e podem variar entre 50 e 60% DW (Flores-Contreras et al., 2023), destacando-se polissacáridos de 3 tipos diferentes: fucoidanos, alginatos e laminarinas.

As paredes celulares das macroalgas castanhas são constituídas por celulose, ácido algínico e fucoidano (Lee, 2018). Contêm também mucilagem, que é apenas constituída por ácido algínico e tem a capacidade de fornecer rigidez e flexibilidade, permitindo às macroalgas resistir às correntes marítimas e à ondulação. Além disso, quando a alga fica exposta ao ar e à luz solar durante a maré baixa, a mucilagem ajuda a evitar a dessecação, garantindo a sobrevivência em ambientes intertidais.

Os alginatos são abundantes nas macroalgas castanhas e constituem até 40-47% do seu peso seco (Holdt & Kraan, 2011). O alginato ou ácido algínico é constituído principalmente por dois monómeros: ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G). Estes monómeros estão ligados entre si através de 1-4 ligações glicosídicas para formar cadeias lineares. Estes dão origem a três tipos de dímeros, nomeadamente dois dímeros homopoliméricos (GG, MM) e um dímero heteropolimérico (MG ou GM) (Hotchkiss & Murphy, 2015) (Figura 1).

A proporção de dímeros M e G no alginato varia consoante a espécie de macroalga e as condições em que este foi extraído. O alginato com uma maior proporção de dímeros G tende a formar géis mais fortes, quando comparado com alginatos com uma maior proporção de resíduos M, que tendem a formar alginatos mais viscosos ou permanecem solúveis em água. Além disso, com uma maior quantidade de dímeros M, o alginato fica mais viscoso, por outro lado, quanto mais dímeros G existirem na constituição, mais marcadas são as propriedades gelificantes (Gombotz et al., 2012; Saji et al., 2022; Flores-Contreras et al., 2023).



**Figura 1.** Estrutura química dos alginatos de macroalgas castanhas: a) monómeros dos alginatos ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), b) estrutura da cadeia dos alginatos e c) composição de blocos de alginato com alternância entre blocos M, blocos G e MG (Fonte: Rhee & Steinbuchel, 2005)

Os alginatos são amplamente utilizados como agentes espessantes, gelificantes e estabilizantes, tendo aplicações em diversos setores industriais: alimentar (molhos para salada, gelados, cerveja, geleias e bebidas lácteas), cosmética (champô, batons, cremes), farmacêutica, ou mesmo para produção de papel e de tintas (Cardoso et al., 2014; Pereira & Ribeiro-Claro, 2015).

As clorofilas são pigmentos apolares esverdeados, presentes em todos os organismos fotossintéticos. O principal tipo de clorofila presente em todos os organismos fotossintéticos é a clorofila *a*, responsável pela conversão química da energia solar. No entanto, existem outros tipos de clorofilas como a clorofila *b*, *c*, *d*, e *f* (Gallardo, 2015).

As ficobiliproteínas são os pigmentos que conferem à maioria dos organismos do grupo Cyanobacteria a sua cor azul-esverdeada e à divisão Rhodophyta a sua cor vermelha (Carvalho & Pereira, 2015).

Os carotenóides são pigmentos apolares que desempenham um papel fundamental na fotoproteção, inativando as espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas durante a exposição à luz. São divididos em duas classes distintas: os carotenos (por exemplo o  $\beta$ -caroteno e licopeno), que são hidrocarbonetos insaturados, e as xantofilas (como a fucoxantina e violaxantina), que são semelhantes aos carotenos, mas têm na sua constituição um grupo funcional que contém átomos de oxigênio (Gallardo, 2015; Carvalho & Pereira, 2015).

A fucoxantina, ao ser o pigmento predominante das algas castanhas, é responsável pela coloração castanha-amarelada ou castanho-escuro (Din et al., 2022). Pode ser utilizada na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica (Lourenço-Lopes et al., 2020). Tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas, anti-obesidade, neuroprotetoras, anticancerígenas e fotoprotetoras (Din et al., 2022).

As macroalgas, oferecem pigmentos naturais que, por sua vez, podem ser usados para substituir corantes sintéticos em várias indústrias como a alimentar, cosmética, entre outras (Carvalho & Pereira, 2015). As macroalgas são conhecidas também pelo seu conteúdo mineral. Contêm 10 a 20 vezes mais quantidade de minerais quando comparadas com as plantas terrestres (Muñoz & Diaz, 2020).

A composição mineral varia de acordo com a divisão da macroalga, bem como vários outros fatores, como por exemplo, variações sazonais, ambientais e geográficas (Mabeau & Fleurence, 1993).

No corpo humano podemos encontrar diversos nutrientes, e podemos dividir estes elementos em dois grupos: os macronutrientes, mais abundantes (cerca de 99% do peso corporal), e micronutrientes, que correspondem a 0,02% do peso corporal. Os elementos mais abundantes estão envolvidos em ligações covalentes, em manutenções eletrolíticas e são importantes constituintes dos tecidos, enquanto que os micronutrientes desempenham vários processos metabólicos (Wada, 2004).

O teor de macronutrientes e micronutrientes das algas castanhas é elevado, com 30-39% DW (Kim, 2011). As macroalgas castanhas têm taxas de absorção de minerais superiores às apresentadas pelas macroalgas verdes e vermelhas, devido à presença dos alginatos e sais de ácido algínico. Estes, por sua vez, têm grande afinidade com sais de cálcio, magnésio, sódio e potássio (Muñoz & Diaz, 2020).

As macroalgas castanhas, quando ingeridas são uma fonte valiosa de minerais essenciais que desempenham funções vitais no corpo humano. Entre os principais minerais encontrados nessas algas, estão o sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), cloro

(Cl), magnésio (Mg) e fósforo (P), além de micronutrientes como ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), cobalto (Co), molibdênio (Mo), selênio (Se) e iodo (I). Esses minerais são fundamentais para o funcionamento saudável do organismo (Muñoz & Diaz, 2020).

O iodo é indispensável para o funcionamento normal da glândula tireoide. A deficiência de iodo pode levar a problemas de saúde como bócio. Outros minerais, como o ferro e o zinco, são essenciais para a formação de células sanguíneas e para a função imunológica. O cálcio e o magnésio, presentes em abundância nas macroalgas castanhas, são cruciais para a saúde óssea, contração muscular e transmissão nervosa (Muñoz & Diaz, 2020; Mann & Truswell, 2002).

No entanto, as algas marinhas acumulam não só os minerais desejáveis, mas também metais indesejáveis, que podem afetar a sua segurança para consumo humano. Os minerais tóxicos, tais como o mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As) têm efeitos adversos nos organismos. O cádmio pode causar disfunção renal irreversível e aumentar o risco de cancro do pulmão. Por sua vez, a exposição ao mercúrio afeta principalmente os sistemas nervoso central e periférico, levando a diversas perturbações nos sistemas nervoso, digestivo e imunitário (Circuncisão et al., 2018)

## **1.2. Aquacultura de Macroalgas**

A aquacultura desempenha uma função vital na sociedade tanto para a produção de alimentos, como para fornecimento de emprego de milhões de pessoas, onde muitas das quais vivem e dependem da aquacultura para subsistência (FAO, 2020). Com o aumento populacional previsto, é espectável o aumento do desenvolvimento da produção de amostra algal através de aquacultura para diversos fins, tanto para produtos alimentares como para a produção de compostos com utilização diversa (nutracêutica, cosmética, ficocolóides, biocombustíveis).

Desde o ano 2000 que a produção mundial de macroalgas marinhas tem vindo a aumentar, passando de 10,6 milhões de toneladas para 35 milhões de toneladas (FAO, 2022). O cultivo global de algas, dominado por macroalgas marinhas, cresceu meio milhão de toneladas em 2020, um aumento de 1,4% em relação aos 34,6 milhões de toneladas em 2019.

A cultura de macroalgas marinhas é feita num crescente número de países, sendo dominada por países asiáticos, incluindo a China e o Japão, que registaram um

crescimento em 2020, enquanto as colheitas de algas marinhas diminuíram no Sudeste Asiático e na República da Coreia (FAO, 2022).

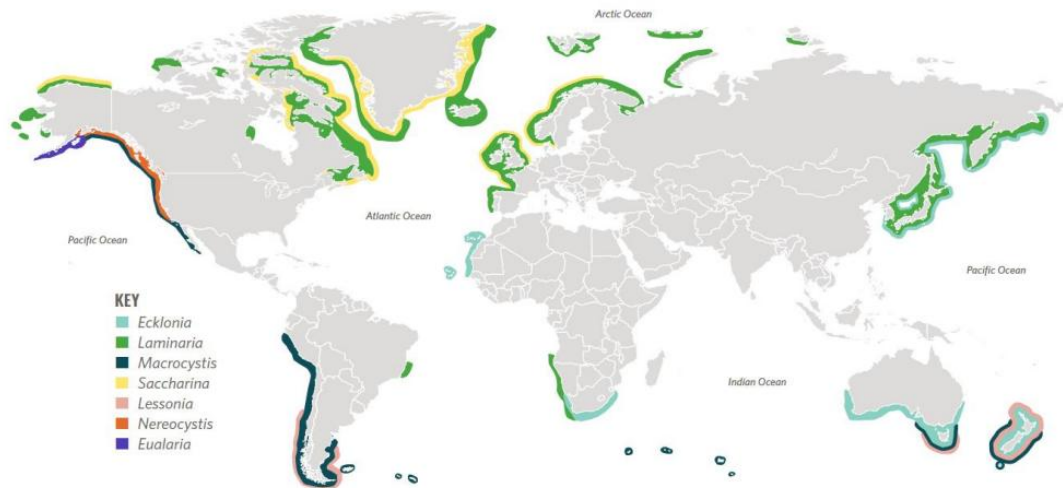
Em 2020, destacou-se o cultivo de algumas espécies da classe Phaeophyceae como a *Saccharina japonica* e a *Undaria pinnatifida*, que atingiram, no mesmo ano, cerca de 12,5 e 2,8 milhões toneladas, respectivamente.

As principais espécies cultivadas comercializadas no mercado europeu são: *Saccharina latissima*, *Alaria esculenta*, *Ulva* sp. e, em menores quantidades, a *Porphyra* spp., *Palmaria palmata*, *Codium tomentosum*, *Gracilaria gracilis* e *Laminaria digitata*. Estas são utilizadas como ingredientes alimentares, alimentos para animais e suplementos, bem como produtos médicos, cosméticos, nutracêuticos, farmacêuticos, biomateriais e energia (Barbier et al., 2019).

Existe uma ampla variedade de métodos de cultivo de algas marinhas. Podem ser *onshore* ou *offshore*. O cultivo *onshore* baseia-se numa produção em sistemas fechados, em tanques, onde a água é mantida sob agitação, para manter as algas suspensas e periodicamente expostas à luz. Em contrapartida, o sistema *offshore* é um cultivo a alguma distância da costa em estruturas flutuantes. Os métodos de cultivo *offshore* podem ser em: cordas, cultivo em rede ou em jangadas flutuantes (Radulovich et al., 2015).

### **1.3. Kelps e Florestas Marinhas**

As macroalgas castanhas crescem em diversos ambientes, desde regiões temperadas a regiões polares, diminuindo a sua frequência à medida que nos aproximamos dos trópicos (Figura 2). Há, todavia, exceções, como o caso de organismos pertencentes ao género *Sargassum* que surgem abundantemente em águas tropicais (Aaron-Amper et al., 2020). Conhecidas pela diversidade de formatos e tamanhos, podem variar desde pequenos filamentos até grandes parenquimatosas, como os *kelps*.

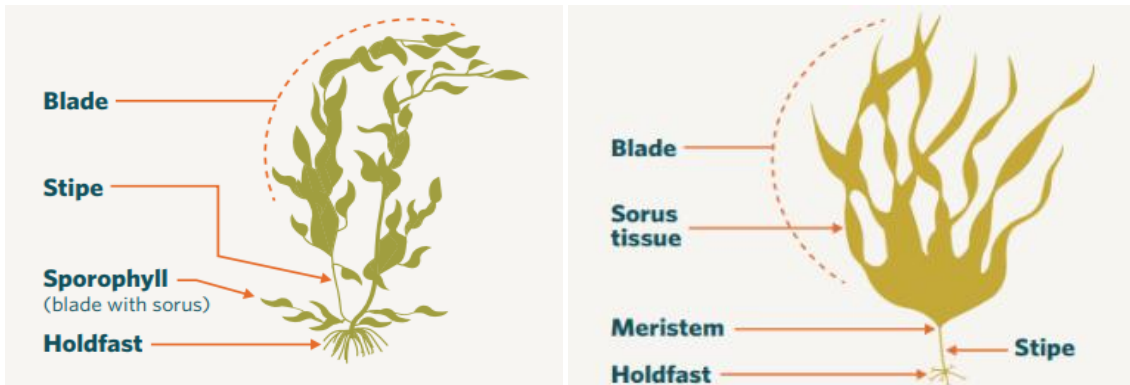


**Figura 2.** Distribuição global de florestas de *kelps* por gêneros (Eger & Wenberg, 2022)

O termo *kelp* é um termo não taxonômico e refere-se às grandes algas castanhas que pertencem tipicamente às ordens Laminariales e Tilopteridales. Atualmente são conhecidas cerca de 112 espécies de *kelps* (SeaForester, 2024). Estes dominam as zonas intertidal e subtidal rochosas pouco profundas.

Em relação à morfologia dos *kelps*, têm um talo que é composto principalmente por três estruturas: órgão de fixação (*holdfast*), estipe (*stipe*) e lâminas (*blades*) (Figura 3). Para além dessas estruturas, podem também ter um único ou vários pneumatocitos, permitindo assim que a macroalga se mantenha em suspensão na coluna de água. O órgão de fixação permite que a macroalga esteja fixa ao substrato rochoso.

Entre as lâminas e o órgão de fixação, existe o estipe que pode alcançar mais de 40 metros de comprimento, é resistente, mas flexível, suportando o hidrodinamismo. O crescimento do talo deve-se à atividade de um meristema, que se encontra entre o estipe e as lâminas. A reprodução na maioria dos *kelps* dá-se através da degradação das células reprodutivas, os soros. Como se pode verificar pela Figura 3, dependendo da espécie, o soro pode estar localizado na lâmina ou no estipe. Dentro do soro encontra-se o esporângio, que contém os esporos, os quais fazem a reprodução da alga (Eger et al., 2022). Por último, o número de lâminas pode variar desde uma ou várias lâminas planas.



**Figura 3.** Morfologia dos talos dos *kelps* (Fonte: Eger et al., 2022)

Quando os *kelps* estão presentes em elevadas densidades, formam as conhecidas florestas marinhas. Em Portugal, podem-se encontrar algumas espécies de *kelp*, nomeadamente a *Laminaria hyperborea*, *Laminaria ochroleuca*, *Saccharina latissima*, *Undaria pinnatifida*, *Phyllariopsis brevipes* e *Phyllariopsis purpurascens* (Assis et al., 2011).

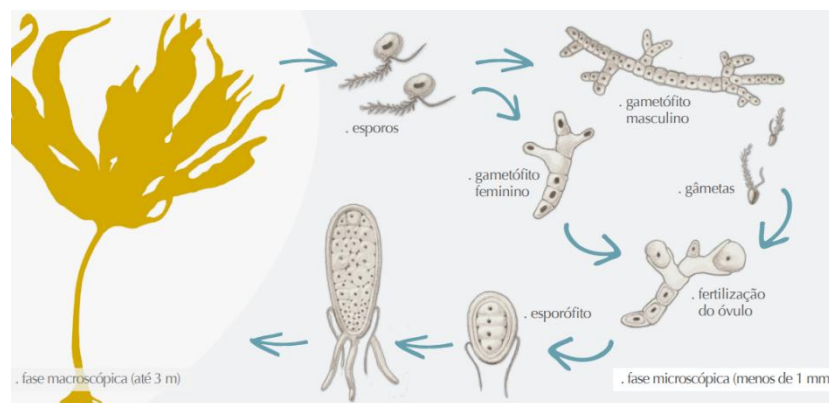
As florestas de *kelps*, bem como os recifes de coral e as pradarias de ervas marinhas, são ecossistemas muito importantes para inúmeras espécies marinhas. As florestas marinhas desempenham um papel fundamental na estruturação dos ecossistemas marinhos: influenciam alguns fatores ambientais (tais como a sedimentação e o fluxo de água), evitam a erosão das zonas costeiras e funcionam como sumidouros de CO<sub>2</sub>. Também são zonas de berçário para outras espécies marinhas e servem como fonte de alimento e abrigo (Wernberg et al., 2019).

#### 1.4. Ciclo de vida

Os *kelps* possuem um ciclo de vida diploide, caracterizado por um gametófito haploide microscópico e um esporófito diploide macroscópico. A fase gametófito, produtora de gâmetas, é formada por poucas células só visíveis ao microscópio (Figura 4). A fase esporófito é parenquimatosa e é possível observar a olho nu, sendo responsável pela produção de esporos (Assis et al., 2011), entre o inverno e a primavera. O esporófito atinge a maturidade e entra em período fértil entre o verão e o começo do outono.

O esporângio, desintegra-se e leva à libertação dos esporos que, por sua vez, se desenvolvem em gametófitos haploides masculinos e femininos, após agregação a um substrato (Pereira et al., 2011).

Os gametófitos libertam os gâmetas masculinos (anterozóides) e os gâmetas femininos (oosferas). Os gâmetas masculinos são biflagelados, permitindo que ocorra a fertilização, formando um zigoto que vai originar um novo esporófito diploide (Figura 4) (Pereira et al., 2011).



**Figura 4.**Esquema ilustrativo do ciclo de vida de um *kelp* (Fonte: Assis et al., 2011)

Consoante a duração do esporófito, as espécies podem ser classificadas como anuais ou perenes. Os *kelps* possuem um ciclo de vida perene, que tem duração superior a um ano, são exemplos a *Laminaria* spp., *Saccharina* spp. e *Macrocystis* spp. .

Em contraste, aqueles que têm um ciclo de vida anual são denominadas de pseudo-*kelps* e incluem-se na ordem Tilopteridales, sendo a espécie *Saccorhiza polyschides* um exemplo de pseudo-*kelp*.

## 1.5. Macroalgas em estudo

### 1.5.1. *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh 1820

A *Macrocystis pyrifera* (Figura 5), conhecida por *kelp* gigante, tem um crescimento rápido, podendo alcançar mais de 40 metros de comprimento. É uma macroalga que pode viver entre 5 e 8 anos. Morfologicamente, distingue-se pelos estipes longos, cilíndricos, flexíveis e ramificados dicotomicamente. As lâminas são rugosas e apresentam margens dentadas.

Na base das lâminas, a macroalga possui aerocistos ou vesículas gasosas. Tem uma distribuição geográfica vasta, ocorrendo em zonas temperadas do Oceano Pacífico oriental e do hemisfério sul (Pereira, 2016).

Esta alga é rica em minerais, como o iodo e o potássio (Pereira, 2016; Pérez-Alva et al., 2023) e pode ser utilizada em formulações de cremes para o rejuvenescimento da pele (Gold et al., 2023), para enriquecer rações (Gojon-Baez et al., 1998) ou como bioestimulante agrícola (Mansilla & Ávila, 2011).

Além disso, o seu alginato é utilizado na alimentação como emulsionante, gelificante ou estabilizador, em iogurtes e gelados (Purcell-Meyerink et al., 2021). Também pode ser utilizado como biomaterial graças às propriedades reológicas dos seus ficocolóides (Qin, 2008).



**Figura 5.** Cultivo de *Macrocystis pyrifera* em mar aberto (Fonte: *Kelp Forest Foundation*)

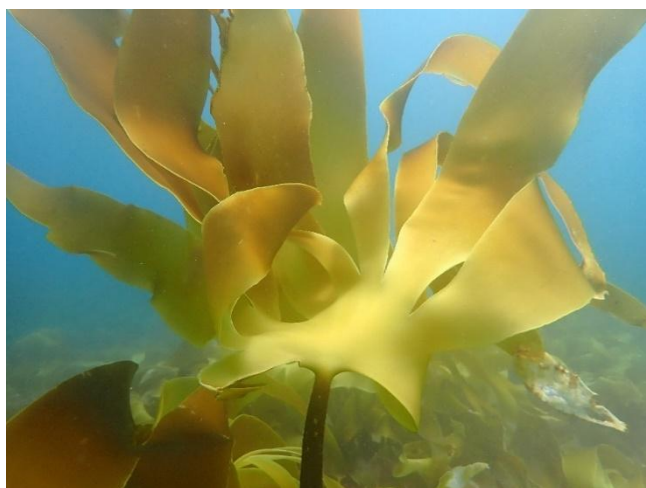
### **1.5.2. *Laminaria ochroleuca* Bachelot de la Pylaie 1824**

A macroalga, *Laminaria ochroleuca*, mais conhecida por *kombu*, é uma macroalga edível muito consumida nos países asiáticos. Cresce até aos 3 metros de comprimento, exibindo uma lâmina plana, dividida em segmentos lineares, que se expande abruptamente a partir de um estipe rígido, liso e cilíndrico.

A alga está fixa ao substrato por um órgão de fixação formado por pequenos rizoides (hápteros). Uma característica distintiva da espécie é o seu tom amarelado (Figura 6). Distribui-se entre os 3 e os 18 m de profundidade (Assis et al., 2011).

É uma macroalga perene que pode viver até cerca de 18 anos, e distribui-se ao longo de águas temperadas ao longo da costa atlântica (desde o sul do Reino Unido até Marrocos), podendo também ser encontrada nos Açores e em algumas áreas no Mediterrâneo. Em Portugal continental pode ser encontrada em toda a zona costeira (Assis et al., 2011; Pereira et al., 2019).

É uma espécie que ajuda a regular o trânsito intestinal e o peso corporal. Entra na confeção de pratos culinários para dar sabor. É uma espécie rica em minerais nomeadamente magnésio, cálcio e iodo. A presença de laminarinas confere a esta alga propriedades antirreumáticas e anti-inflamatórias (Freitas et al., 2022b).



**Figura 6.** *Laminaria ochroleuca* (Fonte: A. Gallego@MARE-IPL)

### **1.5.3. *Saccorhiza polyschides* (Lightfoot) Batters1902**

A macroalga castanha *Saccorhiza polyschides* (Figura 7), em Portugal é apelidada por vários nomes comuns “carocha”, “caixeira”, “cintas”, “golfe” ou “gulfo”, “limo-correia” e “limo-corriola” (Norton, 1970). É distinguida pelo seu estipe achatado, com vários centímetros de largura, helicoidal e com as margens onduladas nos indivíduos adultos, crescendo a partir de um grande órgão de fixação bolboso e rugoso e acabando por alargar em várias lâminas.

Como possui uma elevada semelhança com as algas da ordem Laminariales, durante muito tempo foi considerada uma alga do género *Laminaria*. De acordo com Salland et al. (2024), a fase esporófito pode durar entre 12 e 18 meses. É uma macroalga caracterizada por crescer rapidamente na primavera e no verão, sendo o fim do ciclo no Outono (Biskup et al., 2014).

A *S. polyschides* possui uma ampla distribuição ao longo da costa do Atlântico Nordeste e pode ser encontrada na zona intertidal baixa e na zona subtidal pouco profunda, podendo ser encontrada até aos 19 m (metros) de profundidade sobre fundos rochosos.

Segundo Assis et al. (2011), em Portugal, pode ser encontrada a norte, desde a foz do Rio Minho a Aveiro, na zona centro, na Figueira da Foz, Peniche, Ericeira, Cascais e Sesimbra, enquanto mais a sul pode ser encontrada na região do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina.



**Figura 7.** *Saccorhiza polyschides*, Praia das Pedras Muitas (Casais do Baleal - Peniche)

É tradicionalmente conhecida por ser edível, tem potencial biofertilizante (Soares et al., 2020) e também pode ter propriedades antioxidantes e neuroprotetoras (Freitas et al., 2022b; Pinteus et al., 2017; Silva et al., 2018).

## 1.6. Objetivos

O objetivo deste trabalho é realizar um estudo comparativo da amostra de algas castanhas selvagens e de cultivo, e avaliar as suas potencialidades para a obtenção de bioprodutos de elevado valor. Foram usados como casos de estudo as algas castanhas da costa de Peniche, *Laminaria ochroleuca* e *Saccorhiza polyschides*, e a espécie *Macrocystis pyrifera*, produzida em aquacultura *offshore* na costa de Lüderitz, Namíbia. Foi também analisado o resíduo resultante de uma extração aquosa de *Macrocystis pyrifera*. A comparação envolveu a caracterização bioquímica destas espécies, bem como a avaliação das suas bioatividades, nomeadamente através da:

- Caracterização bioquímica (humidade, cinza, conteúdo proteico total, conteúdo lipídico total e quantificação de ficocolóides),
- Quantificação de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *c* e fucoxantina),
- Quantificação elementar por Fluorescência por Raio-X (Macronutrientes e Micronutrientes)
- Avaliação das bioatividades (atividade antioxidante e antimicrobiana) de extratos hidroetanólicos

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Recolha e Processamento de Amostra Algal

A amostra algal de *Macrocystis pyrifera* proveniente de cultivo *offshore*, foi colhida no mês de junho de 2023 e fornecida pela organização não governamental *Kelp Forest Foundation*. A temperatura média da água do mar registada variou entre os 14 e 16°C.

De acordo com informações fornecidas pela *Kelp Forest Foundation*, *M. pyrifera* foi inicialmente seca a 40°C numa estufa ventilada e posteriormente moída. Para a produção de um bioestimulante, a amostra seca de *M.pyrifera* foi submetida a uma extração aquosa a 40°C. Num processo de extração, a fase sólida é geralmente descartada, sendo aproveitada apenas a fase líquida. Para evitar o descarte da fração bruta não solúvel, este foi seco a 40°C numa estufa ventilada para posterior análise e aferição do potencial biotecnológico do mesmo. O extrato sólido foi denominado como “resíduo de extração aquosa”. Para facilitar a sua manipulação e análise, o resíduo foi moído num processador de alimentos Bimby (Vorwerk, Thermomixer 31-1, Alemanha).

Para determinar diferenças na estrutura celular das amostras de *Macrocystis pyrifera* e do resíduo de extração, foram tiradas fotografias num microscópio ótico (Zeiss, Axio Lab.A1, Alemanha) equipado com uma câmara de microfotografia digital a cores de 5 megapixéis (Zeiss, AxioCam 105, Alemanha).

A amostra de *L. ochroleuca*, foi colhida entre os 10 e os 17 metros de profundidade, em agosto de 2023. Durante a colheita, a temperatura média registada foi de 16,1°C. Esta operação foi realizada pela equipa do projeto *Seaforester* do MARE- Instituto Politécnico de Leiria. Apenas as lâminas de *L. ochroleuca* foram utilizadas para proceder às análises.

As algas da espécie *S. polyschides* foram colhidas no final de setembro de 2023. A temperatura média da água do mar registada foi de 20°C (Windguru®, 2023). Da colheita de *S. polyschides*, com o objetivo de preservar a população selvagem da alga naquela praia e permitir que as macroalgas voltassem a crescer, cortaram-se apenas as lâminas e os estipes.

Na tabela I estão resumidas a época e o local de colheita das macroalgas em estudo.

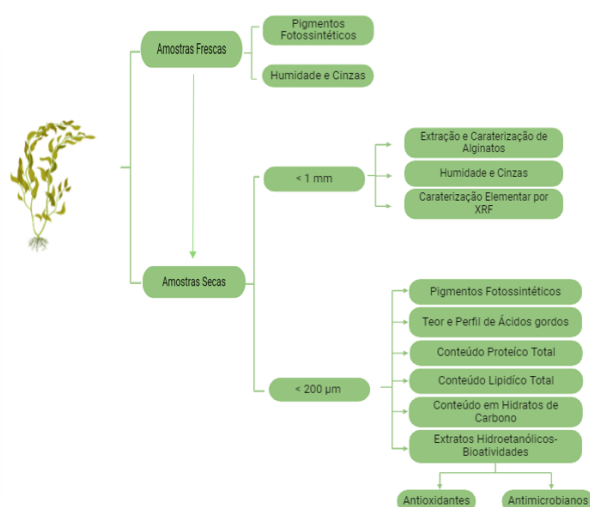
**Tabela I.** Lista das espécies estudadas, ordem taxonômica, época e local de colheita

Espécie	Ordem Taxonômica	Época de Colheita	Local de Colheita	Coordenadas
<b><i>Macrocystis pyrifera</i></b> (Linnaeus) C. Agardh 1820	Laminariales	inverno	Lüderitz, Namíbia	26°38'15.8"S 15°06'17.5"E
<b><i>Laminaria ochroleuca</i></b> Bachelot de la Pylaie 1824	Laminariales	verão	Costa de Peniche	-
<b><i>Saccorhiza polyschides</i></b> (Lightfoot) Batters 1902	Tilopteridales	fim verão/Início outono	Casais do Baleal, Peniche	39°22.595'N 9°20.404'W

No laboratório, a amostra fresca de *S. polyschides* e *L. ochroleuca* foi lavada, e procedeu-se à limpeza de impurezas e de epibiontes/epífitas, com água salgada corrente, seguida de uma lavagem com água destilada. Uma parte da amostra foi conservada a -20°C. A restante amostra foi seca a 40°C por 48 horas, em estufa ventilada (Memmert, IF110, Alemanha).

Todas as amostras secas foram, posteriormente moídas, num processador de alimentos (Breville, VBL120X Personal Active Pro, Reino Unido) e depois num moinho de café (SilverCrest, SKMS 180 A1, Alemanha). A amostra moída e crivada a 200 µm, foi armazenada a -20°C em tubos de plástico, protegidos da luz e selados, para evitar a absorção de humidade. A amostra de maiores dimensões, de cerca de 1 mm, foi conservada à temperatura ambiente e selada a vácuo.

Na Figura 8 estão resumidas as análises realizadas neste estudo e a amostra utilizada (fresca ou seca).



**Figura 8.** Fluxograma resumo das análises realizadas (criado com Biorender.com)

## **2.2. Determinação do Perfil Bioquímico**

### **2.2.1. Teor de Humidade**

Para quantificação do teor de Humidade, foram usadas amostras frescas e amostras secas. Pesou-se 1 g de amostra para cadinhos de cerâmica, em quadruplicado. Os cadinhos foram colocados em estufa ventilada (Memmert, UF110, Alemanha) a 105°C durante 48 h. Após arrefecimento dos cadinhos com a amostra, foi feita nova pesagem e a percentagem de humidade presente na amostra algal foi determinada de acordo com seguinte fórmula (AOAC, 2016):

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{P_i - P_s}{P_i} \times 100$$

onde,  $P_i$  = Peso da amostra inicial (g);  $P_s$  = Peso da amostra seca (g).

### **2.2.2. Teor de Cinzas**

As amostras secas foram posteriormente queimadas em mufla (B170, Nabertherm, Alemanha) com uma rampa de aquecimento de 4 h e um patamar de 5 h a 525°C. Após o arrefecimento, os cadinhos contendo as cinzas foram pesados e a massa de cinza (em % de peso seco) foi calculada segundo a fórmula seguinte (AOAC, 2016):

$$\text{Cinza (\% peso seco)} = \frac{W_c}{W_s} \times 100$$

onde,  $W_c$  = Peso da cinza (g);  $W_s$  = Peso da amostra seca (g).

### **2.2.3. Conteúdo Proteico total**

O conteúdo proteico total de cada uma das amostras estudadas foi determinada a partir do valor de azoto total, pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2016). Pesou-se 0,5 gramas de amostra seca com dimensões inferiores a 200 µm, em triplicado, à qual se adicionou 25 mL de ácido sulfúrico (Honeywell/Fluka, 30743, EUA) e 1 pastilha de selénio, que funcionou como catalisador (VWR Chemicals, EUA). Esta mistura foi depois colocada num aparelho digestor (J.P Select bloc digest 6, Espanha).

A digestão compreendeu dois tratamentos térmicos: um a 220°C por 30 min (minutos) e outro a 400°C durante 90 min. Os ensaios foram realizados em triplicado e foram realizadas cinco extrações em branco, nos quais foram adicionados apenas ácido sulfúrico e pastilha de catalisador. Decorrido o tempo de digestão e após os tubos terem arrefecido, foram adicionados 8 mL de água destilada e 100 mL de NaOH ao destilador (Velp Scientifica, UDK 139, Itália).

Adicionaram-se 30 mL de ácido bórico a um erlenmeyer e, após a destilação, foi efetuada uma titulação com HCl até se verificar o aparecimento de cor cinzenta. Registrou-se o volume de HCl adicionado. A quantidade de proteína, em percentagem de peso seco, foi calculada pela fórmula seguinte, considerando-se um fator de conversão de 5, próprio para macroalgas (Angell et al., 2016):

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

onde,  $V_a$  = Volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL);  $V_b$  = Volume de HCl gasto na titulação do branco (mL);  $n$  = Concentração do HCl gasto na titulação (0,1 mol. L<sup>-1</sup>);  $m$  = Massa inicial da amostra (g);  $c_f$  = Fator de conversão; 0,014 = fator de divisão da massa molar do azoto pelo seu equivalente.

#### **2.2.4. Matéria Gorda Total**

A determinação da matéria gorda total foi efetuada segundo o método de Bligh & Dyer (1959), com algumas alterações, propostas por De Coen & Janssen (2013). Após pesagem, em triplicado, de 13 mg de amostra seca (com dimensão inferior a 200 µm), em vials de 2 mL, foram adicionados 500 µL de clorofórmio (Fisher Scientific, C/4960/17), 500 µL de metanol (Fisher Scientific, M/4000/17) e 500 µL de água ultrapura. As amostras foram agitadas em vórtex durante 1 minuto, após o que foi feita uma centrifugação a 252 × g durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemanha). Procedeu-se à recolha de 400 µL da fração orgânica e desta fração foram divididos 100 µL de amostra por 2 tubos de ensaio de vidro (tubo A e tubo B). A cada tubo, adicionaram-se 500 µL de ácido sulfúrico e, posteriormente, as amostras foram incubadas numa estufa (Memmert, UF110, Alemanha) a 200°C durante 15 minutos. Finalmente, foi adicionado 1,5 mL de água ultrapura e cada amostra foi dividida em 6 x 200 µL, para uma microplaca (Greiner Bio-one, 655101, Alemanha). Esta foi então colocada num leitor de microplacas (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek® Instruments, EUA), e a absorvância foi lida a 375 nm (Marsh & Weinstein, 1966). A absorvância das amostras foi comparada com as absorvâncias de uma curva de calibração com dez pontos de concentração (0 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,3 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,4 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>; 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>; 1,3 mg.mL<sup>-1</sup> e, por último, 1,6 mg.mL<sup>-1</sup>) da solução-mãe de tripalmitina a 3,2 mg.mL<sup>-1</sup> (Sigma Aldrich, T5888, EUA). A concentração de lípidos em mg.mL<sup>-1</sup>, foi convertida em percentagem de peso seco (% DW).

### **2.2.5. Teor e Perfil de Ácidos gordos**

A análise de ácidos gordos foi adaptada de Gomes et al. (2022). Para isso, 2 mL de metanol ácido (em 2% ácido sulfúrico) foram adicionados às amostras secas (50 mg) em triplicado e aquecidos em banho-maria (Memmert, OB14, Alemanha) a 80°C por 2 horas. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de água ultrapura e 2 mL de hexano (Fisher Scientific/0355/15, EUA). As amostras foram agitadas no vórtex (VWR, VV3, EUA) durante 1 minuto e centrifugadas (Eppendorf, 5810R, Alemanha) a 1500 × g durante 5 minutos à temperatura ambiente. A fase orgânica superior foi recuperada para vials de cromatografia gasosa e analisada por cromatografia gasosa (GC) (Finnigan Ultra trace) equipado com uma coluna capilar Thermo TR-FAME (60 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm de espessura de película), um amostrador automático (AS 3000, Thermo Electron Corporation, EUA) e um detetor de ionização de chama (FID). O hélio foi usado como gás de arraste. A integração e as áreas dos picos foram determinadas com o software XCalibur™ (Thermo Scientific™, Waltham, EUA).

### **2.2.6. Quantificação do conteúdo em Hidratos de Carbono**

Os hidratos de carbono presentes nas algas foram quantificados pelo método colorimétrico de Dubois et al. (1956) com algumas modificações, de acordo com Wychen & Laurens (2013). Pesaram-se 100 mg de amostra seca, em triplicado, à qual se adicionou 5 mL de HCl 4 M (molar). Procedeu-se a um tratamento térmico a 100°C num banho-maria (Memmert, OB14, Alemanha) durante 3 horas. Findo o tempo, as amostras foram neutralizadas com carbonato de sódio (Chem-Lab, CL00.1431.1000, Bélgica) e foi adicionado 10 mL de água ultrapura, seguido de centrifugação a 1643 × g durante 8 minutos (Eppendorf, 5810R, Alemanha). Após centrifugação, procedeu-se à recolha de 200 µL do sobrenadante, para tubos de ensaio de vidro em duplicados. Preparou-se uma diluição na proporção 1:9, à qual se adicionou 100 µL amostra e 900 µL de água ultrapura.

Às amostras e padrões adicionou-se 1 mL de fenol (5%) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Honeywell/Fluka, 30743, EUA). Após um repouso de 10 minutos, as amostras e os padrões foram colocados a 25°C num banho-maria (Memmert, OB14, Alemanha) durante 60 minutos e agitados no vórtex (VWR, VV3, EUA) de 20 em 20 minutos. Para quantificação de hidratos de carbono, utilizou-se o espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific, Evolution 201, EUA), tendo as amostras sido lidas na

absorvância de 480 e 490 nm. A absorvância das amostras foi comparada com as absorvâncias de uma curva de calibração com oito pontos de concentração (0,0 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,10 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,50 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,75 mg.mL<sup>-1</sup>; 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>; e, por último, 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>) feita a partir da solução mãe de D-galactose a 2 mg.mL<sup>-1</sup> (Fisher Scientific, G/0050/48, EUA). Os resultados foram convertidos em percentagem de peso seco (% DW).

### **2.2.7. Quantificação Elementar por XRF**

Para a quantificação do conteúdo mineral por espectrometria de Fluorescência por Raios-X (XRF), foi utilizada amostra seca. Para garantir a completa remoção da humidade, as amostras foram colocadas em copos próprios para análise de XRF e submetidas a uma secagem adicional numa estufa ventilada (Binder, FD23, Alemanha) a 60°C por 48 horas. Após a secagem, uma película transparente (Prolene Thin-Film, Bruker, EUA) foi aplicada sobre as amostras. A quantificação foi realizada com um espectrómetro de Fluorescência por Raios-X (S1 Titan, Kennewick, EUA), com leituras feitas em triplicado. Os resultados foram convertidos em mg.g<sup>-1</sup>.

### **2.3. Extração e caracterização de Alginatos**

Os alginatos foram extraídos através da adaptação do método de Trica et al. (2019). Inicialmente, pesou-se 2 g de amostra moída com dimensões inferiores a 1 mm (em triplicado). As amostras secas foram submetidas a uma despigmentação e desengorduramento ligeiros com 20 mL de EtOH (70% v/v, 24 h). Procedeu-se a uma filtração a vácuo com papel de filtro de 10-12 µm (Prat Dumas, A125108, França).

De forma a converter os sais insolúveis de alginato presente nas paredes celulares em ácido algínico, adicionaram-se à amostra 100 mL de HCl a 0,2M, sem agitação, à temperatura ambiente, por 24 h num tratamento ácido. Novamente, foi efetuada uma filtração a vácuo com papel de filtro de 10-12 µm e procedeu-se à lavagem da amostra com água destilada tipo II.

O tratamento alcalino, tem como função converter o ácido algínico (insolúvel) em alginato de sódio solúvel, e foi executado com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2%). Foram testadas várias temperaturas (25°C, 60°C e 80°C) durante 5 horas em banho-maria (Memmert, OB14, Alemanha). De hora em hora, as amostras foram agitadas no vórtex (VWR, VV3, EUA).

Após o tratamento alcalino foi realizada uma filtração a vácuo a quente com gaze (Ada Swabs, Portugal).

Para proceder à precipitação dos alginatos, foi adicionado o dobro do volume em etanol (96%), ao filtrado obtido anteriormente. As amostras precipitadas foram colocadas *overnight*, a 4°C. Para lavagem do ficocolóide foi adicionado etanol a 96%, ficando em repouso durante 24 horas.

As amostras foram incubadas numa estufa ventilada (Memmert, IF110, Alemanha) durante 48 horas a 60°C para eliminar a humidade acumulada, uma vez que o alginato é altamente higroscópico. Por fim, foi realizada a pesagem dos precipitados. Para calcular o rendimento de extração utilizou-se a seguinte fórmula.

$$\text{Rendimento extração (\%)} = \left( \frac{\text{Peso seco do resultado obtido}}{\text{Peso inicial da amostra}} \right) \times 100$$

Em seguida, os alginatos foram moídos num almofariz, e depois num moinho de café (Kunft, KCG5414, Suécia).

Os resultados foram obtidos no equipamento FTIR (Perkin Elmer, SPECTRUM II, EUA), 64 scans e uma resolução de 8 cm<sup>-1</sup>. Para validar os resultados dos alginatos extraídos, foi utilizado alginato comercial (Farmaquímica Sur, Málaga-Espanha), para servir de controlo. Os resultados foram processados utilizando o software de espectroscopia vibracional Spectrum. Por sua vez, os dados de transmitância foram depois processados em Excel.

#### **2.4. Extração e Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos**

Os pigmentos fotossintéticos presentes nas algas foram quantificados de acordo com os métodos de Osório et al. (2020). Os resultados da quantificação de pigmentos obtidos para a amostra fresca foram ajustados descontando a percentagem de humidade, determinada pelo protocolo do Teor de Humidade.

Para proceder à quantificação de pigmentos fotossintéticos foram pesados 0,5 g de alga seca e de alga fresca, previamente congelada de *L. ochroleuca* e *S. polyschides*. Utilizou-se uma proporção de 1:20 entre amostra e solvente.

Na quantificação da fucoxantina, foi adicionada uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e água ultrapura na proporção de 4:1 (v/v). Para quantificar a clorofila *a* e a clorofila *c* presentes nas amostras, utilizou-se acetona a 90%.

A amostra fresca congelada foi macerada durante 10 minutos, num almofariz previamente refrigerado e mantido em gelo. Tanto a amostra fresca como a amostra seca foram transferidas para um gobelet, em agitação durante 30 minutos num agitador magnético digital de multiposições (OVAN, MM90E, Espanha). Para evitar a degradação dos pigmentos fotossintéticos, as amostras foram mantidas no escuro e em gelo.

Findos 30 min, a amostra foi centrifugada (Eppendorf, 5810R, Alemanha) a 8000 ×g, a 4°C por 20 min, tendo sido posteriormente efetuada uma filtração com filtros de fibra de vidro de 1,2 µm (VWR, 516-0869,EUA). Por fim, foi realizada a leitura da absorvância, com um varrimento entre os 200 nm e os 900 nm, usando para o efeito o espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific, Evolution 201, EUA). Todo o procedimento foi realizado em triplicado.

Para calcular a concentração de fucoxantina, clorofila *a* e clorofila *c* foram utilizadas as seguintes equações (Osório et al., 2020; Seely et al., 1972, Ritchie, 2008):

$$\text{Fucoxantina } (\mu\text{g/mL}) = 7,69 \times (A_{480} - A_{750}) - 5,5 \times [(A_{631} - A_{750}) + (A_{582} - A_{750}) - 0,297 \times (A_{665} - A_{750})] - 0,377 \times (A_{665} - A_{750})$$

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/mL}) = - 0,3319 \times (A_{630} - A_{750}) - 1,7495 \times (A_{647} - A_{750}) + 11,9442 \times (A_{664} - A_{750}) - 1,4306 \times (A_{691} - A_{750}) (\pm 0,0020)$$

$$\text{Clorofila } c \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 23,5902 \times (A_{630} - A_{750}) - 7,8516 \times (A_{647} - A_{750}) - 1,5214 \times (A_{664} - A_{750}) - 1,7443 \times (A_{691} - A_{750}) (\pm 0,0075)$$

Os resultados por fim foram convertidos em mg.g<sup>-1</sup>.

## 2.5. Preparação de Extratos brutos Hidroetanólicos

Para determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana da amostra algal, foi necessário preparar extratos. Os extratos foram preparados de acordo com o método de Afonso et al. (2021). Para este feito, as amostras foram pesadas e adicionou-se etanol absoluto (Aga, UN1170, Portugal) e água ultrapura na proporção 70:30, respetivamente. Foi realizado um tratamento no banho de ultrassons (VWR, USC600TH, EUA) durante 15 minutos.

Findo o tratamento, a mistura entre o solvente e a amostra foram sujeitos a um tratamento térmico, durante 8 horas a 40°C, protegidos da luz.

Para garantir a uniformidade das condições de extração foi usada uma placa de agitação (Velp Scientifica, AREX-6 Digital, Itália). Procedeu-se a uma centrifugação (Eppendorf, 5810R, Alemanha) a 8000 × g, durante 10 min, à temperatura ambiente.

Os extratos foram filtrados com filtros de fibra de vidro de 1,2 µm (VWR, 516-0869, EUA) e o extrato foi evaporado a 40°C utilizando um rotavapor (Heidolph, Laborota 4000, Alemanha). Os extratos foram liofilizados e guardados num exsiccador à temperatura ambiente até à sua utilização.

Para os ensaios seguintes procedeu-se à ressuspensão dos extratos. Foram pesados 100 mg de extrato liofilizado e estes foram dissolvidos em etanol a 70%. Devido à difícil dissolução dos extratos adicionaram-se 5,5 mL de etanol a 70% nos extratos de *L. ochroleuca*, *M. pyrifera* e do resíduo de extração aquosa. No extrato de *S. polyschides* foram adicionados 6,5 mL de etanol 70%. Para melhor dissolução dos extratos, estes foram sujeitos a um tratamento por ultrassons (Ultrasonic cleaner, VWR), durante 15 minutos. Durante o tratamento de ultrassons, o banho foi sempre mantido abaixo de 20°C. Os extratos foram conservados a -20°C até à sua utilização.

## **2.6. Atividade Antioxidante**

### **2.6.1. Quantificação de Polifenóis Totais (QTP)**

O teor de polifenóis totais (QTP) foi determinado para todas as amostras pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu adaptado para uma versão em microescala, utilizando o ácido gálico como padrão. A quantificação de polifenóis foi realizada em microtubos de 2 mL. Adicionaram-se 30 µL dos extratos hidroetanólicos, 770 µL de água ultrapura e 50 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, F9252, EUA), e a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 5 min, no escuro. Em seguida, adicionaram-se 150 µL de carbonato de sódio (20% p/v) (ChemLab, CL00.1431.1000, Bélgica), seguindo-se uma incubação à temperatura ambiente, no escuro, durante 1 hora. Posteriormente, transferiu-se 200 µL de cada amostra, do padrão, e dos respetivos brancos para microplacas de fundo plano (Greiner Bio one, Áustria). A placa foi incubada no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 755 nm (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek® Instruments, EUA). A absorvância das amostras foi comparada com as absorvâncias de uma curva de calibração com cinco pontos de concentração (0,01 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,10 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,50 mg.mL<sup>-1</sup> e por último 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>) da solução-mãe de ácido gálico a 1 mg.mL<sup>-1</sup> (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha). A partir da curva de calibração, foi quantificado o teor total de compostos fenólicos.

Os resultados são expressos em mg de equivalente de ácido gálico por grama de extrato em peso seco (mg GAE.g<sup>-1</sup>). Foram também efetuados controlos do solvente do ácido

gálico, do solvente dos extratos e do reagente de Folin-Ciocalteu. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

### **2.6.2. Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)**

A avaliação da redução do radical DPPH é um ensaio colorimétrico, que quando uma solução de DPPH é misturada com um antioxidante com capacidade de doar um átomo de hidrogénio, gera-se uma forma não radical, a difenil-picrilhidrazina, havendo perda da cor violeta, ou passagem de cor violeta para amarelo-pálido, podendo esta transformação ser detetada por espectrofotometria. Este ensaio foi adaptado da metodologia de Brand-Williams et al. (1995).

Para isso, preparou-se uma solução de DPPH a 0,1 mM em etanol absoluto. Os extratos hidroetanólicos de *Laminaria ochroleuca*, *Macrocystis pyrifera* e do resíduo de extração aquosa foram diluídos nas concentrações de 4, 7, 11, 15 e 18,2 mg.mL<sup>-1</sup>. Por outro lado, como o extrato hidroetanólico de *Saccorhiza polyschides* se encontrava a 15,4 mg.mL, o extrato foi diluído nas concentrações de 3, 6, 9, 12 e 15,4 mg.mL<sup>-1</sup>.

A reação foi preparada em microtubos de 2 mL, aos quais se adicionaram 30 µL do extrato das diferentes diluições, etanol absoluto (controlo do solvente do radical DPPH) e ácido ascórbico (controlo positivo). Às amostras, controlo positivo e controlo negativo adicionou-se 970 µL de solução de DPPH, anteriormente descrita.

Para garantir que a coloração dos extratos não interferisse nos resultados, foram realizados brancos das amostras e dos controlos. A única diferença nesses brancos foi a substituição de DPPH por 970 µL de etanol. Transferiu-se 200 µL de cada padrão e amostras e os respetivos brancos para microplacas de fundo plano (Greiner Bio one, 655001, Áustria), as quais foram incubadas no escuro, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Efetuaram-se leituras de absorvância a 517 nm no leitor de microplacas (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek® Instruments, EUA) e a capacidade de redução do radical DPPH foi calculada através da seguinte equação (Wannes et al., 2010):

$$\text{Redução do Radical DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs C} - (\text{Abs E} - \text{Abs B})}{\text{Abs C}} \times 100\%$$

onde, Abs B - Absorvância do branco; Abs E - Absorvância dos extratos hidroetanólicos e Abs C - Absorvância dos controlos.

Da percentagem de redução do DPPH, foi calculado o valor de EC50, que é definido como a concentração da amostra onde se obtém metade da resposta máxima. Assim, os resultados foram interpretados tendo em conta que quanto menor o EC50, maior a atividade antioxidante do extrato.

### **2.6.3. Potencial de Redução do Poder do Ião Fe (III) (FRAP)**

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada através da determinação do potencial de Redução do Poder do Ião Fe (III) (FRAP) com adaptações para microescala (Benzie & Strain, 1996). O reagente FRAP foi preparado usando tampão acetato 300 mM (pH 3,6), solução de 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) 10 mM e cloreto de ferro 20 mM numa proporção de 10:1:1, sendo esta solução preparada no próprio dia em que foi usada. A absorvância das amostras foi comparada com as absorvâncias de uma curva de calibração com nove pontos de concentração (0 µM; 50µM; 100 µM; 250 µM; 500 µM; 750 µM; 1000 µM; 1250 µM e, por último, 1500 µM) da solução de sulfato de ferro 2 mM (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha).

Em microtubos de 2 mL, foram adicionados 30 µL de extrato e de padrões e 900 µL de reagente FRAP. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho-maria (Memmert OB14, Alemanha) a 37°C, durante 15 minutos, e posteriormente 5 minutos no escuro à temperatura ambiente. Adicionaram-se 200 µL de cada padrão/amostras e os respetivos brancos nas microplacas (Greiner Bio one, 655001, Áustria). Efetuaram-se leituras de absorvância a 593 nm no leitor de microplacas (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek® Instruments, EUA). Os resultados foram expressos em equivalente de sulfato de ferro em mmol.100 mg<sup>-1</sup> de amostra.

## **2.7. Atividade Antimicrobiana**

### **2.7.1. Estirpes Microbianas**

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de algas, foram utilizados os seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, Gram negativa (ATCC 5922) e *Micrococcus luteus*, Gram positiva (ATCC 10240). As estirpes microbianas que se encontravam armazenadas a -80°C, foram revitalizadas em meios de cultura adequados. Na Tabela II encontra-se a informação sobre a temperatura, tempo de incubação e meio de cultura utilizado. Sempre que foi necessário preparar meios sólidos, adicionaram-se 15 g.L<sup>-1</sup> de agar bacteriológico (VWR, 84609.0500, Estados Unidos da América).

**Tabela II.** Temperaturas e meios de referência para a revitalização das estirpes bacterianas

	Temperatura (°C)	Meio de Cultivo	Marca e Referência do meio de cultivo
<i>Escherichia coli</i>	37	Luria-Bertani Agar	Frilabo, 610084, Portugal
<i>Micrococcus luteus</i>	30	Agar Nutriente	Frilabo, 610036, Portugal

### 2.7.2. Avaliação Atividade Antimicrobiana

Das colónias crescidas em meio sólido, procedeu-se à repicagem com ansa estéril, de uma colónia isolada, para Meio Muller Hinton Broth (VWR, Refª 84648.0500, EUA).

O crescimento decorreu durante 24 h e para ajustar para a turbidez de 0,5 na escala de padrões de McFarland (EUCAST, 2003), utilizou-se solução salina de NaCl a 0,85%, estéril.

As microplacas foram organizadas da seguinte maneira:

#### 1. Extratos de *M. pyrifera*, *L. ochroleuca* e Resíduo de Extração Aquosa

- Diluição A: 910 µg de extrato + 145 µL de meio de cultivo
- Diluição B: 182 µg de extrato + 185 µL de meio de cultivo
- Diluição C: 91 µg de extrato + 190 µL de meio de cultivo

#### 2. Extrato de *S. polyschides*

- Diluição D: 769 µg de extrato + 145 µL de meio de cultivo
- Diluição E: 154 µg de extrato + 185 µL de meio de cultivo
- Diluição F: 77 µg de extrato + 190 µL de meio de cultivo

#### 3. Controlo de Crescimento com Solvente de Ressuspensão dos Extratos (Etanol 70%)

- Diluição G: 50 µL de etanol 70% + 145 µL de meio de cultivo
- Diluição H: 10 µL de etanol 70% + 185 µL de meio de cultivo
- Diluição I: 5 µL de etanol 70% + 190 µL de meio de cultivo

#### 4. Controlos de Validação

- Controlo Negativo: 195 µL de meio MH líquido
- Controlo de Esterilidade: 200 µL de meio MH líquido

Foram preparadas 3 microplacas para cada microrganismo, onde se adicionou 5 µL de inóculo com um microrganismo diferente, a todos os poços exceto aos poços do controle de esterilidade. Cada microplaca foi incubada em estufas com a temperatura ótima de crescimento de cada microrganismo. De forma a validar as leituras visuais, foi lida a absorvância por espectrofotometria num leitor de microplacas a 600 nm (SynergyH1, Biotek, EUA), ao tempo 0 e ao fim de 24 h de incubação. Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços, de fundo redondo (Sarstedt, refª 82.1582.001, Alemanha).

## **2.8. Análise estatística**

Os resultados do perfil bioquímico, atividade antioxidante das três espécies de macroalgas e resíduo de extração aquosa foram apresentados como valor médio ± desvio-padrão (DP). Os parâmetros de perfil bioquímico e atividade antioxidante foram comparados entre as diferentes matrizes através de análise de variância a um fator (ANOVA) ou Teste t-student, após validação dos pressupostos de normalidade da distribuição dos dados e homogeneidade de variâncias. Quando os pressupostos não foram cumpridos, adotou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para proceder às comparações descritas. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas sempre que valor de  $p < 0.05$ . Toda a análise estatística foi feita com o auxílio do software IBM SPSS Statistics 29.0 (IBM Corporation, New York, EUA).

### 3. Resultados

#### 3.1. Humidade e Cinzas

As amostras frescas de *L. ochroleuca* e *S. polyschides*, apresentaram um teor de humidade de  $73,35 \pm 1,36\%$  e  $79,74 \pm 0,50\%$  em peso fresco (FW), respetivamente (Tabela III).

O teor de cinzas das amostras frescas *L. ochroleuca* e *S. polyschides*, foi de  $22,16 \pm 0,73\%$  DW e  $20,06 \pm 0,69\%$  DW, respetivamente, havendo uma notória diferença entre as espécies, confirmada estatisticamente pelo Teste t-student ( $t_{(6)} = 4,414$ ;  $p < 0,003$ ).

As amostras que já se encontravam secas, apresentaram humidade residual, que poderá estar associada à absorção de humidade atmosférica.

Observou-se uma ligeira diferença no teor de humidade entre as espécies, estatisticamente confirmada pelo Teste t-student ( $t_{(6)} = -8,837$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tabela III.** Teor de humidade e cinzas das macroalgas frescas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

	<i>L. ochroleuca</i>	<i>S. polyschides</i>
	Fresca	Fresca
Humidade (% FW)	$73,35 \pm 1,36^a$	$79,74 \pm 0,50^b$
Cinzas (% DW)	$22,16 \pm 0,73^a$	$20,06 \pm 0,69^b$

Os sobrescritos <sup>a, b</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

No teor de cinzas das amostras secas, os resultados foram superiores tanto na *M. pyrifera* como no resíduo de extração aquosa, com  $48,94 \pm 0,70\%$  e  $28,56 \pm 0,25\%$  de peso seco total (DW), respetivamente. Já as amostras secas de *S. polyschides* e *L. ochroleuca* apresentaram valores de  $20,01 \pm 0,05\%$  DW e  $22,03 \pm 0,60\%$  DW (Tabela IV), respetivamente.

A diferença estatística apresentada entre amostras secas foi confirmada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis ( $H^2_{(5)} = 21.13$ ,  $p < 0.001$ ).

**Tabela IV.** Teor de cinzas das macroalgas secas e do resíduo resultante de uma extração aquosa. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

	<i>M. pyrifera</i>		<i>L. ochroleuca</i>	<i>S. polyschides</i>
	Seca	Resíduo	Seca	Seca
Cinzas (% DW)	$48,94 \pm 0,70^a$	$28,56 \pm 0,25^b$	$22,03 \pm 0,60^c$	$20,01 \pm 0,05^d$

Os sobrescritos <sup>a, b, c, d</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

### 3.2. Conteúdo Proteico, Matéria gorda total e Hidratos de carbono

Quanto ao teor proteico das amostras secas em estudo, não foram observadas diferenças significativas, conforme indicado pelo teste de ANOVA ( $F_{(3,11)} = 1,860$ ;  $p > 0,215$ ). Como se pode verificar pela Tabela V, as amostras apresentaram um conteúdo proteico aproximadamente de 9%.

**Tabela V.** Proporção do conteúdo proteico, matéria gorda total e hidratos de carbono das amostras, em percentagem em peso seco (%DW). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

	<i>M. pyrifer</i>		<i>L. ochroleuca</i>	<i>S. polyschides</i>	ANOVA		
	Seca	Resíduo Ext.aquosa	Seca	Seca	F	df	p-value
Proteína (% DW)	9,20 $\pm$ 0,04	9,08 $\pm$ 0,02	8,93 $\pm$ 0,16	8,97 $\pm$ 0,27	1,860	3 ;11	0,215
Matéria gorda total (% DW)	1,28 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	2,37 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	2,79 $\pm$ 0,25 <sup>a, b</sup>	3,41 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	25,999	3 ;11	<,001
Hidratos Carbono-480 nm (% DW)	4,86 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	6,30 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	10,10 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	39,513	3 ;11	<,001
Hidratos Carbono-490 nm (% DW)	2,94 $\pm$ 0,32 <sup>c</sup>	4,47 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup>	7,23 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	8,64 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	69,376	3 ;11	<,001

Os sobrescritos <sup>a, b, c</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

Das amostras analisadas, a *S. polyschides* apresentou o conteúdo lipídico mais elevado (3,41  $\pm$  0,46% DW), seguido da *L. ochroleuca* e do resíduo de extração aquosa (2,79  $\pm$  0,25% e 2,37  $\pm$  0,21% DW, respetivamente). A amostra da *M. pyrifer* apresentou o conteúdo lipídico mais baixo, de 1,28  $\pm$  0,19% DW. As amostras mostram que existem diferenças estatisticamente significativas ( $F_{(3,11)} = 25,999$ ,  $p < 0,001$ ).

Também na quantificação de hidratos de carbono foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, tanto a 480 nm ( $F_{(3,11)} = 39,513$ ,  $p < 0,001$ ), como a 490 nm ( $F_{(3,11)} = 69,376$ ,  $p < 0,001$ ). Os resultados a 490 nm revelaram um valor ligeiramente mais elevado para a *S. polyschides* (8,64  $\pm$  0,44%), seguido da *L. ochroleuca* (7,23  $\pm$  0,87%) e um valor ligeiramente mais baixo para o resíduo (4,47  $\pm$  0,94%) e para a *M. pyrifer* (2,94  $\pm$  0,32%).

### 3.3. Teor e Perfil de Ácidos gordos

Nas amostras, foi registada a presença de diversos ácidos gordos; contudo, destacaram-se apenas aqueles apresentados na Tabela VI.

O total de ácidos gordos saturados (SFA) foi mais abundante em *S. polyschides* ( $51,57 \pm 1,57\%$ ), seguido pela *L. ochroleuca* ( $43,45 \pm 0,59\%$ ).

Dos ácidos gordos saturados, o que se destacou perante outros ácidos gordos foi o ácido palmítico em todas as amostras, verificando-se que a percentagem mais elevada deste ácido gordo foi obtida em *S. polyschides* ( $40,25 \pm 1,37\%$ ).

O ácido gordo monoinsaturado (MUFA) mais comum foi o ácido oleico (C18:1 n-9), variando de  $8,64 \pm 0,11$  (no resíduo extração aquosa) a  $17,74 \pm 2,09\%$  (*L. ochroleuca*).

O total de PUFA teve valores que variaram de  $25,08 \pm 1,24\%$  na amostra de *S. polyschides* a  $38,01 \pm 1,05\%$  no resíduo de extração aquosa.

Dos ácidos gordos polinsaturados destacam-se, por exemplo, o ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), o qual foi predominante no resíduo de extração aquosa ( $8,54 \pm 0,06\%$ ) e o menor valor registado foi para a espécie *S. polyschides* ( $2,54 \pm 0,06\%$ ). O ácido araquidónico (ARA) foi registado em maiores percentagens tanto na *M. pyrifera* como no resíduo de extração aquosa,  $14,55 \pm 0,50\%$  e  $10,70 \pm 0,52\%$  respetivamente.

O ácido eicosapentaenóico (EPA - C20:5) foi detetado numa quantidade de  $11,14\%$  no resíduo de extração aquosa.

Em relação ao ácido docosahexaenóico (DHA - C22:6), a sua concentração variou entre  $0,02 \pm 0,01\%$  (*S. polyschides*) e  $0,14 \pm 0,02\%$  (*M. pyrifera*), não tendo sido detetado na amostra de *L. ochroleuca*.

A quantidade de ácidos gordos  $\omega$ -3 (n3) variou entre as amostras, sendo o valor mais elevado no resíduo ( $19,86 \pm 0,55\%$ ) e mais baixo na *S. polyschides* ( $5,05 \pm 0,22\%$ ). A quantidade de ácidos gordos  $\omega$ -6 apresenta também uma variação significativa, alcançando o valor mais alto em *M. pyrifera* ( $21,18 \pm 0,74\%$ ) e o mais baixo em *L. ochroleuca* ( $16,22 \pm 0,03\%$ ), em relação ao total de ácidos gordos.

Os valores do rácio n6/n3 foram altos em todas as amostras variando entre  $1,66 \pm 0,02$  e  $3,92 \pm 0,03$ , com exceção do resíduo. Este apresentou rácio de  $0,87 \pm 0,01$ .

**Tabela VI.** Teor e perfil de ácidos gordos totais extraídos das amostras analisadas. Os resultados são apresentados como (média ± desvio padrão, n = 3)

Ácido Gordo	% ácido gordo total			
	<i>L. ochroleuca</i>	<i>S. polyschides</i>	Resíduo Ext. aquosa	<i>M. pyrifera</i>
<b>∑SFA(%)</b>	<b>43,45 ± 0,59</b>	<b>51,57 ± 1,57</b>	<b>30,91 ± 0,79</b>	<b>37,66 ± 1,52</b>
Ácido Mirístico (C14:0)	6,53 ± 0,56	5,31 ± 0,50	9,71 ± 0,82	13,29 ± 0,66
Ácido Pentadecílico (C15:0)	0,73 ± 0,05	0,49 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,42 ± 0,02
Ácido Palmítico (C16:0)	33,9 ± 0,40	40,25 ± 1,37	18,54 ± 0,47	21,50 ± 0,34
Ácido Octadecanóico (C18:0)	1,43 ± 0,04	3,07 ± 0,12	1,46 ± 0,53	1,70 ± 0,78
Ácido Araquídico (C20:0)	0,32 ± 0,01	1,97 ± 0,22	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,03
<b>∑MUFA(%)</b>	<b>30,79 ± 0,97</b>	<b>23,35 ± 0,35</b>	<b>31,07 ± 0,30</b>	<b>28,14 ± 0,94</b>
Ácido miristoleico (C14:1 n5 cis)	0,22 ± 0,10	0,19 ± 0,00	0,30 ± 0,09	0,30 ± 0,07
Ácido Pentadecenóico C15:1 n5 cis	1,21 ± 0,60	1,04 ± 0,11	0,86 ± 0,24	0,90 ± 0,00
Ácido Palmitoleico (C16:1 n7)	3,58 ± 0,03	1,49 ± 0,06	1,65 ± 0,06	1,82 ± 0,06
Ácido Oleico (C18:1 n9 cis)	17,74 ± 2,09	14,81 ± 0,33	8,64 ± 0,11	12,11 ± 0,55
Ácido Vacênico (C18:1 n11)	0,60 ± 0,92	1,00 ± 0,02	0,32 ± 0,05	0,16 ± 0,02
Ácido Gondóico (C20:1 n9 cis)	6,23 ± 0,06	3,13 ± 0,04	15,56 ± 0,10	9,07 ± 0,15
Ácido Erúxico (C22:1 n9)	0,48 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,69 ± 0,02	1,05 ± 0,74
<b>∑PUFA(%)</b>	<b>25,77 ± 0,60</b>	<b>25,08 ± 1,24</b>	<b>38,01 ± 1,05</b>	<b>34,20 ± 0,68</b>
Ácido Linoleico (C18:2 n6 cis)	6,27 ± 0,12	9,41 ± 0,24	5,53 ± 0,05	5,59 ± 0,06
Ácido α-linolénico ALA (C18:3 n3 cis)	3,38 ± 0,10	2,54 ± 0,06	8,54 ± 0,06	5,68 ± 0,04
Ácido Eicosatrienóico (C20:3 n6)	0,43 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,03
Ácido Araquidónico ARA (C20:4 n6)	8,64 ± 0,17	9,24 ± 0,72	10,70 ± 0,52	14,55 ± 0,50
Ácido Eicosapentaenóico EPA (C20:5 n3)	5,90 ± 0,18	2,49 ± 0,15	11,14 ± 0,50	6,80 ± 0,16
Ácido Docosahexaenóico DHA (C22:6 n3)	nd	0,02 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,02
<b>n3</b>	9,28 ± 0,28	5,05 ± 0,22	19,86 ± 0,55	12,62 ± 0,15
<b>n6</b>	16,22 ± 0,32	19,81 ± 1,02	17,23 ± 0,59	20,98 ± 0,49
<b>∑ outros PUFA</b>	0,27 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,92 ± 0,08	0,59 ± 0,07
<b>Rácio n6/n3</b>	1,75 ± 0,02	3,92 ± 0,03	0,87 ± 0,01	1,66 ± 0,02

nd – não detetado

### 3.4. Quantificação elementar por XRF

Os resultados obtidos da análise de fluorescência por raio-X (XRF) permitiram quantificar os macronutrientes e micronutrientes presentes nas amostras. As análises mostraram uma grande discrepância entre as amostras.

Dito isto, conforme apresentado na Tabela VII pode-se observar que foram detetados vários minerais essenciais como: potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca), fósforo (P) e cloro (Cl). No grupo dos micronutrientes detetou-se o ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e silício (Si). Desta análise, é também de salientar que foi detetado arsénio (metal pesado).

Conforme apresentado na Tabela VII, os teores de fósforo, cloro e potássio variaram significativamente entre as amostras, sendo que a *M. pyrifera* e o resíduo de extração aquosa destacaram-se com os valores mais elevados. O teor de fósforo foi de  $5,29 \pm 0,028 \text{ mg.g}^{-1}$  em *M. pyrifera* e de  $5,29 \pm 0,028 \text{ mg.g}^{-1}$  no resíduo, com diferenças estatisticamente significativas segundo o teste Kruskal-Wallis ( $H^2_{(3)} = 10,385, p < 0.016$ ).

O cloro apresentou valores de  $78,0 \pm 0,65$  na *M. pyrifera* e  $39,8 \pm 0,61 \text{ mg.g}^{-1}$  no resíduo com diferenças estatisticamente significativas ( $H^2_{(3)} = 9,974, p < 0.019$ ).

Em relação ao potássio, as maiores concentrações foram na *M. pyrifera* ( $67,72 \pm 0,62 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e no resíduo ( $56,07 \pm 0,07 \text{ mg.g}^{-1}$ ), existindo diferenças estatísticas ( $H^2_{(3)} = 10,385, p < 0.016$ ).

Quanto ao cálcio, a menor concentração foi encontrada na *M. pyrifera*  $3,61 \pm 0,05 \text{ mg.g}^{-1}$  e a maior concentração foi de  $11,7 \pm 0,74 \text{ mg.g}^{-1}$  (na *S. polyschides*).

O ferro apresentou resultados baixos, contudo foi detetado em maior concentração na *M. pyrifera*  $6,46 \pm 1,44 \times 10^{-1} \text{ mg.g}^{-1}$  e no resíduo extração aquosa  $2,29 \pm 0,06 \times 10^{-1} \text{ mg.g}^{-1}$ , existem diferenças estatisticamente significativas no teor de cálcio e no teor de ferro ( $H^2_{(3)} = 10,385, p < 0.016$ ).

O teor de zinco variou entre  $1,57 \pm 0,11 \times 10^{-2}$  e  $3,33 \pm 0,25 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1}$ . Entre as diferentes amostras através do teste Kruskal-Wallis existem diferenças estatisticamente significativas no teor de zinco ( $H^2_{(3)} = 10,458, p < 0.015$ ).

O teor de arsénio variou entre  $1,27 \pm 0,15 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1}$  e  $5,57 \pm 0,42 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1}$ . O teste Kruskal-Wallis mostra que existem diferenças estatisticamente significativas no teor de arsénio, entre amostras ( $H^2_{(3)} = 10,421, p < 0.015$ ).

Para concluir, o cobre apresenta teores mais baixos na *S. polyschides* e no resíduo  $3,67 \pm 0,58 \times 10^{-3} \text{ mg.g}^{-1}$ . Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre amostras pelo teste Kruskal-Wallis ( $H^2_{(3)} = 9,863$ ,  $p < 0.020$ ).

**Tabela VII.** Quantidade de macronutrientes e micronutrientes expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  das amostras em estudo. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

Macronutrientes e Micronutrientes	<i>L. ochroleuca</i>	<i>S. polyschides</i>	Resíduo Ext. aquosa	<i>M. pyrifera</i>
<b>Fósforo (P)</b>	<b>1,18 <math>\pm</math> 0,05<sup>b, c</sup></b>	<b>8,27 <math>\pm</math> 0,02 <math>\times 10^{-1}</math><sup>c</sup></b>	<b>4,05 <math>\pm</math> 0,26<sup>a, b</sup></b>	<b>5,29 <math>\pm</math> 0,028<sup>a</sup></b>
Enxofre (S)	8,40 $\pm$ 1,80 $\times 10^{-1}$ <sup>a</sup>	7,50 $\pm$ 0,148 <sup>a, b</sup>	2,55 $\pm$ 0,13 <sup>b, c</sup>	5,91 $\pm$ 0,82 $\times 10^{-1}$ <sup>c</sup>
<b>Cloro (Cl)</b>	<b>24,8 <math>\pm</math> 0,86<sup>b</sup></b>	<b>20,2 <math>\pm</math> 1,95<sup>b</sup></b>	<b>39,8 <math>\pm</math> 0,61<sup>a, b</sup></b>	<b>78,0 <math>\pm</math> 0,65<sup>a</sup></b>
<b>Potássio (K)</b>	<b>22,3 <math>\pm</math> 0,35<sup>b, c</sup></b>	<b>6,03 <math>\pm</math> 0,44<sup>c</sup></b>	<b>56,07 <math>\pm</math> 0,07<sup>a, b</sup></b>	<b>67,72 <math>\pm</math> 0,62<sup>a</sup></b>
<b>Cálcio (Ca)</b>	<b>7,80 <math>\pm</math> 3,17 <math>\times 10^{-1}</math><sup>a, b</sup></b>	11,7 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	7,18 $\pm$ 0,12 <sup>b, c</sup>	3,61 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>
Ferro (Fe)	7,27 $\pm$ 1,51 $\times 10^{-2}$ <sup>c</sup>	1,38 $\pm$ 0,11 $\times 10^{-1}$ <sup>b, c</sup>	2,29 $\pm$ 0,06 $\times 10^{-1}$ <sup>a, b</sup>	6,46 $\pm$ 1,44 $\times 10^{-1}$ <sup>a</sup>
Zinco (Zn)	1,57 $\pm$ 0,11 $\times 10^{-2}$ <sup>c</sup>	3,33 $\pm$ 0,25 $\times 10^{-2}$ <sup>a</sup>	2,20 $\pm$ 0,10 $\times 10^{-2}$ <sup>b, c</sup>	2,47 $\pm$ 0,6 $\times 10^{-2}$ <sup>a, b</sup>
Silício (Si)	nd <sup>c</sup>	5,18 $\pm$ 1,03 $\times 10^{-1}$ <sup>b, c</sup>	2,32 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,67 $\pm$ 4,51 $\times 10^{-1}$ <sup>a, b</sup>
<b>Arsênio (As)</b>	<b>4,00 <math>\pm</math> 0,17 <math>\times 10^{-2}</math><sup>a, b</sup></b>	<b>1,27 <math>\pm</math> 0,15 <math>\times 10^{-2}</math><sup>c</sup></b>	<b>2,60 <math>\pm</math> 0,10 <math>\times 10^{-2}</math><sup>b, c</sup></b>	<b>5,57 <math>\pm</math> 0,42 <math>\times 10^{-2}</math><sup>a</sup></b>
Bromo (Br)	6,41 $\pm$ 0,09 $\times 10^{-1}$ <sup>a, b</sup>	4,00 $\pm$ 0,07 $\times 10^{-1}$ <sup>c</sup>	4,63 $\pm$ 0,07 $\times 10^{-1}$ <sup>b, c</sup>	7,71 $\pm$ 0,16 $\times 10^{-1}$ <sup>a</sup>
Rubídio (Rb)	2,37 $\pm$ 0,23 $\times 10^{-2}$ <sup>b, c</sup>	1,80 $\pm$ 0,17 $\times 10^{-2}$ <sup>c</sup>	4,20 $\pm$ 0,10 $\times 10^{-2}$ <sup>a, b</sup>	7,70 $\pm$ 0,27 $\times 10^{-2}$ <sup>a</sup>
Estrôncio (Sr)	1,69 $\pm$ 0,01 <sup>a, b</sup>	2,38 $\pm$ 3,52 $\times 10^{-2}$ <sup>a</sup>	8,67 $\pm$ 0,02 $\times 10^{-1}$ <sup>b, c</sup>	5,12 $\pm$ 0,08 $\times 10^{-1}$ <sup>c</sup>
Bário (Ba)	1,89 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,56 $\pm$ 0,49 $\times 10^{-1}$ <sup>c</sup>	7,26 $\pm$ 0,46 $\times 10^{-1}$ <sup>b, c</sup>	1,67 $\pm$ 0,05 <sup>a, b</sup>
Cobre (Cu)	5,00 $\pm$ 0,00 $\times 10^{-3}$ <sup>a, b</sup>	3,67 $\pm$ 0,58 $\times 10^{-3}$ <sup>b, c</sup>	3,67 $\pm$ 0,58 $\times 10^{-3}$ <sup>c</sup>	8,00 $\pm$ 1,00 $\times 10^{-3}$ <sup>a</sup>

nd - não detetado. Os sobrescritos<sup>a, b, c</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

### 3.5. Extração e Caracterização de Alginatos

Procedeu-se à extração de alginatos e foram testados diversos tratamentos térmicos, variando de 25°C a 80°C. Conforme apresentado na Tabela VIII, houve diferenças entre amostras. Os valores em negrito indicam as condições térmicas e a amostra de maior rendimento.

**Tabela VIII.** Rendimento de extração de alginatos e temperatura de extração alcalina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

Temperatura	Amostra	Rendimento Médio (%) (W/W)
80°C	<i>L. ochroleuca</i>	29,91 $\pm$ 0,75 <sup>c</sup>
	<b><i>S. polyschides</i></b>	<b>46,71 <math>\pm</math> 1,02<sup>a</sup></b>
	Resíduo Ext. Aquosa	38,85 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>
	<i>M. pyrifera</i>	31,63 $\pm$ 0,93 <sup>c</sup>
60°C	<i>L. ochroleuca</i>	13,61 $\pm$ 0,71 <sup>d</sup>
	<i>S. polyschides</i>	33,32 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>
	<b>Resíduo Ext. Aquosa</b>	<b>51,04 <math>\pm</math> 0,75<sup>a</sup></b>
	<i>M. pyrifera</i>	28,32 $\pm$ 1,05 <sup>c</sup>
25°C	<i>L. ochroleuca</i>	7,33 $\pm$ 0,29 <sup>d</sup>
	<i>S. polyschides</i>	22,67 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>
	<b>Resíduo Ext. Aquosa</b>	<b>41,37 <math>\pm</math> 0,50<sup>a</sup></b>
	<i>M. pyrifera</i>	13,34 $\pm$ 0,66 <sup>c</sup>

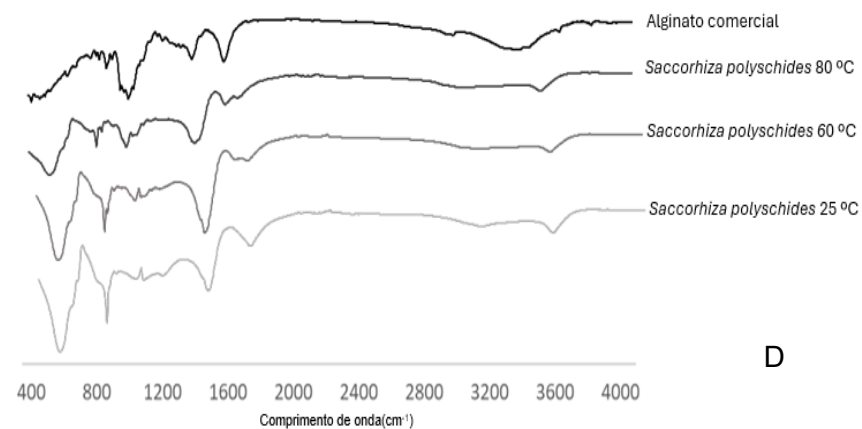
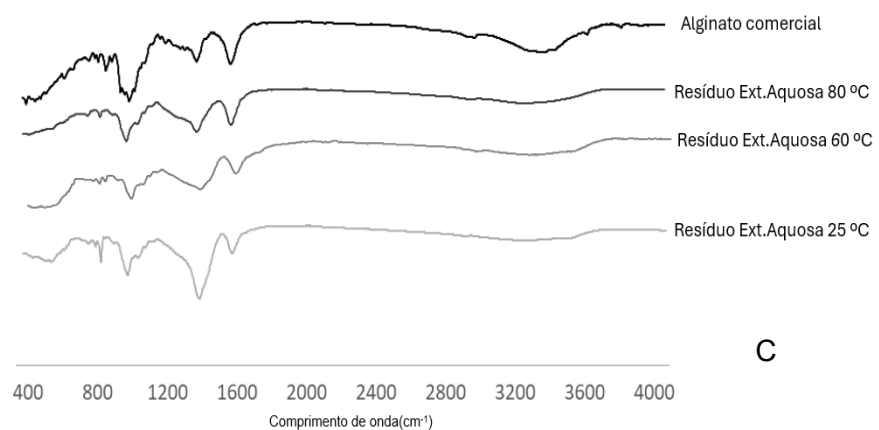
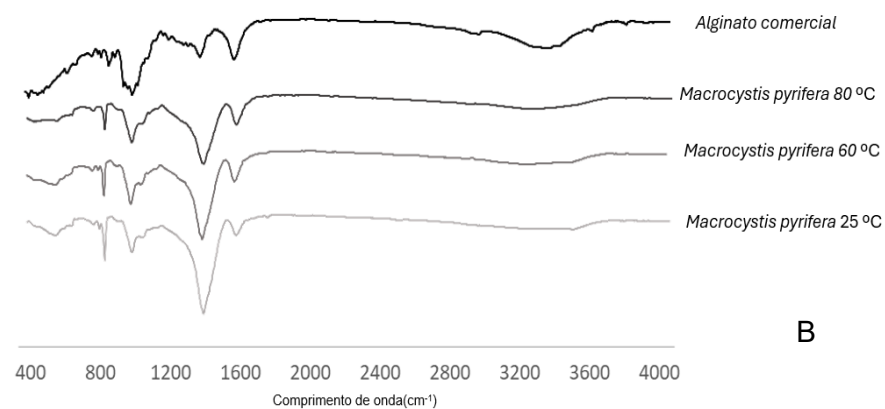
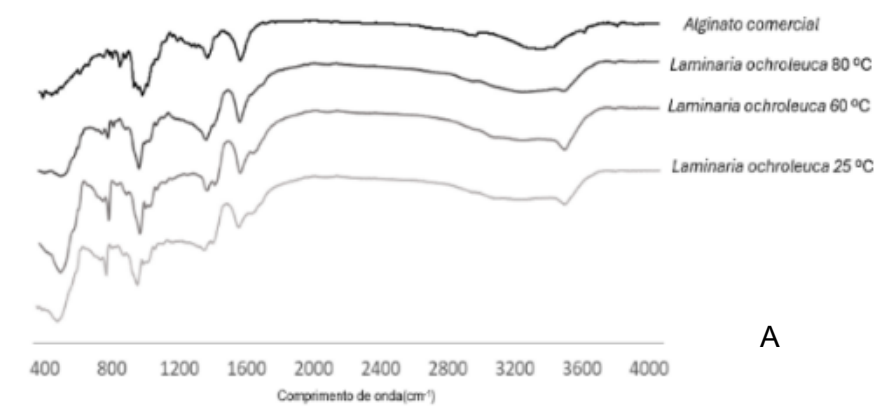
Os sobrescritos <sup>a, b, c, d</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas entre diferentes espécies e tratamentos térmicos ( $p < 0,05$ )

O resíduo de extração aquosa, a 60°C e a 25°C, teve um rendimento superior a todas as demais amostras (51,04  $\pm$  0,75% e 41,37  $\pm$  0,50%, respetivamente). Pela ANOVA unidirecional verificou-se diferenças estatisticamente significativas entre amostras a 60°C ( $F_{(3,11)} = 1055,951$ ,  $p < 0.001$ ) e a 25 °C ( $F_{(3,11)} = 2016,259$ ,  $p < 0.001$ ).

Em contraste, *L. ochroleuca* apresentou os menores rendimentos, com valores de 29,91  $\pm$  0,75% a 80°C, 13,61  $\pm$  0,71% a 60°C e 7,33  $\pm$  0,29% a 25°C.

Para proceder à análise dos grupos funcionais, que estão normalmente associados aos alginatos de sódio, foram realizadas análises em espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica eficaz, não destrutiva e rápida para identificar grupos funcionais presentes na amostra. É útil para caracterizar estruturas polissacarídicas e também possíveis contaminantes existentes nas amostras.

A Figura 9 apresenta os espectros obtidos por FTIR, resultantes da análise dos alginatos extraídos das diferentes amostras submetidas a distintos tratamentos térmicos. Para comparação, foi utilizado um alginato de sódio comercial. Identificaram-se picos entre os 3000 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ , 1400 e 1454  $\text{cm}^{-1}$ , aos 1200  $\text{cm}^{-1}$ , entre 1020 e 1040  $\text{cm}^{-1}$ , aos 940  $\text{cm}^{-1}$  e também aos 880  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 9.** Espectros de FTIR do alginato de sódio das diferentes amostras extraídos a diferentes temperaturas: A - *Laminaria ochroleuca*, B - *Macrocyctis pyrifera*, C - Resíduo extração aquosa, D - *Saccorhiza polyschides*

### 3.6. Extração e Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos

Procedeu-se à quantificação dos pigmentos fucoxantina, clorofila *a* e clorofila *c* nas amostras frescas de *L. ochroleuca* e *S. polyschides*. Na Tabela VIII, estão apresentados os resultados obtidos para as concentrações dos pigmentos fotossintéticos.

Relativamente à concentração de fucoxantina extraída das amostras frescas de *S. polyschides* e *L. ochroleuca*, estas apresentaram concentrações de  $6,95 \times 10^{-1} \pm 2,25 \times 10^{-2}$  mg.g<sup>-1</sup> DW, e de  $4,39 \times 10^{-1} \pm 3,03 \times 10^{-2}$  mg.g<sup>-1</sup> DW, respetivamente. Segundo o Teste t-student ( $t_{(4)} = 11,767$ ,  $p < 0,001$ ), existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras frescas.

Relativamente à concentração de clorofila *a*, a amostra fresca de *S. polyschides* apresentou um resultado de  $4,22 \pm 9,35 \times 10^{-2}$  mg.g<sup>-1</sup> DW, seguido da *L. ochroleuca* fresca, que obteve um resultado de  $2,60 \pm 7,02 \times 10^{-1}$  mg.g<sup>-1</sup> DW. Mais uma vez, verificou-se diferenças estatisticamente significativas segundo o Teste t-student ( $t_{(4)} = -3,963$ ,  $p = 0,008$ ) entre as *L. ochroleuca* e *S. polyschides* frescas.

Em relação aos resultados para a clorofila *c*, a *S. polyschides* fresca apresentou uma concentração de  $9,66 \times 10^{-1} \pm 1,27 \times 10^{-1}$  mg.g<sup>-1</sup> DW e a *L. ochroleuca* fresca obteve  $6,81 \times 10^{-1} \pm 1,60 \times 10^{-1}$  mg.g<sup>-1</sup> DW. As diferenças estatisticamente significativas foram comprovadas segundo o Teste t-student ( $t_{(4)} = -2,412$ ,  $p = 0,037$ ).

**Tabela IX.** Concentração de fucoxantina, clorofila *a* e clorofila *c* (mg.g<sup>-1</sup> DW) entre as diferentes amostras frescas de *Laminaria ochroleuca* e *Saccorhiza polyschides*. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

Amostra	[Fucoxantina] - mg.g <sup>-1</sup> DW
<i>L. ochroleuca</i> , Fresca	$4,39 \times 10^{-1} \pm 3,03 \times 10^{-2}$ b
<i>S. polyschides</i> , Fresca	$6,95 \times 10^{-1} \pm 2,25 \times 10^{-2}$ a
Amostra	[Clorofila a] - mg.g <sup>-1</sup> DW
<i>L. ochroleuca</i> , Fresca	$2,60 \pm 7,02 \times 10^{-1}$ b
<i>S. polyschides</i> , Fresca	$4,22 \pm 9,35 \times 10^{-2}$ a
Amostra	[Clorofila c] -mg.g <sup>-1</sup> DW
<i>L. ochroleuca</i> , Fresca	$6,81 \times 10^{-1} \pm 1,60 \times 10^{-1}$ b
<i>S. polyschides</i> , Fresca	$9,66 \times 10^{-1} \pm 1,27 \times 10^{-1}$ a

Os sobrescritos <sup>a, b</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas entre amostras frescas ( $p < 0,05$ ).

Para além da quantificação da concentração de pigmentos fotossintéticos nas amostras frescas, também se procedeu à quantificação dos pigmentos anteriores, nas amostras secas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela X.

A concentração de fucoxantina mais elevada foi obtida no resíduo de extração aquosa, no qual se obteve um valor médio de  $1,58 \pm 0,03 \times 10^{-1}$  mg.g<sup>-1</sup> DW, sendo seguido pela amostra de *L. ochroleuca* ( $14,2 \pm 0,3$  mg.g<sup>-1</sup> DW). A *M. pyrifera* teve a menor concentração de fucoxantina ( $5,67 \pm 0,14 \times 10^{-2}$  mg.g<sup>-1</sup> DW).

**Tabela X.** Concentração de fucoxantina, clorofila a e clorofila c (mg.g<sup>-1</sup> DW) nas diferentes amostras secas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3)

Amostra	[Fucoxantina]-mg.g <sup>-1</sup> DW
<i>L. ochroleuca_Seca</i>	$1,42 \pm 0,03 \times 10^b$
<i>S. polyschides_Seca</i>	$1,11 \pm 0,05 \times 10^{-1} c$
Resíduo Ext. aquosa	$1,58 \pm 0,03 \times 10^{-1} a$
<i>M. pyrifera</i>	$5,67 \pm 0,14 \times 10^{-2} d$
Amostra	[Clorofila a] – mg.g <sup>-1</sup> DW
<i>L. ochroleuca_Seca</i>	$2,66 \pm 1,93 \times 10^{-2} b$
<i>S. polyschides_Seca</i>	$2,22 \pm 0,25 \times 10^{-2} a, b$
Resíduo Ext. aquosa	$1,66 \pm 0,23 \times 10^{-2} a$
<i>M. pyrifera</i>	$1,93 \pm 0,32 \times 10^{-2} a$
Amostra	[Clorofila c] - mg.g <sup>-1</sup> DW
<i>L. ochroleuca_Seca</i>	$2,95 \pm 0,09 \times 10^{-3} a$
<i>S. polyschides_Seca</i>	$2,66 \pm 0,03 \times 10^{-3} a$
Resíduo Ext. aquosa	$1,47 \pm 0,83 \times 10^{-4} c$
<i>M. pyrifera</i>	$6,94 \pm 0,72 \times 10^{-4} b$

Os sobrescritos <sup>a, b, c, d</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas entre amostras secas

( $p < 0,05$ ).

Em relação à concentração de fucoxantina apresentada pelas amostras secas, houve uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras, determinada pela ANOVA unidirecional ( $F(3,11) = 528.215$ ,  $p < 0.001$ ).

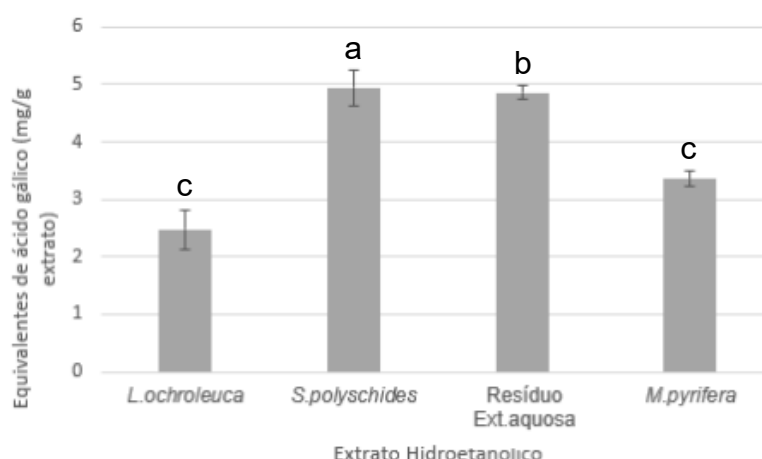
Em relação às amostras secas, a concentração de clorofila *a* foi dominada pela *L. ochroleuca* ( $2,66 \pm 1,93 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) e as restantes amostras tiveram resultados que variaram entre  $1,66 \pm 0,23 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  (no resíduo) e  $2,22 \pm 0,25 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  (*S. polyschides*). Entre amostras secas, a concentração de clorofila *a* houve uma diferença estatisticamente significativa, determinada pela ANOVA unidirecional ( $F_{(3,11)} = 8,654, p < 0.007$ ).

Nas amostras secas, a concentração de clorofila *c* foi maior na *L. ochroleuca* ( $2,95 \pm 0,09 \times 10^{-3} \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ), seguida pela *S. polyschides* ( $2,66 \pm 0,03 \times 10^{-3} \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ), pela *M. pyrifera* ( $6,94 \pm 0,72 \times 10^{-4} \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) e, por último, pelo resíduo de extração aquosa ( $1,47 \pm 0,83 \times 10^{-4} \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ). Determinada pela ANOVA unidirecional ( $F_{(3,11)} = 194,576, p < 0.001$ ), comprovou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre amostras.

### 3.7. Atividade Antioxidante

#### 3.7.1. Quantificação de Polifenóis Totais (QTP)

Em relação aos resultados do ensaio de QTP (quantificação de polifenóis totais), também se identificaram diferenças entre as espécies (Figura 11). Os valores variaram de  $2,47 \pm 0,33 \text{ mg GAE.g}^{-1}$  (para a *L. ochroleuca*) a  $4,94 \pm 0,31 \text{ mg GAE.g}^{-1}$  (na *S. polyschides*), sendo que esta última se destaca evidentemente de todas as outras amostras analisadas. Com valores intermédios, estão a *M. pyrifera* com  $3,36 \pm 0,13 \text{ mg GAE.g}^{-1}$  e o resíduo com  $4,86 \pm 0,12 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ .



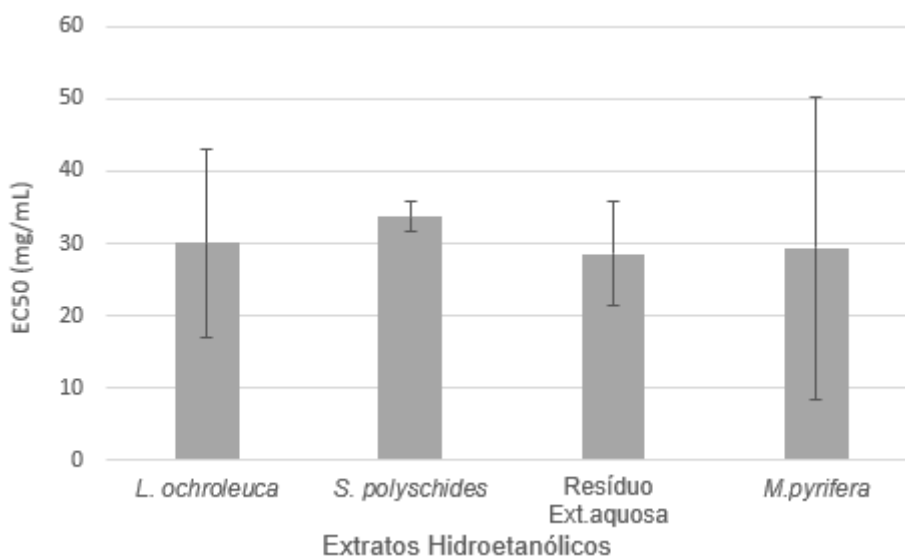
**Figura 10.** Polifenóis totais dos extratos expressos em  $\text{mg GAE.g}^{-1}$ , onde GAE significa equivalente de ácido gálico. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). Os sobrescritos <sup>a, b, c</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas entre extratos hidroetanólicos das 4 amostras testadas ( $p < 0,05$ ).

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

A absorção a 517 nm, o radical DPPH apresenta uma cor violeta em solução, tornando-se amarelo-pálido após a eliminação do radical, permitindo que a reação seja seguida espectrofotometricamente. Esta mudança de cor não foi observada visualmente nas amostras analisadas.

Os resultados de redução do radical DPPH variaram entre 10 e 23% para as concentrações utilizadas (para a *L. ochroleuca* variou entre 17 e 23%; a *S. polyschides* entre 10 e 14%; a *M. pyrifera* entre os 16 e 23%; e o resíduo entre 10 e 16%).

O menor valor de EC50 foi observado no resíduo seguida pela macroalga *M. pyrifera*, com valores de 28,56 mg.mL<sup>-1</sup> e 29.40 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente. Os extratos hidroetanólicos de *L. ochroleuca* apresentaram um EC50 de 30,09 mg.mL<sup>-1</sup>. Por outro lado, a *S. polyschides* teve um EC50 de 33,70 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 11). Não foram observadas diferenças significativas, conforme indicado pelo teste ANOVA univariada ( $F_{(3,11)} = 0,093$ ;  $p > 0,962$ )



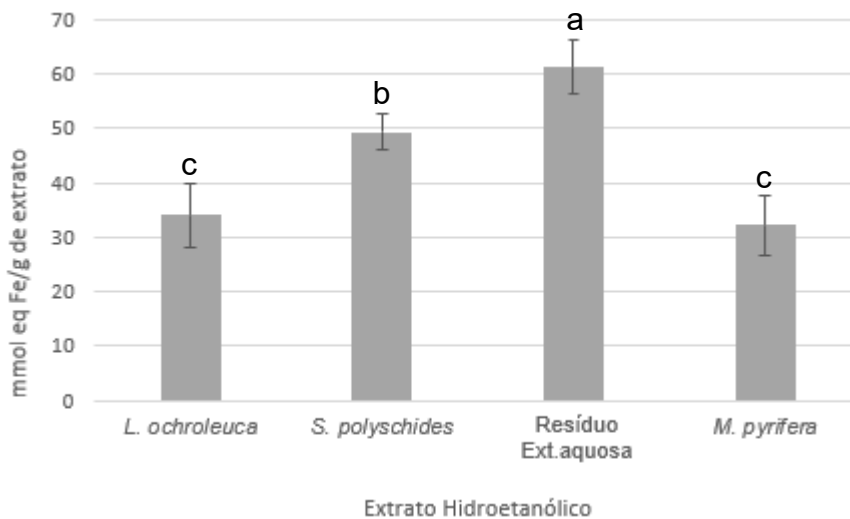
**Figura 11.** EC50 (mg.mL) observado nos extratos hidroetanólicos das 4 amostras testadas. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3)

### 3.7.3. Potencial de Redução do íon Fe (III) (FRAP)

O ensaio de FRAP baseia-se na redução do íon ferro por compostos antioxidantes biológicos e redutores químicos (Griffin & Bhagooli, 2004).

O potencial de redução do íon ferro, foi avaliado em mmol equivalentes de ferro por grama de extrato (mmol eq Fe/g extrato).

O resíduo apresentou o maior potencial de redução de cerca de 61,27 mmol eq Fe/g extrato, seguido de *S. polyschides* com um potencial de redução de cerca de 49,3 mmol eq Fe/g extrato. Os valores mais baixos registados foi na *M. pyrifer* que apresentou um potencial de 34,09 mmol eq Fe/g extrato e *L. ochroleuca* apresentou o teor mais baixo, cerca de 32,21 mmol eq Fe/g extrato (Figura 12).



**Figura 12.** Capacidade de redução do íon ferro, pelos extratos hidroetanólicos (mmol eq Fe/g de extrato) das 4 amostras testadas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Os sobrescritos <sup>a, b, c</sup> indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes extratos hidroetanólicos ( $p < 0,05$ )

### 3.8. Atividade Antimicrobiana

A escolha dos microrganismos a analisar teve em conta a testagem com o maior espectro possível, sendo assim escolhidas uma Gram positiva (*Micrococcus luteus*) e uma Gram negativa (*Escherichia coli*). Foi determinada a capacidade inibitória dos extratos de *L. ochroleuca*, *M. pyrifera* e do resíduo na concentração de 18,2 mg.mL e o extrato de *S. polyschides* na concentração de 15,4 mg.mL, tendo sido feita para o efeito uma leitura visual e confirmada com uma leitura espectrofotométrica.

Quando se observavam os poços de controlo positivo (meio de cultura e microrganismo), estes apresentavam turvação, como esperado, para as estirpes bacterianas. Os poços de controlo negativo (meio de cultura), não apresentaram turvação. Quando se testou o controlo de etanol (meio de cultura + etanol + microrganismo), apenas se verificou crescimento bacteriano nos poços onde o etanol se encontrava em menor concentração, pelo que apenas foram considerados válidos os resultados dos extratos diluídos na mesma percentagem de etanol. Nos poços de testagem dos extratos hidroetanólicos (meio de cultura + extrato + microrganismo), para os extratos menos diluídos de *S. polyschides* e do resíduo, no ensaio com *Micrococcus luteus*, observou-se a formação de depósitos no fundo das amostras.

## 4. Discussão

As macroalgas marinhas apresentam um perfil bioquímico rico e diversificado, contendo compostos biológicos como pigmentos, compostos fenólicos, polissacáridos, ácidos gordos e proteínas, que podem ser utilizados no desenvolvimento de diversos produtos inovadores. No entanto, esse perfil bioquímico pode sofrer variações devido a fatores como a espécie de macroalga, o habitat e mudanças nos fatores bióticos e abióticos (Pacheco et al., 2021)

Os resultados revelam diferenças entre as amostras, indo de encontro com dados já publicados que atestam a elevada diversidade da composição bioquímica.

### 4.1. Teor de Humidade e Cinzas

Ao analisar resultados já publicados, os resultados obtidos de *S. polyschides* colhida no outono estão abaixo dos 94,3% FW e 87,09% FW obtidos por Garcia et al. (2016) e Pacheco et al. (2021), respetivamente. Em relação à *L. ochroleuca*, o estudo de Pacheco et al. (2021), obteve para o teor de humidade de 85,90% FW, resultados ligeiramente superiores aos resultados apresentados no presente estudo.

O teor de cinzas representa o conteúdo inorgânico presente na amostra (Millinovic et al., 2021). Quanto ao conteúdo de cinzas verifica-se também uma grande discrepância de valores entre os estudos já publicados para *S. polyschides*, com variações entre 29 e 44,6% (Garcia et al., 2016; Milinovic et al., 2021; Norton, 1970), superiores aos valores obtidos neste estudo.

As macroalgas analisadas por Garcia et al. (2016) foram recolhidas no outono, no Estuário de Barbate (Golfo de Cádiz – Espanha). As de Milinovic et al. (2021) e Norton (1970) foram recolhidas entre o verão e o outono, na costa portuguesa. De acordo com Pacheco et al. (2021), com algas recolhidas no verão em Viana do Castelo, o conteúdo de cinzas de *S. polyschides* foi de 20,89% DW, e no caso da *L. ochroleuca* foi de 18,33% DW. O conteúdo de cinzas de *S. polyschides* foi semelhante comparando os resultados obtidos (20,01% DW), mas a *L. ochroleuca* teve um teor de cinzas inferior ao obtido neste estudo.

Ao analisar-se os resultados, verifica-se que os teores de cinzas obtidos neste estudo para a *M. pyrifera* estão acima dos 41,6% DW obtidos por Lamare & Wing (2001), macroalga essa colhida na Península de Otago-Nova Zelândia, no Inverno, o que

poderá estar relacionado com a disponibilidade de matéria inorgânica no ambiente marinho.

O elevado teor de cinzas da *M. pyrifera* (48,94% DW) pode estar relacionado com esta ter sido cultivada em Lüderitz, Namíbia. Nesta zona existe uma corrente oceânica importante, a Corrente de Benguela. Esta é uma corrente de águas frias que se desenvolve perto do Cabo das Agulhas, e segue a costa até ao largo de Angola (Fennel, 1999). A Corrente de Benguela é acompanhada por *upwelling* costeiro, que é mais intenso junto à costa da Namíbia. Por ação do vento, as águas superficiais são afastadas, permitindo assim que a massa de água fria rica em nutrientes, que está no fundo, suba. A macroalga, ao estar presente em águas produtivas como as da corrente de Benguela, e como tem capacidade de bioacumular os minerais presentes na água, apresenta um teor de cinzas mais elevado (Garcia et al., 2016), justificando assim os valores obtidos.

Assim, é possível perceber que as diferenças apresentadas na percentagem de cinzas das diferentes macroalgas devem-se, provavelmente, às diferenças entre os locais e épocas de colheita, além da acumulação de matéria inorgânica, que depende de vários fatores ambientais, da acumulação de minerais presentes em sedimentos (Garcia et al., 2016) e da fase do ciclo de vida das macroalgas (Holdt & Kraan, 2011).

Comparando os resultados obtidos pelo teor de cinzas do resíduo resultante de extração aquosa, notou-se que este teve uma percentagem inferior comparando com a amostra original de *M. pyrifera*. Este resultado do resíduo pode estar relacionado com a redução no teor de matéria inorgânica durante o processo de extração aquosa.

Apesar de não terem tido os mesmos valores no teor de cinza, tanto o estudo como o artigo de Cebrián-Lloret et al. (2022) apresentaram a mesma tendência de decréscimo. Quando comparou as amostras de *Alaria esculenta*, *Saccharina latissima* e *Ascophyllum nodosum* com os seus resíduos resultantes da extração de alginatos, concluíram que os resíduos possuíam menor percentagem de cinzas. Embora os processos de extração das amostras sejam diferentes, os resultados são muito idênticos e podem estar relacionados com a libertação de matéria inorgânica para a fração líquida tanto na extração aquosa como na extração de alginatos.

#### 4.2. Conteúdo Proteico, Matéria gorda total e Hidratos de Carbono

O conteúdo proteico nas algas marinhas não varia apenas entre espécies, mas também entre épocas do ano, condições ambientais (ex: temperatura, nutrientes e luz) e estado fisiológico dos organismos (Fleurence, 1999).

Os resultados obtidos estão dentro da faixa de valores típicos para o teor proteico das algas castanhas, que pode variar entre 5% e 20% (Purcell-Meyerink et al., 2021).

Segundo os estudos de Milinovic et al. (2021), Pacheco et al. (2021) e Garcia et al. (2016), o conteúdo proteico total da *S. polyschides* foi de 16% DW, 14,01% DW e 7,3% DW, respectivamente. Os valores obtidos pelos autores anteriormente citados foram superiores aos obtidos neste estudo (8,97% DW), com exceção dos resultados de Garcia et al. (2016).

Em relação ao conteúdo proteico total obtido para a macroalga *L. ochroleuca* (8,93% DW), o resultado foi inferior ao obtido por Pacheco et al. (2021). Por outro lado, segundo Sánchez-Machado et al. (2004), para a *L. ochroleuca*, observou-se um conteúdo proteico de 7,49% DW, inferior ao obtido no presente trabalho. Enquanto isso, os valores obtidos por *L. ochroleuca* são superiores aos obtidos pela *Laminaria digitata* (3,8% DW) (Hou et al., 2015), mas inferiores aos 9,15% DW apresentados por Goñi et al. (2002) pela *Laminaria digitata*. Apesar disso, os resultados obtidos de *L. ochroleuca* neste estudo foram idênticos aos obtidos por Amaro et al. (2022).

O valor obtido pela *M. pyrifera* neste estudo é inferior ao obtido por Ortiz et al. (2009) e Biparva et al. (2023), no qual o conteúdo proteico registado foi de 13,2% DW e 11,4% DW, respectivamente. As macroalgas analisadas pelos autores citados foram colhidas no Chile e na Patagônia-Argentina, respectivamente. Os valores de teor proteico apresentados tanto para o resíduo de extração aquosa quanto para *M. pyrifera* foram de 9%. Essa constatação sugere que a extração aquosa não teve influência significativa no conteúdo proteico do resíduo.

Para além da colheita das macroalgas ter sido feito em zonas distintas e épocas do ano diferentes, também é preciso ter em conta que, para além de ter sido usado o método de Kjeldahl, o fator de conversão utilizado foi distinto (o fator de conversão usado por Garcia et al. (2016), Hou et al. (2015), Ortiz et al. (2009) e Sánchez-Machado et al. (2004) foi de 6,25). Segundo Angell et al. (2016), o valor de 6,25 sobrestima o valor proteico total das algas. Em contrapartida, neste estudo e nos trabalhos de Pacheco et al. (2021) e Biparva et al. (2023), utilizou-se um fator de conversão de 5, próprio para

macroalgas (Angell et al., 2016). Em relação aos métodos aplicados por Goñi et al. (2002), foram diferentes do método de Kjeldahl.

O teor lipídico das macroalgas castanhas é na generalidade baixo, variando entre 1% e 5% (DW), sendo assim compatíveis com uma dieta saudável (Lordan et al., 2011). As macroalgas avaliadas neste trabalho seguem esta tendência.

Quando se comparam os resultados obtidos da *L. ochroleuca* em relação ao teor lipídico com bibliografia, há uma diversidade de resultados. Nos estudos dos autores Pacheco et al. (2021) e Sánchez-Machado et al. (2004), a *L. ochroleuca* apresenta, respetivamente, um teor lipídico de 0,51% DW e 0,92% DW, inferior aos valores obtidos neste trabalho. Em relação à *L. ochroleuca* colhida na Primavera por Soares et al. (2021), esta apresenta valores do teor lipídico de 2,2% DW, semelhantes aos observados neste trabalho.

Tanto as colheitas levadas a cabo pelos autores Pacheco et al. (2021) e Sánchez-Machado et al. (2004), como as que foram realizadas no presente estudo, foram realizadas em pleno verão.

No caso da *S. polyschides* colhida no verão, os artigos publicados apresentam valores que variam entre 1,1 e 2,5% DW (Rodrigues et al. (2015); Pacheco et al. (2021); Soares et al. (2021)). Por outro lado, a *S. polyschides* colhida no Outono por Soares et al. (2021), obteve um resultado de apenas 1,0% de teor lipídico. Tanto a *S. polyschides* colhida neste estudo como no estudo de Milinovic et al. (2021) foram colhidas entre o final do verão/início do outono e tiveram o mesmo conteúdo lipídico (3,3% DW).

Isto pode indicar que, para além da estação do ano em que a macroalga foi colhida, pode haver outros fatores que influenciem os valores do conteúdo lipídico. De acordo com Soares et al. (2021), o teor lipídico das algas marinhas não só depende da estação do ano em que a macroalga foi colhida, mas também varia conforme a localização geográfica, o clima e as condições ambientais, como temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Além desses fatores, as diferentes metodologias analíticas empregadas podem influenciar os resultados do teor lipídico.

Como se pode confirmar, a *M. pyrifera* utilizada neste estudo foi colhida no inverno e apresentou 1,4% DW de teor lipídico. Comparando com os valores obtidos para a mesma alga que foi colhida no verão no Chile, por Ortiz et al. (2009), os valores foram metade dos que foram obtidos neste estudo. Esta diferença pode ser justificada por o teor lipídico, segundo Milinovic et. (2021), ser mais baixo no verão e do outono,

enquanto os valores mais elevados ocorrem no inverno. Segundo Biparva et al. (2023), a *M. pyrifera* obteve valores de 1,57% DW, idênticos ao obtido neste trabalho.

Ao comparar o conteúdo lipídico do resíduo de extração aquosa com o da amostra original, observou-se que o resíduo apresentou um teor lipídico 2,4% DW superior ao da amostra original. No estudo de Cebrián-Lloret et al. (2022), verificou-se que o conteúdo lipídico nos resíduos das macroalgas *Alaria esculenta* e *Saccharina latissima* aumentou em relação à amostra original, enquanto o resíduo de *Ascophyllum nodosum* apresentou um teor lipídico inferior.

Segundo Mouga (2024), a integridade da membrana celular é suscetível a fatores como temperatura, variações de pH e a utilização de solventes orgânicos. No processo de extração aquosa, utilizou-se apenas água a 40°C, o que pode ter comprometido parcialmente a integridade da membrana celular do resíduo. A membrana celular ao estar já comprometida por causa da extração aquosa, com o processo de quantificação do teor de lípidos, no qual foram empregues o metanol (um solvente polar) e o clorofórmio (um solvente apolar), pode ter acabado por levar mais facilmente à rutura das membranas celulares e à lise celular, o que pode justificar o teor lipídico mais elevado no resíduo em comparação com a amostra original.

A gama de hidratos de carbono pode variar entre os 12% e os 54% (Li et al., 2021), o que indica que os resultados obtidos neste estudo foram baixos. Apesar de ser um método fácil e rápido de proceder, pode ter algumas desvantagens, tais como: a resposta variável da absorvância a diferentes açúcares que, por vezes, acaba por dificultar a determinação do verdadeiro teor de açúcar em misturas ou em amostras biológicas e não permite a distinção de diferentes hidratos de carbonos (Taylor, 1995).

Este método tem uma primeira fase, na qual se procede a uma digestão das amostras com um ácido que, por sua vez, causa a decomposição de polissacáridos em monossacáridos. Com o objetivo de formar derivados de furfural, procedeu-se à desidratação dos monossacáridos por ácido sulfúrico concentrado. Os derivados de furfural ao reagir com o fenol origina uma coloração amarelada. Estes compostos absorvem a luz na gama visível, com um máximo de absorção a 490 nm para as hexoses e 480 nm para as pentoses e ácidos urónicos (ácido glucurónico e ácido galacturónico) (Kurzyna-Szklarek et al., 2022).

Os resultados reduzidos obtidos neste estudo podem ser atribuídos à utilização de um ácido fraco para a digestão, que não favoreceu a hidrólise de certos polissacáridos presentes nas algas castanhas. Muitos desses polissacáridos têm uma função estrutural e não se convertem facilmente em formas detetáveis pelo método de Dubois.

A reatividade limitada desses polissacáridos resulta em menor absorvância, levando a leituras de hidratos de carbono inferiores (Kurzyna-Szklarek et al., 2022).

De acordo com Mansilla & Ávila (2011), o conteúdo de hidratos de carbono da *M. pyrifera* variou entre 3,27% e 8,46% DW, nas diferentes estações do ano, valores esses idênticos aos obtidos. Segundo Biparva et al. (2023), que utilizaram o mesmo método usado neste estudo, foi registada uma percentagem de hidratos de carbono de 17,14% DW a 490 nm para *M. pyrifera*.

No entanto, existem resultados para os hidratos de carbono superiores ao obtido. Na alga *S. polyschides*, os valores variam de 45,6% a 52% DW (Milinovic et al., 2021; Rodrigues et al., 2015), enquanto a *M. pyrifera* obteve 40% DW e 75.3% DW (Navarrete et al., 2021; Ortiz et al., 2009) e a *L. ochroleuca* teve 68,33% DW (Pacheco et al., 2021). Contudo é necessário ter em conta que os valores superiores de hidratos não são baseados num método extração, mas são valores obtidos indiretamente com recurso a equações tais como a seguinte (Martins et al., 2023):

$$\% \text{Hidratos de Carbono} = 100\% - (\text{cinzas} (\%) + \text{proteínas} (\%) + \text{fibras} (\%) + \text{lípidos} (\%))$$

Em relação ao resíduo de extração aquosa, este apresentou nos dois comprimentos de onda, uma percentagem de hidratos de carbono superior à amostra original *M. pyrifera*. Este resultado pode ser ter sido causado pela extração aquosa na quantidade de hidratos de carbono ter ficado mais disponível.

Citando novamente o estudo de Cebrián-Lloret et al. (2022), o conteúdo de hidratos de carbono foi superior nos resíduos de *Saccharina latissima* e *Ascophillum nodosum*, em contrapartida o resíduo de *Alaria esculenta* apresentou uma percentagem de hidratos de carbono inferiores à amostra original. Deste modo, indica que pode existir um comportamento semelhante entre a amostra original e o respetivo resíduo, mas que este pode variar entre espécie de macroalga.

### **4.3. Teor e Perfil de Ácidos gordos**

Tanto o ácido palmítico (C16:0) como o ácido oleico (C18:1n9) foram os ácidos gordos mais abundantes neste estudo, resultado corroborado por diversos autores (Belattmania et al. 2018; Otero et al., 2019; Pacheco et al., 2021; Pereira et al., 2021).

É de frisar a quantidade registada pelo resíduo e pela *M. pyrifera* de ALA, EPA, ARA e DHA que foi superior em relação às outras macroalgas.

Segundo Méndez et al. (2023), o conteúdo de EPA mudou consoante a estrutura de *M. pyrifera* que foi avaliada e teve percentagens superiores ao deste estudo. Os ácidos gordos EPA e DHA, em particular, são essenciais para o crescimento e a sobrevivência de larvas de espécies marinhas como o ouriço-do-mar, indicando a possível utilização do resíduo e da *M. pyrifera* como rações (Carboni et al., 2013; Gomes et al., 2022).

O ácido alfa-linolénico (ALA) e o ácido docosa-hexaenóico (DHA) não foram detetados nos estudos de Belattmania et al. (2018) e Pereira et al. (2021). Da mesma forma, o estudo de Méndez et al. (2023) não encontrou DHA nas suas amostras de macroalgas. No entanto, neste estudo atual, o DHA foi identificado, embora em quantidades baixas. A exceção foi a espécie *Laminaria ochroleuca*, em que o DHA não foi detetado.

O rácio entre ómega-6 e ómega-3 é amplamente utilizado para avaliar a qualidade de gorduras numa dieta saudável. De acordo com a bibliografia, o valor ideal do rácio para uma dieta equilibrada deve ser próximo de 1, pois este valor reflete o equilíbrio recomendado entre os ácidos gordos essenciais (Gómez et al., 2011).

Os rácios de ácidos gordos ómega-3 e ómega-6 obtidos para a *L. ochroleuca* e a *S. polyschides* neste estudo são superiores aos valores relatados por Sánchez-Machado et al. (2004). Especificamente para *L. ochroleuca*, o rácio foi de 0,83, enquanto para *S. polyschides* foi de 0,71, indicando um perfil de ácidos gordos com maior proporção de ómega-3 em comparação aos dados obtidos. Foram registados rácios semelhantes ou superiores aos do presente estudo para *S. polyschides* em amostras recolhidas na Costa de Marrocos, em Peniche e no Golfo de Cádiz (Espanha), com rácios de 6,62, 3,31 e 10,9, respetivamente (Belattmania et al., 2018; Garcia et al., 2016; Pereira et al., 2021). Nos PUFA e na percentagem de ácidos gordos polinsaturados ómega-3, verificou-se que o resíduo da extração aquosa apresentou valores superiores às restantes amostras. Este resultado pode ser explicado pelo facto de os ácidos gordos serem lípidos simples e, por serem imiscíveis em água, não terem sido extraídos na etapa inicial de extração aquosa. Além disso, a temperatura utilizada de 40°C pode ter comprometido parcialmente a integridade da membrana celular do resíduo, permitindo que, na etapa subsequente com solventes orgânicos, alguns ácidos gordos fossem extraídos mais facilmente.

Contudo, o resíduo teve um rácio inferior a 1, o que significa que a sua introdução nas dietas pode vir a ser benéfica do ponto de vista nutracêutico, já que fornece ácidos gordos essenciais necessários para numerosos processos metabólicos, contribuindo simultaneamente para a redução do rácio n6/n3 da dieta dos consumidores, prevenindo

assim o risco de obesidade e de algumas doenças de natureza cardiovascular, inflamatória, autoimune ou carcinogénica (Simopoulos, 2016; Rocha et al., 2021).

Como se pode verificar existe uma grande variabilidade de resultados consoante vários autores. Esta diversidade pode dever-se à exposição às condições ambientais específicas do local onde foram colhidas, à fase do ciclo de vida da alga, ao local de amostragem e às condições de stress (Pereira et al., 2021; Hafting et al., 2015) e à estrutura da macroalga em análise (Méndez et al., 2023). As diferentes metodologias de quantificação de ácidos gordos entre artigos também pode ter influência (Pereira et al., 2021).

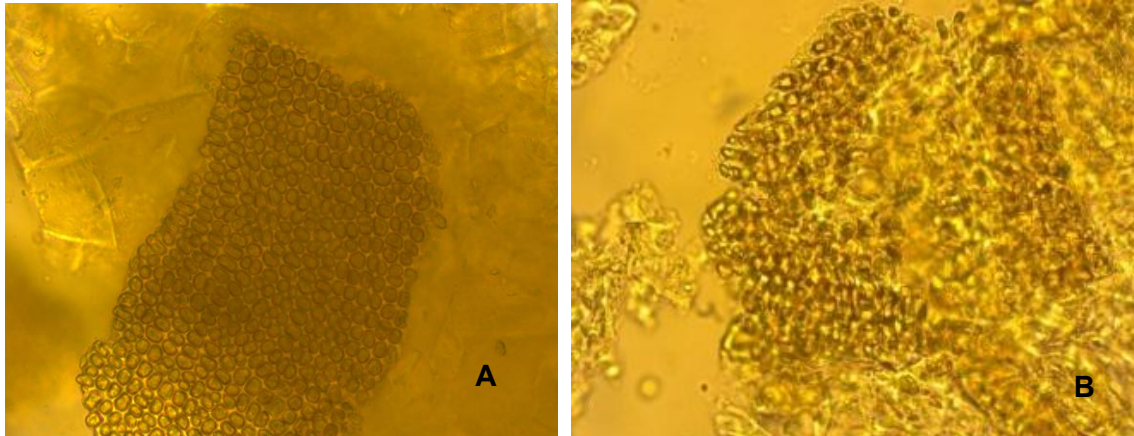
Conforme indicado na Tabela VI, tanto *Macrocystis pyrifera* como o resíduo de extração aquosa, apresentaram um conteúdo de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) em relação às restantes amostras. Por outro lado as outras macroalgas (*Laminaria ochroleuca* e *Saccorhiza polyschides*), mostraram um perfil oposto, com maior teor de SFA.

Temperaturas mais baixas favorecem o aumento do conteúdo de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) nas macroalgas, em comparação com as encontradas em águas mais quentes (Schmid et al., 2014; Belattmania et al., 2018). Esse aumento de PUFA contribui para a maior fluidez das membranas celulares em ambientes de baixa temperatura (Paiva et al., 2018).

O processo de extração aquosa pode ter removido substâncias com propriedades adesivas, responsáveis por manter as células mais próximas entre si. Como mostrado na Figura 13, a amostra original exhibe células organizadas e justapostas, enquanto no resíduo da extração aquosa as células estão mais espaçadas e com uma estrutura celular aparentemente desorganizada.

Em comparação, no resíduo de extração com a amostra original de *M. pyrifera* o conteúdo de PUFA foi superior. Este resultado pode ser explicado pelo resíduo ter resultado de uma extração aquosa, ou seja, como já dito anteriormente, com a extração aquosa a membrana celular do resíduo pode ter sido comprometida.

Com o processo de extração dos ácidos gordos e o uso de solventes como metanol ácido pode ter afetado ainda mais a membrana celular, facilitando a libertação de ácidos polinsaturados para o exterior.



**Figura 13.** Observação a microscópio ótico de A - *Macrocystis pyrifera* e B - Resíduo extração aquosa de *Macrocystis pyrifera* (Ampliação total 400 ×)

#### 4.4. Quantificação Elementar por XRF

As macroalgas marinhas são conhecidas pelo potencial de concentrar minerais da água do mar e são frequentemente ricas em macronutrientes e micronutrientes (Moreda-Piñeiro et al., 2012). Um elemento vestigial é nutricionalmente significativo se for essencial ou potencialmente tóxico para um organismo quando presente em baixas concentrações nos alimentos. Considera-se que um elemento é essencial para um organismo quando a redução da sua exposição abaixo de certos limites resulta numa redução de uma função fisiológica importante ou quando o elemento é parte integrante de uma estrutura orgânica que desempenha uma função vital para o organismo (World Health Organization, 1996).

Minerais como o Ca (cálcio), Fe (ferro), Mg (magnésio), Se (selênio), Cu (cobre) e Cr (cromo) são exemplos de elementos essenciais, enquanto o arsénio e os metais pesados como o Cd (cádmio), Pb (chumbo) e Hg (mercúrio) são motivo de grande preocupação devido à sua concentração excessiva em certos alimentos.

Contudo, neste estudo foram detetados os seguintes minerais essenciais: K (potássio), Ca (cálcio), Fe (ferro), P (fósforo), Cu (cobre). Contudo também foi detetado a presença de arsénio. No entanto, em relação ao conteúdo de minerais, existe uma grande variabilidade entre estudos.

No caso do teor de potássio e fósforo nos estudos de Pacheco et al. (2021), em *S. polyschides* e *L. ochroleuca*, foram superiores aos observados neste estudo. Por outro lado, em relação à quantidade obtida neste estudo para a quantidade de cálcio em *S.*

*polyschides*, apresentou concentrações superiores às reportadas por Milinovic et al. (2021) e Rodrigues et al. (2015) e inferior aos apresentados por Pacheco et al. (2021).

Para *L. ochroleuca* e *S. polyschides*, os resultados de Pacheco et al. (2021) para o zinco e o ferro foram semelhantes aos obtidos neste estudo. No caso do cobre, ao comparar os valores obtidos com os do autor anteriormente citado, observou-se que aquele autor apresentou uma quantidade inferior à encontrada no presente estudo tanto para a *L. ochroleuca* como para a *S. polyschides*.

Neste estudo existem diferenças apresentadas para a *M. pyrifera* e para o resíduo de extração aquosa relativamente a vários minerais, sendo a maior concentração registrada o potássio, algo que também foi verificado por Pérez-Alva et al. (2023). Entre o resíduo e a amostra original, como se pode verificar pela Tabela VI, existem elementos como o fósforo e o potássio, que podem ter sido removidos durante a extração aquosa e estarem presentes no bioestimulante. Contudo, alguns minerais como o enxofre, o cálcio, o silício e o estrôncio encontram-se em maiores quantidades do que comparando com *M. pyrifera*.

No entanto, segundo Milinovic et al. (2021) e Pacheco et al. (2021), estes identificaram a presença de sódio e iodo, elementos que não foram detetados neste estudo. Dadas as elevadas concentrações de iodo e sódio nas águas marinhas, e considerando que as algas em estudo são marinhas (Muñoz & Diaz, 2022), era esperado que a análise por fluorescência de raios X (XRF) identificasse esses elementos nas amostras. Contudo, é importante considerar possíveis limitações no equipamento quanto à detecção de elementos.

O equipamento XRF utilizado possui capacidade para detetar apenas elementos na faixa entre magnésio e urânio, o que pode justificar a ausência de sódio nos resultados, uma vez que o sódio pode não ser eficientemente detetado. Além disso, como o iodo é um elemento volátil, os processos de secagem das macroalgas podem ter levado à sua ausência nas amostras.

Adicionalmente, seria interessante realizar em estudos futuros técnicas como a Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), conforme realizado por Martins et al. (2023), para uma identificação elementar completa.

Neste contexto, e tendo em atenção que as concentrações de arsénio observadas em todas as amostras ultrapassa o limite segundo o regulamento da EU nº465/2023 para comercializados em forma de pó ou sob forma líquida o teor máximo é de 0,010/0,020 µg.g/dia, a sua ingestão pode constituir um manifesto risco para a saúde pública.

Contudo com processos de extração (ex: extração aquosa), o problema da concentração total de arsênio poderá ser resolvido. Inversamente, os outros elementos encontram-se em quantidades inferiores ao valor de referência nutricional (Tabela XI).

**Tabela XI.**Valores referência nutricional de cada elemento químico: VRN

Elementos	VRN	Fontes
P	700 mg/dia (VRN)	Regulamento (UE) n° 1169/2011
Cl	800 mg/dia (VRN)	Regulamento (UE) n° 1169/2011
K	2000 mg/dia (VRN)	Regulamento (UE) n° 1169/2011
Ca	800 mg/dia (VRN)	Regulamento (UE) n° 1169/2011
Fe	14 mg/dia (VRN)	Regulamento (UE) n° 1169/2011
Cu	1 mg/dia (VRN)	Regulamento (UE) n° 1169/2011
Zn	10 mg/dia (VRN)	Regulamento (UE) n° 1169/2011
As	0,010/0,020 µg/dia*	Regulamento (UE) n° 465/2023

\* comercializados em forma de pó ou sob forma líquida

Apesar da quantificação de bromo, bário, enxofre e estrôncio nas amostras, para estes elementos não existem valores de referência, uma vez que não há evidências de toxicidade dos elementos, que implique riscos para a saúde pública.

#### 4.5. Extração e Caracterização de Alginatos

A eficiência da extração e as propriedades dos alginatos são principalmente afetadas por vários parâmetros, como a temperatura, tempo de extração, pH, dimensão da amostra e a extração alcalina realizada (Mohammed et al., 2018; Saji et al., 2022).

Segundo o trabalho realizado por Fertah et al. (2017), este procedeu à extração de alginatos da macroalga *Laminaria digitata*, com dimensões inferiores a 1 mm e superiores a 1 mm até os 5 mm. Também procedeu a temperaturas diferentes na extração alcalina, obtendo o melhor rendimento obtido com a amostra de dimensões inferiores a 1 mm e com uma extração alcalina a 40°C.

Analisando atentamente os resultados do resíduo, a temperatura mais alta teve um rendimento inferior às temperaturas mais baixas. O resíduo é a porção não solúvel de uma extração aquosa de *M. pyrifera*, por isso, embora a parede celular não tenha sido afetada pela extração aquosa, esta teve a sua estrutura celular desorganizada, como se pode verificar pela Figura 13.

Com a extração de alginatos e a desorganização da estrutura celular, os alginatos insolúveis podem ter-se tornado mais biodisponíveis. A temperatura mais alta teve um menor rendimento devido à possibilidade da degradação dos alginatos pela solução alcalina a 80°C.

Segundo Belattmania et al. (2020), o rendimento de extração para a *S. polyschides* foi 25% e 27,5% para a *L. ochroleuca*, semelhantes nos resultados obtidos neste estudo para a *S. polyschides*, mas superior para a *L. ochroleuca* (7,33%). Comparando os resultados de extração de alginatos das lâminas da *L. ochroleuca*, verificou-se que o resultado à temperatura ambiente foi inferior aos 28,96%, obtidos por Kaidi et al. (2022).

Os valores obtidos para *M. pyrifera* a 60°C são muito próximos aos valores apresentados por Panikkar e Brasch (1996). Em relação aos valores de rendimento a 80°C da *M. pyrifera*, os valores obtidos neste estudo foram superiores ao de Hernández-Carmona et al. (1999). Contudo os mesmos autores tiveram rendimentos de extração a 60°C muito idênticos aos obtidos neste estudo.

A análise FTIR foi realizada para identificar os grupos funcionais do alginato de sódio, comparar as diferentes amostras e identificar os picos típicos. Utilizou-se como comparação um alginato de sódio comercial (utilizado como controlo da experiência). Os picos mais comuns encontrados e apresentados na Figura 9, foram os grupos funcionais já explicados na literatura para o alginato de sódio.

Entre o comprimento de onda de 3000 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ , associa-se tipicamente o teor de água (Azizi et al., 2017). A presença de água nas amostras de alginatos, pode estar relacionado a capacidade hidróscópica dos mesmos, o qual permite a absorção de humidade do ambiente circundante. As bandas largas a 1600-1610  $\text{cm}^{-1}$  foram sugeridas como o estiramento assimétrico do carboxilato (O-C-O). Entre 1400 e 1454  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas à vibração de deformação C-OH (Beratto-Ramos et al., 2020), sendo mais proeminente na alga *M. pyrifera* e no resíduo, em comparação com *L. ochroleuca* e *S. polyschides*.

O pico acentuado entre os 1020 e 1040  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao alongamento dos grupos C-O (Beratto-Ramos et al., 2020). Aos 1200  $\text{cm}^{-1}$ , foi verificada a existência de picos ligeiros que podem estar associados à vibração do grupo sulfato ( $\text{SO}_3$ ) (Pereira & Ribeiro-Claro, 2015). Entre os 848 e 880  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde à vibração da deformação da ligação entre o carbono 1 e hidrogénio (C1-H) dos resíduos de ácido manurónico. Aos 940  $\text{cm}^{-1}$  está associado ao estiramento de C-O de resíduos de ácido gulurónico (Beratto-Ramos et al., 2020).

Na Figura 9 também se pode verificar que não existem muitas diferenças dos picos entre os alginatos extraídos e o alginato comercial. Contudo, como se pode verificar nessa mesma figura, abaixo dos 800  $\text{cm}^{-1}$  a presença de algum ruído. Ruído esse que poderá estar diretamente relacionado com compostos das próprias macroalgas, como por

exemplo aos 580 cm<sup>-1</sup> podem estar associados à vibração do grupo S-O (grupo sulfóxido) em galactanos sulfatados (Pereira & Ribeiro-Claro, 2015).

#### **4.6. Extração e Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos**

As algas castanhas são conhecidas pela produção de fucoxantina, pigmento dominante e responsável pela coloração das espécies pertencentes à divisão Ochrophyta. Além da produção de fucoxantina, é ainda possível encontrar outros carotenoides como a violaxantina e β-caroteno (Pal et al., 2014), assim como a clorofila *a* e a clorofila *c*.

A quantificação destes pigmentos ajuda a determinar o potencial biotecnológico destas amostras. Os resultados obtidos na quantificação dos três tipos de pigmentos, permitem preencher uma lacuna do conhecimento para o resíduo.

Relativamente à amostra fresca de *L. ochroleuca* e *S. polyschides*, estas apresentaram o melhor resultado tanto na quantificação de fucoxantina como nas clorofilas *a* e *c*, como seria expectável.

Segundo Mouga (2024), a degradação da membrana plasmática é afetada tanto por temperaturas muito altas como por temperaturas muito baixas. As amostras frescas, antes de serem maceradas, encontravam-se a -20°C. A diminuição do movimento molecular e a potencial formação de cristais de gelo também podem levar à rutura da membrana, induzida pela quebra das pontes de hidrogénio (Mouga, 2024). Por sua vez, durante o processo de maceração acabou por libertar mais pigmentos.

Para além da temperatura a que as amostras se encontravam, o solvente utilizado também teve influência. No caso das clorofilas *a* e *c*, foi utilizado acetona a 90% para a extração, o que pode ter influenciado a integridade da membrana celular. Também é de salientar a afinidade da acetona para com as clorofilas *a* (Streit et al., 2005).

A clorofila *a*, pigmento apolar, tem maior afinidade com a acetona, em contrapartida a clorofila *c*, um pigmento mais polar que clorofila *a*, tem menos afinidade com a acetona, o que pode explicar os resultados mais baixos da clorofila *c*. No entanto, esta diferença também pode ser explicada pela presença de diferentes quantidades entre a clorofila *a* e *c* nas amostras, como mostra Osório et al. (2020).

Em relação aos resultados obtidos pelos pigmentos fotossintéticos na amostra seca, estes podem estar diretamente relacionados pelo processo de secagem, já que este processo pode degradar as clorofilas, mas, segundo os resultados obtidos, a maior degradação acontece na clorofila *c* (Chen & Roca, 2018).

Apesar da fucoxantina ser o pigmento dominante nas macroalgas castanhas, a concentração de fucoxantina foi inferior quando comparada com a concentração de

clorofila *a*. Para a extração de fucoxantina, é de salientar que a mesma pode ser extraída com inúmeros solventes: dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, metanol, entre outros . Para futuros ensaios seria interessante comparar a quantificação do pigmento fucoxantina com os diferentes solventes(ex:etanol,metanol) . Neste estudo foi utilizado DMSO, solvente conhecido por ter a capacidade de dissolver tanto compostos apolares como polares.

Vale destacar que os métodos de extração desempenham um papel significativo nos resultados, especialmente no processamento de macroalgas ricas em compostos como alginatos, laminarinas e fucoidanos. No presente estudo, o processo de maceração foi dificultado pela presença desses polissacáridos, que pode ter afetado a quantidade de pigmento extraído.

Além do processo de maceração, diversos fatores contribuem para a grande variabilidade nos resultados de quantificação de pigmentos. A literatura mostra que a extração de pigmentos fotossintéticos é influenciada por uma combinação de fatores abióticos e bióticos (Osório et al., 2020; Shannon et al., 2017), o tipo de solvente utilizado (como etanol ou metanol, conforme Marcheafave et al., 2019), o estado da amostra (fresca ou seca) e a fase do ciclo de vida da alga.

#### **4.7. Atividade Antioxidante**

##### **4.7.1. Quantificação Total de Polifenóis (QTP)**

As algas castanhas são geralmente ricas em compostos fenólicos, que exibem propriedades antioxidantes (Gupta et al., 2011). Embora existam na literatura bastantes dados sobre o conteúdo fenólico das algas castanhas em estudo, é difícil obter valores fiáveis e consistentes para a capacidade antioxidante das espécies em estudo.

Relativamente à *S. polyschides*, os resultados apresentados pelos extratos metanólicos de Pinteus et al. (2017) possuem um maior teor de fenólicos ( $66,89 \pm 0,002$  mg GAE/g extrato). Já os extratos aquosos de *L. ochroleuca* e *S. polyschides* do estudo de Pacheco et al. (2021) obtiveram valores inferiores aos obtidos no presente estudo. Outro estudo em relação à *L. ochroleuca* apresentou um conteúdo total de polifenóis superior ao obtido neste estudo (Otero et al., 2019).

Em relação a *M. pyrifera* colhida também no inverno com a deste estudo, a quantidade de polifenóis obtida por Beratto-Ramos et al. (2019), foi superior ao obtido neste estudo.

O resíduo de extração aquosa após a extração original a 40°C, provavelmente já deveria ter a integridade da membrana celular comprometida. Com o processo de extração hidroetanólica do resíduo, com recurso a temperatura, o solvente orgânico polar (etanol) e a água levaram a que a membrana celular estivesse parcialmente comprometida fazendo com que compostos antioxidantes fossem mais facilmente extraídos.

O resultado do resíduo deste trabalho foi inferior quando comparado com resultados de resíduos de *Alaria esculenta*, *Saccharina latissima* e *Ascophyllum nodosum*, resultantes de uma extração de alginatos (Cebrián-Lloret et al., 2022). Este resultado pode estar relacionado com a extração de alginatos feita pelos anteriores autores e que, por sua vez, tanto o tratamento ácido como o tratamento básico podem ter posto em causa a integridade tanto da membrana como a parede celular e que, por sua vez, pode ter sido libertado mais polifenóis para o exterior.

Estes compostos poderão ser uma boa fonte de compostos antioxidantes com inúmeras aplicações farmacêuticas e cosméticas, como em cremes antienvhecimento e protetores solares (Leandro et al., 2019).

#### **4.7.2. Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)**

De acordo com os resultados obtidos, o resíduo apresentou o melhor EC50, seguido da *M. pyrifera*, o que significa que apenas é necessária uma pequena quantidade desse mesmo extrato para inibir a atividade do radical DPPH.

Em relação à *S. polyschides*, embora esta tenha tido um conteúdo de polifenóis elevado, esta obteve um EC50 superior a todos os outros extratos, o que significa que este extrato tem menor atividade antioxidante, resultado este que pode estar diretamente relacionado com o extrato hidroetanólico estar mais diluído em comparação aos outros extratos.

Segundo Susano et al. (2022), todas as frações de *S. polyschides*, embora o solvente usado, tiveram um EC50 superior a 0,2 mg/mL.

Por outro lado, segundo Meirelles et al. (2023), *S. polyschides* não obteve resultados para redução do radical DPPH, tanto para extratos aquosos como etanólicos.

Pinteus et al. (2017) teve a maior capacidade de eliminação de radicais DPPH com extratos metanólicos (valor EC50: 0,0492 mg/mL). Estas diferenças apresentadas por

*S. polyschides* podem estar relacionadas com os solventes usados e a metodologia de extração utilizada.

Segundo Amaro et al. (2022), os extratos hidroetanólicos de *L. ochroleuca* apresentaram o melhor potencial para a espécie na redução do radical DPPH (13,99 mg equivalentes Trolox.g extrato). Por outro lado, Jiménez-Escrig et al. (2001) obteve um resultado de EC50 dos extratos metanólicos de *L. ochroleuca* de 29,12 g de peso seco por grama de DPPH.

Para futuros trabalhos, deveriam ser feitos novos testes com estes extratos e utilizar um padrão (Trolox, BHT ou ácido ascórbico) e realizar outros ensaios de análise de antioxidantes, como o ABTS (capacidade de captura do radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)).

#### **4.7.3. Potencial de Redução do íão Fe(III) (FRAP)**

Em relação à macroalga *S. polyschides*, segundo Meirelles et al. (2023), os autores não obtiveram resultados para o FRAP. Já Susano et al. (2022) apresentou um valor de 44,5 µM equivalentes de FeSO<sub>4</sub> por grama de extrato em comparação com outros extratos resultantes de éter dietílico e acetato de etilo mostraram uma maior capacidade de reduzir o íão Fe (III) (1081,6 ± 33,3 e 828,2 ± 21,2 µM FeSO<sub>4</sub>/g), respetivamente.

Relativamente ao extrato de *L. ochroleuca* por Jiménez-Escrig et al. (2001), este apresentou uma atividade que variou entre 6,90 e 13,31 µmol Trolox.g<sup>-1</sup>, valores esses inferiores ao obtido neste estudo.

Em relação aos resultados obtidos os resultados de *M. pyrifera* dos extratos etanólicos e hidroetanólicos foram de 9,4 e 9,0 mM eq. FeSO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>, conforme os resultados de Tenorio-Rodriguez et al. (2019). Pelas unidades diferentes, há uma dificuldade de comparação com os resultados obtidos.

Além disso, ao comparar o resíduo com a amostra original, nota-se que o resíduo possui uma maior atividade antioxidante, algo que poderá estar relacionado com os polifenóis presentes no resíduo.

#### 4.8. Atividade Antimicrobiana

Com as leituras espectrofotométricas, verificou-se que, em alguns extratos, a absorvância medida no tempo inicial era maior do que a registrada após 24 horas. Além disso, observou-se que, em certas concentrações dos extratos, os resultados das leituras do espectrofotômetro indicavam maior crescimento em comparação ao controle positivo. Esses resultados podem ser atribuídos à interferência da coloração dos extratos hidroetanólicos nas leituras e nos valores de absorvância, motivo pelo qual não foram considerados.

No estudo de Silva et al. (2021) com extratos etanólicos de *L. ochroleuca* não se registou nenhuma atividade antibacteriana contra *E. coli*. Já o extrato obtido da extração com clorofórmio apresentou inibição para a mesma bactéria. Os resultados dos mesmos autores indicam que a bactéria mais resistente foi a *E. coli*, sendo sensível a um número reduzido de extratos de macroalgas diferentes.

Em relação ao extrato hidroetanólico de *S. polyschides*, este não apresentou inibição para a *E. coli*, resultado corroborado por Farid et al. (2024), que testaram extratos de metanol e etanol de várias macroalgas, na proporção de 50:50 (V/V%). No caso de *S. polyschides* colhida na primavera, só apresentou inibição para *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e para o fungo *Cryptococcus coliforme*, e não apresentou inibição para *E. coli*, independentemente da época do ano da colheita.

Ainda, segundo Susano et al. (2022), a fração insolúvel em água resultante da ressuspensão do extrato bruto de *S. polyschides* apresentou resultados de inibição contra *Cutibacterium acnes*, superiores a todas as outras frações. Segundo Muktaf et al. (2022), extratos aquosos e etanólicos de *M. pyrifera* apresentam atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* e *Staphylococcus aureus*. Contudo, a fração residual líquida apresentada por Leyton et al. (2021), apresentou tanto atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*.

Seria interessante realizar no futuro métodos diferentes como os testes da difusão em discos (antibiogramas), bem como comparar as atividades destes extratos com alguns antibióticos existentes no mercado.

Também seria interessante avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos com outros microrganismos.

## 5. Conclusão

Com o crescente interesse em produtos saudáveis, sustentáveis e biodegradáveis, aliado ao esforço para minimizar a geração de resíduos, este estudo destaca a importância de caracterizar bioquimicamente as macroalgas castanhas e, em especial, o resíduo da extração aquosa. Analisar esse resíduo oferece a oportunidade de valorizar um subproduto que, tradicionalmente, seria descartado, fomentando uma economia circular e um aproveitamento integral dos recursos.

Este estudo explorou o potencial das macroalgas castanhas e do resíduo de extração aquosa de *Macrocystis pyrifera*, com ênfase no perfil mineral, lipídico, de ácidos gordos e de alginatos, além de avaliar as atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos hidroetanólicos. Os resultados destacaram o resíduo como uma fonte significativa de alginatos, minerais como fósforo e potássio, e ácidos gordos ômega-3. Com os resultados obtidos pelo resíduo de extração aquosa, comprova-se que este ainda tem compostos de interesse. Essa composição bioquímica diversificada sugere a sua aplicabilidade em setores alimentícios, cosméticos, farmacêuticos e até mesmo na formulação de rações por exemplo para aquacultura. Para futuros estudos seria recomendado estudos sobre métodos de extração adicionais para estes compostos.

Observou-se que tanto o resíduo, quanto *Macrocystis pyrifera* apresentam ácidos gordos eicosapentaenóico (EPA, C20:5), alfa-linolênico (ALA C18:3 n3 cis), araquidônico (ARA C20:4 n6), contudo em baixa percentagem de ácidos gordos totais. É importante também destacar a alta proporção de ácidos gordos ômega-3 (n3) no resíduo, com uma relação entre ômega-6 e ômega-3 (n6/n3) inferior a 1, um perfil que sugere o seu uso em suplementos alimentares e rações para animais. No entanto é necessário testar métodos de extração e perceber a sua viabilidade para fins alimentares e a sua viabilidade econômica.

O rendimento de 51% obtido pelo resíduo de extração aquosa a 60°C também reforça o potencial deste material como uma fonte valiosa de alginatos. Esses compostos podem ser utilizados na alimentação, em cosméticos como emulsionantes e gelificantes para produtos como gelados, cremes e iogurtes.

Quanto ao conteúdo mineral, destaca-se o teor de fósforo e potássio em *M. pyrifera* e no resíduo, o que sugere seu uso tanto em rações quanto em alimentação humana. Com a ampla diversidade mineral presente nas diferentes amostras, sugere-se também explorar a eficácia dessas amostras como bioestimulantes em plantações agrícolas e

proceder a testes tanto com as amostras como os resíduos, para formular rações e proceder a ensaios com invertebrados e peixes.

Devido à utilização de solventes verdes na extração de compostos e estes terem demonstrado potencial antioxidante, sendo de destacar a capacidade de redução do íão de ferro e o conteúdo de polifenóis dos extratos hidroetanólicos de *S. polyschides* e do resíduo de extração aquosa, estes poderão ser uma boa fonte de compostos antioxidantes com aplicações na área farmacêutica e cosmética.

Para estudos futuros, recomenda-se realizar uma caracterização detalhada também de resíduos das extrações aquosas das algas *L. ochroleuca* e *S. polyschides*, com foco na análise comparativa dos perfis bioquímicos e na avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos, permitindo uma comparação mais abrangente com as características bioquímicas das amostras originais.

Adicionalmente, para uma caracterização elementar mais completa, também se sugere o uso de métodos como a Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), como realizado por outros estudos.

Para o futuro, com vista a criação de um novo produto para uso em aquacultura seria interessante formular rações com as amostras utilizadas neste estudo e realizar ensaios com invertebrados e peixes.

## 6. Bibliografia

- Aaron-Amper, J., Largo, D. B., Handugan, E. R. B., Nini, J. L., Alingasa, K. M. A., & Gulayan, S. J. (2020). Culture of the tropical brown seaweed *Sargassum aquifolium*: From hatchery to field out-planting. *Aquaculture Reports*, 16, 100265. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100265>
- 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>
- Amaro, H. M., Pagels, F., Tavares, T. G., Costa, I., Sousa-Pinto, I., & Guedes, A. C. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory potential of seaweed extracts as functional ingredients. *Hydrobiology*, 1(4), 469-482.
- 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, 511-524. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0650-1>
- AOAC, G. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International.
- Assis, J; Tavares J.T., Serrão E.A.; Alberto F; Ferreira C; Tavares D; Paulos L; Tempera F. (2011). Florestas marinhas. As espécies de algas castanhas gigantes de Portugal. Centro de Ciências do Mar e Mundo Gobius Comunicação e Ciência, Lda
- Azizi, N., Najafpour, G., & Younesi, H. (2017). Acid pretreatment and enzymatic saccharification of brown seaweed for polyhydroxybutyrate (PHB) production using *Cupriavidus necator*. *International Journal of biological macromolecules*, 101, 1029-1040. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.184>
- Barbero, H., Díez-Poza, C., & Barbero, A. (2017). The oxepane motif in marine drugs. *Marine Drugs*, 15(11), 361. <https://doi.org/10.3390/md15110361>
- Barbier, M., Charrier, B., Araujo, R., Holdt, S., Jacquemin, B. & Rebours, C., (2019). PEGASUS: Phycomorph european guidelines for sustainable aquaculture of seaweeds. COST Action FA1406 (M. Barbier and B. Charrier, Eds), Roscoff, France. <https://doi.org/10.21411/2c3w-yc73>
- Belattmania, Z., Engelen, A. H., Pereira, H., Serrão, E. A., Custódio, L., Varela, Zrid, Reani, A., Sabour, B. (2018). Fatty acid composition and nutraceutical perspectives of brown seaweeds from the Atlantic coast of Morocco. *International Food Research Journal*, 25(4), 1520-1527.
- Belattmania, Z., Kaidi, S., Atouani, E., Katif, C., Bentiss, F., Jama, C., Reani, A., Sabour, B., Atouani, S. El, Vasconcelos, V. (2020). Isolation and FTIR-ATR and <sup>1</sup>H NMR characterization of alginates from the main alginophyte species of the atlantic coast of Morocco. *Molecules* 2020, 25(18), 4335. <https://doi.org/10.3390/molecules25184335>
- 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>

- Beratto-Ramos, A., Agurto-Muñoz, C., Vargas-Montalba, J. P., & Castillo, R. D. P. (2020). Fourier-transform infrared imaging and multivariate analysis for direct identification of principal polysaccharides in brown seaweeds. *Carbohydrate polymers*, 230, 115561. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115561>
- Beratto-Ramos, A., Castillo-Felices, R. D. P., Troncoso-Leon, N. A., Agurto-Muñoz, A., & Agurto-Muñoz, C. (2019). Selection criteria for high-value biomass: seasonal and morphological variation of polyphenolic content and antioxidant capacity in two brown macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 31, 653-664.
- Biparva, P., Mirzapour-Kouhdasht, A., Valizadeh, S., & Garcia-Vaquero, M. (2023). Advanced Processing of Giant Kelp (*Macrocystis pyrifera*) for Protein Extraction and Generation of Hydrolysates with Anti-Hypertensive and Antioxidant Activities In Vitro and the Thermal/Ionic Stability of These Compounds. *Antioxidants*, 12(3), 775. <https://doi.org/10.3390/antiox12030775>
- Biskup, S., Bertocci, I., Arenas, F., & Tuya, F. (2014). Functional responses of juvenile kelps, *Laminaria ochroleuca* and *Saccorhiza polyschides*, to increasing temperatures. *Aquatic botany*, 113, 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.10.003>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedi, J., Rodenas, S., & Sanchez-Muniz, F. J. (2009). Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of medicinal food*, 12(2), 236-258. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0151>
- 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.
- Carboni, S., Hughes, A. D., Atack, T., Tocher, D. R., & Migaud, H. (2013). Fatty acid profiles during gametogenesis in sea urchin (*Paracentrotus lividus*): Effects of dietary inputs on gonad, egg and embryo profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(2), 376-382.
- Cardoso, S., Carvalho, L., Silva, P., Rodrigues, M., Pereira, O. & Pereira, L. (2014). Bioproducts from seaweeds: a review with special focus on the Iberian Peninsula. *Current Organic Chemistry*, 18(7), 896-917.
- Carvalho, L., & Pereira, L. (2015). Marine Algae as Source of Bioactive Metabolites. In Pereira, L. & Neto, J. (Eds.), *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology* (pp. 210–214).
- Cebrián-Lloret, V., Metz, M., Martínez-Abad, A., Knutsen, S. H., Ballance, S., López-Rubio, A., & Martínez-Sanz, M. (2022). Valorization of alginate-extracted seaweed biomass for the development of cellulose-based packaging films. *Algal Research*, 61, 102576. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102576>
- Chen, K., & Roca, M. (2018). Cooking effects on chlorophyll profile of the main edible seaweeds. *Food Chemistry*, 266, 368-374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.040>

- Choi, S. W., Graf, L., Choi, J. W., Jo, J., Boo, G. H., Kawai, H., Choi, C., Xiao, S., Knoll, A. H., Andersen, R. A., & Yoon, H. S. (2024). Ordovician origin and subsequent diversification of the brown algae. *Current Biology*, *34*(4), 740-754. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.12.069>
- Circuncisão, A. R., Catarino, M. D., Cardoso, S. M., & Silva, A. M. (2018). Minerals from macroalgae origin: Health benefits and risks for consumers. *Marine drugs*, *16*(11), 400. <https://doi.org/10.3390/md16110400>
- De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, *6*, 43-55. <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>
- Din, N. A. S., Mohd Alayudin, A. S., Sofian-Seng, N. S., Rahman, H. A., Mohd Razali, N. S., Lim, S. J., & Wan Mustapha, W. A. (2022). Brown algae as functional food source of fucoxanthin: A review. *Foods*, *11*(15), 2235. <https://doi.org/10.3390/foods11152235>
- 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.
- Eger, A. M., Ling, S. D., McHugh, T. A., Filbee-Dexter, K., Ha Kim, J., Marzinelli, E., Verbeek, J., Barbery, K., Gray, K. G., Falace, A. (2022). *Kelp restoration guidebook* (pp. 29–30).
- Eger, A. M., Layton, C., McHugh, T. A., Gleason, M., & Eddy, N. (2022). Kelp restoration guidebook: lessons learned from kelp projects around the world. *Caselle, J., DeAngelis, B., Eds.*
- EUCAST. (2003). European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infec*, *9*, 1-7. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
- FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO. 2022. *In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. In *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0463en>
- Farid, Y., Jaatit, L., & Chennaoui, M. (2024). Optimization of Seaweed Harvesting for Maximum Antimicrobial Activity—Impact of Seasonal Variation, Temperature, and Salinity. *Journal of Ecological Engineering*, *25*(2). <https://doi.org/10.12911/22998993/176861>
- Fennel, W. (1999). Theory of the Benguela upwelling system. *Journal of Physical Oceanography*, *29*(2), 177-190.
- Fertah, M., Belfkira, A., Taourirte, M., & Brouillette, F. (2017). Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, S3707-S3714. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>

Fleurence, J. (1999). Seaweed Proteins: Biochemicals, Nutritional Aspects and Potential Uses. *Trend in Food Science Publicers*.

Flores-Contreras, E. A., Araújo, R. G., Rodríguez-Aguayo, A. A., Guzmán-Román, M., García-Venegas, J. C., Nájera-Martínez, E. F., Sosa-Hernández, J. E., Iqbal, H. M. N., Melchor-Martínez, E. M., & Parra-Saldivar, R. (2023). Polysaccharides from the *Sargassum* and brown algae genus: extraction, purification, and their potential therapeutic applications. *Plants*, *12*(13), 2445. <https://doi.org/10.3390/plants12132445>

Freitas, M. V., Pereira, L., Afonso, C., & Mouga, T. (2022b). *Sabores do mar*, Edição: Politécnico Leiria. ISBN: 978-989-53390-0-6. <https://doi.org/10.25766/GGG5-NX88>.

Freitas, M. V., Inácio, L. G., Ruas, A., Silva, I. A., Mouga, T., Pereira, L., & Afonso, C. (2022a). Antioxidant and antimicrobial properties of selected red seaweeds from central Portugal. *Applied Sciences*, *13*(1), 157. <https://doi.org/10.3390/app13010157>

Garcia, J. S., Palacios, V., & Roldán, A. (2016). Nutritional potential of four seaweed species collected in the barbate estuary (Gulf of Cadiz, Spain). *J. Nutr. Food Sci*, *6*(3), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000505>

Gojon-Báez, H. H., Siqueiros-Beltrones, D. A., & Hernández-Contreras, H. (1998). *In situ* ruminal digestibility and degradability of *Macrocystis pyrifera* and *Sargassum* spp. in bovine livestock. *Ciencias Marinas*, *24*(4), 463-481.

Gold, M., Bae, Y. S. C., Goldberg, D. J., Jamal, S., Lewis, A. B., Marchbein, S., Ros, A., Santhanam, U., Dinatale, L. & Emmetsberger, J. (2023). *Macrocystis pyrifera* ferment-containing creams for optimizing facial skin rejuvenation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *22*(12), 3313-3319. <https://doi.org/10.1111/jocd.15986>

Gombotz, W. R., & Wee, S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*, *64*, 194-205.

Gomes, A. S., Lourenço, S., Santos, P. M., Neves, M., Adão, P., Tecelão, C., & Pombo, A. (2022). High dietary protein, n-3/n-6 ratio and  $\beta$ -carotene enhances *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) larval development. *Aquaculture Research*, *53*(15), 5398-5412. <https://doi.org/10.1111/are.16023>

Gómez, C., Bermejo López, L.M., & Loria Kohen, V. (2011). Importancia del equilibrio del índice omega-6/omega-3 en el mantenimiento de un buen estado de salud: Recomendaciones nutricionales. *Nutrición Hospitalaria*, *26*(2), 323-329. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.2.5117>

Goñi, I., Gudiel-Urbano, M., & Saura-Calixto, F. (2002). In vitro determination of digestible and unavailable protein in edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *82*(15), 1850-1854.

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>

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; Consultado a 28 Agosto 2024

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>

Hafting, J. T., Craigie, J. S., Stengel, D. B., Loureiro, R. R., Buschmann, A. H., Yarish, C., Edwards, M. & Critchley, A. T. (2015). Prospects and challenges for industrial production of seaweed bioactives. *Journal of Phycology*, 51(5), 821-83

Hernández-Carmona, G., McHugh, D. J., & López-Gutiérrez, F. (1999). Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*. 2. Studies on extraction conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. *Journal of Applied Phycology*, 11, 493-502. <https://doi.org/10.1023/A:1008114709681>

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. <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, 543-597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>

Hotchkiss, S., & Murphy, C. (2015). Marine Macroalgae and Human Health. In Pereira L. & Neto, J. M. (Eds.), *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology* (pp. 320–350).

Hou, X., Hansen, J. H., & Bjerre, A. B. (2015). Integrated bioethanol and protein production from brown seaweed *Laminaria digitata*. *Bioresource technology*, 197, 310-317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.091>

Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 530-534.

Kaidi, S., Bentiss, F., Jama, C., Khaya, K., Belattmania, Z., Reani, A., & Sabour, B. (2022). Isolation and structural characterization of alginates from the Kelp species *Laminaria ochroleuca* and *Saccorhiza polyschides* from the Atlantic Coast of Morocco. *Colloids and Interfaces*, 6(4), 51. <https://doi.org/10.3390/colloids6040051>

Khotimchenko, S. V., Vaskovsky, V. E., & Titlyanova, T. V. (2002). Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California. <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.003>

Kim, S. K. (Ed.). (2011). *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons. Wiley-Blackwell.

Kurzyna-Szklarek, M., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2022). Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates—an overview of methods. *Food Chemistry*, 394, 133466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133466>

Lamare, M. D., & Wing, S. R. (2001). Calorific content of New Zealand marine macrophytes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35(2), 335-341. <https://doi.org/10.1080/00288330.2001.9517004>

Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. (2019). Diverse applications of marine macroalgae. *Marine drugs*, 18(1), 17.

Lee. (2018). *Phycology* (Fifth edition). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316407219>

- Leyton, A., Araya, M., Tala, F., Flores, L., Lienqueo, M. E., & Shene, C. (2021). *Macrocystis pyrifera* extract residual as nutrient source for the production of sophorolipids compounds by marine yeast *Rhodotorula rubra*. *Molecules*, 26(8), 2355.
- Li, Y.; Zheng, Y.; Zhang, Y.; Yang, Y.; Wang, P.; Imre, B.; Wong, A.C.Y.; Hsieh, Y.S.Y.; Wang, D. Brown. (2021). Brown algae carbohydrates: Structures, pharmaceutical properties, and research challenges. *Marine drugs*, 19(11), 620.
- Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine drugs*, 9(6), 1056-1100. <https://doi.org/10.3390/md9061056>
- Lourenço-Lopes, C., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Prieto, M.A. & Simal-Gandara, J. (2020). Scientific approaches on extraction, purification and stability for the commercialization of fucoxanthin recovered from brown algae. *Foods*, 9(8), 1113. <https://doi.org/10.3390/foods9081113>
- Mabeau, S., & Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 4(4), 103-107. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90091-NN](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90091-NN)
- Mann, J., & Truswell, A. S. (2002). *Essentials of Human Nutrition* (Second Edition). Oxford University Press.
- Mansilla, A., & Ávila, M. (2011). Using *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh from southern Chile as a source of applied biological compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 262-267. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000072>
- Marcheafave, G. G., Tormena, C. D., Pauli, E. D., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019). Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. *Microchemical Journal*, 146, 713-721.
- Marsh, J. B., & Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of lipid research*, 7(4), 574-576. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)39274-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)39274-9)
- Martins, A., Pinto, F.R., Barroso, S., Pereira, T., Mouga, T., Afonso, C., Freitas, M.V., Pinteus, S., Pedrosa, R., Gil, M.M. (2023) Valorization of the Red Seaweed *Gracilaria gracilis* Through a Biorefinery Approach. *Journal of Visualized Experiments: Jove*, (201)
- Meirelles, B., Pagels, F., Sousa-Pinto, I., & Guedes, A. C. (2023). Biorefinery as a tool to obtain multiple seaweed extracts for cosmetic applications. *Journal of Applied Phycology*, 35(6), 3041-3055. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03089-7>
- Méndez, F., Rivero, A., Bahamonde, F., Gallardo, P., Frangopulos, M., Zolezzi, J., Inestrosa, N. & Mansilla, A. (2023). Fatty acid composition of different morphological structures in the sub-Antarctic kelps *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh and *Lessonia flavicans* Bory of the Magellan Ecoregion: Nutritional and biomedical potentials. *Journal of Applied Phycology*, 36(2), 831-844. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03114-9>
- Milinic, J., Fernando, A. L., Campos, B., Leite, B., Mata, P., Diniz, M., Sardinha, J., & Noronha, J. P. (2021). Nutritional benefits of edible macroalgae from the central Portuguese coast: inclusion of low-calorie 'sea vegetables' in human diet. *International Journal of Environmental Science & Natural Research*, 28, 556250. <https://doi.org/10.19080/ijesnr.2021.28.556250>

Miyashita, K., Mikami, N., & Hosokawa, M. (2013). Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1507-1517. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.019>

Mohammed, A., Bissoon, R., Bajnath, E., Mohammed, K., Lee, T., Bissram, M., John, N., Jalsa, N. K., Lee, K.-Y., & Ward, K. (2018). Multistage extraction and purification of waste *Sargassum natans* to produce sodium alginate: An optimization approach. *Carbohydrate polymers*, 198, 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.067>

Moreda-Piñeiro, A; Peña- Vázquez, E., Bermejo-Barrera, P. (2012) Significance of the Presence of Trace and Ultratrace Elements in Seaweeds. In Se-Kwon (Eds.), *Handbook of Marine Macroalgae* (pp. 116–146)

Mouga, T. (2024). Integridade membranar: a resposta da membrana plasmática ao stress térmico e aos solventes orgânicos em células de beterraba. *Captar, Ciência e ambiente para todos*, 13(2), 1-13.

Muktaf, A. M. Q., & Al Ashoor, A. S. (2022) Contribution of Biological Activity of Some Secondary Metabolites of Two Seaweeds Against Some Pathogenic Bacteria Isolated From Patients in Hospitals of Thi-Qar Province. *International Journal of Health Sciences*, (III), 4428-4439.

Muñoz, I., & Díaz, N. F. (2020). Minerals in edible seaweed: Health benefits and food safety issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(6), 1592-1607. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1844637>

Navarrete, I. A., Kim, D. Y., Wilcox, C., Reed, D. C., Ginsburg, D. W., Dutton, J. M., Heidelber, J., Raut, W. & Wilcox, B. H. (2021). Effects of depth-cycling on nutrient uptake and biomass production in the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 141, 110747.

Norton, T. (1970). Synopsis of biological data on *Saccorhiza Polyschides*. In *Food and Agriculture Organization Fisheries Synopsis* (Vol. 83, pp. 1–35).

Ortiz, J., Uquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V., & Llantén, C. (2009). Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European journal of lipid science and technology*, 111(4), 320-327. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800140>

Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F. B., C. Alves, R., & Oliveira, M. B. P. (2020). Pigments content (chlorophylls, fucoxanthin and phycobiliproteins) of different commercial dried algae. *Separations*, 7(2), 33. <https://doi.org/10.3390/separations7020033>

Otero, P., López-Martínez, M. I., & García-Risco, M. R. (2019). Application of pressurized liquid extraction (PLE) to obtain bioactive fatty acids and phenols from *Laminaria ochroleuca* collected in Galicia (NW Spain). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.057>

Pacheco, D., Miranda, G., Rocha, C. P., Pato, R. L., Cotas, J., Gonçalves, A. M. M., Dias Santos, S. M., Bahcevandziev, K., & Pereira, L. (2021). Portuguese Kelps: Feedstock Assessment for the Food Industry. *Applied Sciences*, 11(22), 10681. <https://doi.org/10.3390/app112210681>

- Paiva, L., Lima, E., Neto, A. I., & Baptista, J. (2018). Seasonal variability of the biochemical composition and antioxidant properties of *Fucus spiralis* at two Azorean Islands. *Marine drugs*, 16(8), 248.
- Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive compounds and properties of seaweeds—a review. *Open Access Library Journal*, 1(4), 1-17. <https://doi.org/10.4236/oalib.1100752>
- Panikkar, R., & Brasch, D. J. (1996). Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds. *Carbohydrate Research*, 293(1), 119-132. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00193-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00193-0)
- Pereira, L. (2016). *Edible seaweeds of the world*. crc Press. (pp.354-355)
- Pereira, L. (2021). Macroalgae. *Encyclopedia 2021*, 1, 177–188. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1010017>
- Pereira, L., & Ribeiro-Claro, P. (2015). Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweeds with Potential in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries. In L. Pereira & J. Neto (Eds.), *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology* (pp. 228–239).
- Pereira, T. R., Azevedo, I. C., Oliveira, P., Silva, D. M., & Sousa-Pinto, I. (2019). Life history traits of *Laminaria ochroleuca* in Portugal: The range-center of its geographical distribution. *Aquatic botany*, 152, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.09.002>
- Pereira, T. R., Engelen, A. H., Pearson, G. A., Serrao, E. A., Destombe, C., & Valero, M. (2011). Temperature effects on the microscopic haploid stage development of *Laminaria ochroleuca* and *Sacchoriza polyschides*, kelps with contrasting life histories. *CBM-Cahiers de Biologie Marine*, 52(4), 395.
- Pereira, T., Horta, A., Barroso, S., Mendes, S., & Gil, M. M. (2021). Study of the seasonal variations of the fatty acid profiles of selected macroalgae. *Molecules*, 26(19), 5807. <https://doi.org/10.3390/molecules26195807>
- Pérez-Alva, A., Ramírez-Rodrigues, M. A., Baigts-Allende, D. K., Martínez-Jiménez, L. A., & Ramírez-Rodrigues, M. M. (2023). *Macrocystis pyrifera*: A Potential Source of Bioactive Compounds. *Current Nutrition & Food Science*, 20(4), 505-512. <https://doi.org/10.2174/1573401319666230601110804>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.067>
- Purcell-Meyerink, D., Packer, M. A., Wheeler, T. T., & Hayes, M. (2021). Aquaculture production of the brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Macrocystis pyrifera*: applications in food and pharmaceuticals. *Molecules*, 26(5), 1306. <https://doi.org/10.3390/molecules26051306>
- Qin, Y. (2008). Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer international*, 57(2), 171-180. <https://doi.org/10.1002/pi.2296>
- Radulovich, R., Neori, A., Valderrama, D., Reddy, C. R. K., Cronin, H., & Forster, J. (2015). Farming of seaweeds. In *Seaweed Sustainability*. Academic Press, 27- 59.

Regulamento (UE) Nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011 (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169>)

Regulamento (UE) Nº 465/2023 do Parlamento Europeu e do Conselho de 3 de março de 2023 (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0465&from=PT>)

Rhee, S. K., & Steinbuchel, A. (Eds.). (2005). *Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents*. Wiley-Vch.

Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46, 115-126.

Rocha, C.P.; Pacheco, D.; Cotas, J.; Marques, J.C.; Pereira, L.; Gonçalves, A.M.M. Seaweeds as Valuable Sources of Essential Fatty Acids for Human Nutrition. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 4968. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094968>

Rodrigues, D., Freitas, A. C., Pereira, L., Rocha-Santos, T. A. P., Vasconcelos, M. W., Roriz, M., Rodríguez-Alcalá, L. M., Gomes, A. M. P., & Duarte, A. C. (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food chemistry*, 183, 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.057>

Saji, S., Hebden, A., Goswami, P., & Du, C. (2022). A brief review on the development of alginate extraction process and its sustainability. *Sustainability*, 14(9), 5181. MDPI. <https://doi.org/10.3390/su14095181>

Salland, N., Jensen, A., & Smale, D. A. (2024). The structure and diversity of macroinvertebrate assemblages associated with the understudied pseudo-kelp *Saccorhiza polyschides* in the Western English Channel (UK). *Marine Environmental Research*, 198, 106519. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2024.106519>

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.001>

Schmid, M., Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2014). Fatty acid contents and profiles of 16 macroalgae collected from the Irish Coast at two seasons. *Journal of applied phycology*, 26, 451-463. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0132-2>

SeaForester, 2024, The Forgotten Ocean Forests, 10 Agosto 2024, <https://www.seaforester.org>

Seely, G. R., Duncan, M. J., & Vidaver, W. E. (1972). Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. *Marine Biology*, 12, 184-188.

Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2017). Optimisation of fucoxanthin extraction from Irish seaweeds by response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 29, 1027-1036. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0983-4>

Silva, A., Rodrigues, C., Garcia-Oliveira, P., Lourenço-Lopes, C., Silva, S. A., Garcia-Perez, P., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Barroso, M. F., Delerue-Matos, C., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Screening of bioactive properties in brown algae from the northwest iberian peninsula. *Foods*, *10*(8), 1915.

Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Mendes, S., & Pedrosa, R. (2018). Neuroprotective effects of seaweeds against 6-hydroxidopamine-induced cell death on an in vitro human neuroblastoma model. *BMC complementary and alternative medicine*, *18*, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2103-2>

Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, *8*(3), 128

Soares, C., Sousa, S., Machado, S., Vieira, E., Carvalho, A. P., Ramalhosa, M. J., Morais, S., Correia, M., Oliva-Teles, T., Domingues, V. F., & 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>

Soares, C., Švarc-Gajić, J., Oliva-Teles, M. T., Pinto, E., Nastić, N., Savić, S., Almeida, A., & Delerue-Matos, C. (2020). Mineral composition of subcritical water extracts of *Saccorhiza polyschides*, a brown seaweed used as fertilizer in the North of Portugal. *Journal of Marine Science and Engineering*, *8*(4), 244.

Sousa, V. C., Silva, M. F., Aroucha, R. J. N., Silva, M. T. G., Marchão, R. S., Bastos, M. V. S. e Ribeiro, F. B. (2023). Fósforo na nutrição de peixes. In Pereira, A. M., de Sousa, G. C. e Viana, G. E. N. (Org.), *Ciências veterinárias: Patologias, saúde e produção animal 2* (Chap. 6, p. 54-62). Atena Editora. ISBN 978-65-258-1299-1

Streit, N. M., Canterle, L. P., Canto, M. W. D., & Hecktheuer, L. H. H. (2005). The chlorophylls. *Ciência Rural*, *35*, 748-755.

Susano, P., Silva, J., Alves, C., Martins, A., Pinteus, S., Gaspar, H., Goettert, M. I., & Pedrosa, R. (2022). *Saccorhiza polyschides*—A Source of Natural Active Ingredients for Greener Skincare Formulations. *Molecules*, *27*(19), 6496. <https://doi.org/10.3390/molecules27196496>

Taylor, K. A. (1995). A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *53*, 207-214.

Tenorio-Rodríguez, P. A., Esquivel-Solis, H., Murillo-Álvarez, J. I., Ascencio, F., Campa-Córdova, Á. I., & Angulo, C. (2019). Biosprospecting potential of kelp (Laminariales, Phaeophyceae) from Baja California Peninsula: Phenolic content, antioxidant properties, anti-inflammatory, and cell viability. *Journal of Applied Phycology*, *31*, 3115-3129.

Trica, B., Delattre, C., Gros, F., Ursu, A. V., Dobre, T., Djelveh, G., Michaud, P., & Oancea, F. (2019). Extraction and characterization of alginate from an edible brown seaweed (*Cystoseira barbata*) harvested in the Romanian Black Sea. *Marine drugs*, *17*(7), 405. <https://doi.org/10.3390/md17070405>

Gallardo, T. (2015). Marine Algae: General Aspects (Biology, Systematics, Field and Laboratory Techniques). In L. Pereira & J. Neto (Eds.), *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology* (pp. 2–8).

Wada, O. (2004). What are trace elements? Their deficiency and excess states. *Journal of the Japan Medical Association*, 47(8), 607–612.

Wannes, A.W., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, B.M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M.E., Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and chemical toxicology*, 48(5), 1362-1370. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002>

Wernberg, T., Krumhansl, K., Filbee-Dexter, K., & Pedersen, M. F. (2019). Status and trends for the world's kelp forests. In *World seas: An environmental evaluation* (pp. 57-78). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805052-1.00003-6>

Windguru (2023) Boletins Climatológicos. Consultado em <https://www.windguru.cz>. Último acesso em 29 de setembro de 2023

World Health Organization. (1996). *Trace elements in human nutrition and health*. World Health Organization.

Wycken, S., & Laurens, L. M. (2023). *Determination of total carbohydrates in algal biomass: laboratory analytical procedure (LAP)* (No. NREL/TP-2700-87500). National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO (United States).