

## **Óleos essenciais de macroalgas: avaliação da capacidade antioxidante**

**Lucinda Maria Marques da Rocha Bordonhos**

Peniche

2023

## **Óleos essenciais de macroalgas: avaliação da capacidade antioxidante**

**Lucinda Maria Marques da Rocha Bordonhos**

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

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora Joaquina Pinheiro e do Professor Doutor Rui Ganhão

Peniche

2023

**Título:** Óleos essenciais de macroalgas: avaliação da capacidade antioxidante.

Copyright © Lucinda Maria Marques da Rocha Bordonhos  
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche  
Politécnico de Leiria  
2023

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação 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

Com o fim desta etapa é inevitável não agradecer a todas as pessoas que me apoiaram e me aturaram nesta fase mais complicada e sem dúvida de realização na minha vida. Foram momentos difíceis e que sabia que podia contar com todas estas pessoas e que algumas apareceram sem aviso, mas que se tornaram um grande suporte na minha vida.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, os meus principais apoiantes nesta fase e claros investidores, brincando, mas falando a sério, sem eles não seria nada e não estaria aqui com a motivação final para acabar este trabalho.

Às minhas amigas, desde as mais antigas (Teresa, Lurdes, Márcia, Catarina, Inês, Rafaela) até às mais recentes, mas não menos importantes (Márcia, Alice, Nicoleta, Catarina F., Luz, Mónica, Catarina, Camille, Romana, Ina, Beatriz, Andreia) e ao meu namorado Lucas, que nunca deixaram de me dar um empurrãozinho para o sucesso e de me recordar que a vida não é feita de desistências, mas sim de aprendizagens.

Agradeço também aos meus orientadores Professora Doutora Maria Joaquina Pinheiro e Professor Doutor Rui Ganhão e à Professora Doutora Ana Cristina Figueiredo da Faculdade de Ciências de Lisboa que aguentaram comigo até ao fim e que me ajudaram em tudo o que precisei.

À minha grande Comissão de Praxe, a segunda maior família na minha vida, que nunca me deixou sozinha e nos momentos em que mais precisava estavam sempre presentes para me levantar o entusiasmo e motivarem-me a praxar. Uma família que levo para a minha vida toda, que me deu muitos ensinamentos e histórias que permanecerão para sempre no coração.

Uma surpresa enorme nesta fase final foram os meus colegas e formadores com quem passei 3 meses e meio para a formação de Marinheiro Pescador, que concluída com sucesso, foi uma grande conquista pessoal. Todos eles de forma diferente me ensinaram bastante, mostraram ser pessoas com um coração enorme e cheio de empatia por esta fase da minha vida.

Um grande obrigada a todos e a Peniche por me acolherem estes 6 anos nesta cidade com as suas paisagens e praias magníficas. Histórias e memórias passadas por cada recanto e encanto desta cidade vão ficar para sempre guardadas no meu coração. Relembrarei de tudo e de todos com o maior carinho.

Obrigada!

## Resumo

Nos dias de hoje, as macroalgas têm vindo a ser cada vez mais apreciadas pelos consumidores, devido a uma maior procura por alimentos inovadores e saudáveis. As macroalgas são um recurso marinho que apresenta propriedades de relevo, como a elevada capacidade antioxidante, antibacteriana, anticancerosa, entre outras.

Neste sentido, a procura por óleos essenciais tem vindo a crescer ao longo dos últimos anos, tanto na indústria alimentar e cosmética como na área medicinal.

No presente estudo, avaliou-se o impacto da metodologia de hidrodestilação em duas macroalgas comumente encontradas na Costa Portuguesa, *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis*, avaliando também os respetivos componentes extraídos no óleo essencial, água de decocção e hidrolato. Estes foram avaliados relativamente ao seu teor de fenólicos totais (TPC), e o seu potencial antioxidante expresso pela absorção do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e capacidade de redução do ião férrico (FRAP). Foi efetuada também a análise dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais de ambas as algas por cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (CG-MS).

Relativamente ao teor de fenólicos totais, entre as duas macroalgas observaram-se diferenças ( $P < 0.05$ , teste Tukey) relativamente ao extrato da água de decocção onde a *Fucus vesiculosus* obteve  $1.57 \pm 0.05$  mg EAG e a *Gracilaria gracilis*  $1.31 \pm 0.04$  mg EAG por grama de extrato.

A capacidade antioxidante expressa pelo método de DPPH, verificou-se em ambas as macroalgas valores similares ( $P > 0.05$ , teste Tukey), no extrato de óleo essencial. Por outro lado, o extrato da água de decocção e o hidrolato da macroalga *Fucus vesiculosus* revelaram uma capacidade antioxidante superior e significativamente diferente ( $P < 0.05$ , teste Tukey) quando comparado com os valores obtidos na *Gracilaria gracilis*, 82.14%, 53.74% e 60.04%, 50.61%, respetivamente.

No que diz respeito à capacidade antioxidante expressa pelo método FRAP, o óleo essencial foi o componente que se demarcou de forma significativa, sendo que a *Fucus vesiculosus* registou o valor médio de  $15.43 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$  e a *Gracilaria gracilis*  $32.19 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ .

Na análise dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais de ambas as macroalgas, foi notória a presença em maior proporção do ácido palmítico na *Gracilaria gracilis* (84.4%) e o ácido mirístico na macroalga *Fucus vesiculosus* (82.4%).

Em termos globais, foi possível evidenciar a capacidade antioxidante e a presença de ácidos gordos naturais após a hidrodestilação da macroalga *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis*, perspetivando-se no futuro uma utilização eficiente nas diversas indústrias de modo a proporcionar benefícios ao consumidor.

**Palavras-Chave:** Clevenger; *Fucus vesiculosus*; *Gracilaria gracilis*; óleos essenciais; compostos voláteis, capacidade antioxidante.

## Abstract

Nowadays, macroalgae are becoming increasingly popular with consumers, due to a greater demand for innovative and healthy foods. Macroalgae are a marine resource with important properties such as high antioxidant, antibacterial, anticancer and other properties.

In this sense, the demand for essential oils has been growing in recent years, both in the food industry and in the cosmetics and medicinal fields.

This study assessed the impact of the hydrodistillation method on two macroalgae commonly found on the Portuguese coast, *Fucus vesiculosus* and *Gracilaria gracilis*, and evaluated the respective extracted components such as essential oil, decoction water and hydrolate. These were evaluated according to their total phenolic content (TPC), as well as their antioxidant potential expressed by the absorption of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant potential (FRAP). The volatile compounds present in the essential oils of both algae were also analyzed.

Regarding the total phenolic content, differences were observed between the two macroalgae ( $P < 0.05$ , Tukey test) about the decoction water extract, where *Fucus vesiculosus* obtained  $1.57 \pm 0.05$  mg EAG and *Gracilaria gracilis*  $1.31 \pm 0.04$  mg EAG per gram of extract.

The antioxidant capacity expressed by the DPPH method showed similar values in both macroalgae ( $P > 0.05$ , Tukey test) in the essential oil extract. On the other hand, the decoction water extract and the hydrolate from the macroalgae *Fucus vesiculosus* revealed a superior and significantly different antioxidant capacity ( $P < 0.05$ , Tukey test) when compared to the values obtained from *Gracilaria gracilis*, 82.14%, 53.74% and 60.04 %, 50.61%, respectively.

Concerning the antioxidant capacity expressed by the FRAP method, the essential oil was the component that stood out significantly, with *Fucus vesiculosus* recording an average value of  $15.43 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$  and *Gracilaria gracilis*  $32.19 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ .

By analysis of the volatile compounds present in the essential oils of both macroalgae, the presence of a greater proportion of palmitic acid in *Gracilaria gracilis* (84.4%) and myristic acid in the macroalgae *Fucus vesiculosus* (82.4%) was notable.

Overall, it was possible to show the presence of antioxidant ability and natural fatty acids after hydrodistillation of the macroalgae *Fucus vesiculosus* and *Gracilaria gracilis*, with the prospect of their efficient use in various industries in the future to help the consumer.

**Keywords:** *Clevenger*, *Fucus vesiculosus*; *Gracilaria gracilis*; essential oils; volatile compounds, antioxidant ability.

## Índice

Agradecimentos .....	iv
Resumo.....	v
<i>Abstract</i> .....	vii
Lista de Figuras.....	x
Figuras do Anexo.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Tabelas do Anexo.....	xi
Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Macroalgas .....	1
1.2. Algas verdes .....	5
1.3. Algas castanhas.....	6
1.3.1. <i>Fucus vesiculosus</i> .....	7
1.4. Algas vermelhas.....	10
1.4.1. <i>Gracilaria gracilis</i> .....	11
1.5. Óleos essenciais .....	13
1.6. Cromatografia – óleos essenciais.....	15
1.7. Métodos de Extração .....	16
1.7.1. Hidrodestilação .....	18
1.8. Avaliação da capacidade antioxidante .....	20
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1. Macroalgas .....	24
3.2. Reagentes.....	24
3.3. Processo de hidrodestilação para a obtenção dos óleos essenciais, hidrolato e água de decocção .....	25
3.4. Avaliação da composição química dos óleos essenciais, hidrolato e água de decocção .....	26
3.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais (TPC) .....	26
3.4.2. Determinação da capacidade de absorção do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) .....	26
3.4.3. Determinação da capacidade de redução do ião férrico (FRAP) .....	27
3.5. Análise da componente volátil por cromatografia gasosa.....	27
3.6. Análise estatística .....	28
4. Apresentação e Discussão dos Resultados .....	29
4.1. Avaliação da atividade antioxidante presente nos constituintes da hidrodestilação das macroalgas .....	29

4.1.1.	Teor de compostos fenólicos totais (TPC).....	29
4.1.2.	Capacidade de absorção do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)...	31
4.1.3.	Determinação da capacidade redutora do íon férrico (FRAP).....	32
4.2.	Análise de compostos voláteis por Cromatografia Gasosa (CG) .....	34
5.	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	39
6.	Referências Bibliográficas .....	41
Anexos	.....	49

## Lista de Figuras

Figura 1.1: Imagem representativa de microalgas ( <i>Scenedesmus</i> , Chlorophyta) (a) e das macroalgas ( <i>Porphyra umbilicalis</i> , Rhodophyta) (b). .....	2
Figura 1.2: Hápteros de uma alga com talo. ....	2
Figura 1.3: Representação das três zonas onde os três grupos de alga podem ser encontrados. ....	5
Figura 1.4: Exemplo de uma alga verde, <i>Ulva linza</i> . ....	5
Figura 1.5: Macroalga <i>Fucus vesiculosus</i> (bladdwrack). ....	7
Figura 1.6: Distribuição geográfica da macroalga <i>Fucus vesiculosus</i> . ....	8
Figura 1.7: Alga vermelha <i>Gracilaria gracilis</i> . ....	11
Figura 1.8: Distribuição geográfica da macroalga <i>Gracilaria gracilis</i> . ....	11
Figura 1.9: As várias aplicações dos óleos essenciais. ....	14
Figura 1.10: Esquema de um equipamento de cromatografia gasosa. ....	15
Figura 1.11: Métodos de ruptura celular aplicados na extração de algas marinhas. ....	17
Figura 1.12: Esquema do processo de extração por hidrodestilação utilizando o sistema Clevenger: (1) balão volumétrico; (2) manta de aquecimento e (3) condensador. ....	19
Figura 3.1: Macroalgas <i>Fucus vesiculosus</i> (a) e <i>Gracilaria gracilis</i> (b). ....	24
Figura 3.2: Sistema de hidrodestilação <i>Clevenger</i> , com identificação do óleo essencial (a), hidrolato (b) e água de decocção (c). ....	25
Figura 4.1: Atividade antioxidante expressa através do conteúdo fenólico total (TPC mg EAG/g) dos extratos da água de decocção, hidrolato e óleo essencial obtidos após hidrodestilação das macroalgas <i>Fucus vesiculosus</i> e <i>Gracilaria gracilis</i> . As linhas horizontais representam o desvio padrão e as letras diferentes indicam as diferenças significativas a $P < 0.05$ (Teste de Tukey). ....	29
Figura 4.2: Atividade antioxidante expressa pela capacidade de absorção do radical livre DPPH (%) dos extratos da água de decocção, hidrolato e óleo essencial obtidos após hidrodestilação das macroalgas <i>Fucus vesiculosus</i> e <i>Gracilaria gracilis</i> . As linhas horizontais representam o desvio padrão e as letras diferentes indicam as diferenças significativas a $P < 0.05$ (Teste de Tukey). ....	31
Figura 4.3: Atividade antioxidante expressa através da redução do ião férrico (FRAP, $\mu\text{M}$ de $\text{FeSO}_4/\text{g}$ de extrato) dos extratos da água de decocção, hidrolato e óleo essencial obtido após hidrodestilação das macroalgas <i>Fucus vesiculosus</i> e <i>Gracilaria gracilis</i> . As linhas horizontais representam o desvio padrão e as letras diferentes indicam as diferenças significativas a $P < 0.05$ , Teste de Tukey). ....	33

## Figuras do Anexo

Figura A1: Compostos voláteis presentes no óleo essencial da <i>Fucus vesiculosus</i> . ....	55
Figura A2: Compostos voláteis presentes no óleo essencial da <i>Gracilaria gracilis</i> . ....	55

## Lista de Tabelas

Tabela I - Composição percentual dos compostos voláteis extraídos por hidrodestilação de *Fucus vesiculosus* (Fv\_11\_22) e de *Gracilaria gracilis* (Gg\_11\_22). .....35

## Tabelas do Anexo

Tabela A I - Controlo microbiológico realizado à macroalga *Fucus vesiculosus* produzida pela empresa portuguesa Algaplus. ....49

Tabela A II - Composição nutricional da macroalga castanha, *Fucus vesiculosus*. ....49

Tabela A III - Identificação e informação para conhecimento do consumidor, relativamente à macroalga *Fucus vesiculosus*. ....50

Tabela A IV - Especificação do transporte e armazenamento, relativamente à macroalga *Fucus vesiculosus*. ....51

Tabela A V - Parâmetros de avaliação toxicológica, de metais pesados e outros elementos e os valores de referência para cada um, relativamente à macroalga *Fucus vesiculosus*. .....51

Tabela A VI - Controlo microbiológico realizado à macroalga *Gracilaria gracilis* pela empresa portuguesa Algaplus. ....51

Tabela A VII - Composição nutricional da macroalga castanha, *Gracilaria gracilis*. ....52

Tabela A VIII- Identificação e informação para conhecimento do consumidor, relativamente à macroalga *Gracilaria gracilis*. ....53

Tabela A IX - Especificação do transporte e armazenamento, relativamente à macroalga *Gracilaria gracilis*. ....54

Tabela A X - Parâmetros de avaliação toxicológica, de metais pesados e outros elementos e os valores de referência para cada um, relativamente à macroalga *Gracilaria gracilis*. .....54

## Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

**Abs** – Absorvância

**AAE** – *Ascorbic acid equivalente* (ácido ascórbico equivalente)

**DPPH** – Capacidade antioxidante expressa pela redução do radical livre DPPH

**EAE** – *Enzyme - assisted extraction* (Extração enzimática assistida)

**EAG** – Equivalente de ácido gálico

**EC** – *European Council* (Conselho Europeu)

**FC** – Folin-Ciocalteu

**FRAP** – *Ferric reducing antioxidant power* (Capacidade de redução do ferro)

**(GC-FID)** – *Gas Chromatography-flame ionization detector* (cromatografia gasosa - detetor de ionização por chama)

**(GC-MS)** - *Gas Chromatography-mass spectrometry* (cromatografia gasosa - espetrometria de massa)

**IMTA** – *Integrated Multitrophic Aquaculture* (Aquacultura Multitrófica Integrada)

**MAE** – *Microwave assisted extraction* (Extração assistida por micro-ondas)

**MiliQ-H<sub>2</sub>O** – Água purificada em sistema miliQ

**OEs** - Óleos essenciais;

**OGM** – Organismos geneticamente modificados

**PBPs** – *Phycobiliproteins* (ficobiliproteínas)

**PE** – *Phycoerythrin* (ficoeritrina)

**PLE** – *Pressurized liquid extraction* (Extração por líquidos pressurizados)

**PUFA** – *Polyunsaturated fatty acids* (Ácidos gordos polinsaturados)

**Rpm** - Rotações por minuto

**SFE** – *Supercritical fluid extraction* (Extração por fluídos supercríticos)

**TE** – Equivalente de Trolox

**TPC** – *Total phenolics content* (teor fenólico total);

**TPTZ** - 2,4,6 – tris (2-pyridyl) -s-triazil

**UAE** – *Ultrasound assisted extraction* (Extração assistida por ultrassons)

**ufc/g** – Unidades formadoras de colónia por grama de amostra

**µM** - Micromolar

## 1. Introdução

Nos últimos anos, os consumidores têm demonstrado uma preocupação crescente em ter uma vida saudável associada a praticas de atividade física que proporcionem um aumento do bem-estar. Neste sentido a indústria tem desenvolvido novos produtos/ingredientes que para além do seu valor nutricional, possam proporcionar um caracter funcional e assim oferecerem uma mais-valia (Bhowmik *et al.*, 2022; Neto *et al.*, 2018).

As reações de oxidação são das principais causas de perda de qualidade e possível aumento da toxicidade dos alimentos. Assim, tem existido um maior interesse na utilização de antioxidantes naturais de origem vegetal (frutas, ervas aromáticas e algas) que, para além da sua ação antioxidante, os seus compostos bioativos têm sido associados á prevenção de certas doenças tais como, diabetes, distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares, tendo estas últimas como perspetiva afetar 23.6 milhões de pessoas até 2030 (Agregán *et al.*, 2019; Neto *et al.*, 2018).

O meio marinho tem suscitado cada vez mais interesse por parte dos investigadores por conter uma vasta gama de organismos com propriedades biológicas únicas, motivando a investigação na área do desenvolvimento de estudos dos organismos que pertencem a esse meio. Dentro destes organismos, as algas marinhas estão bem fundamentadas na literatura como fonte de compostos bioativos, que podem ser utilizados na preparação e desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos (Sapatinha *et al.*, 2022).

### 1.1. Macroalgas

As algas pertencem ao grupo dos organismos autotróficos, capazes de produzir os seus próprios alimentos através do um processo de anabolismo. Nestes existe uma grande diversidade, no que diz respeito à sua morfologia, ao grau de complexidade da estrutura morfológica, e ao tamanho. Por causa destas variantes, as algas são geralmente divididas em microalgas (Figura 1.1a) e macroalgas (Figura 1.1b). As algas marinhas têm um vasto grupo

de filós, sendo que até à data, estão registadas cerca de 72.500 espécies (Pereira, 2021a; Shao & Duan, 2022).

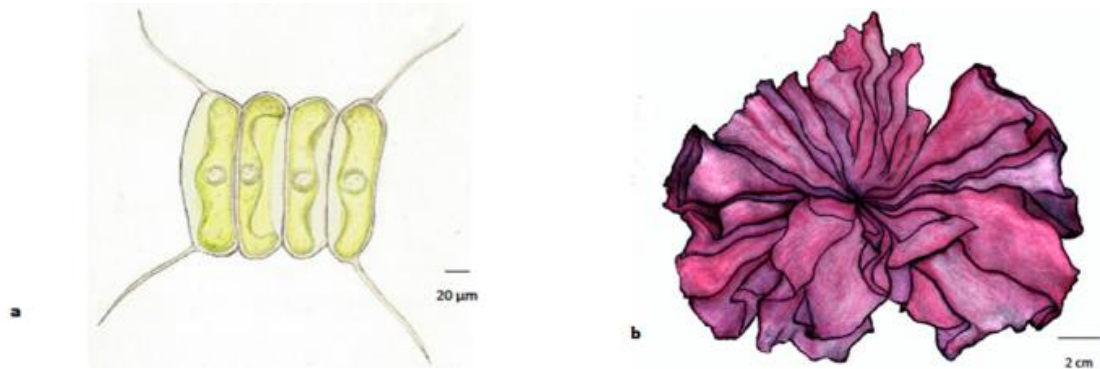


Figura 1.1: Imagem representativa de microalgas (*Scenedesmus*, Chlorophyta) (a) e das macroalgas (*Porphyra umbilicalis*, Rhodophyta) (b). Adaptado de Pereira, (2021).

As macroalgas ou algas marinhas são seres multicelulares com órgãos diferenciados, que podem ser encontradas fixadas no fundo das águas costeiras ou até mesmo pouco profundas e terem milímetros de comprimento e um aspeto frágil, como podem atingir metros de comprimento, sendo que algumas algas podem atingir 60 metros de comprimento, se não sofrerem um excesso de consumo por parte de herbívoros (Oliveira, 2015; Pal *et al.*, 2014; Pereira, 2009, 2021a).

Podem ter um ciclo de vida anual ou de vários anos (perene), sendo que a maioria se encontra fixa às rochas através de um órgão de fixação discreto na forma de um disco ou tufo incolor, designado de rizóides ou de hápteros, estruturas com aparência de raiz, mas que só se apresenta em macroalgas de maiores dimensões, como se pode observar pela Figura 1.2.



Figura 1.2: Hápteros de uma alga com talo. Adaptado de Pereira, (2009).

Não têm verdadeiras raízes, ramos ou folhas e são consideradas as formas ancestrais da evolução de todas as plantas terrestres.

As macroalgas são produtores primários, encontram-se na base da cadeia alimentar marinha suportando várias comunidades de animais herbívoros (invertebrados, tais como alguns ouriços e/ou gastrópodes do mar, e vertebrados, tais como peixes herbívoros) onde podem encontrar abrigo dos seus predadores, os carnívoros (Pereira, 2009, 2021a). Para controlar o seu consumo por parte dos herbívoros, têm vindo a melhorar as estratégias de defesa, como a calcificação (comum nas algas vermelhas), produzindo também metabolitos secundários (terpenos, substâncias aromáticas, polifenóis, etc.) que atuam como desmotivadores da sua ingestão. Contudo, apesar de serem mais simples de as plantas, apresentam uma diversidade notável. A incrível variabilidade de estruturas, cores e formas das algas é concorrida pelo número de usos e aplicações que encontramos para elas ou de materiais que delas extraímos (Franco, Lemos & Neto 2022).

As macroalgas, conhecidas também pelo nome de algas marinhas e vegetais marinhos, ao longo dos anos têm sido extremamente exploradas, estando já enraizadas na tradição e história de inúmeras culturas espalhas por todo o mundo, sendo a Ásia um dos locais onde estas já se encontravam com função de alimento por séculos de história. A sua importância e interesse por parte da população tem vindo a aumentar devido ao crescimento da população mundial e à segurança alimentar, tornando-se uma questão emergente (Freitas *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023; Ummat *et al.*, 2021).

Neste momento, as macroalgas são consideradas como alimento não-animal do futuro, devido à sua habilidade de crescerem em zonas em que não é necessário terra arável ou recursos de água doce, não competindo assim com as culturas tradicionais (Neto *et al.*, 2018). Graças ao desenvolvimento dos métodos de recolha e cultivo durante o último século, têm vindo a aumentar a importância do seu consumo, preferencialmente na Europa (Ferraces-Casais *et al.*, 2013). As mesmas também são conhecidas por terem um rico equilíbrio de nutrientes e de fitoquímicos bioativos cujo consumo regular tem sido correlacionado com a prevenção de várias doenças (Neto *et al.*, 2018).

Durante as últimas décadas, todos os grupos de macroalgas estão a ser relevantes na comunidade científica, devido aos compostos bioativos complexos e metabolitos primários e secundários que produzem. Vários produtos de macroalgas têm propriedades únicas, sendo usadas em variadas aplicações, tais como cosméticos, indústrias (biomedicina e agroalimentar), e farmacêuticas (Biris-Dorhoi *et al.*, 2020; Cotas *et al.*, 2020a; Nadeeshani *et al.*, 2022). Estas podem ser consumidas como legumes do mar, sendo 25% a 75% do seu peso seco fibra alimentar que consiste principalmente em carragenina e ágar (algas vermelhas), alginatos e fuicodanos (algas castanhas) e ulvanos (algas verdes) (Neto *et al.*, 2018; Shao & Duan, 2022). Quanto às fibras alimentares em geral, apresentam vários benefícios para a saúde, principalmente devido às suas capacidades de retenção de óleo e água (Neto *et al.*, 2018).

Além de serem consumidas na sua forma natural, também são encontradas em alimentos transformados e produtos dietéticos, crescendo assim o interesse para o seu consumo por serem uma fonte rica de compostos bioativos incluindo carotenoides, proteínas, peptídeos, vitaminas, minerais, oxilipinas, florotaninas, esteroides, minerais, ácidos gordos essenciais, fibras alimentares, polissacáridos e polissacáridos sulfatados. Podem também ser usados como alimento funcional e ervas medicinais, particularmente nos países asiáticos (Ummat *et al.*, 2021).

As algas são diferenciadas pela cor do seu pigmento dominante, podendo ser divididas em três grupos; as verdes – Chlorophyceae, as castanhas - Phaeophyceae e as vermelhas - Rhodophyceae. Os 3 grupos de macroalgas contêm clorofila, pigmento de cor verde e realizam a fotossíntese. No entanto a cor verde é camuflada nas duas últimas por pigmentos adicionais de cor castanha e vermelha. As algas, como organismos fotossintéticos que são, podem ser encontradas em diferentes profundidades ou zonas determinadas pela luz disponível (Figura 1.3). De um modo geral, as verdes estão mais próximas da costa, desta forma numa maior elevação, as castanhas na zona intermareal e submareal, e as vermelhas

mais distantes da costa a maior profundidade, existindo, claro, alguma sobreposição (Biris-Dorhoi *et al.*, 2020; Franco *et al.*, 2022).

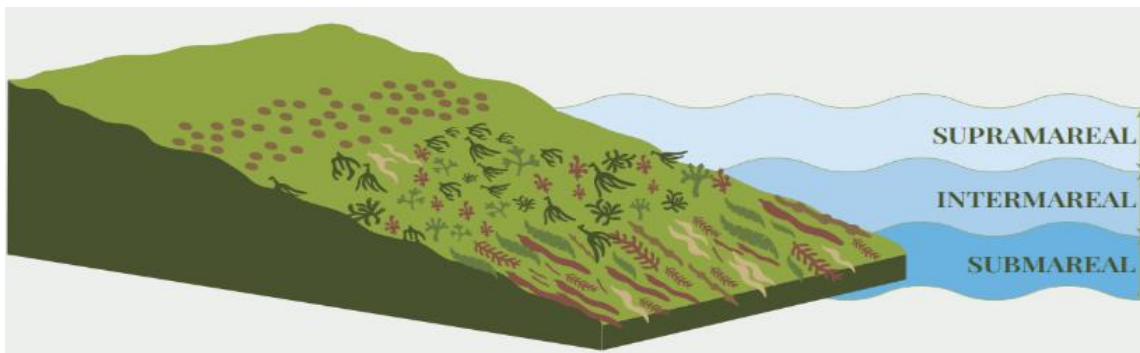


Figura 1.3: Representação das três zonas onde os três grupos de alga podem ser encontrados. Adaptado de Franco *et al.*, (2022).

## 1.2. Algas verdes

As algas verdes (Chlorophyta) podem chegar no máximo até 1m de altura e neste momento são conhecidas cerca de 2200 espécies de algas verdes, sendo o grupo mais diversificado dos três tipos de algas (Morais *et al.*, 2020). Na sua constituição têm pigmentos como,  $\beta$ - caroteno, xantofilas, clorofilas a e b, que proporcionam a cor verde, por ter clorofila. Diversos autores referem que estes tipos de algas podem estar na origem das plantas (Delaux *et al.*, 2015; Leliaert *et al.*, 2012; Lewis & McCourt, 2004; Qiu, 2008). A cor da mesma pode alterar consoante o balanço entre os pigmentos mencionados anteriormente (Leandro *et al.*, 2020; Morais *et al.*, 2020).

Estas algas são comumente encontradas em áreas de luz abundante, em águas pouco profundas ou até mesmo em piscinas naturais. Dentro destas as comuns são a *Ulva*, *Codium*, *Chaetomorpha* e *Cladophora*, sendo a *Ulva* o género mais comum (Morais *et al.*, 2020).



Figura 1.4: Exemplo de uma alga verde, *Ulva linza*. Adaptado de Cotas *et al.*, (2020b).

As algas verdes também são conhecidas por terem compostos fenólicos, como bromofenol e flavonol, conhecidos por proporcionarem elevada capacidade antioxidante, em que os bromofenóis, mostraram ter capacidade antimicrobiana, antibacteriana e outros efeitos. Já o flavonol demonstrou possuir capacidade antidiabética (Cotas *et al.*, 2020b).

Ao longo das últimas décadas, apesar de terem valores baixos de cultivo, as algas verdes têm aumentado em termos de produtividade e diversificação comercial, uma vez que estas algas têm inúmeras vantagens de serem cultivadas, tais como: i) terem uma diversidade única; ii) elevada tolerância a condições abióticas extremas; iii) enorme potencial de biofiltração; iv) compostos bioativos exclusivos e v) um valor elevado no mercado (Moreira *et al.*, 2021).

Estas algas têm aplicações tanto na parte de biorrefinaria, como em sistemas de aquicultura multitrófica integrada de base terrestre (IMTA) e produtos alimentares de elevado valor na cozinha moderna (Moreira *et al.*, 2021).

### 1.3. Algas castanhas

As algas castanhas possuem pigmentos como as clorofilas a e c e carotenóides, predominando a fucoxantina, responsável pela sua cor acastanhada (Pereira, 2021a). As algas castanhas biosintetizam compostos fenólicos que têm atraído muito interesse, devido aos benefícios que possuem, tanto para a saúde como para aplicação farmacológica. Também são ricas em alginatos, um polissacarídeo complexo encontrado nos géneros *Laminaria*, *Fucus*, e *Ascophyllum* (Catarino *et al.*, 2020; Pereira, 2021a). Por outro lado, estes produtos naturais podem variar com a estação e espécies de algas. As macroalgas castanhas podem conter entre 10 e 50% de alginatos alcalinos, que podem ser usados como espessantes, material de moldes dentários, revestimentos para papel, tecidos, medicamentos, entre outros (Kuda *et al.*, 2021).

Podem também conter na sua composição cerca de 15% de florotaninos na matéria seca. Várias capacidades biológicas têm sido atribuídas a estes compostos como a elevada atividade antioxidante e inibição de enzimas (André *et al.*, 2020; Pedro *et al.*, 2021). Os

fucoïdanos são polissacarídeos sulfatados muito abundantes nas algas castanhas protegendo-a do stress ambiental, por possuírem propriedade antimicrobiana e antitumoral (Cabral *et al.*, 2021; Milinovic *et al.*, 2021).

Para além destas propriedades, as algas castanhas têm demonstrado capacidade de redução dos níveis de colesterol nos humanos com hipercolesterolemia (André *et al.*, 2020; Pedro *et al.*, 2021).

### 1.3.1. *Fucus vesiculosus*

A macroalga *Fucus vesiculosus*, Linnaeus (1753), representada na Figura 1.5, pertencente à família Fucaceae também é conhecida por “bladderwrack” (bodelha), com cor variável entre o verde azeitona, verde acastanhado e o castanho avermelhado, com odor a mar e com sabor encorpado e suave e que relembra o sabor a marisco (Catarino *et al.*, 2019; Heavisides *et al.*, 2018; Rodrigues, 2015).



Figura 1.5: Macroalga *Fucus vesiculosus* (bladderwrack). Adaptado de AlgaeBase – M.D. Guiry.

Cresce em águas temperadas a frias, e está distribuída pela zona litoral (litoral norte, em Portugal), ecossistemas costeiros rochosos, no Norte da Europa e na costa Atlântica da América do Norte, principalmente em praias abrigadas, como se pode ver na distribuição geográfica, representada pela Figura 1.6. O seu comprimento pode variar entre os 40 centímetros e os 1.5 e 2 metros. Para aumentar a sua capacidade de fotossíntese, têm uma posição vertical nas fixações rochosas e, para as manterem a flutuar, possuem pequenas vesículas esféricas cheias de ar (bexigas), que as mantem nesta posição vertical quando submersas (Catarino *et al.*, 2019; Heavisides *et al.*, 2018; Nicolucci *et al.*, 2021; Rodrigues, 2015).

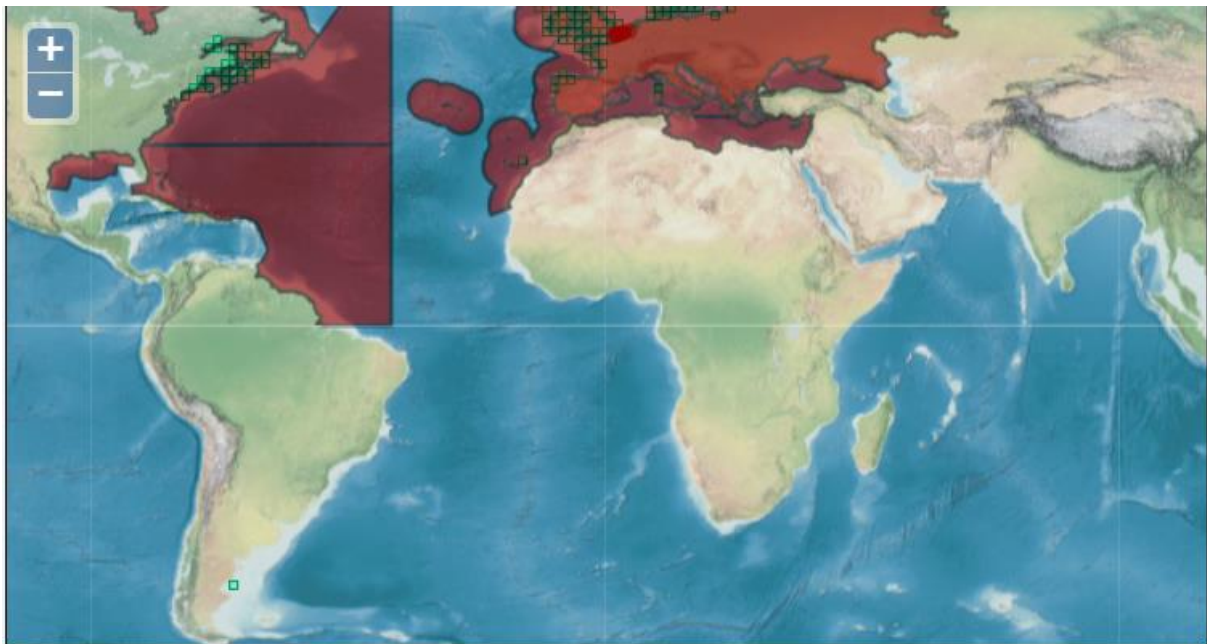


Figura 1.6: Distribuição geográfica da macroalga *Fucus vesiculosus*. Adaptado de WoRMS (World Register of Marine Species).

Nesta macroalga podem ser encontradas na sua composição, compostos bioativos como florotaninos, fucoxantina, fucoidanos, compostos fenólicos, iodo sob a forma de sais e ligado a proteínas e lípidos, potássio, minerais, várias vitaminas, polissacarídeos não digeríveis, entre outros, que apresentam um variado espectro de bioatividades (Catarino *et al.*, 2020; Pereira, 2011). Estes compostos podem depender da época de recolha a sua recolha, localização geográfica e fatores ambientais como a firmeza do substrato, exposição ao gelo e às ondas, salinidade, força das ondas, luz, ou competição entre macroalgas, e do modo de secagem da alga (André *et al.*, 2020; Rodrigues, 2015), sendo a cor castanha a predominante por ter a presença de alguns compostos mencionados anteriormente, como florotaninos e fucoxantina. Ambos têm bastantes vantagens de serem compostos presentes nesta macroalga, contudo, não obstante, a complexidade desta macroalga está a aumentar

exponencialmente o seu interesse na zona da Europa, principalmente devido ao seu efeito na redução do impacto ambiental da agricultura intensiva e da aquicultura e eutrofização (Costa *et al.*, 2019; Heavisides *et al.*, 2018).

De acordo com a *EU Directive* (EC 258/97) esta alga é considerada segura para ser consumida, sendo utilizada como alimentação humana e animal na Europa desde o século XVII, não só como também era e é utilizada como fonte combustível, fertilizante agrícola e ração (André *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2019). Esta macroalga é usada e conhecida como "legume do mar", onde se pode dar uso para fazer chá ou pratos de cozinha, tais como sopas, especiarias ou "croûton" em saladas. Uma vez que é conhecida por ser uma elevada fonte de iodo, daí ter um forte sabor, que a torna também muito salgada. Desta forma, consegue trazer uma enorme diversidade de aplicações em produtos alimentares, acabando por ser um ingrediente funcional, que promove a saúde e a qualidade dos alimentos (André *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2019; Pereira, 2011; Ribeiro *et al.*, 2021).

Como mencionado anteriormente, na sua composição entram diversos compostos e cada um destes tem uma aplicação. Por exemplo, os florotaninos têm potencial antioxidante, anticancerígeno e antimicrobiano. Por outro lado, a fucoxantina, além de apresentar as duas primeiras mencionadas, tem atividade antidiabética, antimalárica e antioxidante. Os ácidos gordos polinsaturados essenciais (PUFA) também presentes são considerados importantes, sendo que têm a capacidade de prevenir várias doenças, tais como doenças cardiovasculares e cancro. Têm também um potencial anti-inflamatório e anticelulítico (Heavisides *et al.*, 2018; Pereira, 2011).

Além das aplicações mencionadas, de um modo mais geral, as aplicações podem ser encontradas em produtos tais como, suplementos alimentares e de iodo (regular bócio e tiroide), disglícemia, artrite, artrose, para emagrecimento (peso, equilíbrio do peso corporal, estimula metabolismo de lípidos e de hidratos de carbono), aditivo e aromatizante em alimentos, todos estes para desenvolvimentos de novos produtos alimentares, farmacêuticos e cosméticos (André *et al.*, 2020; Catarino *et al.*, 2020; Nicolucci *et al.*, 2021; Rodrigues, 2015).

## 1.4. Algas vermelhas

As algas vermelhas, conhecidas também como Rhodophytas, são um grupo com bastante potencial. Consideradas como sendo um dos principais para a obtenção de compostos naturais com um potencial elevado para várias indústrias. Todas as algas contêm vários pigmentos que afetam o seu espectro colorido com propriedades funcionais. A sua cor vermelha deriva da presença de  $\alpha$  e  $\beta$  caroteno, luteína e zeaxantina (Aziz *et al.*, 2021; Cotas *et al.*, 2020; Milinovic *et al.*, 2021).

As mesmas têm uma composição química que revela um elevado teor em proteínas e diversos compostos bioativos com grande potencial farmacêutico e biomédico. Na sua constituição revela também um elevado teor em vitamina C, aminoácidos, péptidos, ácidos gordos ómega-3, e proteínas (Hoseinifar *et al.*, 2018). O seu elevado teor de proteínas, cerca de 35% a 47%, é mais elevado em comparação com os recursos vegetais terrestres (Cotas *et al.*, 2020a).

Na sua constituição são encontrados terpenoides, uma elevada diversidade de ácidos gordos essenciais (EFAs), particularmente as espécies que pertencem às ordens Gigartinales, Corallinales e Gracilariales, biopolímeros (polissacáridos) e fitocolóides. A obtenção dos constituintes mencionados anteriormente pode ser realizada através de métodos de cultivo, não só na indústria dos fitocolóides, que já acontece atualmente, mas também na indústria dos pigmentos e outras indústrias, como na substituição da gelatina de origem animal por polímeros de algas, ou a indústria têxtil por pigmentos naturais (Cotas *et al.*, 2020a).

### 1.4.1. *Gracilaria gracilis*

Dentro das algas vermelhas, a *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentof, L.M. Irvine & Farnham, 1995 (Figura 1.7) revela ser uma das mais importantes pertencente a Rhodophyta, Florideae, Gigartinales, Gracilariaceae, apresentando como características organolépticas, cor vermelha, odor a mar e sabor encorpado, suave que relembra o sabor a marisco.



Figura 1.7: Alga vermelha *Gracilaria gracilis*. Adaptado de Pereira, (2021b).

A *Gracilaria gracilis* pode ser encontrada nas zonas tropicais do Atlântico com maior localização além deste, como se pode verificar na Figura 1.8. A mesma é conhecida por ser uma fonte de muitos produtos, por ter elevadas taxas de crescimento que atingem altos rendimentos no seu cultivo, tornando-a desta forma um dos géneros mais atrativos entre as algas (Hoseinifar *et al.*, 2018; Kazir *et al.*, 2019; Passos *et al.*, 2021a).



Figura 1.8: Distribuição geográfica da macroalga *Gracilaria gracilis*. Adaptada de WoRMS (World Register of Marine Species).

Na *Gracilaria gracilis*, há uma abundância de componentes interessantes, tais como proteínas lipídicas, hidratos de carbono, ficobiliproteínas, fenóis e fitoquímicos biologicamente

ativos, em que o composto encontrado em maior abundância são as ficobiliproteínas (PBPs), proteínas não tóxicas solúveis em água (Passos *et al.*, 2021b; Pereira *et al.*, 2020). Esta macroalga tem um elevado teor proteico, e nos seus períodos de crescimento sazonal, que cobrem quase todo o ano, permitem a produção de proteínas de alto rendimento ao longo de todo o ano (Kazir *et al.*, 2019).

Esta macroalga é um recurso valioso para aplicações industriais e biotecnológicas, sendo as ficobilinas, mais precisamente, a ficoeritrina (PE) tem sido amplamente utilizadas nas indústrias alimentar, cosmética, farmacêutica e biomédica, devido às suas fortes propriedades de absorção e fluorescência, bem como capacidades antioxidantes e de neutralização de radicais livres (Pereira *et al.*, 2020).

Atualmente, é principalmente utilizada como fonte de ágar comercial e de polissacáridos sulfatados que são utilizados em indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. Vários estudos científicos mostram que as espécies pertencentes a este género, detêm um grande potencial económico no diagnóstico médico, nos mercados de corantes naturais para alimentos e cosméticos bem como, proteínas para alimentos e rações (Kazir *et al.*, 2019; Passos *et al.*, 2021b).

O ágar apresenta também um vasto potencial para a alimentação animal como substituto da farinha de peixe, devido ao seu teor relativamente elevado de proteínas (Passos *et al.*, 2021a).

Já estabelecida como sendo uma macroalga importante fonte de ágar, estudos recentes têm utilizado *Gracilaria* spp. como uma nova fonte de compostos bioativos com potenciais aplicações nas indústrias alimentares, de rações e farmacêuticas. Verificou-se que os extratos de *Gracilaria gracilis* obtidos com solventes orgânicos ou água podem exibir atividade antioxidante, embora as atividades globais tenham sido relatadas como estando sujeitas à sazonalidade (Reboleira *et al.*, 2020).

## 1.5. Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também conhecidos por “óleos voláteis”, são substâncias complexas e multifuncionais, de compostos voláteis com origem vegetal, resultando de todas as partes de algumas plantas, proporcionando a efetiva economia circular do produto. São responsáveis pelas características apresentadas pelas plantas aromáticas, devido à presença de um aroma forte, e são deste modo “essenciais” por conseguirem conter a essência das várias fragâncias diferentes propriedades que caracterizam a planta usada (Blowman *et al.*, 2018; Irshad *et al.*, 2020; Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019). Estas substâncias são utilizadas há milhares de anos pelo seu papel na prevenção e tratamento de várias doenças. Tem-se conhecimento de pelo menos 3000 óleos essenciais (OEs), dos quais 300 são comercialmente considerados relevantes. Nos óleos o rendimento e a composição dependem tanto de fatores intrínsecos (hereditariedade) quanto extrínsecos (chuva, seca) (Blowman *et al.*, 2018; Gomes, 2003; Hou *et al.*, 2022).

Os compostos químicos que os óleos essenciais apresentam são produtos do metabolismo secundário de plantas. Os mesmos desempenham um papel na atração de polinizadores, na defesa contra os herbívoros, na resistência das plantas aos insetos, e na redução da perda de água. Em geral, os óleos essenciais são voláteis e solúveis em lípidos e solventes orgânicos. Podem estar presentes em todos os órgãos vegetais, incluindo botões, flores, folhas, sementes, caules, flores, frutos, raízes, madeira ou casca (Blowman *et al.*, 2018; Burt, 2004; Mith *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2022; Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019). Perceber como a sazonalidade interfere na formação dos óleos essenciais pode contribuir para processos mais eficientes de produção, cultivo e conhecimento das características ecológicas das espécies. Uma grande parte dos estudos sugere que a sazonalidade interfere com a composição química dos óleos essenciais (Silveira *et al.*, 2022; Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019). Para a obtenção destes óleos, esta pode ser realizada a partir de destilação a vapor ou hidrodestilação, extração por fluídos supercríticos e por muitos mais métodos de extração. O sucesso no processo de extração dos óleos pode variar consoante o tipo de solvente, temperatura, tempo e pressão (Azmir *et al.*, 2013; Bassolé & Juliani, 2012; Mith *et al.*, 2014; Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019).

Os óleos têm se tornado relevantes devido a se ter encontrado nas suas composições vários compostos antimicrobianos com vastas aplicações comerciais usadas no nosso dia a dia, como detergentes, perfumes, cosméticos, e outros produtos, como se pode verificar pela Figura 1.9 (Hou *et al.*, 2022).



Figura 1.9: As várias aplicações dos óleos essenciais. Adaptado de Hou *et al.*, (2022).

Os compostos presentes nos óleos podem ser divididos em dois grupos: terpenos, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos, o outro grupo que contém compostos não-terpênicos como compostos fenólicos tais como eugenol, cinamaldeído e safrol. Entre eles, os terpenóides são os compostos bioativos que têm um papel mais importante na resistência aos agentes patogênicos. Especificamente, os monoterpenóides afetam a multiplicação e desenvolvimento de microrganismos, interferindo com os seus processos fisiológicos e bioquímicos durante o seu desenvolvimento (Bassolé & Juliani 2012; Irshad *et al.*, 2020; Kryshen, 2016; Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019).

Os potenciais compostos antimicrobianos encontrados nos óleos são apontados como tendo um largo espectro de atividade antibacteriana e antifúngica. Possuem também propriedades antioxidantes, antiviral, anticancerígena, antiparasitários, inseticidas, imunomoduladoras, e conservantes de alimentos. Os óleos essenciais podem ser utilizados também em aromaterapia como fonte alternativa de cura de feridas devido aos compostos aromáticos que estão presentes nos óleos essenciais. Têm uma capacidade de relaxamento,

mas esta evidência não está a ser comprovada (Bassolé & Juliani, 2012; Burt, 2004; Irshad *et al.*, 2020; Kryshen, 2016; Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019).

## 1.6. Cromatografia – óleos essenciais

A cromatografia gasosa (CG) é considerada uma técnica analítica importante para a análise da composição dos voláteis que está dependente de fatores como: métodos de extração, tipo de solvente, temperatura, tempo de extração, parte da planta que é utilizada como amostra e a pressão (Azmir *et al.*, 2013; Makgwane, 2006).

A cromatografia, principalmente a gasosa (CG), tem sido uma das mais aplicadas em estudos, devido a haver uma procura de métodos sofisticados para a análise dos componentes complexos dos óleos essenciais e das variações na sua composição (Chamorro *et al.*, 2012; Makgwane, 2006). Além de serem simples, rápidos e eficientes, estes têm a elevada capacidade de sorção das armadilhas (Chamorro *et al.*, 2012; Sargazi *et al.*, 2016).

A cromatografia gasosa (GC), executada no equipamento esquematizado na Figura 1.10, tem como função separar os componentes químicos de uma mistura de compostos e depois detetá-los continuando a presença ou ausência e/ou a quantidade presente na amostra de óleo essencial (Salahaddin, 2021).

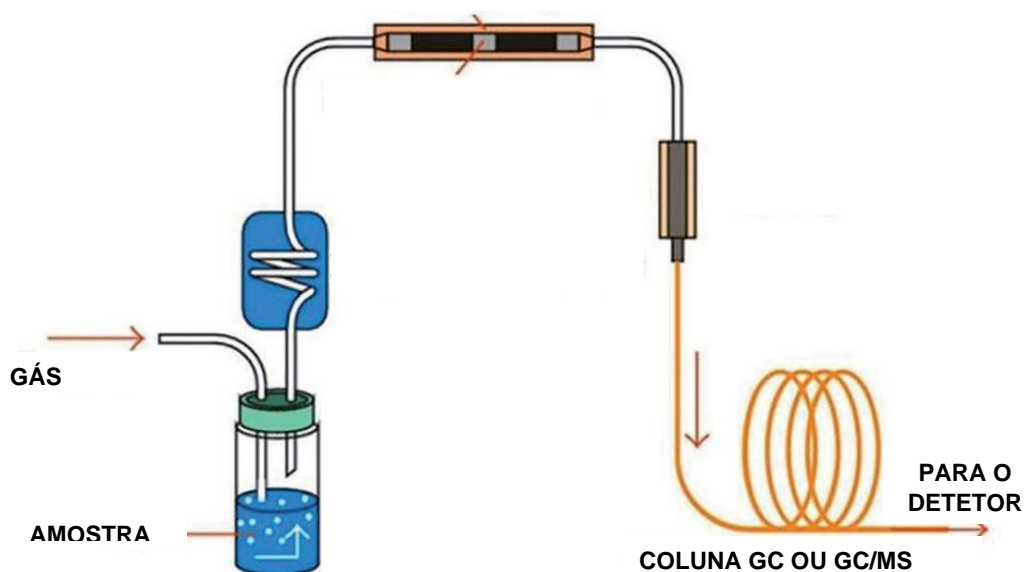


Figura 1.10: Esquema de um equipamento de cromatografia gasosa.

Sem a cromatografia, a análise química como a conhecemos hoje não existiria, sendo que esta domina os esforços analíticos em domínios tão diversos, utilizada na maioria das indústrias: i) alimentação; ii) controlo de qualidade no fabrico de variados produtos, desde automóveis a produtos químicos e farmacêuticos; iii) aromas e fragrâncias; iv) petroquímica; v) para fins de investigação, desde a análise de meteoritos a produtos naturais; vi) segurança, desde o ambiente à investigação forense (Makgwane, 2006; Salahaddin, 2021).

## 1.7. Métodos de Extração

Para uma extração de óleo a partir de matéria vegetal, existe uma variedade de métodos para a mesma ocorrer (Figura 1.11). A maioria destas técnicas baseia-se no poder de extração com recurso a diferentes solventes e a aplicação de calor e/ou mistura de solventes (Azmir *et al.*, 2013; Mahanta *et al.*, 2021). Os métodos estão divididos em: método convencional e não-convencional (Azmir *et al.*, 2013; Ummat *et al.*, 2021).

Segundo Hou *et al.*, (2022), nas técnicas convencionais para a extração do óleo essencial incluem-se, a hidrodestilação, destilação a vapor, extração de solventes e maceração, Estes são métodos comumente utilizados e que, por norma, na sua extração são incolores, podendo envolver mistura álcool/água ou solvente não-polar (Ummat *et al.*, 2021).

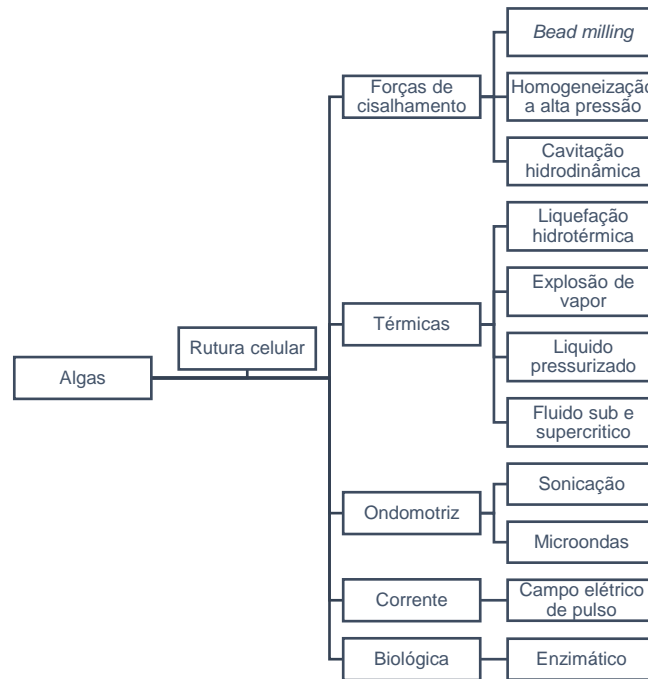


Figura 1.11: Métodos de ruptura celular aplicados na extração de algas marinhas. Adaptado de Ummat *et al.*, (2021).

Os principais desafios da extração convencional são: i) o tempo para a realização da extração; ii) nem sempre se consegue uma extração eficiente; iii) possível perda de alguns compostos voláteis; iv) degradação de compostos insaturados; v) exigência de um solvente caro e de alta pureza; vi) ocorre a evaporação de uma enorme quantidade de solvente; vii) baixa seletividade de extração e viii) pode ocorrer a decomposição térmica dos compostos termolábeis. Dentro dos métodos de extração convencionais, a maceração é um dos mais utilizados, devido ao seu baixo impacto económico, tempo de extração curto, e fácil instalação. Para ultrapassar todas as desvantagens que as técnicas de extração convencional, começaram a ser desenvolvidas as técnicas não-convencionais (Azmir *et al.*, 2013; Beattie *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2022).

Atualmente, tendem a ser utilizados métodos mais amigos do ambiente, “*green extraction concept*”. Com este conceito podem ser encontrados uma variedade de métodos não-convencionais, tais como: extração assistida por micro-ondas (MAE - *Microwave assisted extraction*), extração assistida por ultrassons (UAE - *Ultrasound-assisted extraction*), extração assistida enzimática (EAE - *Enzyme-assisted extraction*), extração por fluidos supercríticos (SFE - *Supercritical fluid extraction*) e extração por líquidos pressurizados (PLE - *Pressurized liquid extraction*), que são consideradas “técnicas verdes”, uma vez que cumprem as normas estabelecidas pela Agência de Proteção Ambiental, EUA (EPA, 2009) (Azmir *et al.*, 2013).

Sendo uma metodologia de extração não convencional considerada uma "tecnologia verde" a extração assistida por ultrassons apresenta uma redução significativa no tempo de extração, com maiores rendimentos de extração a temperaturas mais baixas, sendo adequada para compostos termolábeis. Outra alternativa moderna, não convencional, é a extração assistida por alta pressão. É um método de extração rápido e altamente eficiente, facilmente operado e altamente mecanizado, exigindo baixas quantidades de solvente. Além disso, pode ser operado à temperatura ambiente, protegendo a bioatividade de compostos com baixa estabilidade térmica, o que é útil na extração de cromoproteínas sensíveis ao calor (Pereira *et al.*, 2020).

### 1.7.1. Hidrodestilação

De acordo com Azmir *et al.*, (2013) existem três tipos de hidrodestilação: destilação utilizando água, destilação de água e vapor e destilação direta a vapor. No método de hidrodestilação, os materiais vegetais são embalados num compartimento de alambique, posteriormente, acrescenta-se água em quantidade suficiente e aquece-se até à ebulição. Em alternativa, o vapor direto é injetado na amostra da planta. Após o arrefecimento indireto por água existe a condensação da mistura de vapor de água e óleo, sendo que a mistura condensada flui do condensador para um separador, onde o óleo e os compostos bioativos se separam automaticamente da água (Silva *et al.*, 2005). A hidrodestilação envolve três processos físico-químicos principais; hidrodifusão, hidrólise e decomposição por calor. A uma temperatura de extração elevada, pode haver a perda de alguns componentes voláteis (Azmir *et al.*, 2013).

A hidrodestilação, presente nos métodos convencionais, é um dos processos mais antigos para obtenção de óleos essenciais. É uma técnica comumente utilizada para extração sem solventes orgânicos, de óleos essenciais devido à sua facilidade de operação, reprodutibilidade e viabilidade econômica. No método de hidrodestilação podem encontrar-se diferentes variantes, podendo ser realizado num sistema de *Clevenger*, apresentado na Figura 1.12. Com este sistema o é realizado uma extração através da destilação da água, do seu vapor ou de uma combinação das duas (Gomes 2003; Mahanta *et al.*, 2021).

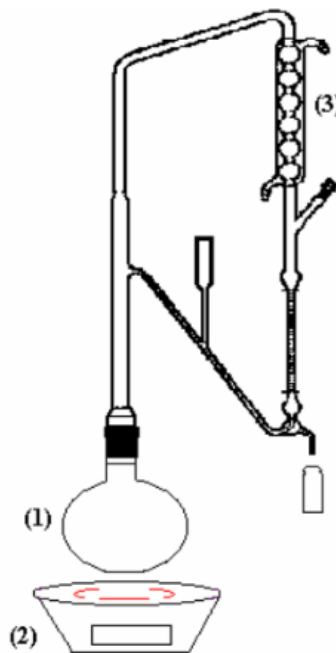


Figura 1.12: Esquema do processo de extração por hidrodestilação utilizando o sistema *Clevenger*. (1) balão volumétrico; (2) manta de aquecimento e (3) condensador. Adaptado de Gomes, (2003).

No sistema de *Clevenger*, o material é inserido no interior de um balão volumétrico (1) com água suficiente para cobrir a matéria pretendida, onde é mantido em manta de aquecimento, algumas com agitação outras sem (2) e este está acoplado ao *Clevenger*. Com o aquecimento, a água evapora, arrastando os compostos voláteis presentes na amostra. De seguida, no condensador (3) do próprio aparelho, a matéria começa a condensar-se na forma de óleo. Dependendo do tipo de planta e de que parte da planta é extraída, a hidrodestilação pode proporcionar um rendimento de 1 a 2% de óleo essencial (Azmir *et al.*, 2013; Gomes, 2003). Com a extração dois extratos são obtidos em paralelo, sendo que condensam em conjunto, o hidrolato e o óleo essencial, presentes num sistema de duas fases, sendo o hidrolato ou hidrossol, que ao ser a parte mais densa, fica na parte inferior ao óleo, sendo o óleo o sobrenadante neste processo. Já a água de decoção é a junção da água com a

macroalga em que, com o aquecimento desta mistura, se forma um extrato que tem que sofrer uma filtração (Figueiredo, Pedro & Barroso, 2017).

## 1.8. Avaliação da capacidade antioxidante

As reações de oxidação representam uma das principais causas de degradação na indústria alimentar. Por outro lado, tem existido uma maior consciencialização por parte dos consumidores em obter produtos que lhe garantam uma alimentação saudável e consequentemente, o bem-estar. No passado recente a indústria tem recorrido à utilização de antioxidantes sintéticos para preservação dos alimentos, tais como o hidroxitolueno butilado (BHT), o hidroxianisol butilado (BHA) e o galato de propila. No entanto, recentes estudos têm associado a estes antioxidantes problemas de toxicidade, gerando preocupação para a população (Oliveira *et al.*, 2009; Shao & Duan, 2022; Tierney *et al.*, 2013) De forma a se resolverem os problemas que advêm dos antioxidantes sintéticos, e também seguindo as tendências atuais da população, a procura por antioxidantes naturais de origem vegetal, nomeadamente algas marinhas, tornou-se relevante, sendo que estes têm a mesma, ou até mesmo melhor capacidade antioxidante, estabilizando a cor e textura dos alimentos. Ganham também um crescente interesse entre os clínicos, uma vez que têm a capacidade de poder ajudar na proteção do corpo humano contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigénio (ROS)(Keyrouz *et al.*, 2011; Shao & Duan, 2022; Tierney *et al.*, 2013).

Existem diferentes metodologias para a avaliação da capacidade antioxidante, no entanto estudos anteriores revelam que para avaliar produtos de matriz vegetal são utilizados preferencialmente a determinação do teor total de fenólicos (TPC), a capacidade de absorção do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e da redução do ião  $Fe^{3+}$  (FRAP).

O método de determinação do TPC, é considerado ser um dos mais importantes, devido à sua associação com as várias atividades bioativas das macroalgas e os seus produtos. Os compostos fenólicos estão divididos em classes sendo os florotaninos já usados em produtos comerciais (Cotas *et al.*, 2020b; Neto *et al.*, 2018). Os compostos fenólicos, além de aparecerem em algas marinhas, também podem ser encontrados em frutas, vegetais e oleaginosas (Keyrouz *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos, nomeadamente os bromofenóis e flavonóides podem ser encontrados em maior quantidade nas algas verdes e vermelhas. Já os florotaninos são encontrados principalmente em algas castanhas, em algas vermelhas (1.8-3.2%) e ainda menor percentagem nas verdes (Besednova *et al.*, 2020). As estruturas dos fenólicos diversificam-se de compostos simples a compostos complexos com maior peso molecular (Kalasariya & Pereira, 2022).

A partir da metodologia da capacidade antioxidante de absorção do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), avalia-se a capacidade de redução de radicais livres dos extratos obtidos da hidrodestilação (óleo essencial, água de decocção, hidrolato). Este método tem uma abordagem popular, rápida e acessível, para conseguir medir as propriedades antioxidantes, associada à neutralização do radical DPPH, que seria um radical livre estabilizado. Este radical recebe um átomo de hidrogénio dos antioxidantes, produzindo uma forte absorvância a 517nm. registada após um período definido (Baliyan *et al.*, 2022; Kedare & Singh, 2011, Garcia *et al.*, 2012). Este é considerado o método mais simples, em que o composto ou extrato é misturado com uma solução de DPPH, sendo que proporciona uma forma fácil e rápida de avaliar os antioxidantes por espectrofotometria, pelo que é vantajoso para avaliar vários produtos de uma só vez (Garcia *et al.*, 2012; Kedare & Singh, 2011).

O poder de capacidade antioxidante deste método é usufruído com o objetivo de avaliar a sua capacidade de preservar os alimentos e, caso seja possível, a extensão do tempo de prateleira (Hou *et al.*, 2022).

Este ensaio mede o potencial redutor dos antioxidantes que reagem em contacto com um complexo de tripiridiltriazina férrica ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) e produz uma tripiridiltriazina ferrosa colorida ( $Fe^{2+}$ -TPTZ), esta quebra da cadeia de radicais livres acontece através da doação de um átomo de hidrogénio. Com um pH baixo, de cerca de 3,6, dá-se a redução do complexo  $Fe^{3+}$ -TPTZ a  $Fe^{2+}$ -TPTZ, que então origina a cor azul ferrosa, cuja absorvância é lida a 593 nm (Rajurkar & Hande, 2011).

O FRAP foi desenvolvido como uma alternativa para determinar a redução do radical livre em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser

aplicado não só para o estudo da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas também para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis aos obtidos com outros métodos mais complexos (Borges *et al.*, 2019).

## 2. Objetivos

A utilização das macroalgas tem suscitado o interesse crescente nos diferentes sectores industriais. Dentro das macroalgas, as algas castanhas e as algas vermelhas são as mais conhecidas por terem uma maior aplicação em várias indústrias.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade de utilização das macroalgas castanhas, *Fucus vesiculosus*, e vermelhas, *Gracilaria gracilis*, após sujeitas à metodologia de extração por hidrodestilação. Foram avaliadas as capacidades antioxidantes para além dos óleos essenciais, do hidrolato e da água de decocção através da determinação do conteúdo fenólico total e da capacidade da captura dos radicais livres DPPH e da capacidade de redução do ião férrico.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Macroalgas

No presente trabalho utilizaram-se as macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis* (Figura 3.1). Estas foram adquiridas pela Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM-Politécnico de Leiria) à empresa portuguesa Algaplus localizada em Ílhavo.



Figura 3.1: Macroalgas *Fucus vesiculosus* (a) e *Gracilaria gracilis* (b). Adaptadas de WoRMS (*World Register of Marine Species*) e AlgaeBase.

Ambas as macroalgas se apresentavam desidratadas em floco, com um tamanho de partícula entre 1.0 - 10.0 mm tendo sido armazenadas à temperatura ambiente até ao momento da hidrodestilação.

#### 3.2. Reagentes

Na avaliação da capacidade antioxidante dos constituintes obtidos por hidrodestilação das macroalgas foram utilizados reagentes de grau de pureza adequado às diferentes determinações: **i)** metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , VWR-international - Fontenay-Sous-Bois, França); **ii)** Folin-Ciocalteu(FC, Merck KGaA, Alemanha); **iii)** ácido gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ , Merck KGaA, Alemanha); **iv)** carbonato de sódio( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , BIOCHEM Chemopharma de ZA Cosne sur Loire, França); **v)** 2,4,6 -Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, Sigma-Aldrich da Suíça); **vi)** ácido clorídrico (HCl, Analar Normapur, França); **vii)** cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Carlo Erba, França); **viii)** acetato de sódio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ , Panreac Applichem, Alemanha); **ix)** ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , VWR da França); **x)** sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ , Panreac Applichem, Alemanha); **xi)** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, TCI de Tóquio, Japão).

### 3.3. Processo de hidrodestilação para a obtenção dos óleos essenciais, hidrolato e água de decocção

Para a extração dos compostos bioativos das macroalgas em estudo recorreu-se à técnica por hidrodestilação no aparelho *Clevenger*, de acordo com a Farmacopeia Portuguesa (Figueiredo *et al.*, 2017). Em suma, a hidrodestilação realizou-se com a mistura da macroalga: água, na proporção de 1:14 (m:v; g: mL) e 1:32 (m:v; g: mL), na *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis*, respetivamente, durante 3 horas. Durante a extração foram retiradas três extrações em três fases diferentes, e por isso mesmo, dando a estes nomes diferentes, o óleo essencial (Fig. 3.3 (a)), o hidrolato (Fig.:3.3 (b)) e a água de decocção (Fig.3.3 (c)), sendo posteriormente acondicionados e armazenados à temperatura de -20°C para posterior

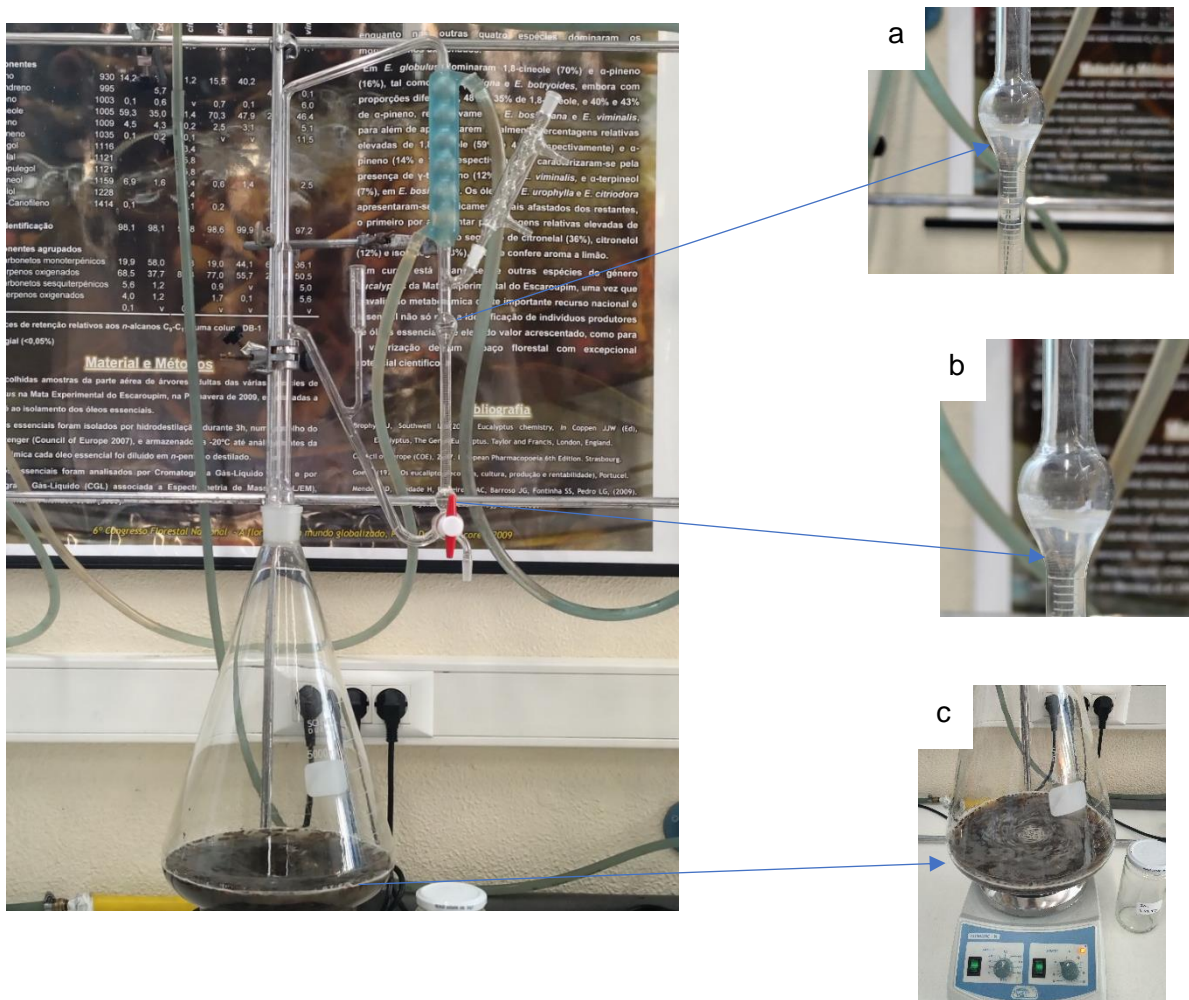


Figura 3.2: Sistema de hidrodestilação *Clevenger*, com identificação do óleo essencial (a), hidrolato (b) e água de decocção (c). (Fonte: próprio autor).

análise.

### 3.4. Avaliação da composição química dos óleos essenciais, hidrolato e água de decocção

#### 3.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais (TPC)

O conteúdo total fenólico presente na água de decocção, hidrolato e óleo essencial, obtidos após a extração por hidrodestilação das macroalgas castanha e vermelha, foi determinado de acordo com a reação colorimétrica promovida pelo reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1965) adaptada para microplaca (Pinheiro *et al.*, 2023).

Inicialmente procedeu-se à mistura de 20 µL de amostra/padrão, 100 µL do reagente Folin–Ciocalteu (1/10, v/v) e após 4 min adicionam-se 80 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5%, (m/v)). Após 2 h à temperatura ambiente, o produto da reação foi medido a uma absorvância de 750 nm com recurso ao leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Micro-plate Reader, BioTek® Instruments, Winooski, VT, EUA). O ácido gálico foi utilizado como solução padrão para elaboração da reta de calibração (0.05 a 0.25 mg/mL). O valor de TPC foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de macroalga desidratada (mg EAG / g), sendo os valores correspondes à média de 16 determinações por amostra/extrato.

#### 3.4.2. Determinação da capacidade de absorção do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

A capacidade antioxidante dos componentes obtidos pela técnica de hidrodestilação foi determinada recorrendo à metodologia da absorção do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) descrita por Brand-Williams *et al* (1995) e adaptada para microplaca de 96 poços (Pinheiro *et al* .,2023). Inicialmente realizaram-se ensaios preliminares para a otimização da proporção de extrato e solução DPPH, da qual resultou a proporção ótima, ou seja, 50 µL de amostra/padrão e 150 µL de solução de DPPH (150 µmol/L). Após 30 min, à temperatura ambiente e protegido da luz, a absorvância do produto da reação foi medida a 517 nm no leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek® Instruments, Winooski, VT, EUA).

A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a equação seguinte:

$$\text{DPPH (\%)} = [(Abs_i - Abs_a) / Abs_i] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo que:

Abs<sub>i</sub> – Absorvância da solução de DPPH a 517 nm

Abs<sub>a</sub> - Absorvância da amostra/extrato com a solução DPPH a 517nm

Os resultados apresentados correspondem à média de 16 determinações por amostra/extrato, sendo representado como a capacidade de redução do radical livre expressa em %.

### 3.4.3. Determinação da capacidade de redução do ião férrico (FRAP)

A capacidade antioxidante dos extratos obtidos pela hidrodestilação foi determinada através da redução do complexo amarelo Fe<sup>3+</sup> ao complexo azul Fe<sup>2+</sup>, por meio dos antioxidantes, em meio ácido a 593 nm sendo a metodologia adaptada para microplaca de 96 poços de acordo com Pinheiro *et al.*, (2021). Sucintamente, foram previamente preparadas as seguintes soluções: TPTZ 10 mM dissolvido em HCL 40 mM (A), cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) 20 mM (B) e 300 mmol de tampão acetato pH 3,6 (C). Posteriormente o reagente FRAP foi preparado com 2,5 mL de A + 2,5 mL de B e 25 mL de C. A reação ocorreu com a solução FRAP (2,7 mL), 270 µL de água ultrapura com as amostras do extrato (90 µL) tendo sido depois, aquecidas à temperatura de 37°C durante 30 min. Em seguida, a absorvância do produto final (complexo ferroso tripiridiltriazina) foi lido a 593 nm.

A capacidade antioxidante expressa pela redução do complexo férrico foi obtida através da equação da reta da curva de calibração utilizando o sulfato ferroso como padrão a diferentes concentrações (0.075 a 1.5 mg/mL). Os resultados foram expressos em µM FeSO<sub>4</sub>/g, sendo os valores relativos a 16 determinações.

## 3.5. Análise da componente volátil por cromatografia gasosa

Os compostos voláteis presentes nas macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis* após a hidrodestilação, com a passagem de pentano pela amostra, foram determinados de acordo com a metodologia descrita em Venda, Figueiredo & Godinho (2022).

Para tal, utilizou-se um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massas, Clarus 600T Mass Spectrometer equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (100% polidimetilsiloxano, 30 m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão programa 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45 a 175 °C, com incrementos de 3 °C/min, e subsequentemente a 15 °C/min até 300 °C. Atingidos os 300 °C, a temperatura foi mantida constante durante 10 min; temperatura do injetor, 250 °C; temperatura da linha de transferência, 280 °C; temperatura da câmara de ionização, 220 °C; gás de arrastamento: hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s; relação de repartição de fluxo, 1:20; energia de ionização, 70 eV; corrente de ionização, 60 µA; gama de massas, 40-300 u; tempo de varrimento, 1 s.

A identificação dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção em relação aos dos *n*-alcanos e espectros de massa, padrões sintetizados no laboratório, padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos essenciais existentes no laboratório e também por comparação com uma biblioteca de espectros de massa também desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, do centro de investigação: Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM Lisboa).

(1)

### 3.6. Análise estatística

Os resultados obtidos da capacidade antioxidante e do teor de fenólicos totais foram tratados através da análise de variância (ANOVA) com recurso ao software Statistica™ v.8.0 da Statsoft (StatSoft Inc. STATISTICA, 2007). As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes ao nível da significância de 0.05 (P-value < 0.05) de acordo com o teste Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*).

## 4. Apresentação e Discussão dos Resultados

### 4.1. Avaliação da atividade antioxidante presente nos constituintes da hidrodestilação das macroalgas

#### 4.1.1. Teor de compostos fenólicos totais (TPC)

A atividade antioxidante expressa pelo conteúdo de fenólicos totais presentes nos 3 constituintes obtidos após hidrodestilação, das macroalgas em estudo, pode ser observada na Figura 4.1. Após 3 horas de fervura da mistura de macroalga: água, destaca-se de forma significativa ( $P < 0.05$ , teste de Tukey) o conteúdo elevado de fenólicos totais da água de decocção tanto na macroalga vermelha como na castanha,  $1.31 \pm 0.04$  mg de EAG /g e  $1.57 \pm 0.05$  mg de EAG /g, respetivamente. Seguindo-se o teor de fenólicos encontrado nos óleos essenciais e, por fim, o hidrolato. Neste último intervalo do teor de fenólicos totais observado foi similar entre as macroalgas em estudo,  $0.13 \pm 0.01$  mg de EAG /g e  $0.11 \pm 0.004$  mg de EAG /g, nas macroalgas vermelha e castanha, respetivamente.

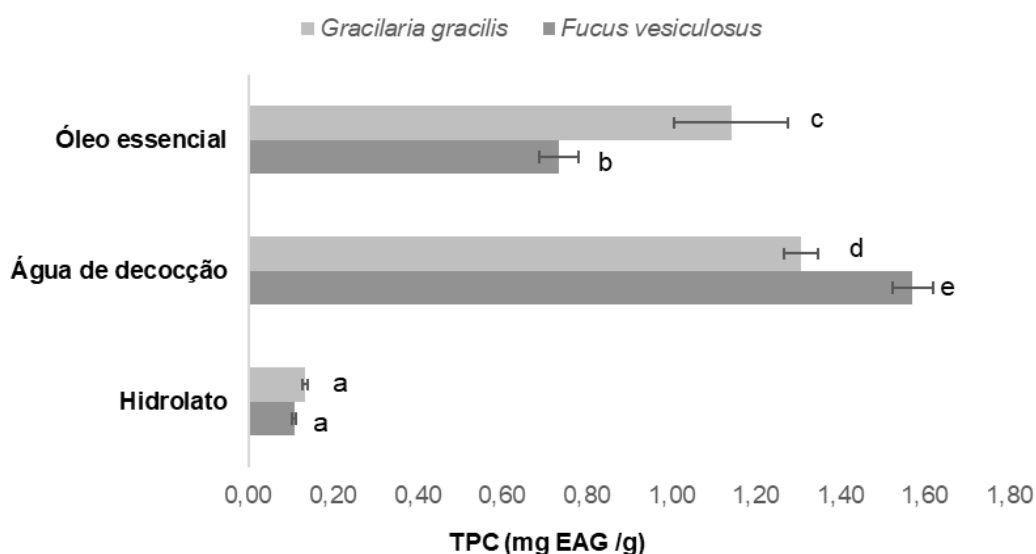


Figura 4.1: Atividade antioxidante expressa através do conteúdo fenólico total (TPC mg EAG/g) dos extratos da água de decocção, hidrolato e óleo essencial obtidos após hidrodestilação das macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis*. As linhas horizontais representam o desvio padrão e as letras diferentes indicam as diferenças significativas a  $P < 0.05$  (Teste de Tukey).

De acordo com o estudo publicado por Heffernan *et al.*, (2015) e Passos *et al.*, (2021b), a macroalga *Gracilaria gracilis* quando sujeita ao método de extração com três filtrações num

período de 24 h, com a mistura de solventes de etanol: água (EW 80:20), obteve um teor de fenólicos totais inferior (0.00476 mg EAG/g), comparativamente ao obtido no presente estudo.

No mesmo estudo, Heffernan *et al.*, (2015), além da extração por EW, realizou ainda o método por *hot water* (HW 60 °C). Na macroalga *Gracilaria gracilis*, com o método HW, mostrou que o conteúdo total de fenólicos é inferior em comparação com o obtido no presente trabalho, tendo um valor de 0.00349 mg de EAG /g.

Por outro lado, no estudo desenvolvido por Sapatinha *et al.*, (2022) ao avaliar diferentes metodologias de extração, como *hot water* (HW) temperatura a 30°C por 6 minutos, *bead mills* (BM), e por extração assistida por enzimas (alcalase (EAA), celulase (EAC) e *viscozyme* (EAV)) da macroalga *Gracilaria gracilis*, resultou numa maior eficácia de extração de compostos fenólicos tendo-se registado teores na ordem de grandeza de 50.73 mg EAG/g, com a metodologia de HW, significativamente superiores aos valores obtidos no presente estudo.

A extração assistida por ultrassons (UAE) realizada a 11 espécies de algas castanhas, foi reportada por Ummat *et al.*, (2020), sendo a *Fucus vesiculosus* uma delas. Os resultados obtidos por estes autores com esta espécie, revelou um teor superior de fenólicos comparativamente às restantes espécies avaliadas, ca. de 572.3 mg EAG /g.

Após análise da escassa literatura científica encontrada sobre a temática da hidrodestilação de macroalgas, optou-se por comparar o efeito da hidrodestilação das macroalgas com outras metodologias de extração como *hot water* (HW) e etanol: água (EW) e extração assistida por ultrassons (UAE) , em estudos desenvolvidos por (Heffernan *et al.*, 2015; Passos *et al.*, 2021b) e (Ummat *et al.*, 2020), respetivamente.

No que concerne a estudos referenciados de macroalgas, a *Gracilaria gracilis* foi a macroalga mais investigada. No entanto, no presente trabalho, dos três extratos analisados (óleos essenciais, água de decocção e hidrolato) foi a macroalga *Fucus vesiculosus* que apresentou o valor mais elevado de TPC ( $P < 0.05$ ), no extrato de água de decocção com um valor de  $1.57 \pm 0.05$  mg de EAG/g, sendo que nos outros dois extratos não se observaram esta predominância.

#### 4.1.2. Capacidade de absorção do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Na Figura 4.2, observa-se o comportamento relativo à absorção do radical livre DPPH pelos constituintes obtidos da hidrodestilação nas macroalgas em estudo.

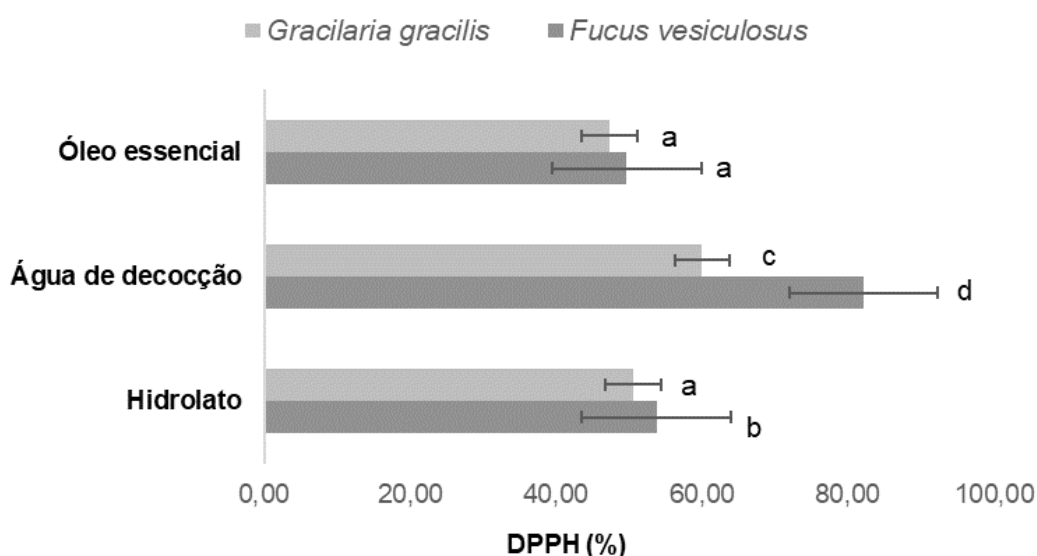


Figura 4.2: Atividade antioxidante expressa pela capacidade de absorção do radical livre DPPH (%) dos extratos da água de decocção, hidrolato e óleo essencial obtidos após hidrodestilação das macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis*. As linhas horizontais representam o desvio padrão e as letras diferentes indicam as diferenças significativas a  $P < 0,05$  (Teste de Tukey).

O extrato da água de decocção foi o que se destacou comparativamente aos óleos essenciais e hidrolato devido à capacidade de absorção do radical livre, sendo de registado ca 60 e 80%, na *Gracilaria gracilis* e *Fucus vesiculosus*, respetivamente. Também nesta análise se observaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na água de decocção e entre as macroalgas. Ao contrário do observado no teor de fenólicos totais, o hidrolato registou uma capacidade antioxidante expressa pela % de DPPH, superior ao dos óleos essenciais (6.86% e 8.22%, *Gracilaria gracilis* e *Fucus vesiculosus*, respetivamente). No que diz respeito ao óleo essencial, tanto na *Gracilaria gracilis* como na *Fucus vesiculosus*, os valores registados foram sensivelmente próximos de 50%, não apresentando diferenças significativas.

No estudo desenvolvido por Ajisaka *et al.* (2016) foram realizadas análises para avaliar a capacidade antioxidante de 5 macroalgas castanhas (*Fucus vesiculosus*, *Cladosiphon*

*okamuranus*, *Sargassum horneri*, *Kjellmaniella crassifolia* e *Saccharine sculpera*) sendo que o fucoídano isolado da macroalga *Fucus vesiculosus*, apresentou um valor de IC<sub>50</sub> entre 15% e 20%, indo ao encontro do obtido nos três extratos (≥ 50%) no presente trabalho.

No estudo de Heffernan *et al.*, (2015) foi determinada a atividade antioxidante pelo método de DPPH em 4 espécies (*Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis*, *Codium fragile* e *Laminaria digitata*) de extratos obtidos com o método de extração *hot water* (HW 60°C). Mesmo não sendo o mesmo método praticado no presente trabalho, são métodos próximos e usados para comparação de dados. A macroalga *Fucus serratus*, obteve um IC<sub>50</sub> de 12.46%, mostrando-se superior ao encontrado nas restantes macroalgas em estudo. Em relação à macroalga *Gracilaria gracilis*, obteve-se um valor de IC<sub>50</sub> de 0.22%. Comparando com o resultado obtido no presente estudo pode verificar que na capacidade de absorção do radical livre DPPH a *Fucus* tem maior capacidade do que a macroalga *Gracilaria gracilis*.

No estudo realizado por Sapatinha *et al.*, (2022), utilizando também o método do DPPH em 4 macroalgas, a *Gracilaria gracilis* apresentou valores inferiores comparativamente ao registrado nas restantes. Os valores apresentados pelo trabalho anterior são evidenciados em cinco metodologias diferentes de extração (água quente (HW), moinhos de esferas (BM) e extração assistida por enzimas utilizando alcalase (EAA), celulase (EAC) e Viscozyme (EAV)), sendo que os valores de eficácia estão entre os 7% e 14.4%, em que o HW apresentou o valor mais elevado de 14.4%. No entanto, estes resultados diferem dos obtidos no presente estudo, tendo-se obtido valores na hidrodestilação de 60.04% e 82.14%, na *Gracilaria gracilis* e *Fucus vesiculosus*, respetivamente. Nas macroalgas castanhas analisadas por estes investigadores, houve uma evidente diferença de atividades, na extração HW, entre estas e a *Gracilaria gracilis*. As algas castanhas evidenciam melhor a atividade (20% a 40%), confirmando-se assim que as algas castanhas têm uma maior capacidade de absorção do radical DPPH comparativamente com a macroalga vermelha, *Gracilaria gracilis*, a que está em concordância com os nossos valores.

#### 4.1.3. Determinação da capacidade redutora do ião férrico (FRAP)

O impacto da hidrodestilação nas duas macroalgas em estudo, *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis*, expresso na capacidade de reduzir o ião Fe<sup>3+</sup> apresenta-se na Figura 4.3.

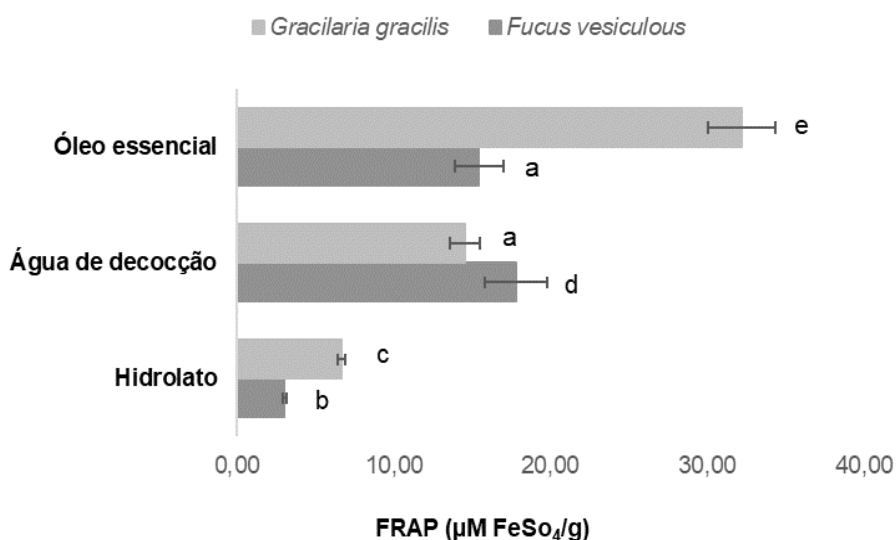


Figura 4.3: Atividade antioxidante expressa através da redução do ião férrico (FRAP,  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de extrato) dos extratos da água de decocção, hidrolato e óleo essencial obtido após hidrodestilação das macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis*. As linhas horizontais representam o desvio padrão e as letras diferentes indicam as diferenças significativas a  $P < 0.05$ , Teste de Tukey).

Através da Figura 4.3, verifica-se uma diferença significativa ( $P < 0.05$ ) no extrato de óleo essencial da *Gracilaria gracilis*, comparativamente com a *Fucus vesiculosus*. Por outro lado, comparando os valores encontrados na água de decocção das duas macroalgas em estudo, é notório o impacto significativo na *Fucus vesiculosus*, com o teor de  $17.79 \mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$ , comparativamente ao encontrado na *Gracilaria gracilis*, ca. de  $14.53 \mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$ .

É ainda possível observar capacidade antioxidante similar à obtida no extrato de decocção da *Gracilaria gracilis* e do óleo essencial da *Fucus vesiculosus*,  $14.53 \mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  e  $15.43 \mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$ , respetivamente

De um modo geral, das duas macroalgas, a *Gracilaria gracilis* foi a que registou valores superiores na capacidade antioxidante expressa pelo método de FRAP, em todas as amostras com exceção da água de decocção, ca. de  $14.53 \mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de extrato comparado com  $17.79 \mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$ , respetivamente.

No estudo desenvolvido por Agregán *et al.* (2019) o extrato da macroalga *Fucus vesiculosus* apresentou um valor de cerca de  $37.5 \mu\text{M TE/g}$ . Este, em comparação com o

presente estudo é bastante similar ao valor do extrato de óleo essencial, da *Gracilaria gracilis*, com um valor de 32.19 µM de FeSO<sub>4</sub>/g de extrato.

Noutro estudo (Jiménez-Escrig *et al.* . 2001) a atividade antioxidante do extrato de *Fucus vesiculosus* foi de 66.13 µM TE/g, sendo este valor superior ao obtido pelos três extratos analisados neste estudo.

#### 4.2. Análise de compostos voláteis por Cromatografia Gasosa (CG)

Os compostos voláteis (COV) destacam-se dos compostos bioativos produzidos por macroalgas, os que têm uma atividade biológica significativa (Cebeci, 2023). Existe uma variedade e um teor elevado de metabolitos voláteis, nas macroalgas como por exemplo, os hidrocarbonetos, cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, compostos halogenados, compostos sulfurados, furanos, pirazinas, piridinas, aminas etc.(Vilar *et al.*, 2020).

A presença de compostos voláteis torna-se essencial na alimentação uma vez que são responsáveis pelos atributos de sabor e qualidade geral dos alimentos. Acresce ainda a responsabilidade pelas ligações químicas que, quando libertados para o ecossistema marinho, agem como feromonas sexuais que se envolvem no processo de acasalamento, ajudando como dissuasores ou defesa química para herbívoros e inibidores de bactérias e fungos (Ferraces-Casais *et al.*, 2013; López-Pérez *et al.*, 2017).

No presente trabalho, e apesar da quantidade reduzida de óleo essencial obtida após a hidrodestilação das duas macroalgas, foi possível realizar a identificação dos compostos voláteis, tal como se pode observar na Tabela I.

**Tabela I** - Composição percentual dos compostos voláteis extraídos por hidrodestilação de *Fucus vesiculosus* (Fv\_11\_22) e de *Gracilaria gracilis* (Gg\_11\_22).

<b>Componente</b>	<b>IR</b>	<b>Fv_11_22</b>	<b>Gg_11_22</b>
1-Octen-3-ol	961	0.2	v
2-Pentil furano	973	v	v
<i>trans</i> -2-Octenal	1017	v	v
<i>n</i> -Octanol	1045	0.1	
<i>n</i> -Nonanal	1073	0.1	
2- <i>trans</i> -Nonenal	1124	v	
2- <i>trans</i> -Decenal	1236	v	
NI 2	1250	0.2	v
Epóxido de $\beta$ -ionona	1452	v	v
<i>trans</i> - $\beta$ -Ionona	1456	0.2	v
1-Pentadeceno	1493	1.5	
<i>n</i> -Pentadecano	1500	1.7	v
<i>n</i> -Heptadecano	1700		2.9
Ácido tetradecanóico (= ácido mirístico)	1723	82.4	
Hexahidrofarnesil acetona	1803	2.0	7.9
Ácido hexadecanóico (= ácido palmítico)	1908	8.5	84.4
% identificação		96.9	95.2

RI: Índice de Retenção relativo a uma série de *n*-alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>. v: vestigial (<0,05%);

Relativamente à *Fucus vesiculosus* os dois componentes dominantes são os ácidos gordos mirístico e palmítico, representando cerca de 82.4 % e 8.5 %, respetivamente do total de compostos identificados. Os restantes compostos apresentaram uma percentagem bastante reduzida, na maioria dos casos, vestigial.

Comparativamente ao encontrado na macroalga *Gracilaria gracilis*, foi notória uma menor expressão em termos de compostos voláteis com exceção da predominância do ácido gordo, o ácido hexadecanóico ou ácido palmítico, com cerca de 84.4%.

Na *Fucus vesiculosus* foram encontrados para além do ácido mirístico em quantidade considerável, como referido anteriormente, também os compostos 1-Pentadeceno, *trans*- $\beta$ -ionona, 1-octen-3-ol, respetivamente por ordem de maior para menor concentração. Os compostos encontrados nestas amostras também são visíveis nos hidrolatos extraídos nas análises cromatográficas.

Nos estudos desenvolvidos por López-Pérez *et al.*, (2017) e Vilar *et al.*, (2020), destacou-se a variação do teor de compostos voláteis das macroalgas de acordo com a sua composição, da espécie da macroalga, da região geográfica e até mesmo do método de extração aplicado. Tendo em conta as condicionantes para a identificação e a quantificação dos compostos voláteis ser na maioria vestigial, foi possível identificar e quantificá-los.

No estudo realizado por Ferraces-Casais *et al.* (2013) em duas macroalgas castanhas, Wakame (*Undaria pinnatifida*) e Kombu (*Laminaria* spp.), foi detetada uma percentagem do álcool 1-octen-3-ol de 0.49% e 0.51%, respetivamente. Noutro estudo, elaborado por López-Pérez *et al.*, (2017), o 1-octen-3-ol foi identificado em 7 macroalgas distintas e, representativas das três classes de macroalgas. Neste estudo, a macroalga castanha *Himanthalia elongata* apresentou uma maior abundância deste composto, ao contrário da macroalga vermelha *Palmaria palmata* com uma diferença de valores que variou entre 528.3 de índice de retenção para um total de 1445.8 e 83.7 de índice de retenção para um total de 1435.8, de IR total de álcoois, respetivamente. De acordo com o estudo de Su *et al.*, (2022), este composto é indicativo de um aroma característico de cogumelos confirmado pelo estudo de Wurzenberger & Grosh (1983) em que se observaram diferenças no teor deste compostos em duas variedades de cogumelos, sendo que a variedade castanha comparando com os cogumelos de variedade branca, apresentaram teores mais elevados.

Miladi *et al.* (2013) refere que o álcool 1-octen-3-ol encontrado no óleo essencial de tomilho (0.39%) e alecrim (0.12%). apresentou um índice de retenção de 981. Outros autores, Ilić *et al.*, (2022) referem para a menta, bálsamo de limão e manjerição doce, que o índice de retenção (974) foi superior ao do presente estudo (961). De acordo com estudos anteriores, este composto volátil ao ser aplicado na planta *Arabidopsis*, mostrou induzir genes de defesa na planta, principalmente no aumento da resistência contra o fungo *Botrytis cinerea*, um agente patogénico que causa perda de folhas, murcha flores e causa o apodrecimento de vegetais, criando uma camada cinzenta, normalmente em condições de humidade (Kishimoto *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2023).

De acordo com os compostos voláteis que mostram uma maior presença nas macroalgas, além do composto volátil mencionado anteriormente, temos a presença do composto o *trans*- $\beta$ -ionona, conhecido também por 3-buten-2-one ou 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl).

Num estudo realizado por Venda, Figueiredo & Godinho, (2022) em framboesas foi possível identificar o composto terpenóide *trans*- $\beta$ -ionona, como um dos mais presentes na sua composição, sendo um dos compostos responsáveis pelo aroma. Noutro estudo reportado por Vilar *et al.* (2020) a presença deste terpenóide foi encontrado em seis macroalgas (*Himanthalia elongata*, *Laminaria* spp., *Laminaria ochroleuca*, *Undaria pinnatifida*, *Palmaria palmata* e *Porphyra umbilicalis*), juntamente com a macroalga castanha *Saccharina latíssima* de acordo com o estudo de López-Pérez *et al.*, (2017). Comparando o teor nas várias macroalgas, há uma notória diferença de concentração entre estas, sendo o composto que se apresenta mais abundante na alga vermelha *Porphyra umbilicalis* (83.9%) e com menor abundância na macroalga castanha *Laminaria ochroleuca* (4.2%).

Outro composto de interesse e presente na macroalga *Fucus vesiculosus* foi o 1-pentadeceno, composto volátil pertencente ao grupo dos hidrocarbonetos, tendo sido encontrado em 5 macroalgas estando em maior proporção na alga *Chondrus crispus* (López-Pérez *et al.*, 2021). Num estudo de Mohy El-Din & El-Ahwany (2016), a alga *Corollina mediterranea*, que atualmente tem o nome de *Ellisolandia elongata*, segundo o *World Register of Marine Species* (WORMS), o composto 1-pentadeceno apresentou um valor de tempo de retenção de cerca de 32.75.

Relativamente aos ácidos gordos com maior expressão (ácido tetradecanóico e ácido hexadecanóico) na alga *Fucus vesiculosus* (tabela I), verifica-se que o ácido tetradecanóico se apresenta em maiores quantidades do que o hexadecanóico. De acordo com Petry *et al.*, (2021), o ácido gordo com maior presença na *Fucus vesiculosus* foi o ácido linoleico, que não foi detetado no presente estudo. Ao contrário, estes autores referem que o ácido tetradecanóico se encontra em menor quantidade comparativamente com o ácido hexadecanóico, 0.06% e 8.73%, respetivamente. Estes dados podem resultar da não extração do óleo, mas sim da aquisição de um composto comercial, e o método cromatográfico ser diferente do aplicado no presente estudo. Tal como no estudo mencionado anteriormente, Lorenzo *et al.*, (2017) apresenta dados que contrariam os apresentados no presente trabalho, ou seja, na macroalga *Fucus vesiculosus*, verificou-se uma proporção de ácido tetradecanóico (mirístico) inferior à de ácido hexadecanóico (palmítico), com valores de 11.38% e 14.66%, respetivamente. Esta diferença poderá ser devida aos métodos de extração, à metodologia de identificação utilizada e à proveniência do óleo.

No que diz respeito à macroalga *Gracilaria gracilis*, na literatura foram encontrados vários estudos que confirmam a elevada quantidade do ácido palmítico presente neste tipo de macroalga. No trabalho de Capillo *et al.*, (2018), verificou-se a presença de cerca de 31.62% e 41.71% de ácido palmítico, nos extratos de clorofórmio e de éter dietílico, respetivamente, em que, mais uma vez, foi utilizada como método cromatográfico o GC-FID de forma a analisar os compostos voláteis. Este estudo também retém a presença de ácido mirístico o que contraria o apresentado no presente trabalho, apesar dos valores diminutos de 4.76% e 5.96% nos extratos de clorofórmio e de éter dietílico, respetivamente. Francavilla *et al.*, (2013), concentração mais elevada dos ácidos palmítico e de mirístico, confirmando o estudo anterior.

Num ensaio de Neto *et al.*, (2018), foi efetuada a comparação das mesmas espécies mostrando que o ácido palmítico era o ácido gordo saturado maioritário. No presente estudo o ácido palmítico foi detetado como maioritário na *Gracilaria gracilis*, enquanto o ácido mirístico foi o dominante na *Fucus vesiculosus*.

## 5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Considerando a matriz das macroalgas estudadas, a metodologia da hidrodestilação deverá ser otimizada no futuro pois, a *Gracilaria gracilis* revelou alguma instabilidade durante o processo, apresentando comportamentos diferentes durante a ebulição.

A avaliação da capacidade antioxidante dos três extratos (óleo essencial, água de decocção e hidrolato) obtidos após a hidrodestilação das macroalgas *Gracilaria gracilis* e *Fucus vesiculosus*, foi realizada através da determinação do teor de compostos fenólicos totais (TPC), da capacidade de absorção do radical livre DPPH e pela capacidade de reduzir o íon  $Fe^{3+}$  (FRAP).

Dependendo do tipo de extrato (óleo essencial, água de decocção e hidrolato) o TPC foi variável, evidenciado diferentes eficácias/afinidades com o processo de extração. No extrato da água de decocção, a *Fucus vesiculosus* evidenciou um TPC elevado, enquanto que no extrato do óleo essencial foi a *Gracilaria gracilis* que se superiorizou.

Relativamente à avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH, a *Fucus vesiculosus* mostrou uma maior atividade antioxidante, enquanto na avaliação pela metodologia FRAP foi a *Gracilaria gracilis* que apresentou um potencial antioxidante superior. Estas diferenças poderão ser devido à metodologia aplicada, ou seja, no método DPPH, existe a transferência de eletrões do composto antioxidante para o radical livre DPPH, enquanto que no método FRAP na presença de um antioxidante, ocorre a redução em meio-ácido do complexo férrico,  $Fe(III)$ -TPTZ, ao complexo ferroso ( $Fe(II)$ -TPTZ). Assim, as macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis* apresentam na sua composição compostos com características distintas e complementares que contribuem para a sua capacidade antioxidante.

Os compostos voláteis já conhecidos na área alimentar, por serem essenciais para a determinação da qualidade de um produto, foram identificados no presente estudo a partir do extrato do óleo essencial recolhido das duas macroalgas em estudo (*Gracilaria gracilis* e *Fucus vesiculosus*). De todos os compostos voláteis, o ácido palmítico foi detetado com uma percentagem relevante na macroalga *Gracilaria gracilis*, sendo a *Fucus vesiculosus* a que

teve um maior número de compostos voláteis identificados, sendo o ácido mirístico o composto maioritário.

Apesar das dificuldades sentidas ao longo do trabalho, os objetivos inicialmente definidos foram atingidos, contribuindo para o conhecimento do potencial antioxidante, após hidrodestilação, das macroalgas *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria gracilis*.

## 6. Referências Bibliográficas

- Agregán, R., Barba, F. J., Gavahian, M., Franco, D., Khaneghah, A. M., Carballo, J., Ferreira, I. C. F. R., da Silva Barretto, A. C., & Lorenzo, J. M. (2019). *Fucus vesiculosus* extracts as natural antioxidants for improvement of physicochemical properties and shelf life of pork patties formulated with oleogels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(10), 4561–4570. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9694>
- Ajisaka, K., Yokoyama, T., & Matsuo, K. (2016). Structural Characteristics and Antioxidant Activities of Fucoidans from Five Brown Seaweeds. *Regular Paper*, 63, 31–37. <https://doi.org/10.5458/jag.jag>.
- André, R., Guedes, L., Melo, R., Ascensão, L., Pacheco, R., Vaz, P. D., & Serralheiro, M. L. (2020). Effect of food preparations on in vitro bioactivities and chemical components of *Fucus vesiculosus*. *Foods*, 9(7), 955. <https://doi.org/10.3390/foods9070955>
- Aziz, E., Batool, R., Khan, M. U., Rauf, A., Akhtar, W., Heydari, M., Rehman, S., Shahzad, T., Malik, A., Mosavat, S. H., Plygun, S., & Shariati, M. A. (2021). An overview on red algae bioactive compounds and their pharmaceutical applications. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 17(4). <https://doi.org/10.1515/jcim-2019-0203>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989–4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Beattie, S. W., Moranchais, M., Déléris, P., Fleurence, J., & Dumay, J. (2020). *Protocols for Macroalgae Research* (B. Charrier, T. Wichard, & C. R. K. Reddy (eds.); Vol. 21, Issue 1). CRC Press. <http://journal.um-surabaya.ac.id/index.php/JKM/article/view/2203>
- Besednova, N. N., Andryukov, B. G., Zaporozhets, T. S., Kryzhanovsky, S. P., Kuznetsova, T. A., Fedyanina, L. N., Makarenkova, I. D., & Zvyagintseva, T. N. (2020). Algae polyphenolic compounds and modern antibacterial strategies: Current achievements and immediate prospects. *Biomedicines*, 8, 342. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8090342>
- Bhargava, K., Conti, D. S., da Rocha, S. R. P., & Zhang, Y. (2015). Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology*, 47, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.007>
- Bhowmik, S., Agyei, D., & Ali, A. (2022). Bioactive chitosan and essential oils in sustainable active food packaging: Recent trends, mechanisms, and applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 34(October), 100962. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100962>
- Biris-Dorhoi, E. S., Michiu, D., Pop, C. R., Rotar, A. M., Tofana, M., Pop, O. L., Socaci, S. A., & Farcas, A. C. (2020). Macroalgae—A sustainable source of chemical compounds with biological activities. *Nutrients*, 12(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu12103085>
- Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M. F. L., Cabral, C., & Pires, I. M. (2018). Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary*

and *Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3149362>

- Borges, L., Lima, G., Artés, F., Souza, M. E. De, Freitas, L. D. S., Jesus, H. I. De, Fátima, N. De, & Melo, M. (2019). Efficiency of DPPH and FRAP assays for estimating antioxidant activity and separation of organic acids and phenolic compounds by liquid chromatography in fresh-cut nectarine. *Australian Journal of Crop Science*, 13(07), 1053–1060. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.07.p1368>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cabral, E. M., Mondala, J. R. M., Oliveira, M., Przyborska, J., Fitzpatrick, S., Rai, D. K., Sivagnanam, S. P., Garcia-Vaquero, M., O'Shea, D., Devereux, M., Tiwari, B. K., & Curtin, J. (2021). Influence of molecular weight fractionation on the antimicrobial and anticancer properties of a fucoidan rich-extract from the macroalgae *Fucus vesiculosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 994–1002. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.182>
- Capillo, G., Savoca, S., Costa, R., Sanfilippo, M., Rizzo, C., Giudice, A. Lo, Albergamo, A., Rando, R., Bartolomeo, G., Spanò, N., & Faggio, C. (2018). New insights into the culture method and antibacterial potential of *Gracilaria gracilis*. *Marine Drugs*, 16(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/md16120492>
- Catarino, M. D., Silva, A., Cruz, M. T., Mateus, N., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2020). Phlorotannins from *Fucus vesiculosus*: Modulation of inflammatory response by blocking nf-kb signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6897. <https://doi.org/10.3390/ijms21186897>
- Catarino, M. D., Silva, A. M. S., Mateus, N., & Cardoso, S. M. (2019). Optimization of phlorotannins extraction from *Fucus vesiculosus* and evaluation of their potential to prevent metabolic disorders. *Marine Drugs*, 17(3), 162. <https://doi.org/10.3390/md17030162>
- Cebeci, T. ğba. (2023). Chemical composition , scolicidal effects and antimicrobial activities of green macroalga. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare Des Science*, 76(1), 44–55. <https://doi.org/10.7546/CRABS.2023.01.05>
- Chamorro, E., Zambón, S., Morales, W., Sequeira, A., & Velasco, G. (2012). Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*, 1(February), 307–324. <https://doi.org/10.5772/33201>
- Costa, E., Domingues, P., Melo, T., Coelho, E., Pereira, R., Calado, R., Abreu, M. H., & Domingues, M. R. (2019). Lipidomic signatures reveal seasonal shifts on the relative abundance of high-valued lipids from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *Marine Drugs*, 17(6), 335. <https://doi.org/10.3390/md17060335>
- Cotas, J., Leandro, A., Monteiro, P., Pacheco, D., Figueirinha, A., Gonçalves, A. M. M., Jorge, G., & Pereira, L. (2020). Seaweed Phenolics: From Extraction to Applications. *Marine Drugs*, 18(8), 384.
- Cotas, J., Leandro, A., Pacheco, D., Gonçalves, A. M. M., & Pereira, L. (2020). A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta). *Life*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/life10030019>

- De Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009). Vegetals as natural sources of antioxidants. *Quimica Nova*, 32(3), 689–702. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300013>
- Delaux, P. M., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J. D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., Rothfels, C. J., Sederoff, H. W., Stevenson, D. W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M. R., Dunand, C., Morris, R. J., Roux, C., ... Ane, J. M. (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), 13390–13395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>
- Ebrahimzadeh, M. A., Khalili, M., & Dehpour, A. A. (2018). Antioxidant activity of ethyl acetate and methanolic extracts of two marine algae, *nannochloropsis oculata* and *Gracilaria gracilis* - An in vitro assay. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000117280>
- Ferraces-Casais, P., Lage-yusty, M. A., Quirós, A. R.-B. De, & López-Hernández, J. (2013). Rapid identification of volatile compounds in fresh seaweed. *Talanta*, 115, 798–800. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.049>
- Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., & Barroso, J. G. (2017). Voláteis e óleos essenciais Parte I / II Volatiles and essential oils. *Ciência & Investigação*, 24, 14–17. [http://cbv.fc.ul.pt/2017\\_Agrotec\\_24\\_14\\_Voláteis e óleos essenciais. Parte I\\_II.pdf](http://cbv.fc.ul.pt/2017_Agrotec_24_14_Voláteis e óleos essenciais. Parte I_II.pdf)
- Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., & Caroppo, C. (2013). The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine Drugs*, 11(10), 3754–3776. <https://doi.org/10.3390/md11103754>
- Franco, J. N., Lemos, M. F. L., & Neto, J. M. (2022). *Macroalgas das Berlengas e Costa de Prata. Do conhecimento à utilização.* (M.-P. de Leiria (ed.)). <https://doi.org/https://doi.org/10.25766/rwp2-8k68>
- Freitas, M. V., Inácio, L. G., Ruas, A., Silva, I. A., Mouga, T., Pereira, L., & Afonso, C. (2023). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Selected Red Seaweeds from Central Portugal. *Applied Sciences*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/app13010157>
- Garcia, E., Odoni, T., Alencar, S., Reis, A., Loguercio, A., & Grande, R. (2012). Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth. *New England Journal of Medicine*, 23(1). <https://doi.org/10.1056/nejm197611182952105>
- Gomes, F. (Universidade F. do R. G. do S. (2003). *Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida ( SPME ), hidrodestilação e extração com fluído supercrítico ( sfe ).* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Departamento de Química Inorgânica e Analítica.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2023). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M.D. Guiry). *Fucus vesiculosus* Linnaeus, 1753. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=145548> on 2023-05-06
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2023). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M.D. Guiry). *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, L.M. Irvine & Farnham, 1995. Acesso: *World Register of Marine Species* at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=145700> em 2023-05-06
- Heavisides, E., Rouger, C., Reichel, A. F., Ulrich, C., Wenzel-Storjohann, A., Sebens, S., & Tasdemir, D. (2018). Seasonal variations in the metabolome and bioactivity profile of

*Fucus vesiculosus* extracted by an optimised, pressurised liquid extraction protocol. *Marine Drugs*, 16(12), 503. <https://doi.org/10.3390/md16120503>

- Heffernan, N., Smyth, T. J., Soler-Villa, A., Fitzgerald, R. J., & Brunton, N. P. (2015). Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (*Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis* and *Codium fragile*). *Journal of Applied Phycology*, 27, 519–530. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0291-9>
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Capillo, G., Paknejad, H., Khalili, M., Tabarraei, A., Van Doan, H., Spanò, N., & Faggio, C. (2018). Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebrafish (*Danio rerio*) fed on *Gracilaria gracilis* powder. *Fish and Shellfish Immunology*, 83, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.046>
- Hou, T., Sana, S. S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V. R., & Zhang, Z. (2022). Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Bioscience*, 47, 101716. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101716>
- Ilić, Z. S., Milenković, L., Tmušić, N., Stanojević, L., Stanojević, J., & Cvetković, D. (2022). Essential oils content, composition and antioxidant activity of lemon balm, mint and sweet basil from Serbia. *LWT*, 153, 112210. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112210>
- Irshad, M., Ali Subhani, M., Ali, S., & Hussain, A. (2020). Biological Importance of Essential Oils. In *Essential Oils: Oils of Nature* (Vol. 1). <https://doi.org/10.5772/intechopen.87198>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.842>
- Kalasariya, H. S., & Pereira, L. (2022). Dermo-Cosmetic Benefits of Marine Macroalgae-Derived Phenolic Compounds. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 23, p. 11954). <https://doi.org/10.3390/app122311954>
- Kazir, M., Abuhassira, Y., Robin, A., Nahor, O., Luo, J., Israel, A., Golberg, A., & Livney, Y. D. (2019). Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva sp.* and *Gracilaria sp.*, for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 87, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.047>
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Keyrouz, R., Abasq, M. L., Bourvellec, C. Le, Blanc, N., Audibert, L., Argall, E., & Hauchard, D. (2011). Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chemistry*, 126, 831–836. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.061>
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2007). Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, 73(1), 35–37. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0314-8>
- Kryshen, A. (2016). *Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais e nisina*. Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.
- Kuda, T., Nishizawa, M., Toshima, D., Matsushima, K., Yoshida, S., Takahashi, H., Kimura, B., & Yamagishi, T. (2021). Antioxidant and anti-norovirus properties of aqueous acetic acid macromolecular extracts of edible brown macroalgae. *Lwt*, 141, 110942. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110942>

- Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2020). Diverse applications of marine macroalgae. *Marine Drugs*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/md18010017>
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, 91(10), 1535–1556. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535>
- Li, S., Hu, M., Tong, Y., Xia, Z., Tong, Y., Sun, Y., Cao, J., Zhang, J., Liu, J., Zhao, S., & He, P. (2023). A review of volatile compounds in edible macroalgae. *Food Research International*, 165(January), 112559. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112559>
- López-Pérez, O., del Olmo, A., Picon, A., & Nuñez, M. (2021). Volatile compounds and odour characteristics of five edible seaweeds preserved by high pressure processing: Changes during refrigerated storage. *Algal Research*, 53, 102137. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102137>
- López-Pérez, O., Picon, A., & Nuñez, M. (2017). Volatile compounds and odour characteristics of seven species of dehydrated edible seaweeds. *Food Research International*, 99, 1002–1010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.013>
- Lorenzo, J. M., Agregán, R., Munekata, P. E. S., Franco, D., Carballo, J., Şahin, S., Lacomba, R., & Barba, F. J. (2017). Proximate composition and nutritional value of three macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*. *Marine Drugs*, 15(11), 360. <https://doi.org/10.3390/md15110360>
- Mahanta, B. P., Sut, D., Lal, M., & Haldar, S. (2021). Hydrodistillation alters the compositional originality in black turmeric (*Curcuma caesia* Roxb.) essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 33(3), 240–246. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1873868>
- Makgwane, P. R. (2006). Methods For Essential Oil Analysis. *Characterization of Essential Oils by Comprehensively Coupled Supercritical Fluid and Gas Chromatography SFCxGC*, 21–50. <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-02222007-184250/>
- Miladi, H., Slama, R. Ben, Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 05(06), 729–739. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.56090>
- Milinic, J., Vale, C., Botelho, M. J., Pereira, E., Sardinha, J., Murton, B. J., & Noronha, J. P. (2021). Selective incorporation of rare earth elements by seaweeds from Cape Mondego, western Portuguese coast. *Science of the Total Environment*, 795, 148860. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148860>
- Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2(4), 403–416. <https://doi.org/10.1002/fsn3.116>
- Mohy El-Din, S. M., & El-Ahwany, A. M. D. (2016). Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 471–484. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.06.004>
- Morais, T., Inácio, A., Coutinho, T., Ministro, M., Cotas, J., Pereira, L., & Bahcevandziev, K. (2020). Seaweed potential in the animal feed: A review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(8), 1–24. <https://doi.org/10.3390/JMSE8080559>

- Moreira, A., Cruz, S., Marques, R., & Cartaxana, P. (2021). The underexplored potential of green macroalgae in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 14(1). <https://doi.org/10.1111/raq.12580>
- Nadeeshani, H., Hassouna, A., & Lu, J. (2022). Proteins extracted from seaweed *Undaria pinnatifida* and their potential uses as foods and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 6187–6203. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1898334>
- Neto, R. T., Marçal, C., Queirós, A. S., Abreu, H., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2018). Screening of *Ulva rigida*, *Gracilaria sp.*, *Fucus vesiculosus* and *Saccharina latissima* as functional ingredients. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2987. <https://doi.org/10.3390/ijms19102987>
- Nicolucci, A., Rossi, M. C., & Petrelli, M. (2021). Effectiveness of *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* on Metabolic Syndrome Components: A Real-World, Observational Study. *Journal of Diabetes Research*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3389316>
- Oliveira, C. S. D. (2015). *Prospecção de compostos bioativos nas macroalgas Himanthalia elongata, Laminaria ochroleuca e Undaria pinnatifida*. Universidade de Aveiro.
- 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>
- Passos, R., Correia, A. P., Ferreira, I., Pires, P., Pires, D., Gomes, E., do Carmo, B., Santos, P., Simões, M., Afonso, C., & Baptista, T. (2021). Effect on health status and pathogen resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with diets supplemented with *Gracilaria gracilis*. *Aquaculture*, 531, 735888. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735888>
- Passos, R., Correia, A. P., Pires, D., Pires, P., Ferreira, I., Simões, M., do Carmo, B., Santos, P., Pombo, A., Afonso, C., & Baptista, T. (2021). Potential use of macroalgae *Gracilaria gracilis* in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Health benefits from a sustainable source. *Fish and Shellfish Immunology*, 119, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.033>
- Pedro, B., Guedes, L., André, R., Gaspar, H., Vaz, P., Ascensão, L., Melo, R., & Luísa Serralheiro, M. (2021). *Undaria pinnatifida* (*U. pinnatifida*) bioactivity: Antioxidant, gastrointestinal motility, cholesterol biosynthesis and liver cell lines proteome. *Journal of Functional Foods*, 83, 104567. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104567>
- Pereira, L. (2009). Guia ilustrado das macroalgas: conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa. In *Imprensa da Universidade de Coimbra*. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-0397-1>
- Pereira, L. (2011). A Review of the Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds. In V. H. Pomin (Ed.), *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses* (1st ed., Vol. 7, Issue 4, pp. 15–47). Nova Science Publishers, Inc.
- Pereira, L. (2021). Macroalgae. *Encyclopedia*, 1(1), 177–188. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1010017>
- Pereira, T., Barroso, S., Mendes, S., Amaral, R. A., Dias, J. R., Baptista, T., Saraiva, J. A., Alves, N. M., & Gil, M. M. (2020). Optimization of phycobiliprotein pigments extraction from red algae *Gracilaria gracilis* for substitution of synthetic food colorants. *Food Chemistry*, 321, 126688. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126688>
- Petry, B. R., Rial, R. C., De Freitas, O. N., Barbosa, J. M. dos S., Cavalheiro, L. F., Nazário, C. E. D., & Viana, L. H. (2021). Macroalgae *Fucus vesiculosus* oil: Biodiesel production

- using alkaline transesterification. *Quimica Nova*, 44(4), 410–414. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170704>
- Pinheiro, J., Fernandes, W., Sá, H., Bernardino, R., Leandro, S. M., & Ganhão, R. (2023). Adding Value to Stalked Barnacles from Berlengas Nature Reserve (Portugal) by the Development of a New Food. *Sustainability*, 15(4), 3149. <https://doi.org/10.3390/su15043149>
- Pinheiro, J., Santos, D. I., Gonçalves, E. M., Abreu, M., & Moldão-Martins, M. (2021). Effect of Heat Treatment on Smoothie Quality by Response Surface Methodology. *Proceedings*, 70(1), 6. [https://doi.org/10.3390/foods\\_2020-07626](https://doi.org/10.3390/foods_2020-07626)
- Qiu, Y.-L. (2008). Phylogeny and evolution of charophytic algae and land plants. *Journal of Systematics and Evolution*, 46(3), 287–306. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1002.2008.08035>
- Rajurkar, N. S., & Hande, S. M. (2011). *Estimation of Phytochemical Content and Antioxidant Activity of Some Selected Traditional Indian Medicinal Plants* (Issue April).
- Reboleira, J., Ganhão, R., Mendes, S., Adão, P., Andrade, M., Vilarinho, F., Sanches-Silva, A., Sousa, D., Mateus, A., & Bernardino, S. (2020). Optimization of extraction conditions for *Gracilaria gracilis* extracts and their antioxidative stability as part of microfiber food coating additives. *Molecules*, 25(18), 4060. <https://doi.org/10.3390/molecules25184060>
- Ribeiro, A. R., Botelho, G., Gaspar, A., & Costa, R. (2021). Storage stability of durum wheat pasta enriched with seaweeds flours. *Foods*, 10(10), 2450. <https://doi.org/10.3390/foods10102450>
- Rodrigues, M. (2015). *Caracterização da composição nutricional da macroalga Fucus vesiculosus e a alteração dos compostos bioativos nos diferentes métodos de secagem* [Escola Superior Agrária de Bragança]. <http://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/12592>
- Salahaddin, S. K. (2021). *Analysis of Essential Oils Using GC- FID And GC-MS*.
- Sapatinha, M., Oliveira, A., Costa, S., Pedro, S., Gonçalves, A., Mendes, R., Bandarra, N. M., & Pires, C. (2022). Red and brown seaweeds extracts: A source of biologically active compounds. *Food Chemistry*, 393, 133453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133453>
- Sargazi, M., Hossein Hashemi, S., & Kaykhaii, M. (2016). Modern Sample Preparation Techniques: A Brief Introduction. *Intech*, 11 (tourism), 13. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- Shao, Z., & Duan, D. (2022). The Cell Wall Polysaccharides Biosynthesis in Seaweeds : A Molecular Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 13(May). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.902823>
- Shi, S., Wang, J., Liu, C., & Zheng, L. (2023). Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Developmental toxicity and inflammatory response induced by Botrytis cinerea in zebrafish ( *Danio rerio* ) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 267, 109575. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109575>
- Silveira, R. M., Carvalho, A. F. F. U., Bünger, M. de O., Silva, F. M. R. d. O., & da Costa, I. R. (2022). Meta-analysis of the influence of seasonality on the chemical composition of essential oils from Myrtaceae species. *South African Journal of Botany*, 150, 1096–1101. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.003>
- Singleton, V. L., Rossi Jr., J. A., & Rossi J A Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and*

*Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

- Su, T., Chen, Y., Liu, H., Gao, Y., Guo, J., Li, Y., Qi, Y., & Qiu, L. (2022). The Biosynthesis of 1-octene-3-ol by a Multifunctional Fatty Acid Dioxygenase and Hydroperoxide Lyase in *Agaricus bisporus*. *Journal of Fungi*, 8(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/jof8080827>
- Tierney, M. S., Smyth, T. J., Hayes, M., Soler-Vila, A., Croft, A. K., & Brunton, N. (2013). Influence of pressurised liquid extraction and solid – liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology* 2013, 48, 860–869. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12038>
- Ummat, V., Sivagnanam, S. P., Rajauria, G., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2021). Advances in pre-treatment techniques and green extraction technologies for bioactives from seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.018>
- Ummat, V., Tiwari, B. K., Jaiswal, A. K., Condon, K., Garcia-Vaquero, M., O'Doherty, J., O'Donnell, C., & Rajauria, G. (2020). Optimisation of ultrasound frequency, extraction time and solvent for the recovery of polyphenols, phlorotannins and associated antioxidant activity from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 18(5), 250. <https://doi.org/10.3390/md18050250>
- Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., & Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11(11), 2786. <https://doi.org/10.3390/nu11112786>
- Venda, A. F., Figueiredo, A. C., & Godinho, M. do C. (2022). Compostos voláteis de frutos de *Rubus idaeus* L. e sua utilização como atrativos na captura da *Drosophila suzukii*. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 35(3), 253–261.
- Vilar, E. G., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P., & Kilcawley, K. N. (2020). Volatile compounds of six species of edible seaweed: A review. *Algal Research*, 45(2), 101740. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101740>
- Wurzenberger, M., & Grosh, W. (1983). Bestimmung von 1-Oeten-3-ol in Pilzen und Pilzprodukten. *Zeitschrift Fur Lebensmittel - Untersuchung Und Forschung*, 176, 16–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01089340>

## Anexos

**Tabela A I** - Controlo microbiológico realizado à macroalga *Fucus vesiculosus* produzida pela empresa portuguesa Algaplus.

Parâmetros	Valores de referência
Contagem total viável (30 °C) (1)	$\leq 10^6$ ufc/g (1)
Bactérias redutoras de sulfato	$\leq 10^3$ ufc/g (1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\leq 10^2$ ufc/g (2)
Coliformes fecais	$\leq 10^4$ ufc/g (1)
<i>Clostridium perfringens</i>	$\leq 10^3$ ufc/g (1)
Bolores	$\leq 10^3$ ufc/g (1)
Leveduras	$\leq 10^5$ ufc/g (1)
<i>Salmonella spp.</i>	Absent in 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Absent in 25 g

(1) Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos INSA\_Grupo 3,

(2) Regulamento francês – CEVA 2019

**Tabela A II** - Composição nutricional da macroalga castanha, *Fucus vesiculosus*.

Parâmetros	Valores de referência
Energia (kcal)	209
(kj)	865
Ácidos gordos totais (g)	2.4
Ácidos gordos saturados (g)	0.46
Ácidos gordos polinsaturados (g)	0.38
Hidratos de carbono (g)	10.8
Açúcar (g)	0.2
Proteína (g)	14.5
Fibra dietética (g)	43.1
Potássio (mg)	3272
Cálcio (mg)	1167
Magnésio (mg)	885
Ferro (mg)	14.7
Zinco (mg)	8.2
Cobre (mg)	0.4

Manganês (mg)	8.3
Selênio (µg)	88.4
Iodo (µg)	40000
Sal (g)	7.6
Humidade (%)	12

\*Vitaminas e minerais presentes em quantidades significativas de acordo com o Regulamento (EU)No. 1169/2011.

**Tabela A III** - Identificação e informação para conhecimento do consumidor, relativamente à macroalga *Fucus vesiculosus*.

Parâmetros	Valores de referência
<b>Macronutrientes</b>	
Nome do produto	<i>Fucus vesiculosus</i> totalmente seca
	<i>Fucus vesiculosus</i> semi-seca (flocos)
	<i>Fucus vesiculosus</i> semi-seca (farinha)
Produtor	Algaplus - Produção e comercialização de algas e seus derivados, Lda
Quantidade líquida	Depende do formato da embalagem
Ingredientes	100% <i>Fucus vesiculosus</i> seca
Declaração nutricional	Energia, Hidratos de carbono, Açúcar, Gordura total, Ácidos gordos saturados, Proteínas, Fibra dietética, Sal; Vitaminas e Minerais (presentes em quantidades significativas =15% do DDI)
Alergénicos	Produto não alérgico; Dada a sua origem natural, pode conter vestígios de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peixe,</li> <li>• Crustáceos,</li> <li>• Moluscos;</li> </ul> Sem glúten
Informação adicional	Livre de OGM Sem corantes nem conservantes
Cultura e a transformação têm certificação biológica pela entidade competente e independente SATIVA PT-BIO-O3.	



Data mínima de validade	Até 2 anos depois de seca e embalada
	Na falha de seguir as condições ideais de preservação pode diminuir a qualidade do produto e diminuir a durabilidade do mesmo

**Tabela A IV** - Especificação do transporte e armazenamento, relativamente à macroalga *Fucus vesiculosus*.

Transporte	Transporte realizados por veículos fechados
Armazenamento	Manter a embalagem fechada, resguardada de qualquer fonte direta de luz e calor. Armazenada num local fresco e seco a temperatura ambiente.

**Tabela A V** - Parâmetros de avaliação toxicológica, de metais pesados e outros elementos e os valores de referência para cada um, relativamente à macroalga *Fucus vesiculosus*.

Parâmetros	Valores de referência
Arsénio inorgânico	3 mg/kg (peso seco) (1)
Estanho	5 mg/kg (peso seco) (1)
Cádmio	0,5 mg/kg (peso seco) (1)    3 mg/kg (peso molhado) (2)
Chumbo	5 mg/kg (peso seco) (1)
Mercúrio	0,1 mg/kg (peso seco) (1)
Iodo	≤103 ufc/g (1) kg (peso seco) (1)
Regulamento francês – CEVA 2014 (2) Regulamentações CE nº 629/2008; 420/2011; 488/2014 para suplementos alimentares constituídos exclusiva ou principalmente por algas secas, produtos derivados de algas marinhas ou moluscos bivalves.	

**Tabela A VI** - Controlo microbiológico realizado à macroalga *Gracilaria gracilis* pela empresa portuguesa Algaplus.

Parâmetros	Valores de referência
Contagem total viável (30 °C) (1)	≤10 <sup>6</sup> ufc/g (1)
Bactérias redutoras de sulfato	≤10 <sup>3</sup> ufc/g (1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤10 <sup>2</sup> ufc/g (2)
Coliformes fecais	≤10 <sup>4</sup> ufc/g (1)

<i>Clostridium perfringens</i>	≤10 <sup>3</sup> ufc/g (1)
Bolores	≤10 <sup>3</sup> ufc/g (1)
Leveduras	≤10 <sup>5</sup> ufc/g (1)
<i>Salmonella spp.</i>	Absent in 25g

**Tabela A VII** - Composição nutricional da macroalga vermelha, *Gracilaria gracilis*.

Parâmetros	Valores de referência
<b>Macronutrientes</b>	
Energia (kcal)	210
(kj)	873
Ácidos gordos totais (g)	1.4
Ácidos gordos saturados (g)	0.42
Ácidos gordos polinsaturados (g)	0.16
Hidratos de carbono (g)	8.4
Açúcar (g)	0.2
Proteína (g)	21.9
Fibra dietética (g)	5.9
Potássio (mg)	5853
Cálcio (mg)	1292
Fósforo (mg)	177
Magnésio (mg)	412
Ferro (mg)	19.7
Zinco (mg)	3.3
Cobre (mg)	0.4
Manganês (mg)	103.5.
Iodo (µg)	494300
Sal (g)	5.9
Humidade (%)	12

\*Vitaminas e minerais presentes em quantidades significativas de acordo com a Regulamento (EU)No. 1169/2011.

**Tabela A VIII-** Identificação e informação para conhecimento do consumidor, relativamente à macroalga *Gracilaria gracilis*.

Parâmetros	Valores de referência
<b>Macronutrientes</b>	
Nome do produto	Ogonori <i>Gracilaria gracilis</i> totalmente seca
	Ogonori <i>Gracilaria gracilis</i> semi-seca (flocos)
	Ogonori <i>Gracilaria gracilis</i> semi-seca (farinha)
Produtor	Algaplus - Produção e comercialização de algas e seus derivados, Lda
Quantidade líquida	Depende do formato da embalagem
Ingredientes	100% <i>Gracilaria gracilis</i> seca
Declaração nutricional	Energia, Hidratos de carbono, Açúcar, Gordura total, Ácidos gordos saturados, Proteínas, Fibra dietética, Sal; Vitaminas e Minerais (presentes em quantidades significativas =15% do DDI)
Alergénicos	Produto não alérgico; Dada a sua origem natural, pode conter vestígios de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peixe,</li> <li>• Crustáceos,</li> <li>• Moluscos;</li> </ul> Sem glúten
Informação adicional	Livre de OGM Sem corantes nem conservantes
Cultura e a transformação têm certificação biológica pela entidade competente e independente SATIVA PT-BIO-O3.	
Data mínima de validade	Até 2 anos depois de seca e embalada
	Na falha de seguir as condições ideais de preservação pode diminuir a qualidade do produto e diminuir a durabilidade do mesmo

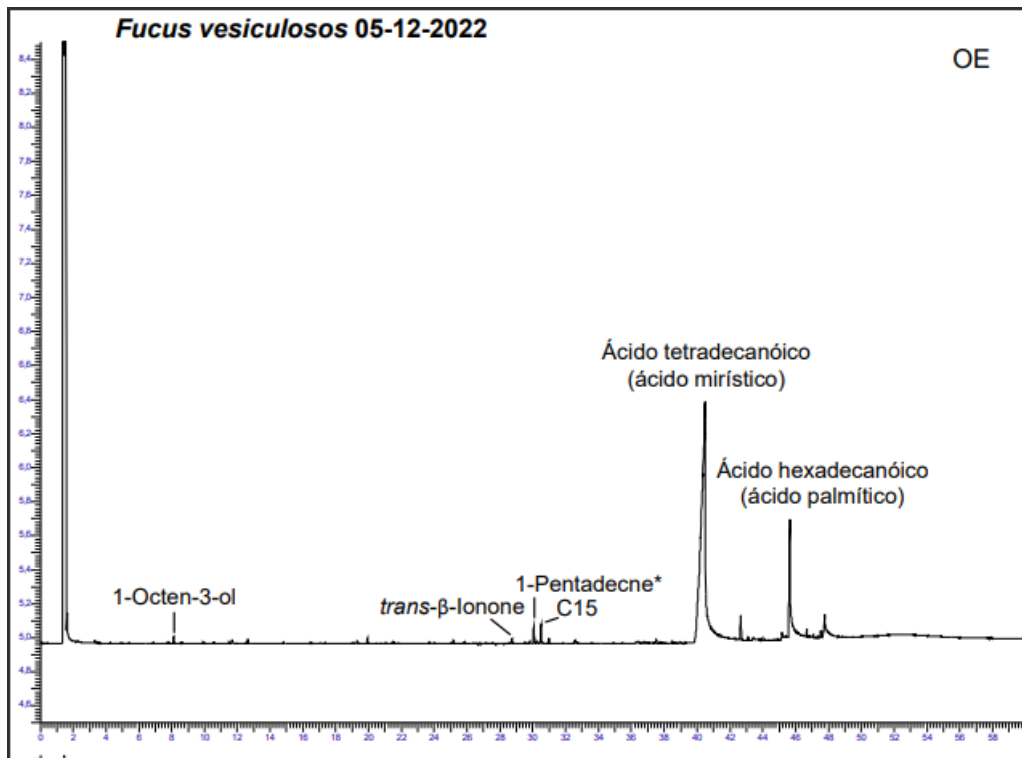


**Tabela A IX** - Especificação do transporte e armazenamento, relativamente à macroalga *Gracilaria gracilis*.

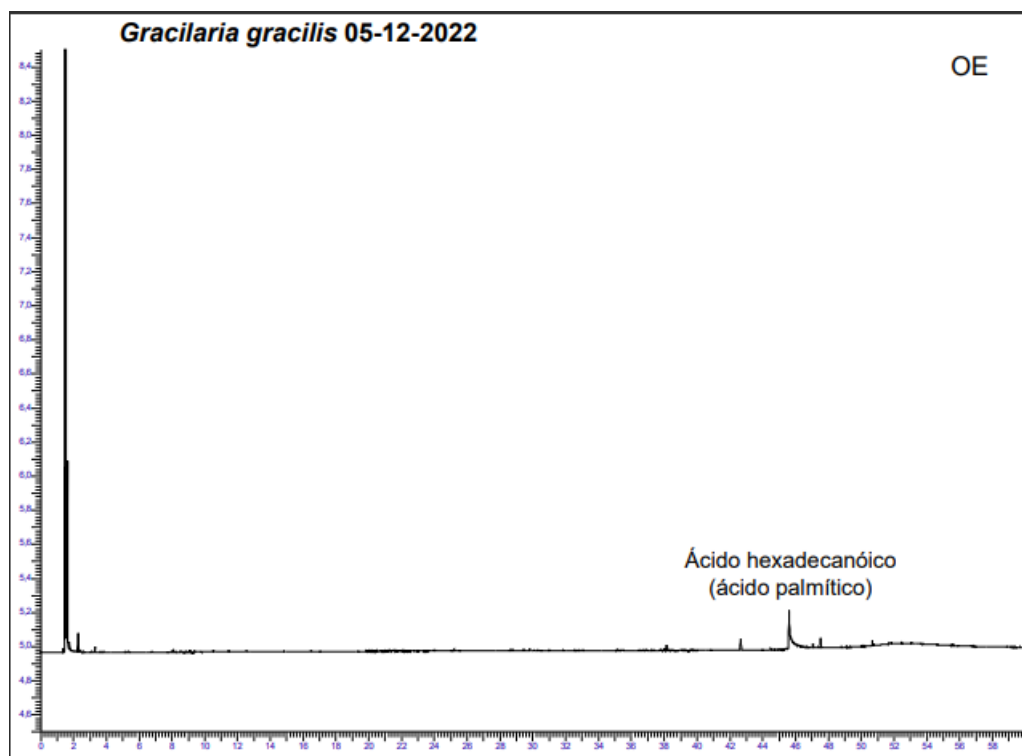
Transporte	Transporte realizados por veículos fechados
Armazenamento	Manter a embalagem fechada, resguardada de qualquer fonte direta de luz e calor. Armazenada num local fresco e seco a temperatura ambiente.

**Tabela A X** - Parâmetros de avaliação toxicológica, de metais pesados e outros elementos e os valores de referência para cada um, relativamente à macroalga *Gracilaria gracilis*.

Parâmetros	Valores de referência
Arsénio inorgânico	3 mg/kg (peso seco) (1)
Estanho	5 mg/kg (peso seco) (1)
<i>Cádmio</i>	0,5 mg/kg (peso seco) (1)    3 mg/kg (peso molhado) (2)
Chumbo	5 mg/kg (peso seco) (1)
<i>Mercúrio</i>	0,1 mg/kg (peso seco) (1)
Iodo	≤103 ufc/g (1) kg (peso seco) (1)
Regulamento francês – CEVA 2014 (2) Regulamentações CE nº 629/2008; 420/2011; 488/2014 para suplementos alimentares que consistem exclusiva ou principalmente em algas secas, produtos derivados de algas marinhas, ou de moluscos bivalves secos.	



**Figura A1:** Compostos voláteis presentes no óleo essencial da *Fucus vesiculosus*.



**Figura A2:** Compostos voláteis presentes no óleo essencial da *Gracilaria gracilis*.