

Caracterização de um extrato da macroalga *Ericaria selaginoides* e estudo da incorporação em iogurte.

Jéssica Cristina Faria Abreu

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

Engenharia Alimentar

Orientadores: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra, Investigadora Auxiliar com agregação do Instituto Português do Mar e da Atmosfera

Júri:

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto da Motta, Investigadora do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra, Investigadora Auxiliar com agregação do Instituto Português do Mar e da Atmosfera

2022

Agradecimentos

Agradeço ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), pela oportunidade de realizar o presente trabalho, pelo apoio material e profissional prestado ao longo da investigação e escrita em função da presente tese.

Agradeço à professora Margarida Moldão por receber-me, orientar e apoiar ao longo de todo este trabalho.

Agradeço também à Doutora Narcisa Bandarra por receber-me e direcionar-me no IPMA, pelos recursos e apoio disponibilizado.

Agradeço ao Doutor Carlos por acompanhar cada passo do meu trabalho, a sua sabedoria e apoio foram também indispensáveis.

Agradeço à Doutora Carmo e à Carolina pela disponibilidade, auxílio e alocação de recursos, bem como por todo o carinho.

Agradeço à D. Júlia e à Ana Bispo por direcionarem e auxiliarem nos laboratórios do IPMA e à Joana, com quem tive o prazer de trabalhar lado a lado e que permitiu a realização da presente tese com a recolha da alga em estudo.

Principalmente agradeço à minha família, por todo o apoio, compreensão e carinho indispensáveis. Ao meu pai pelo seu amor incondicional e paciência. À minha mãe, que plantou a semente do que sou hoje mas que não pôde colher os frutos, e à qual espero orgulhar eternamente. Ao meu irmão por tirar-me o juízo. E à minha tia por estar sempre de olho em mim.

Agradeço aos amigos da ilha que ficam para sempre, aos da RUB pela casa longe de casa, aos da FCUL por iniciarem esta jornada e por cá continuarem e aos do ISA pela partilha e amizade. Em especial à Juliana e ao David, pelo seu apoio, paciência e distração.

Resumo:

A incorporação de macroalgas na alimentação requer o seu estudo para uma melhor aplicação na indústria alimentar. Foram estudados extratos com acetato de etilo da macroalga *Ericaria selaginoides*. Tendo como variáveis o tipo de trituração/homogeneização e o tempo de extração e como respostas, o rendimento e a análise dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) foi selecionado o método com dupla homogeneização em homogeneizador, cujo rendimento foi 7,8 % m/m. Efetuou-se a análise do respetivo extrato em que o teor de fenóis totais foi 84,18 mg GAE/g de matéria seca de extrato, a atividade antioxidante, medida pelo método do poder antioxidante de redução férrica (FRAP) foi de 3211,68 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ e pelo método do ácido 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) com 379,01 $\mu\text{mol Eq Trolox}/\text{g ms}$. A atividade anti-inflamatória foi elevada, com 79% de inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2). À exceção da atividade anti-inflamatória, as restantes análises mostram valores superiores no extrato em comparação aos verificados na biomassa. O extrato obtido e caracterizado foi incorporado numa matriz alimentar, um iogurte natural, para se obter um alimento com funcionalidade acrescida. Foram formulados iogurtes com 0,9 g e 1,8 g de extrato seco por litro de iogurte. A atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP foi de 0,43 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ e 2,47 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ para os iogurtes com menor e maior concentração de extrato, respetivamente. Foi realizada uma análise sensorial, por teste hedónico e um painel de 50 provadores, através da qual se percebeu que quanto maior a percentagem de incorporação de extrato maior a rejeição por parte do provador. Foram identificadas propriedades benéficas no extrato de *E.selaginoides*, no entanto, as características sensoriais indesejadas do mesmo, evidenciam a necessidade de procura de métodos de extração mais seletivos ou de encapsulamento do extrato previamente à incorporação em alimentos.

Palavras-chave: Macroalga; Extração; Atividade Anti-inflamatória; Atividade Antioxidante; Alimento Funcional

Abstract

The incorporation of macroalgae in food requires its study for a better application in the food industry. Extracts with ethyl acetate from the macroalgae *Ericaria selaginoides* were studied. Having as variables the type of grinding/homogenization and the extraction time and as answers, the yield and the analysis of the fatty acid methyl esters (FAME), the method with double homogenization in a homogenizer was selected, whose yield was 7.8 % m/m. The analysis of the selected extract was carried out in which the total phenols content was 84.18 mg GAE/g of extract dry matter, the antioxidant activity, measured by the ferric reduction antioxidant power (FRAP) method, was 3211.68 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ dry matter and by the method of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was 379.01 $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ dry matter. Anti-inflammatory activity was high, with 79% inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). With the exception of the anti-inflammatory activity, the remaining analyses showed higher values in the extract compared to those verified in the biomass. The extract obtained and characterized was incorporated into a food matrix, a natural yogurt, to obtain a food with increased functionality. Yogurts were formulated with 0.9 g and 1.8 g of dry extract per liter of yogurt. The antioxidant activity evaluated by the FRAP method was 0.43 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ and 2.47 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ for yogurts with lower and higher extract concentrations, respectively. A sensory analysis was carried out by hedonic test and a panel of 50 tasters, through which was clear that the higher the percentage of extract incorporated, the greater the rejection by the taster. Beneficial properties were identified in the extract of *E.selaginoides*, however, the undesirable sensory characteristics of the extract, highlight the need to search for more selective extraction methods or encapsulation of the extract prior to incorporation in foods.

Keywords: Macroalgae; Extraction; Anti-inflammatory activity; Antioxidant activity; Functional food

Índice

1	Introdução e objetivos	1
2	Enquadramento Teórico	2
2.1	Macroalgas	2
2.1.1	Composição	3
2.1.1.1	Lípidos	3
2.1.1.2	Pigmentos.....	5
2.1.1.3	Proteínas e enzimas	6
2.1.1.4	Polissacáridos	7
2.1.1.5	Vitaminas e minerais	8
2.1.1.6	Compostos Fenólicos.....	9
2.1.2	Atividade Biológica	11
2.1.2.1	Atividade Antioxidante.....	11
2.1.2.2	Atividade Anti-inflamatória.....	12
2.2	Macroalga <i>Ericaria selaginoides</i> como ingrediente funcional	13
2.3	Alimentos Funcionais	15
3	Desenvolvimento Experimental	17
3.1	Delineamento Experimental	17
3.2	Amostragem de <i>Ericaria selaginoides</i>	18
3.3	Seleção do método de extração da componente bioativa de <i>E.selaginoides</i>	18
3.3.1.1	Análise dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) por catálise ácida... 20	
3.3.2	Caraterização química da biomassa e dos extratos	21
3.3.2.1	Teor de Fenóis Totais	22
3.3.3	Caracterização da atividade Biológica.....	23
3.3.3.1	Atividade antioxidante	23
3.3.3.2	Atividade Anti-Inflamatória.....	26
3.3.4	Análise Estatística.....	28
3.3.5	Resultados e discussão.....	29
3.3.5.1	Rendimento de extração	29
3.3.5.2	FAME	30
3.3.5.3	Teor de fenóis totais.....	32
3.3.5.4	Atividade Antioxidante.....	33
3.3.5.5	Atividade Anti-inflamatória.....	35
3.4	Desenvolvimento de um logurte Funcional	36
3.4.1	Ensaio prévios	36

3.4.2	Preparação do iogurte funcional.....	37
3.4.3	Controlo analítico	37
3.4.3.1	Análise Sensorial.....	37
3.4.3.2	Caracterização da atividade Biológica do iogurte	40
3.4.4	Resultados e Discussão	41
3.4.4.1	Análise sensorial.....	41
3.4.4.2	Caracterização da Atividade Biológica do iogurte.....	43
4	Conclusões e Perspetivas Futuras	44
5	Bibliografia	46
6	Anexos.....	52

Figura 1- Estrutura química dos florotaninos: Floroglucinol, Eckol e Dieckol. Adaptado de Gupta & Abu-Ghannam, (2011)	10
Figura 2- Macroalga <i>Ericaria selaginoides</i> de uma poça de maré no concelho de Cascais. Joana Pedro, agosto 2020.	14
Figura 3- Esquema do desenvolvimento experimental de extração, caracterização e utilização do extrato da macroalga <i>E.selaginoides</i> para incorporação em iogurte natural.....	17
Figura 4- (A)- Amostra de biomassa de <i>E.selaginoides</i> após recolha e lavagem com água doce. (B)- Amostra de macroalga <i>E.selaginoides</i> após moagem no moinho de facas Grindomix GM 200 (Retsch, Alemanha) Jéssica Abreu, 2021.....	18
Figura 5- A- Balão em forma de pera com fase líquida extraída após centrifugação e antes da evaporação B- Balão em forma de pera com extrato seco evaporado.....	20
Figura 6- Esquema ilustrativo da redução do complexo Fe III/TPTZ (Incolor) para FeII /TPTZ (Azul intenso) na presença de substâncias antioxidantes Adaptado de Prior <i>et al.</i> (2005).....	23
Figura 7- (A)Soluções padrão de sulfato de ferro; (B) e soluções do extrato de <i>E.selaginoides</i> , imediatamente antes da leitura das absorvâncias. Jéssica Abreu, 2021	24
Figura 8- Tubo com extrato da <i>E.selaginoides</i> que possuía coloração, incolor após ABTS. Jéssica Abreu, 2021.....	26
Figura 9- Placa no leitor de placas Biorad, modelo 680 para leitura da absorvância. Jéssica Abreu, 2021.....	28
Figura 10- Rendimento (%) de extração da macroalga <i>E.selaginoides</i> com acetato de etilo (M1- Agitador orbital M2- Homogeneizador (extração única) M3- Homogeneizador (extração dupla) M4 – Ultrassons (extração única) M5 - Ultrassons (extração dupla)). As diferentes letras minúsculas correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) entre métodos usados.	29
Figura 11- Extrato da macroalga <i>Ericaria selaginoides</i> dissolvido em etanol.....	36
Figura 12- Iogurtes formulados: C- Iogurte Natural sem extrato; I1- Iogurte com menor concentração de extrato; I2- Iogurte com maior concentração de extrato	37
Figura 13- Percentagem de provadores em função da escolaridade: Licenciatura; Mestrado e Doutoramento.....	38
Figura 14- Iogurtes C, I1 e I2 ordenados para a prova de análise sensorial em função da percentagem crescente de extrato incorporado da esquerda para a direita.....	40
Figura 15 – Resposta média dos provadores (n=50) para o Iogurte controlo (C), o Iogurte com 0,9g de extrato (I1) e Iogurte com 1,8g extrato (I2) (9-Gosto extremamente; 8-Gosto muito; 7-Gosto moderadamente; 6-Gosto ligeiramente; 5-Não gosto nem desgosto; 4-Desgosto ligeiramente; 3-Desgosto moderadamente; 2- Desgosto muito e 1- Desgosto extremamente)41	
Figura 16- Intenção de compra dos Iogurtes sem e com extrato da macroalga <i>E.selaginoides</i> (N=50) Legenda: 5-Certamente compraria; 4-Provavelmente compraria; 3-Talvez comprasse/talvez não comprasse 2-Provavelmente não compraria; 1-Certamente não compraria	42
Figura 17- Curva de calibração do ácido gálico para quantificação do teor total de fenóis.....	52

Figura 18- Curva de calibração do sulfato de ferro para quantificação da atividade antioxidante pelo método FRAP.....	52
Figura 19- Curva de calibração de trolox para quantificação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	53
Figura 20 – Ficha de prova da análise sensorial de iogurtes.....	55

Tabela 1- Volume de DMSO (μl) a adicionar ao resíduo seco de extrato (mg) para obter concentração de [10mg/mL]	26
Tabela 2- Perfil relativo de ácidos gordos (%) do extrato de <i>E.selaginoides</i> para cada um dos métodos de extração. Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) no perfil relativo de ácidos gordos (%) da macroalga <i>E.selaginoides</i> entre métodos usados....	31
Tabela 3- Teor fenóis totais (mg GAE/g) por matéria seca de biomassa e do extrato de acetato de etilo da macroalga <i>E.selaginoides</i> . Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas em cada linha correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) entre o tipo de matéria usada.....	32
Tabela 4- Atividade antioxidante da matéria seca da Biomassa e matéria seca do Extrato de acetato de etilo de <i>E.selaginoides</i> quantificado pelos métodos FRAP($\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}$ /g matéria seca) e ABTS ($\mu\text{mol Eq Trolox/g ms}$). Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas em cada linha correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) entre o tipo de matéria usada.....	34
Tabela 5 - Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da biomassa e do extrato do extrato de acetato de etilo expressa em percentagem (%) de inibição de COX-2). Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas em cada linha correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) entre o tipo de matéria usada (Biomassa e Extrato)	35
Tabela 6 - Atividade antioxidante avaliada no matéria seca dos iogurtes c- controlo; I1- e I2 quantificado pelo método FRAP ($\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}$ /g matéria seca). Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas em cada linha correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre cada iogurte.....	43
Tabela 7 - Perfil relativo de ácidos gordos (%) do extrato de <i>E.selaginoides</i> para cada um dos métodos de extração. Os valores são apresentados como média das amostras.	54

Lista de Abreviaturas

AA ácido araquidónico

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

ACh neurotransmissor acetilcolina

AChE acetilcolinesterase

AF alimentos funcionais

LA ácido linoleico

ALA ácido α linolénico

BuChE butirilcolinesterase

COX-2 cicloxigenase-2

DHA ácido docosahexaenóico

DMSO dimetilsulfóxido

ELISA ensaio imunoenzimático

EPA ácido eicosapentaenóico

EqAA equivalente de ácido ascórbico

Eq Fe²⁺ equivalente de Fe²⁺

Eq Trolox equivalente de Trolox

FAME análise cromatográfica dos ésteres metílicos dos ácidos gordos

IgG imunoglobulinas G

LP lípidos totais

LPS lipopolissacarídeos

TYRO tirosinase

ROS espécies reativas de oxigénio

MS matéria seca

NOS oxido nítrico sintases

PG Prostaglandina

PGF₂ α Prostaglandina F₂ α

PUFA Ácidos gordos polinsaturados

SFA Ácidos gordos saturados

TNF- α fator de necrose tumoral alfa

TNF- β fator de necrose tumoral beta

TPTZ 2,4,6-tripiridil-s-triazina

UV radiação ultravioleta

1 Introdução e objetivos

Atualmente existe grande interesse na exploração de recursos marinhos como é o caso das macroalgas, estes organismos possuem, muitas vezes, compostos com propriedades de grande valor biológico. Por sua vez, os alimentos funcionais são cada vez mais procurados pelos consumidores. A adição dos compostos obtidos a partir de macroalgas, poderá garantir o aproveitamento deste recurso natural e o suprimento de necessidades dos consumidores cada vez mais preocupados com a saúde e bem-estar. A procura de soluções cómodas, versáteis e apelativas que permitam englobar os benefícios pretendidos para uma vida saudável são um dos atuais desafios da indústria alimentar.

A realização deste trabalho teve como objetivo selecionar o melhor método de extração da macroalga *Ericaria selaginoides* e conhecer a atividade biológica da mesma, de forma a posteriormente desenvolver um alimento funcional através da incorporação do extrato desta macroalga.

2 Enquadramento Teórico

2.1 Macroalgas

As algas são organismos fotossintéticos que podem existir na forma de organismos unicelulares microscópicos (microalgas) ou multicelulares de diversos tamanhos (macroalgas) (Ibañez & Cifuentes, 2013).

As macroalgas são organismos multicelulares, macroscópicos, eucariotas e autotróficos (Leandro *et al.*, 2020). Estes organismos, como produtores primários que são, estão na base da cadeia alimentar marinha, garantindo a subsistência de comunidades de animais bentónicos (Klinc *et al.*, 2013). Assumem também um papel importante na regulação de oxigénio na biosfera e possivelmente no sequestro de carbono e posterior exportação para grandes profundidades no oceano, garantindo que o mesmo não é libertado durante vários anos (Abdul *et al.*, 2016; Krause-Jensen & Duarte, 2016).

Com base na cor que apresentam as macroalgas marinhas podem ser classificadas em três grandes grupos taxonómicos: algas verdes, algas vermelhas e algas castanhas. As algas verdes pertencem ao filo *Chlorophyta* e possuem pigmentos nas suas células como a clorofila a e b, xantofilas e carotenoides. A cor das algas vermelhas deve-se ao pigmento de ficoeritrina, possuem também clorofila a e d nas suas células e pertencem ao filo *Rhodophyta*. Já as algas castanhas devem a sua cor à presença de carotenoides, nomeadamente a fucoxantina, possuem também clorofila a e c. Pertencem ao filo *Ochrophyta* e à classe *Phaeophyceae* (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Leandro *et al.*, 2020).

O interesse pelas algas é justificado pela presença de várias moléculas com potenciais benefícios para a saúde. As condições ambientais a que as macroalgas estão sujeitas sofrem constante mudança, como é o caso das variações de temperatura e salinidade das águas, a poluição e a radiação ultravioleta. Graças a estas condições as algas evoluíram de forma a estarem adaptadas às mesmas, o que espoleou a necessidade de produzirem diversos metabolitos secundários (Leandro *et al.*, 2020). O metabolismo primário diz respeito à síntese e decomposição de compostos como proteínas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, essenciais ao crescimento dos organismos (Dewick, 2002). Para o seu eficaz crescimento e reprodução, as macroalgas produzem também diversas proteínas e aminoácidos, ácidos gordos e grande variedade de polissacáridos (Leandro *et al.*, 2020). Já os metabolitos secundários não são geralmente essenciais, resultam da adaptação ou defesa dos organismos ao ambiente que os

rodeia e às condições onde se desenvolvem (Dewick, 2002). É o caso das vitaminas, compostos fenólicos e esteróis (Leandro *et al.*, 2020).

Para grande parte das espécies de macroalgas, o ciclo rápido de crescimento e a possibilidade de controlo de produção de determinados compostos bioativos, em função da manipulação das condições de cultivo, são alguns dos aspetos que permitem ter estes organismos em forte consideração como alternativa à síntese química dos compostos pretendidos (Plaza *et al.*, 2008).

2.1.1 Composição

Como referido anteriormente as algas marinhas são consideradas importantes reservatórios de compostos bioativos com potencial benéfico para a saúde humana uma vez que demonstram possuir atividades de relevo como a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. Possuem também compostos com propriedades neuroprotetoras e como tal, com grande potencial para desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos com benefícios para o bom funcionamento do nosso organismo (Custódio *et al.*, 2016).

2.1.1.1 Lípidos

Os lípidos totais (LP) representam 1 a 6% da matéria seca das macroalgas marinhas (Fleurence & Levine, 2016). O teor de lípidos presentes varia em função da espécie da macroalga bem como das condições ambientais em que a mesma se desenvolve, como a temperatura, a salinidade, a estação do ano, entre outros fatores (Miyashita *et al.*, 2013). Os lípidos podem ser classificados em dois grupos: polares e neutros. Os lípidos polares incluem os fosfolípidos e os glicolípidos, enquanto os lípidos neutros incluem os acilgliceróis (tri-, di- e monoacilgliceróis) e os ácidos gordos livres (D'Alessandro e Filho, 2016). A classe dos fosfolípidos e dos glicolípidos constitui cerca de 1 a 5 % da massa das células das macroalgas. Na maioria destas algas os glicoglicerolípidos representam mais de metade do conteúdo de lípidos totais (Miyashita *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2015).

Glicolípidos e Fosfolípidos

Os glicolípidos são lípidos polares ligados a resíduos de hidratos de carbono. Estes garantem a energia necessária a processos como a fotossíntese. Desempenham também um papel importante no reconhecimento celular, uma vez que estão associados às membranas das células (Miyashita *et al.*, 2013). Apesar de presentes em menor proporção, os fosfolípidos são

também de grande importância nos mecanismos de sinalização molecular nas macroalgas. Os fosfolípidos são constituídos por ácidos gordos e um grupo fosfato ligado a um glicerol. (Miyashita *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2020).

PUFA

As macroalgas possuem grande variedade de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) com atividades biológicas igualmente diversas (Shanura Fernando *et al.*, 2016).

Os ácidos gordos polinsaturados são muito importantes para o metabolismo humano. Além de serem um dos principais constituintes dos fosfolípidos das membranas celulares desempenham também um papel relevante na biossíntese de moléculas semelhantes a hormonas, os eicosanóides, como as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos. (Pereira *et al.*, 2012)

Os ácidos gordos de cadeia longa são, na sua maioria, sintetizados pelos vertebrados, no entanto, o ácido α -linolénico (ALA, 18:3 n-3) e o ácido linoleico (LA, 18:2 n-6) são exceção. Estes são precursores para a biossíntese de outros PUFA n-3 e n-6 e devem estar presentes na alimentação, são ácidos essenciais. No organismo humano o ALA pode ser convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) e em ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3). Segundo as recomendações da agência europeia da segurança alimentar o consumo de EPA + DHA deve ser de pelo menos 250 mg por dia (EFSA, 2010) quer através da alimentação ou da suplementação direta (Pereira *et al.*, 2012).

O rácio n-6:n-3 deve ser inferior a 10 para evitar doenças cardiovasculares, inflamatórias e neurológicas. O equilíbrio no consumo destes ácidos gordos na alimentação promove a saúde. Os ácidos gordos n-3 demonstram atividade anti-inflamatória e antioxidante, promovem também o bom funcionamento do sistema nervoso, uma vez que são um dos componentes principais das células cerebrais. Por outro lado, a maioria dos ácidos gordos n-6 tendem a promover inflamação e crescimento de tumores (Van Ginneken *et al.*, 2011).

Uma vez que são usadas as mesmas enzimas para a síntese de ácidos gordos de cadeia longa n-3 e n-6 a produção em maior quantidade de um implica, geralmente, a diminuição da síntese do outro (Pereira *et al.*, 2012) . Os PUFAS n-3 podem ser obtidos através do consumo de peixe, enquanto os PUFAS n-6 são maioritariamente consumidos pela ingestão de óleos vegetais (Van Ginneken *et al.*, 2011).

Atualmente as principais fontes de ALA e LA consumidas são o peixe e os óleos vegetais (Pereira *et al.*, 2012). Contudo, é nas algas marinhas e no fitoplâncton que encontramos a fonte

primária destes PUFA. Com o decréscimo das populações de peixe é urgente explorar alternativas para o consumo de PUFA, como por exemplo as algas marinhas. Estas, apesar de geralmente apresentarem um teor lipídico baixo, podem ser uma alternativa viável para a obtenção de PUFA n-3 e n-6. (Pereira *et al.*, 2012; Van Ginneken *et al.*, 2011)

Esteróis

Os esteróis são derivados de triterpenóides formados por 6 unidades de isoprenos (Fernando *et al.*, 2016). Estes compostos presentes nas macroalgas marinhas variam consoante a espécie das mesmas. No caso das algas castanhas estão presentes o colesterol, o brassicasterol e em maior proporção o fucosterol. O colesterol afeta a fluidez da membrana celular, sendo essencial para o bom funcionamento celular. Está também envolvido na sinalização celular e funciona como precursor para determinadas proteínas e hormonas (Holdt & Kraan, 2011). É também de grande interesse o uso do fucosterol extraído das macroalgas uma vez que este apresenta atividades biológicas relevantes como atividade antioxidante, antidiabética, hepatoprotetora, antifúngica e ainda contribui para a redução do colesterol no plasma (Abdul *et al.*, 2016).

2.1.1.2 Pigmentos

Os pigmentos presentes nas algas incluem as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas. Além da sua comercialização para efeitos de coloração os pigmentos de macroalgas começam a ganhar interesse pelo potencial que demonstram a nível de benefícios para a saúde (Cardoso *et al.*, 2014).

As clorofilas são pigmentos lipossolúveis que podem ser encontrados nas algas, plantas superiores e cianobactérias que realizam a fotossíntese. Os carotenoides estão também presentes nas algas, em plantas superiores e em bactérias fotossintéticas. Para além de absorverem energia luminosa, estes pigmentos funcionam como antioxidantes, uma vez que inativam espécies reativas de oxigénio formadas pela exposição à luz e ao ar (Holdt & Kraan, 2011)

Alguns carotenoides, como os β -carotenos, estão presentes em todas as algas outros são característicos de determinadas algas. É o caso da zeaxantina característica de algas vermelhas

e a fucoxantina predominante em algas castanhas (Holdt & Kraan, 2011). A fucoxantina é vulnerável à degradação por agentes externos como altas temperaturas e pressão, luz e a exposição a oxigênio. A estabilidade da fucoxantina é comprometida em função das condições de processamento e posterior armazenamento e pode ser melhorada na presença de ingredientes orgânicos como os polifenóis. Por norma os valores de fucoxantina presente nas algas aumentam do inverno para a primavera e decrescem durante o verão. Existem evidências de que a fucoxantina apresenta propriedades benéficas para a saúde. Os seus benefícios advêm da capacidade antidiabética, anti-inflamatória, antioxidante e do efeito protetor que podem ter para os ossos, cérebro, pele e olhos (Cardoso *et al.*, 2014).

As ficobiliproteínas são pigmentos solúveis em água que se encontram no citoplasma ou no estroma dos cloroplastos. São complexos formados pela ligação covalente entre ficobilinas e proteínas (Cardoso *et al.*, 2014). Algumas das propriedades biológicas de relevo destes pigmentos incluem a atividade antioxidante e anti-inflamatória a capacidade antiviral e antitumoral (Holdt & Kraan, 2011).

2.1.1.3 Proteínas e enzimas

A composição em proteína e aminoácidos das macroalgas varia consoante o grupo de algas. A percentagem de proteína e aminoácidos é superior nas algas vermelhas, seguida das algas verdes e em menor percentagem nas algas castanhas, cerca de 3-15% da matéria seca nestas últimas. É de salientar a alga castanha *Undaria pinnatifida* (Wakame) em que o conteúdo proteico é elevado para uma alga castanha (11-24% da matéria seca) (Fleurence & Levine, 2016) Em algumas algas castanhas estão presentes em elevadas quantidades aminoácidos de cadeia lateral com carga negativa, como é o caso do ácido aspártico e o ácido glutâmico. Atualmente é de interesse comercial o uso do ácido glutâmico sob a forma de sais de sódio (E621) para aplicação como aditivo alimentar (Cardoso *et al.*, 2014).

A percentagem de proteína também varia consoante a estação do ano, em consequência das condições em que a alga se desenvolve. Geralmente o conteúdo em proteína nas macroalgas é superior no inverno (Cardoso *et al.*, 2014). Na maioria das macroalgas estão presentes os aminoácidos essenciais que o organismo não consegue produzir. Alguns destes estão presentes em quantidades semelhantes às encontradas nas leguminosas, é o caso da isoleucina e a treonina. A histidina também está presente em quantidades semelhantes às encontradas nas proteínas do ovo (Fleurence, 1999).

Na fração de aminoácidos livres geralmente estão presentes a alanina e aminoácidos não-proteinogénicos, como o ácido aminobutírico, a taurina, a ornitina, a citrulina e a hidroxiprolina. A diferente proporção destes aminoácidos tem influência no sabor das algas comestíveis, é o caso da espécie *Porphyra tenera* (*nori*) que apresenta um sabor distinto conferido pela alanina, o ácido glutâmico e a glicina (McHugh, 2003).

As proteínas das macroalgas castanhas são descritas como fonte de treonina, valina, leucina, lisina, glicina e alanina. Nestas algas a biodisponibilidade das proteínas é por vezes limitada pelo elevado conteúdo de fenóis, o que possivelmente não sucede nas algas verdes e vermelhas uma vez que possuem níveis de fenóis mais baixos e maior conteúdo proteico (Holdt & Kraan, 2011; Mabeau & Fleurence, 1993).

As lectinas são proteínas com afinidade para se ligarem a hidratos de carbono (glicoproteínas). É devido à ligação entre proteínas e hidratos de carbono que as lectinas estão envolvidas em diversos processos biológicos, como interação entre hospedeiro e o agente patogénico, comunicação célula a célula e indução à apoptose. Atualmente existe interesse na purificação destas proteínas para uso na indústria farmacêutica (Holdt & Kraan, 2011; Hori *et al.*, 2000). Estas glicoproteínas contribuem para o aumento da aglutinação das células do sangue (eritrócitos), intervêm também na deteção de alterações da síntese de glicanos relacionadas com doenças provocadas por agentes infecciosos como vírus, bactérias, fungos e parasitas (Holdt & Kraan, 2011).

2.1.1.4 Polissacáridos

Os polissacáridos são polímeros de açúcares simples, os monossacáridos, unidos por ligações glicosídicas. Podem ser usados como estabilizadores, emulsionantes e espessantes, entre outras utilizações para aplicação comercial (Holdt & Kraan, 2011). Os polissacáridos são classificados em dois grupos distintos de acordo com a sua função biológica: Polissacáridos de estrutura e de armazenamento de energia (Stadnik & Freitas, 2014). No seu conjunto, e em determinadas espécies, os polissacáridos representam até 76% da matéria seca de algumas macroalgas (Holdt & Kraan, 2011).

Os polissacáridos das paredes celulares conferem rigidez ao talo nas macroalgas e são essencialmente compostos por celulose, hemicelulose e polissacáridos neutros. Quer os polissacáridos de estrutura, quer os de armazenamento estão presentes em diferentes concentrações em função das espécies da alga (Holdt & Kraan, 2011).

As algas verdes contêm polissacáridos constituídos por galactanos e xilanas sulfatados. Nas algas castanhas predomina o ácido algínico castanho, o fucoídano e a laminarina (β -1,3 glucano). Nas algas vermelhas existe agar, carragenanas, xilanas, galactano sulfatado hidrossolúvel, bem como porfirano (Holdt & Kraan, 2011).

Os alginatos são os principais polissacáridos nas algas castanhas. Estes são um dos colóides alimentares mais importantes com diversas aplicações, além de aplicados na indústria alimentar servem também a indústria farmacêutica e cosmética. Na indústria alimentar são utilizados como espessantes, emulsionantes e géis. Estes polissacáridos estão também associados a efeitos positivos no trato gastrointestinal, na regulação do apetite e possuem ainda propriedades com efeito antidiabético. São também considerados bons pré-bióticos, uma vez que promovem o crescimento de bactérias benéficas ao organismo (Afonso *et al.*, 2019).

O monómero fucose está presente nos fucanos sulfatados, polissacáridos que podem ser encontrados em algas verdes, vermelhas e, em maior quantidade, nas algas castanhas (Pomin & Mourao, 2008). Têm sido demonstradas atividades biológicas de interesse para os fucanos, a atividade antioxidante, anticoagulante, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras com resultados pré-clínicos promissores (Wang *et al.*, 2019) A ingestão de fucoídanos presentes em algas castanhas poderá ter efeito protetivo através da inibição da replicação viral e ao estimular o sistema imunitário (Holdt & Kraan, 2011).

As fibras alimentares são polissacáridos não digeríveis presentes nas macroalgas e podem ser classificadas em dois tipos. As fibras insolúveis, como é o caso da celulose, dos mananos e xilanos, e as fibras solúveis em água como o agar, os ácidos algínicos, a laminarina e o porfirano. A fibra solúvel permite prolongar a sensação de saciedade, a redução dos níveis de colesterol e glicose no sangue (Fleurence & Levine, 2016; Holdt & Kraan, 2011). Por sua vez, a fibra insolúvel facilita o movimento do material no sistema digestivo facilitando a defecação, de forma a que ambas contribuam de forma positiva para o processo de digestivo (Holdt & Kraan, 2011). Além dos benefícios mencionados as fibras alimentares podem agregar-se a compostos tóxicos e permitir que estes sejam eliminados do organismo (Mišurcová *et al.*, 2010).

2.1.1.5 Vitaminas e minerais

Nas algas marinhas estão presentes vitaminas de dois tipos, hidrossolúveis e lipossolúveis. São uma excelente fonte de vitaminas A, B1, B12, C, D e E, riboflavina, niacina, ácido pantoténico e ácido fólico. Comparativamente às algas verdes e vermelhas, algumas algas castanhas

possuem níveis mais elevados de vitamina E. As macroalgas castanhas possuem também alfa, beta e gama tocoferóis (Fleurence & Levine, 2016).

A importância das vitaminas advém das diversas funções bioquímicas que possuem. Funcionam como hormonas, antioxidantes e como mediadores na sinalização celular e reguladores no crescimento e diferenciação de células e tecidos (Holdt & Kraan, 2011).

A vitamina B12, geralmente presente em maiores quantidades em produtos de origem animal, é importante para a mitigação dos efeitos adversos do envelhecimento e da anemia. Esta pode ser também encontrada nas macroalgas marinhas, que surgem como possível complemento para o aporte de vitamina B12 na ausência de produtos de origem animal (Fleurence & Levine, 2016).

No que respeita a minerais, uns são necessários enquanto outros são mesmo tóxicos para a saúde do ser humano. Nas macroalgas a composição mineral varia, não só com o Filo das mesmas, como também com as variações ambientais, geográficas e fisiológicas (Holdt & Kraan, 2011). Devido às suas características fisionómicas as algas castanhas possuem grande capacidade para acumulação de minerais. É de destacar a acumulação de minerais como o cálcio, magnésio e o fósforo. É também de salientar os elevados níveis de iodo presentes nestas macroalgas, bem como o baixo rácio Na/K (Sódio/Potássio) que contribui para a boa manutenção da saúde cardiovascular (Afonso *et al.*, 2019).

2.1.1.6 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos químicos constituídos por um ou mais grupos hidroxilo (-OH) ligados a um grupo hidrocarboneto aromático que fazem parte de um variado grupo de metabolitos secundários. A sua importância é comum a plantas terrestres e algas, uma vez que garantem mecanismos de defesa contra infeções e agressões ambientais (Holdt & Kraan, 2011; Santos *et al.*, 2019).

Os ácidos fenólicos são compostos fenólicos mais simples em que apenas um anel aromático está ligado a um ou dois grupos hidroxilo, dividindo-se este grupo em ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos. Os polifenóis são caracterizados pela presença de várias unidades de fenóis. As propriedades químicas, físicas e biológicas destes compostos são determinadas pelo número de unidades fenólicas e as suas características (Wang *et al.*, 2017).

Estes compostos são considerados como uma das moléculas mais potentes no que respeita à sua capacidade de prevenir distúrbios mediados pelo stress oxidativo, exemplo de

distúrbios neurodegenerativos e do cancro. A capacidade que possuem de doar hidrogénios ou eletrões e de estabilizar o radical fenoxil resultante garante, aos compostos fenólicos, uma forte atividade de eliminar radicais livres (Custódio *et al.*, 2016).

Os florotaninos são um grupo heterógeno de compostos fenólicos com potencial para fornecer uma grande variedade de atividades biológicas. Estes estão presentes em diversas algas e em concentrações mais elevadas nas algas castanhas (Holdt & Kraan, 2011). Estes compostos fenólicos podem ser subdivididos em outros grupos em função das ligações que apresentam, nomeadamente em floroglucinol, eckol e dieckol (figura 1) (Wang *et al.*, 2017).

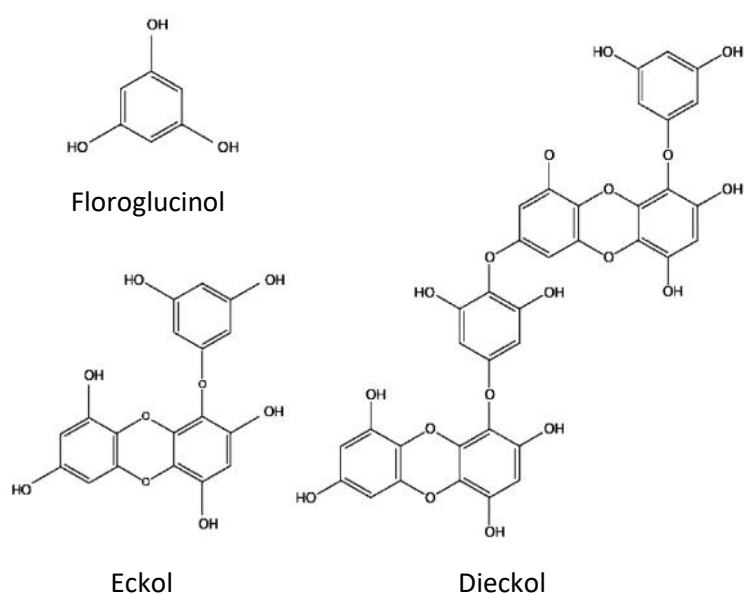


Figura 1- Estrutura química dos florotaninos: Floroglucinol, Eckol e Dieckol. Adaptado de Gupta & Abu-Ghannam, (2011)

As propriedades dos compostos fenólicos incluem atividade antioxidante, antidiabética e proteção contra a radiação. Alguns destes compostos atuam também na prevenção de determinados problemas, como doenças cardiovasculares, artrite e doenças autoimunes. Os efeitos benéficos destes compostos chamam à atenção para as possíveis aplicações que podem ter, como ingredientes nutracêuticos, na indústria alimentar e na indústria farmacêutica.

2.1.2 Atividade Biológica

A atividade biológica é, no fundo, o resultado ou efeito que se observa a nível celular, dos tecidos ou do organismo em si, provocado pela exposição a determinados compostos que podem ser encontrados em determinadas matrizes como é o caso dos extratos de macroalgas (Duarte, 2016).

2.1.2.1 Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são substâncias com capacidade para proteger o organismo uma vez que neutralizam o efeito dos radicais livres. Estes são sintetizados como resposta ao stress provocado pela exposição solar a que as macroalgas podem estar sujeitas (Francisco *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 1999). As moléculas antioxidantes neutralizam as espécies reativas de oxigénio (ROS), como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), o óxido nítrico (NO), o anião superóxido (O₂⁻) e o radical hidroxilo (OH·). Os ROS são produzidos durante o metabolismo celular, são altamente reativos e como tal, tendem a dar início a reações em cadeia que podem danificar as proteínas, os lípidos e o ADN (Balboa *et al.*, 2013). O stress oxidativo surge quando a capacidade de um sistema biológico para desintoxicar rapidamente os intermediários reativos ou para reparar os danos provocados não é suficiente em relação aos ROS produzidos (Duarte, 2016). À semelhança de outras propriedades das macroalgas também a quantidade e diversidade de antioxidantes presente é influenciada por fatores externos ambientais como, a salinidade, a exposição à luz e o local onde se encontram estes organismos (Francisco *et al.*, 2020; Holdt & Kraan, 2011).

Diversos estudos apontam os extratos de macroalgas como potencial fonte de antioxidantes para uso em alimentos funcionais ou na indústria farmacêutica (Holdt & Kraan, 2011). As macroalgas castanhas e as vermelhas são consideradas boas fontes de antioxidantes, na sua composição apresentam pigmentos, como a fucoxantina, e polifenóis, como os florotaninos, com atividade antioxidante (Chakraborty *et al.*, 2013). A presença de clorofilas e os carotenoides também poderá contribuir para a atividade antioxidante dos extratos de macroalgas (Francisco *et al.*, 2020).

Os polifenóis presentes nas macroalgas são compostos complexos e alguns apresentam poder antioxidante até 100 vezes mais forte quando em comparação aos biofenóis produzidos pelas plantas terrestres (Francisco *et al.*, 2020). Os florotaninos são um grupo de compostos fenólicos geralmente presentes em elevadas quantidades nas macroalgas castanhas, além de que não estão presentes em plantas terrestres. Além de atividade antioxidante estes compostos demonstram ação protetiva contra doenças vasculares, atividade anticancerígena, anti-

inflamatória e antimicrobiana contra determinadas bactérias geralmente presentes em algumas matrizes alimentares (Francisco *et al.*, 2020).

2.1.2.2 Atividade Anti-inflamatória

A inflamação é um processo que se manifesta como um fenômeno microcirculatório e que ocorre em resposta a diversos estímulos, desde infecções exógenas, a traumas físicos e celulares, bem como por ação de outros agentes irritantes. O processo tem início com a ativação de macrófagos, induzida pela exposição ao interferão- γ , ao fator de necrose tumoral-alfa (TNF α), ou o lipopolissacarídeo microbiano (LPS) (Xie *et al.*, 1993). O processo inflamatório é mediado por compostos como as óxido nítrico sintases (NOS), as cicloxigenases (COX), as prostaglandinas, citocinas como as interleucinas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e beta (TNF- β) e quimiocinas. A maioria dos mediadores são produzidas em células ativadas, como macrófagos, fibroblastos e monócitos (Fernando *et al.*, 2018).

Apesar de crucial para o organismo, a inflamação crônica pode resultar em danos a nível genético e de imunorregulação que por sua vez provocam a danificação dos tecidos com o aparecimento de diversas doenças como diabetes, obesidade, cancro e doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Fernando *et al.*, 2018; Jaswir & Monsur, 2011).

Devido aos efeitos mencionados é perceptível a importância dos compostos anti-inflamatórios no tratamento das doenças inflamatórias. Contudo os medicamentos anti-inflamatórios também apresentam efeitos secundários indesejados. Como tal, existe urgência na procura de terapêuticas anti-inflamatórias com propriedades pretendidas e diminuição de efeitos indesejados. A procura de novos compostos nas macroalgas pode ser a resposta para colmatar a falta de terapêuticas que satisfaçam as necessidades do organismo no combate a estas patologias. É precisamente nas macroalgas que existe interesse pela presença de compostos bioativos que podem vir a garantir efeitos protetores contra doenças inflamatórias e como tal podem ser uma alternativa viável a medicamentos sintéticos (Fernando *et al.*, 2016).

Atualmente existem estudos promissores em torno dos compostos presentes nas macroalgas com atividade anti-inflamatória. Os compostos fenólicos, por exemplo, com foco nos florotaninos característicos de macroalgas castanhas, demonstram capacidade de inibição de citocinas pro-inflamatórias como a óxido nítrico sintase (NOS), a cicloxigenase-2 (COX-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 β e interleucina-6 (Fernando *et al.*, 2016).

Como já referidos anteriormente outros compostos com alegada capacidade anti-inflamatória incluem os polissacáridos sulfatados, os ácidos gordos, os esteróis e pigmentos como os carotenoides e a fucoxantina.

2.2 Macroalga *Ericaria selaginoides* como ingrediente funcional

A presença de compostos com propriedades benéficas nas algas castanhas faz destas boas candidatas para a aplicação em produtos alimentares. A maioria destes compostos são considerados seguros e estão presentes em grandes quantidades (Mansur *et al.*, 2020). Estas macroalgas, pertencentes à classe *Phaeophyceae*, possuem elevados níveis de polissacáridos, vitaminas, minerais e ácidos gordos polinsaturados. Estão presentes também metabolitos secundários com grande relevância como compostos fenólicos, terpenóides e alcaloides (Vizetto-Duarte *et al.*, 2016).

Os polifenóis, como é o caso do floroglucinol, apresentam atividade antiproliferativa em tumores presentes no cólon e mama (Lopes-Costa *et al.*, 2017; Murphy *et al.*, 2014). Também os flavonóides extraídos com acetato de etilo de algumas algas castanhas mostram-se eficazes na redução da viabilidade celular de algumas linhas de células cancerígenas. Os polissacáridos, como a laminarina e o fucoídano, são agentes ativos contra o cancro da mama, da próstata, do cólon e dos pulmões (Mansur *et al.*, 2020)

No que respeita as algas castanhas existem diversas espécies que pertencem ao género *Cystoseira*, entre elas a *Cystoseira tamariscifolia* (= *E. selaginoides*). As macroalgas do género *Cystoseira* estão distribuídas no Oceano Atlântico e no mar Mediterrâneo (Boundir *et al.*, 2022; Vizetto-Duarte *et al.*, 2016) e demonstram em estudos fitoquímicos abundância de compostos como esteróis e florotaninos. Alguns destes possuem atividades biológicas desejadas para aplicação na indústria alimentar e farmacêutica, o caso da atividade antitumoral, antioxidante e antimicrobiana (Vizetto-Duarte *et al.*, 2016).

De entre as algas pertencentes ao Filo *Phaeophyceae*, as macroalgas do género *Cystoseira* apresentam um dos níveis mais altos de compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes (Vizetto-Duarte *et al.*, 2016). A alga castanha *Ericaria selaginoides* (Linnaeus) (figura 2) (Novoa & Guiry, 2020) anteriormente designada *Cystoseira tamariscifolia* (Papenfuss, 1950) e *Carpodesmia tamariscifolia* (Orellana *et al.*, 2019), é uma macroalga marinha que pertence ao filo *Ochrophyta*, classe *Phaeophyceae*, ordem *Fucales*, família *Sargassaceae*. Está distribuída geograficamente pela costa do Atlântico Nordeste (NE), desde a Mauritânia até aos Países

Baixos, Irlanda e os arquipélagos dos Açores, Canárias e Cabo Verde, bem como pela costa do Mar Mediterrâneo (Boundir *et al.*, 2022).



Figura 2- Macroalga *Ericaria selaginoides* de uma poça de maré no concelho de Cascais. Joana Pedro, agosto 2020.

De entre várias espécies de algas estudadas por Custódio *et al.* (2016) pertencentes às Ochrophytas, Rhodophytas e Chlorophytas, as que possuem maior atividade antioxidante são as Ochrophytas onde se insere o género *Cystoseira*. O maior potencial antioxidante, por exemplo, verificado por Custódio *et al.*, (2016) diz respeito ao extrato metanólico de *Cystoseira tamariscifolia*.

No que respeita à capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi demonstrado por Custódio *et al.* (2016) que entre várias espécies de algas estudadas, aquelas pertencentes ao Filo Ochrophyta possuíam maior capacidade de inibição, sendo que para o extrato de metanol da alga *C.tamariscifolia* a percentagem de inibição foi de 70,1% com concentração de 1mg/mL. A análise foi também feita em relação à inibição das enzimas butirilcolinesterase (BuChE) e tirosinase (TYRO), permitindo perceber que os extratos de *C.tamariscifolia* também se demonstram eficazes na inibição destas enzimas. A hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) por AChE e BChE provoca a diminuição dos níveis de acetilcolina, o que se verifica ser preocupante pela associação que existe entre baixos valores deste neurotransmissor e o aparecimento de patologias como a doença de Alzheimer e de Parkinson (Custódio *et al.*, 2016). O que reforça a importância da existência de alternativas com atividade para inibição destes compostos, como se verifica nos extratos de *C.tamariscifolia*. Os extratos também se mostraram eficazes no aumento da viabilidade de células expostas ao stress oxidativo provocado por peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Custódio *et al.*, 2016).

Os extratos de *C.tamariscifolia* são também ricos em ácidos hidroxicinâmicos, estes são compostos fenólicos que possuem grande capacidade para prevenir distúrbios provocados por stress oxidativo, como é caso das doenças neurodegenerativas e do cancro (Custódio *et al.*, 2016; Soobrattee *et al.*, 2005). Extratos de diferentes espécies de macroalgas pertencentes ao

género *Cystoseira* demonstram atividade citotóxica contra células tumorais (Mansur *et al.*, 2020).

A disponibilidade e distribuição geográfica da macroalga *E.selaginoides* bem como as propriedades acima mencionadas fazem desta uma boa candidata para estudo e posterior formulação de alimentos funcionais, com a adição de propriedades desejadas a partir dos compostos da macroalga.

2.3 Alimentos Funcionais

Os alimentos funcionais (AF), além das propriedades nutricionais base, têm propriedades benéficas para uma, ou mais funções do organismo, contribuindo para a redução de sintomas de determinadas patologias e conseqüentemente para uma vida mais saudável (Plaza *et al.*, 2008). A extração de compostos das algas marinhas permite introduzir os benefícios que os compostos das mesmas aportam na alimentação em geral e mais concretamente no sul da Europa, onde o consumo de algas comestíveis ainda é residual. O conjunto de vantagens que incluem, a elevada biodisponibilidade dos compostos naturais extraídos, os benefícios no combate a determinadas patologias e a possibilidade de incorporação em diversas matrizes, fazem das algas marinhas uma matéria prima de elevado interesse para a indústria alimentar (Lordan *et al.*, 2011; Rodrigues, 2016)

O termo nutracêutico pode ser referente a nutrientes isolados, alimentos e a suplementos alimentares com propriedades benéficas para a saúde, como prevenção ou auxílio no tratamento de algumas doenças (Russo *et al.*, 2016). Existe, atualmente, grande foco no uso de nutracêuticos derivados de recursos marinhos como é o caso das macroalgas (Duarte, 2016). A elaboração de alimentos funcionais tem por base a identificação das interações entre os alimentos ou ingrediente específico, como um nutracêutico, e as funções do organismo. Idealmente devem existir provas concretas destas interações e dos mecanismos associados às mesmas (Plaza *et al.*, 2008).

Existe, atualmente, grande variedade de laticínios utilizados como produtos funcionais. A sua natureza emulsificada permite incorporação de ingredientes nutracêuticos mais hidrofílicos, bem como dos mais lipofílicos com maior facilidade. Entre os laticínios é de destacar o iogurte, cujos benefícios fisiológicos intrínsecos, os atributos organolépticos positivos e a popularidade crescente faz destes uma boa matriz para a formulação de alimentos funcionais. É um alimento bem conhecido e consumido pela população, o que faz deste um bom

candidato à incorporação de compostos com reconhecidas atividades biológicas, como aqueles que se podem extrair a partir das macroalgas (Rodrigues, 2016).

3 Desenvolvimento Experimental

3.1 Delineamento Experimental

O trabalho experimental foi desenvolvido em três etapas. Inicialmente realizou-se uma seleção do método mais indicado para extração da componente bioativa da macroalga *E.selaginoides*, tendo como resposta o rendimento de extração e o perfil de ácidos gordos (FAME). Após a escolha do método procedeu-se à caracterização química do extrato resultante, desse mesmo método, e da biomassa. Numa terceira fase estudou-se a potencialidade de desenvolver um iogurte funcional com adição do extrato da macroalga em estudo. Nesta etapa fez-se a análise sensorial e caracterização dos iogurtes formulados.

As etapas do desenvolvimento do trabalho encontram-se descritas na figura 3.



Figura 3- Esquema do desenvolvimento experimental de extração, caracterização e utilização do extrato da macroalga *E.selaginoides* para incorporação em iogurte natural

3.2 Amostragem de *Ericaria selaginoides*

As amostras de *Ericaria selaginoides* utilizadas na análise da biomassa e para obtenção dos extratos foram recolhidas no mês de Agosto de 2020 em poças de maré no concelho de Cascais nas imediações do Farol do Cabo Raso (38°42'38.7"N 9°29'09.7"W). Procedeu-se à lavagem com água do mar aquando da colheita e posteriormente à lavagem com água potável nas instalações do IPMA de forma a remover o sal e qualquer tipo de detritos. As algas foram então armazenadas na arca a -80°C para congelação e após várias horas foram retiradas rapidamente para se iniciar o processo de liofilização (Thermo Fisher Scientific, EUA). As algas liofilizadas foram moídas no moinho de facas Grindomix GM 200 (Retsch, Alemanha) e armazenadas a -80°C para posterior análise (figura 4).



Figura 4- (A)-Amostra de biomassa de *E.selaginoides* após recolha e lavagem com água doce. (B)- Amostra de macroalga *E.selaginoides* após moagem no moinho de facas Grindomix GM 200 (Retsch, Alemanha) Jéssica Abreu, 2021

3.3 Seleção do método de extração da componente bioativa de *E.selaginoides*

Para a seleção do método de extração efetuou-se um estudo prévio comparativo entre 5 métodos de extração. Foram tomados como resposta o rendimento de extração e os resultados da análise cromatográfica dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) presentes nas amostras.

O solvente de extração usado foi o acetato de etilo. As variáveis estudadas foram o tempo e o tipo de fragmentação da biomassa recorrendo a diferentes instrumentos:

- Agitador orbital durante 18h (método **M1**)
- Homogeneizador durante 3 min (método **M2**)
- Homogeneizador durante 3 min + 3 min (método **M3**)

- Ultrassons durante 10 min (método **M4**)
- Ultrassons durante 10 min + 10 min (método **M5**)

As extrações foram efetuadas em tubos de centrífuga onde foram utilizadas tomas de 0,5 g da macroalga *E. selainoides* liofilizada para tubos de centrífuga, aos quais adicionou-se 3 mL de acetato de etilo p.a. Foram efetuados duplicados para cada método.

Homogeneização com agitador orbital (**M1**)

Esta metodologia é, geralmente, assumida como controlo e referência no laboratório do IPMA. Os tubos previamente preparados foram colocados no agitador orbital a 200 rpm durante cerca de 18h (“overnight”). Em seguida os tubos foram centrifugados 10 minutos a 4°C a 5000 x g. Recolheu-se então a fase líquida para balão em forma de pera, como na figura 5(A), previamente tarado, e evaporou-se o acetato de etilo em evaporador rotativo (Heidolph, Alemanha) a 40°C e 120rpm. Os resíduos de solvente foram removidos sob corrente de azoto num evaporador de azoto Reacti-Therm III nº 18940 (Pierce, EUA) ficando após a evaporação com o aspeto que se observa na figura 5(B). O balão foi então pesado de forma a se obter o peso do resíduo seco e a massa obtida foi reconstituída em 3 mL de acetato de etilo.

Homogeneização com polytron – Extração Única (**M2**) e Dupla (**M3**)

As amostras previamente preparadas foram homogeneizadas no polytron (Kinematica, Suíça) a 30000 rpm durante 3 minutos, em seguida as amostras foram centrifugadas (5000 x g, a 4 °C durante 10 minutos), efetuando-se o restante procedimento igual ao descrito anteriormente até se obter as amostras reconstituídas (M2). O procedimento aplicado à extração dupla é idêntico, sendo que neste caso após a primeira homogeneização e posterior centrifugação foi recolhida a primeira fase líquida. Adicionou-se então 3 mL de acetato de etilo ao resíduo seco e procedeu-se a nova homogeneização. Após a junção de ambas as fases líquidas as amostras seguiram para evaporação e subsequente procedimento já descrito anteriormente (M3).

Homogeneização com Ultra-Sons – Extração Única (**M4**) e Dupla (**M5**)

O método de homogeneização das amostras foi o sistema de ultrassons Sonorex Super Modelo 10 P (Bandelin Electric, Alemanha) onde as amostras foram colocadas com recurso a um suporte de plástico durante 10 minutos sob potência máxima de 40 kHz, após este passo o procedimento foi idêntico ao referido acima (M4). Para a extração dupla após a primeira

homogeneização no ultrassons a amostra foi centrifugada (5000 x g, a 4 °C durante 10 minutos) e a primeira fase líquida recolhida para um balão em forma de pera. Ao resíduo seco que permanece no tubo adicionou-se novamente 3 mL de acetato de etilo e foi efetuada nova homogeneização no aparelho de ultrassons nas mesmas condições. Após a centrifugação a segunda fase líquida é recolhida e adicionada à primeira. O procedimento teve continuidade com a evaporação e os seguintes passos descritos anteriormente até se obter a amostra reconstituída em acetato de etilo (M5).

Foi determinado o rendimento de extração para todos os métodos. Todas as amostras, após reconstituídas em acetato de etilo, foram armazenadas a -80°C para ulterior caracterização química.

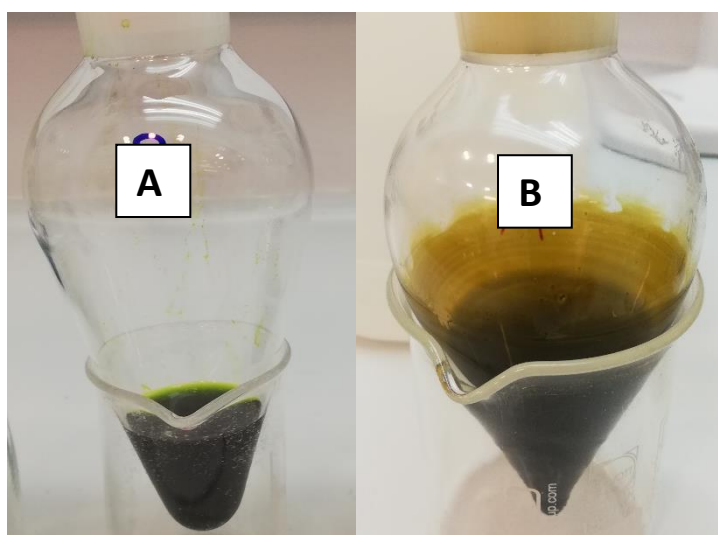


Figura 5- A- Balão em forma de pera com fase líquida extraída após centrifugação e antes da evaporação B- Balão em forma de pera com extrato seco evaporado

3.3.1.1 Análise dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) por catálise ácida

Ainda para avaliação do método com as melhores características para a extração da macroalga *E.selaginoides*, realizou-se a análise dos FAME. As amostras do extrato de acetato de etilo foram colocadas em tubos de vidro de 15 mL com tampa de rosca aos quais se adicionou 5 mL de mistura de cloreto de acetilo:metanol (1:19). Em seguida, agitou-se os tubos no vórtex durante 30 segundos e colocou-se os mesmos no banho a 80°C durante 1 hora. Após arrefecimento durante 30 minutos a temperatura ambiente adicionou-se a cada tubo 1 mL de água ultra-pura (obtida pelo sistema Milli-Q Plus Millipore) e 2mL de n-heptano p.a. e agitou-se a mistura durante 30 segundos no vórtex. Após centrifugação, durante 3 minutos a 3000 x g e 4°C recolheu-se a fase orgânica (fase superior) para um *vidro* de 2 mL através de uma coluna com

algodão e sulfato de sódio anidro para filtração. Em seguida colocou-se a amostra no cromatógrafo de fase gasosa Scion 456-GC (West Lothian, UK) equipado com um detetor de ionização de chama e um amostrador automático com um “split” injector (1:100), ambos a 250 °C, com volume de injeção de 2 µL.

Mediante os resultados obtidos no cromatógrafo é necessário realizar concentração das amostras quando a atenuação (AT) é baixa. Evaporou-se as amostras com baixo valor de atenuação nos *vials* sob corrente de azoto até *secura* completa. Adicionou-se às mesmas 200 µL de n-heptano e colocou-se na arca a - 80°C para posterior repetição do procedimento anteriormente descrito.

3.3.2 Caraterização química da biomassa e dos extratos

Após avaliação dos diversos métodos de extração anteriormente descritos, foi selecionado, como mencionado anteriormente o método de extração dupla com homogeneização por ação mecânica.

Para a preparação dos extratos, pesou-se 0,5 g de alga liofilizada para tubos de centrifuga de 18 mL, em quadruplicado, aos quais foram adicionados 3 mL de acetato de etilo p.a. Homogeneizou-se a solução a 30,000 rpm durante 3 minutos no Polytron (Kinematica, Suíça). Em seguida, centrifugou-se os tubos durante 10 minutos a 5,000 × g a 4 °C. A fase líquida foi então recolhida para um balão em forma de pera de 50 mL, previamente pesado. Ao resíduo seco resultante da centrifugação adicionou-se novamente 3 mL de acetato de etilo e procedeu-se a nova homogeneização e centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. A segunda fase líquida recolhida resultante foi adicionada à primeira fase recolhida no balão de pera previamente pesado. Procedeu-se à evaporação do acetato de etilo em evaporador rotativo sob vácuo a 40°C e 120 rpm com pressão de 120 mbar. Colocou-se os balões sob corrente de azoto para remoção do resíduo de solvente e após evaporação total pesou-se os balões em forma de pera de forma a quantificar a massa extraída. Após pesagem os extratos foram reconstituídos com acetato de etilo de forma a se obter uma concentração de 50 mg/mL e armazenados em *vials* na arca a -80°C.

Para a obtenção de extratos para realizar a avaliação do teor de fenóis totais e da atividade antioxidante preparou-se alíquotas de 500 µL de extrato de acetato de etilo em *vials* e concentração de 50mg/mL. O acetato de etilo presente nos *vials* foi evaporado até *secura* sob

corrente de azoto. Posteriormente, dissolveu-se o extrato seco em etanol absoluto de forma a se obter uma concentração de 50 mg/mL, verificando a ocorrência de dissolução completa pela avaliação da turbidez.

Para os extratos elaborados diretamente a partir da biomassa foram pesadas 0,5 g de *E. selaginoides* para um tubo, ao qual adicionou-se 10 ml de etanol absoluto. Para a homogeneização utilizou-se um Polytron (Kinematica, Suíça) a 30000 rpm durante 1 min e posteriormente a agitação num agitador orbital (IKA, Alemanha) a 300 rpm, durante cerca de 18h após as quais seguiu-se a centrifugação a $5000 \times g$ a 4 °C durante 10 min. Os sobrenadantes foram recolhidos para balões volumétricos de 10ml, com objetivo de obter uma concentração final de 50 mg/ml.

3.3.2.1 Teor de Fenóis Totais

De forma a quantificar os compostos fenólicos foi utilizada uma adaptação do método de Singleton e Rossi (1965) com uso do reagente Folin-Ciocalteu. O reagente é amarelo e na presença de compostos fenólicos dá-se a sua redução, com alteração da coloração para azul.

Foi preparada uma solução de carbonato de sódio a 2%. O reagente Folin-Ciocalteu foi preparado no momento, na proporção 1:1 com água ultra-pura ao abrigo da luz. Inicialmente as amostras não permitiram a leitura da absorvância uma vez que encontravam-se muito concentradas, com coloração escura que resultou em valores de absorvância muito elevados. Por esta razão procedeu-se à diluição na proporção de 1:10 com água ultra-pura. Pipetou-se 10 µL a partir dos extratos em etanol (A,B,C e D) em duplicado para cada tubo, aos quais adicionou-se ainda 690 µL de água ultra-pura e 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu (1:1). Os tubos foram, posteriormente, colocados a incubar durante 5 minutos, no escuro e a temperatura ambiente. Após incubação adicionou-se 750 µL de solução de carbonato de sódio 2% (m/v). Os tubos seguem para nova incubação a temperatura ambiente no escuro durante 1 hora e 30 minutos, após a qual se realiza a leitura da absorvância a 757 nm no espectrofotómetro de luz UV/visível Helios Alpha model (Unicam, Reino Unido). Os ensaios foram realizados em duplicado para cada um dos extratos (A, B, C e D) num total de 8 leituras. Foram realizados brancos como controlo com etanol absoluto. Para os extratos a partir da biomassa aplicaram-se diluições de 1:4, sendo o restante procedimento semelhante. Para estes, os ensaios foram realizados em triplicado e como controlo realizou-se brancos em triplicado com etanol absoluto.

Para a realização da curva de calibração com o ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA) (figura 17, anexo) foi preparada uma solução-mãe de ácido gálico na concentração de 1mg/1mL. A partir da solução mãe fez-se sucessivas soluções diluídas nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 mg/mL. Para cada concentração foi retirado um determinado volume da solução-mãe, este foi adicionado a um balão volumétrico onde adicionou-se água ultra-pura até prefazer o volume necessário para obter cada uma das diluições pretendidas. O ácido gálico é utilizado como padrão e o conteúdo fenólico é expresso em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/g ms).

3.3.3 Caracterização da atividade Biológica

3.3.3.1 Atividade antioxidante

3.3.3.1.1 FRAP

O método FRAP (poder antioxidante de redução férrica) utilizado foi adaptado da técnica descrita por Benzie e Strain (1996). Este método, avalia o poder antioxidante de redução do íon férrico. É baseado em reações redox, as espécies oxidantes reagem com os antioxidantes em vez do substrato, assim, os antioxidantes reduzem os oxidantes. Neste método a presença de antioxidantes dadores de elétrões na solução permite a redução do complexo férrico (Fe III) – 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) à sua forma ferrosa (Fe II/TPTZ), ocorre alteração de coloração que passa de incolor a azul intenso (figura 6). A cor azul permite a leitura da absorvância a 593 nm (Benzie & Strain, 1996; Martins *et al.*, 2013). O Fe III é usado em excesso para que a formação de Fe II esteja limitada apenas pelo poder antioxidante da amostra.

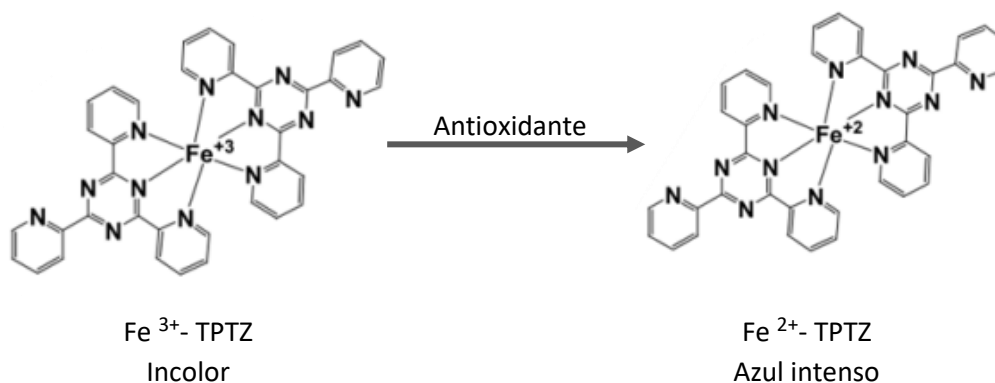


Figura 6- Esquema ilustrativo da redução do complexo Fe III/TPTZ (Incolor) para FeII /TPTZ (Azul intenso) na presença de substâncias antioxidantes Adaptado de Prior *et al.* (2005).

O reagente de FRAP (10:1:1) foi preparado para um volume final de 300 mL, composto por 250 mL de solução tampão de acetato de sódio (300 mM, pH 3,6), 25 mL de solução de TPTZ

(10 mM) previamente dissolvido em ácido clorídrico (40 mM) e 25 mL de solução de Cloreto de Ferro (FeCl_3) (20 mM).

O tampão de acetato de sódio (300 mM, pH 3,6), utilizado anteriormente, foi preparado com a dissolução de 4,9 g de acetato de sódio anidro em 200 ml de água ultra-pura e 8,5 ml de ácido acético glacial em 500 ml de água ultra-pura. Foram transferidos, respetivamente, 18,5 ml e 231,5 ml de cada solução, para um balão volumétrico, perfazendo o volume de 250 ml com água Milli-Q. Acertou-se o pH para 3,6 (Mettler Toledo, EUA), através da adição de soluções de NaOH 1M ou 0,1M e HCl 1M ou 0,1M, consoante a necessidade verificada.

Os extratos previamente preparados como descrito na secção (3.2.1) foram diluídos numa proporção 1:100. A cada tubo foram adicionados 100 μL de extrato diluído e 3 mL de reagente FRAP. Os ensaios foram realizados em duplicado para cada um dos extratos A,B,C e D. Para controlo utilizou-se os brancos com etanol puro em substituição do extrato. Após agitação no vórtex colocou-se os tubos em incubação num banho a 37°C (Büchi, Suíça) durante 30 minutos no escuro. Posteriormente registou-se as absorvâncias a 595 nm das amostras no espectrofotómetro de luz UV/visível (Unicam, Reino Unido).

Utilizou-se uma reta de calibração com sulfato de ferro (figura 18, anexo), com leitura das absorvâncias das soluções padrão de concentrações de 2; 1,5; 1; 0,5; 0,25 mmol/L realizadas a partir de uma solução mãe de sulfato de ferro de 1g/L. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /g ms.

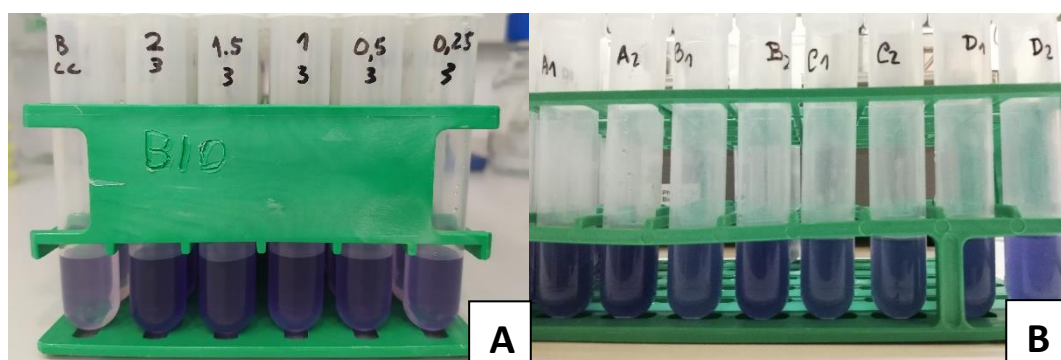


Figura 7- (A) Soluções padrão de sulfato de ferro; (B) e soluções do extrato de *E. selaginoides*, imediatamente antes da leitura das absorvâncias. Jéssica Abreu, 2021

3.3.3.1.2 ABTS

O método do ácido 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) permite avaliar a atividade antioxidante mediante a capacidade de neutralização do radical, ABTS $^{*+}$ pela

amostra. A alteração na coloração após a neutralização pode ser avaliada pela leitura da absorvância. Neste método é adicionado persulfato de potássio ao ABTS para que ocorra a formação de um cromóforo azul-esverdeado ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). Este, quando em contacto com antioxidantes, é reduzido a ABTS o que resulta numa solução incolor (Figura 8). A redução que ocorre depende da concentração dos antioxidantes na amostra, da própria atividade antioxidante e do tempo de reação. O uso deste método permite obter informação sobre a atividade antioxidante de carotenoides e fenóis. (Re *et al.*, 1999). A capacidade de neutralização do radical ABTS^{•+} das amostras é expressa como percentagem de inibição e pode ser calculada através na presente equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_0 - A_{\text{amostra}}}{A_0} \times 100$$

Onde: A_0 é a absorvância do branco e A_{amostra} a absorvância da amostra.

De forma preparar a solução de ABTS^{•+} a 7 mM dissolveu-se 10 mg de ABTS em 2,6 mL de solução de persulfato de Potássio a 2,45 mM. A solução foi depois armazenada por um período de 16 horas no escuro e a temperatura ambiente.

Para diluir a solução de ABTS^{•+} a 7 mM preparou-se o tampão de Fosfato de Sódio (PBS) a 5mM com pH de 7,4. Adicionou-se 353,8 mg de fosfato dissódico a 50 mL de água Milli-Q e 138,5 mg de fosfato monossódico a 20 mL de água Milli-Q. Para elaboração do tampão PBS retirou-se das soluções, previamente preparadas, 38,7 mL de fosfato dissódico e 11,3 de fosfato monossódico para um balão volumétrico de 500mL e perpez-se o volume com água Milli-Q. A solução de ABTS^{•+} a 7 mM, após incubação de 16h, foi diluída com tampão de fosfato de sódio 5 mM de forma a se obter um absorvância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm, utilizou-se um volume aproximado de 238 mL do respetivo tampão.

Para realização do procedimento foi necessário diluir os extratos de *C.tamariscifolia*. Retirou-se do extrato previamente preparado 20 μ L e diluiu-se em 95 μ L de etanol. Após esta diluição e de forma a realizar a análise retirou-se 20 μ L para um tubo ao qual adicionou-se 2 mL da solução diluída de ABTS^{•+}. Após homogeneização no vórtex incubou-se os tubos durante 6 minutos num banho a 30°C (Büchi, Suíça), no escuro. Para os brancos usados como controlo utilizou-se água ou etanol absoluto.

Foi utilizada uma curva de calibração com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), que é um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Alam *et al.*, 2013; Re *et al.*, 1999). Para realização da curva de calibração realizou-se a leitura das absorvâncias de soluções padrão com as concentrações de 2000; 1000; 500; 250 e 100 $\mu\text{mol/L}$ elaboradas a partir de uma solução mãe de Trolox de 4000 $\mu\text{mol/L}$ (figura 19, anexo).

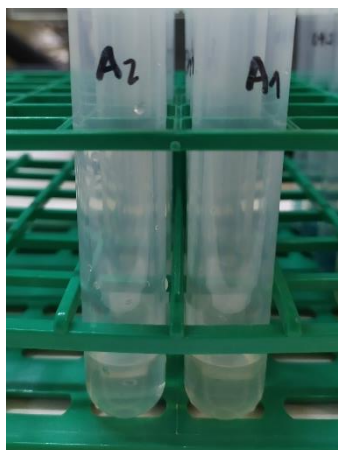


Figura 8- Tubo com extrato da *E.selaginoides* que possuía coloração, incolor após ABTS. Jéssica Abreu, 2021

3.3.3.2 Atividade Anti-Inflamatória

A atividade anti-inflamatória da *E. selaginoides* foi determinada em extratos de acetato de etilo. Os extratos previamente preparados, como descrito no ponto 3.3- Metodologia Homogeneizador – Extração Dupla, foram colocados em *vials* de peso conhecido e posteriormente secos sob corrente de azoto de forma a se obter o resíduo seco de cada extrato. Conforme a massa de resíduo seco, adicionou-se determinado volume de dimetilsulfóxido (DMSO) de forma a se obter uma solução de armazenamento com concentração de 10 mg/mL. A massa de resíduo seco presente em cada vial, bem como o volume de DMSO a adicionar estão descritos na tabela 1.

Tabela 1-Volume de DMSO (μl) a adicionar ao resíduo seco de extrato (mg) para obter concentração de [10mg/mL]

Vials	M resíduo seco de extrato (mg)	DMSO (μl) a adicionar para [10mg/mL]
A	5,4	540
B	2,6	260
C	3	300
D	5,3	530

Para o extrato a partir da biomassa pesou-se amostras em quadruplicado de 0,2 g da macroalga *E. selaginoides* liofilizada para tubos de ensaio com adição de 2 ml de etanol absoluto. Realizou-se homogeneização no Polytron (Kinematica, Suíça) a 30000 rpm durante 1 min, após a qual os tubos seguiram para banho a 80 °C durante 1 h. Após centrifugação a 3000 × g a 4 °C durante 20 min, foi recolhida a fase líquida para balões de pera previamente pesados. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo com a banho a 40 °C (Heidolph, Alemanha) e posteriormente sob corrente de azoto (Pierce, EUA). Para obter-se uma solução mãe com concentração final de 10 mg/ml o resíduo foi pesado e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), desta solução retirou-se 1 ml para balão volumétrico de 10 ml, onde o volume fez-se com DMSO para obtenção da solução filha de concentração final de 1 mg/ml. Os extratos foram armazenados em *vials* a -80 °C até posterior análise.

3.3.3.2.1 Método de inibição da cicloxigenase 2 (COX-2)

Através da quantificação da prostaglandina F2 α (PGF2 α), catalisada a partir do ácido araquidónico (AA), é possível determinar a inibição da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) e dessa forma avaliar a atividade anti-inflamatória. Para tal, é realizado um ensaio imunoenzimático (ELISA), este tem por base a competição por um antissoro, entre prostaglandinas (PG) e um conjugado PG - acetilcolinesterase (AChE), denominado PG tracer. A quantidade de PG tracer que se liga ao antissoro será inversamente proporcional à concentração de PG que será produzida e depende da capacidade anti-inflamatória na amostra em questão. As placas possuem 96 poços e estão revestidas com imunoglobulinas G (IgG) anti-coelho de rato. Os complexos às quais se irão ligar os complexos de antissoro com PG ou PG “tracer” vão ligar-se às IgG. Após lavagem da placa e para remoção dos reagentes que não estabeleceram ligações nos poços, adiciona-se o reagente de Ellman’s. Este possui o substrato necessário para que ocorra a reação catalisada pela AChE. É possível determinar a intensidade da coloração amarela do produto que resulta desta reação através da leitura da absorvância a 415 nm.

Uma vez que a intensidade da cor é proporcional à quantidade de PG tracer que estabeleceu ligações no poço (Cayman Chemical Company, 2018), quanto menos PG livre maior será a absorvância. Por sua vez quanto maior a absorvância, maior a inibição da COX-2 e maior a atividade anti-inflamatória da amostra que foi testada.

De forma a testar os extratos com concentração de 1 mg/mL adicionou-se 450 μ l de DMSO a 50 μ l da solução de armazenamento com concentração de 10 mg/mL em cada um dos

quatro vials (A, B, C e D). Utilizou-se um kit de inibição da COX (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) para avaliação da inibição da cicloxigenase (COX-2) de acordo com as recomendações do fabricante. O volume utilizado foi de 10 µl de cada um dos extratos da amostra ou de DMSO. A reação tem início com a adição de 10 µl de ácido araquidônico 10 mM a todos os tubos de reação que, após agitação no vortex, seguem para incubação em banho termostático durante 2 minutos a 37 °C. Adiciona-se 30 µl de cloreto estanhoso com a finalidade de parar a reação. Após 18 horas de incubação (a temperatura ambiente com agitação), lavagem, adição de reagente de Ellman e posterior incubação no escuro, com agitação (200 rpm), durante 90 minutos, os prostanóides produzidos foram quantificados indireta e espectrofotometricamente no leitor de microplacas Biorad, modelo 680 (figura 9), a 412 nm, via ELISA. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da COX-2.



Figura 9- Placa no leitor de placas Biorad, modelo 680 para leitura da absorvância. Jéssica Abreu, 2021

3.3.4 Análise Estatística

Para testar a normalidade e a homogeneidade de variância, foram aplicados o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Levene F, respetivamente. Os dados que corroboraram estas assunções foram analisados por uma distribuição *one-way* ANOVA utilizando um teste post-hoc Tukey HSD para comparar o rendimento de extração em função do método e um teste LSD para comparar os métodos em função da análise FAME. Para comparação das atividades antioxidantes, teor de fenóis totais e atividade anti-inflamatória também foi usada uma *one-way* ANOVA. Quando a normalidade e/ou homogeneidade da variância não foi verificada (como na análise do método FRAP dos iogurtes com adição de extrato), foi usado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (análise da variância) para análise dos dados. Seguido de um teste

não-paramétrico de comparações múltiplas (Zar, 1999). O nível de significância (α) foi 0,05 para todos os testes estatísticos. A análise de dados foi realizada utilizando o programa STATISTICA 7 (Stat-soft, Inc. USA, 2004).

3.3.5 Resultados e discussão

3.3.5.1 Rendimento de extração

Na figura 10 apresenta-se o rendimento de extração com acetato de etilo da macroalga *E.selaginoides* em função do método de extração utilizado. Os métodos onde se verificou um rendimento mais baixo foram o M4 e M5, ambos com recurso ao equipamento de ultrassons para agitação/fragmentação do material. O método que apresentou um valor mais baixo foi o M4, que diz respeito a uma única extração. O método onde o rendimento foi significativamente superior ($p<0.05$) diz respeito à extração dupla com recurso ao homogeneizador (M3). Através dos resultados e com o objetivo de selecionar o método onde o rendimento foi superior é possível escolher com diferença significativa ($p<0.05$) o método M3.

Os resultados obtidos permitiram excluir, de imediato, o método M4 com um rendimento inferior a 1% pelo que o respetivo extrato não prosseguiu para análise da percentagem dos ácidos gordos presentes.

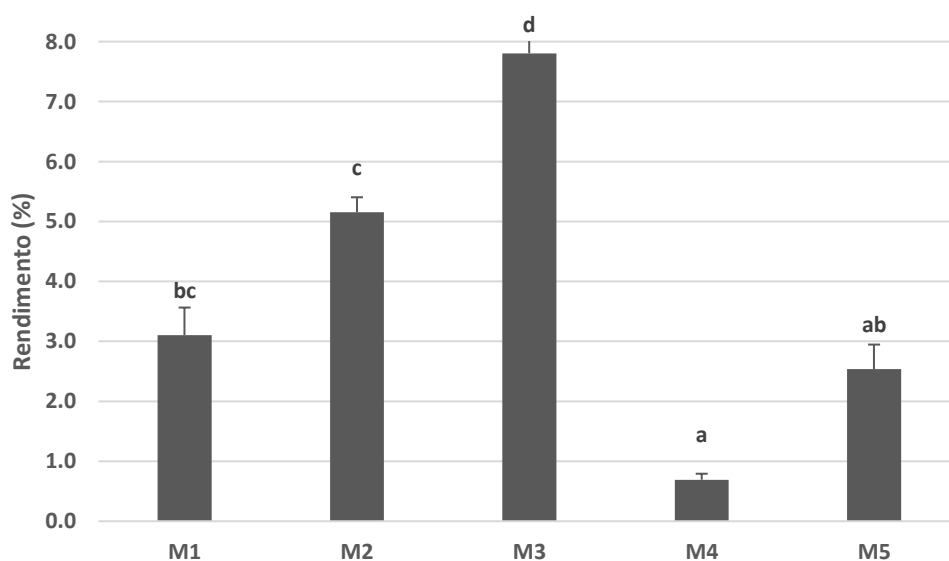


Figura 10- Rendimento (%) de extração da macroalga *E.selaginoides* com acetato de etilo (M1- Agitador orbital M2- Homogeneizador (extração única) M3- Homogeneizador (extração dupla) M4 – Ultrassons (extração única) M5 - Ultrassons (extração dupla)). As diferentes letras minúsculas correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p<0.05$) entre métodos usados.

Em relação à bibliografia é difícil a comparação de métodos, dadas as diferenças de metodologias e solventes usados. Para algas pertencentes ao género onde antes se incluía a macroalga *E.selaginoides*, o género *Cystoseira*, existe evidência de rendimentos de extração semelhantes aos obtidos neste estudo, enquanto outros são consideravelmente superiores. Num estudo feito por Ruberto *et al.* (2001) em que a extração foi realizada com CH₂Cl₂, o rendimento de extração para *Cystoseira amentacea* foi de 0,67%. *C.crinita* apresentou um rendimento de 0,87% e *C.legans* e *C.algeriensis* , 0,52% e 0,21% respetivamente. O rendimento superior no presente estudo poderá estar relacionado com o uso do acetato de etilo em substituição do diclorometano. Foram obtidos rendimentos de extração consideravelmente superiores por De La Fuente *et al.*, (2021), onde extratos etanólicos de *C. amentacea* tiveram um rendimento de 31%. Para a alga *C.tamariscifolia* foi mostrado por Moussa *et al.* (2020) que o rendimento apresenta grande variabilidade em função da polaridade do solvente. Os extratos que apresentaram maior rendimento foram realizados com diclorometano (1,18%), hexano (0,376%) e metano (0,324%).

Os rendimentos superiores de até 7,8 % para M3 e de no mínimo 0,7% para o método M4 continuam a ser superiores aqueles verificados por Ruberto *et al.* (2001) e por Moussa *et al.* (2020) o que poderá estar relacionado não só com os solventes usados mas também com a metodologia de extração. Por sua vez também parece ser possível obter um rendimento consideravelmente superior, como aquele reportado por De La Fuente *et al.* (2021).

Tendo em conta os resultados obtidos optou-se pela escolha do método M3, em que se recorreu ao Polytron para fragmentação da biomassa da macroalga e fez-se uma dupla extração. A escolha foi baseada no rendimento (7,8 %), significativamente superior em relação aos outros métodos. Escolha essa que também teve por base a simplicidade e rapidez de aplicação deste método que, possivelmente, será mais fácil de escalar quando comparado aos restantes.

3.3.5.2 FAME

Na tabela 2 é possível verificar a percentagem de alguns dos ácidos gordos analisados nos extratos obtidos pelos métodos M1, M2, M3 e M5. Não existem diferenças significativas na grande maioria dos grupos de ácidos gordos avaliados por catálise ácida. É exceção o somatório dos MUFA que engloba os ácidos gordos 16:1 ω₉; 16:1 ω₇; 18:1 ω₉; 18:1 ω₇; 18:1 ω₅ e ainda outros MUFA. O valor mais elevado para o somatório de MUFA's corresponde ao extrato obtido

pelo método M1, enquanto o valor mais baixo diz respeito ao extrato obtido através do método M5.

Tabela 2- Perfil relativo de ácidos gordos (%) do extrato de *E.selaginoides* para cada um dos métodos de extração. Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) no perfil relativo de ácidos gordos (%) da macroalga *E.selaginoides* entre métodos usados.

	M1	M2	M3	M5
Σ SFA	27,62 \pm 0,73 ^a	31,72 \pm 0,1 ^a	32,12 \pm 0,29 ^a	27,9 \pm 1,37 ^a
Σ MUFA	22,5 \pm 0,65 ^b	21,16 \pm 0,01 ^{ab}	21,61 \pm 0,01 ^{ab}	20,58 \pm 0,08 ^a
Σ PUFA	36,67 \pm 0,63 ^a	35 \pm 3,81 ^a	38,09 \pm 0,30 ^a	41,06 \pm 1,07 ^a
EPA+DHA	4,67 \pm 0,10 ^a	4,61 \pm 0,63 ^a	5,12 \pm 0,04 ^a	5,26 \pm 0,16 ^a
Razão $\omega 3/\omega 6$	0,52 \pm 0,00 ^a	0,52 \pm 0,05 ^a	0,46 \pm 0,00 ^a	0,50 \pm 0,00 ^a
Σ SFA+Mufa+Pufa	86,79 \pm 0,75 ^a	87,88 \pm 3,72 ^a	91,83 \pm 0,01 ^a	89,54 \pm 0,38 ^a

Com foco nos resultados obtidos para o método selecionado (M3), os valores referentes aos SFA (32,12 \pm 0,29 %) são idênticos aos verificados por Lorenzo *et al.* (2017) para três macroalgas castanhas, para as quais a percentagem de SFA mais baixa foi de 25.14 \pm 0.49 para *A. nodosum* e o valor mais alto, para a macroalga *F. vesiculosus*, de 29.26 \pm 0.34. A maior percentagem de MUFA das algas em estudo foi de 31.15 \pm 0.23 para *A. nodosum*. enquanto o valor mais alto em relação aos PUFA diz respeito à *F. vesiculosus* com 48.19 \pm 0.62 %. Para o método M3, do presente estudo, os valores são semelhantes aos mencionados na literatura, apesar de ligeiramente inferiores, sendo que os MUFA e PUFA foram de 21,61 \pm 0,01 e 38,09 \pm 0,30 %, respetivamente. Os valores obtidos para a análise FAME da *E.selaginoides* com extração pelo método 3 são semelhantes aqueles obtidos por Vizetto-Duarte *et al.* (2015) para a alga *C.tamariscifolia* (designação anterior para *E.selaginoides*), estudo onde reportou-se que os somatórios de SFA em percentagem foram de 39,22 \pm 0,13, de MUFA 16,44 \pm 0,09 e de PUFA 44,34 \pm 0,22.

Apesar de se obterem valores superiores no que respeita o somatório dos MUFA com recurso ao método M1 (22,5 %) este é o único dos parâmetros avaliados em que existiu

diferença significativa favorável ao método M1 face ao método M3 em que a percentagem do somatório dos MUFA's foi de 21,61 %.

Pelas razões discutidas o método M3 foi selecionado para prosseguir o estudo da atividade antioxidante e anti-inflamatória, avaliação do teor de fenóis totais e para a posterior incorporação no iogurte formulado.

Atentando aos resultados obtidos para a análise FAME do método selecionado M3, podemos verificar que o ácido gordo mais abundante (19,55%) foi o ácido araquidónico (C20:4n-6), o EPA representa 5,12% dos FAME e o DHA não foi detetado (tabela 7, anexo). Estes resultados foram semelhantes aos verificados num estudo onde, para a análise de diversas algas do género *Cystoseira*, os valores para EPA estiveram entre 2,21% e 10,12% e não se verificou a presença de DHA (Vizetto-Duarte *et al.*, 2015).

3.3.5.3 Teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais para a matéria seca de biomassa e de extrato da macroalga *E.selaginoides* está apresentado na tabela 3.

Tal como esperado observa-se diferença significativa entre os valores avaliados nos extratos a partir da biomassa e naqueles realizados a partir do extrato de acetato de etilo da macroalga. O teor de fenóis totais foi de 84,18 mg GAE/g de matéria seca de extrato, valor substancialmente superior aos 7,47 mg GAE/g de matéria seca da biomassa.

Tabela 3- Teor fenóis totais (mg GAE/g) por matéria seca de biomassa e do extrato de acetato de etilo da macroalga *E.selaginoides*. Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas em cada linha correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) entre o tipo de matéria usada.

<i>E.selaginoides</i>		
Teor de fenóis totais (mg GAE/g ms)	Biomassa	7,47 \pm 0,34 ^a
	Extrato	84,18 \pm 1,55 ^b

Até à data na bibliografia encontrada os métodos para quantificar os polifenóis totais são realizados em extratos diretamente a partir da biomassa, em que os resultados estão apresentados por matéria seca de biomassa. Fica, assim, dificultada a comparação direta com os valores de polifenóis totais por matéria seca de extrato.

Para um extrato de metanol da macroalga *C.tamariscifolia* há valores reportados de 105.0 ± 6.9 mg GAE/g ms (Custódio *et al.*, 2016). Também (Vizetto-Duarte *et al.*, 2016) verificou que entre algumas algas do género *Cystoseira*, a macroalga *C.tamariscifolia* foi a que apresentou valores mais elevados de polifenóis totais. Para os extratos desta alga com hexano, éter dietílico e acetato de etilo os valores de polifenóis totais foram superiores a 100mg GAE/g ms. A alga castanha *Treptacantha abies-marina* apresentou, num estudo realizado por C. Afonso *et al.*, (2020) um valor de polifenóis totais de $8,43 \pm 73$ mg GAE/g ms, aproximado aquele que obteve-se para no presente estudo para a biomassa. Já os valores para outra alga castanha, *C. compressa*, são superiores, e estão compreendidos entre 48.2 ± 0.5 a 83.4 ± 4.0 mg GAE/g ms, com a maior quantidade de polifenóis presentes referentes à alga colhida em Junho (Čagalj *et al.*, 2022). A análise feita por Vizetto-Duarte *et al.* (2016) a 3 macroalgas castanhas permitiu constatar que o valor mais elevado de polifenóis totais (± 1.92 mg GAE/g ms) foi referente à macroalga *C.tamariscifolia* com uso do solvente de acetato de etilo para extração.

A diferença entre valores encontrados na bibliografia e com os obtidos no presentes estudo pode, além do método e solventes usados, estar dependente de características ambientais. Valores elevados de compostos fenólicos estão associados a uma maior exposição à radiação ultravioleta (UV), o que depende de fatores como a localização, a estação e a própria localização da macroalga (Afonso *et al.*, 2020; Bischof *et al.*, 2006).

Em função dos benefícios dos polifenóis, o uso do extrato de *E.selaginoides* para a formulação de alimentos funcionais poderia garantir um bom aporte destes compostos com menos adição de extrato face à biomassa, uma vez que o extrato possui aproximadamente 11 vezes maior teor de polifenóis totais.

3.3.5.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada por meio de dois métodos, FRAP e ABTS. Os valores estão dispostos na tabela 4.

Em ambos os métodos, e tal como seria de esperar, existe diferença significativa entre os valores obtidos na matéria seca da biomassa e os valores obtidos para a matéria seca do extrato de acetato de etilo. Com o método FRAP o extrato de acetato de etilo possui $3211,68 \mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ de matéria seca, enquanto para a biomassa o valor é de $80,31 \mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$.

O mesmo se verificou no método ABTS, em que os valores obtidos são consideravelmente mais altos para o extrato ($379 \mu\text{mol Eq Trolox}/\text{g ms}$) quando em comparação à biomassa ($44,97 \mu\text{mol Eq Trolox}/\text{g ms}$).

Com os resultados obtidos pela aplicação dos métodos FRAP e ABTS, é possível verificar que a macroalga possui atividade antioxidante relevante e que esta é concentrada aquando da realização de extrato com acetato de etilo.

Tabela 4- Atividade antioxidante da matéria seca da Biomassa e matéria seca do Extrato de acetato de etilo de *E.selaginoides* quantificado pelos métodos FRAP($\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ matéria seca) e ABTS ($\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ ms). Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas em cada linha correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) entre o tipo de matéria usada.

<i>E.selaginoides</i>		
FRAP ($\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ ms)	Biomassa	$80,31 \pm 11,77^a$
	Extrato	$3211,68 \pm 340,52^b$
ABTS ($\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ ms)	Biomassa	$44,97 \pm 2,5^a$
	Extrato	$379,01 \pm 12,95^b$

A comparação dos valores obtidos com a demais bibliografia mostrou-se difícil devido às diferenças dos métodos e das unidades usadas, em particular para o método FRAP onde a maior parte da bibliografia apresenta os valores em $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ ms.

Quando em comparação aos valores obtidos por C. Afonso *et al.* (2020) em que pelo método FRAP o valor da atividade antioxidante foi de $113.1 \pm 8.2 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ms para a macroalga *Treptacantha abies-marina* o valor do presente estudo para a matéria seca da biomassa é ligeiramente inferior. Para a mesma alga também realizaram o método ABTS com valor de $43.5 \pm 1.2 \mu\text{mol Eq Trolox/g}$ ms, muito próximo ao valor obtido para a biomassa de *E.selaginoides* ($44,97 \pm 2,5 \mu\text{mol Eq Trolox/g}$ ms). Os valores referentes à matéria seca de extrato podem ser comparados com aqueles que foram obtidos para a avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS de três macroalgas castanhas por Agregán *et al.* (2017) de onde resultaram valores entre os 147.26 ± 0.70 e os $1046.79 \pm 18.38 \mu\text{mol Eq Trolox/g}$ ms. Neste intervalo insere-se o valor obtido para o extrato de *E.selaginoides*.

O uso do extrato ao invés da biomassa permite obter, por uma grama de matéria seca uma atividade antioxidante quase 40 vezes superior à da biomassa quando avaliada pelo método FRAP e quase 8 vezes superior avaliada pelo método ABTS. Estes resultados sugerem a possibilidade de incorporação de um extrato em quantidades muito inferiores aquelas que seriam necessárias com a biomassa para obter produtos funcionais com propriedades antioxidantes desejadas.

3.3.5.5 Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória avaliada está representada na tabela 5. A percentagem de inibição é consideravelmente alta e apesar de não se verificarem diferenças significativas, a percentagem de inibição da COX-2 é superior nos extratos etanólicos da biomassa em comparação aos extratos obtidos através do extrato de acetato de etilo. Para o extrato etanólico a partir da biomassa foi atingida quase 100% de inibição da COX-2 com o valor exato de $94,24 \pm 2,86\%$ de inibição. Enquanto para os extratos realizados a partir do extrato de acetato de etilo a percentagem ascende quase aos 80% com o valor de $79,12 \pm 5,03\%$ de inibição da COX-2.

Tabela 5 - Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da biomassa e do extrato do extrato de acetato de etilo expressa em percentagem (%) de inibição de COX-2). Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas em cada linha correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$) entre o tipo de matéria usada (Biomassa e Extrato)

<i>E.selaginoides</i>		
Atividade Anti-inflamatória (% inibição)	Biomassa	$94,24 \pm 2,86^a$
	Extrato	$79,12 \pm 5,03^a$

Verificou-se difícil a comparação dos resultados obtidos uma vez que não foi encontrada bibliografia em que se utiliza o mesmo método para avaliar a atividade anti-inflamatória em extrato realizado a partir de extrato prévio na macroalga estudada ou em outras espécies pertencentes às algas castanhas.

Contudo para a avaliação em extrato feito diretamente a partir da biomassa e na concentração de 1mg/ml, Campos *et al.*, (2019) obteve, para extratos etanólicos da macroalga castanha, *Halopteris scoparia* capacidades de inibição de COX-2 $79 \pm 8\%$. Este resultado é muito aproximado àquele que se obteve para o extrato de acetato de etilo, contudo é inferior ao valor que se obteve para a biomassa, em que a percentagem de inibição foi superior a 90%. Num extrato lipídico da macroalga *Fucus vesiculosus* em que Lopes *et al.*, (2020), para a avaliação da atividade anti-inflamatória, utilizou o método de inibição da cicloxigenase 2 (COX-2) o resultado foi de $34.6 \pm 7.1\%$ de inibição. Este valor é inferior aqueles obtidos no presente estudo. Apesar do uso de uma metodologia diferente do presente estudo por Yang *et al.*, (2010), este verificou, que um extrato de acetato de etilo da macroalga castanha *Petalonia binghamiae* apresentou capacidade de redução da expressão, induzida por lipopolissacarídeos de síntese, de óxido nítrico induzível e COX-2. Resposta esta, detetada a nível das proteínas por Western blotting e dependente da concentração.

Apesar de não existir diferença significativa, a percentagem de inibição mostrou-se superior nos extratos a partir da biomassa o que poderá sugerir que a extração prévia com acetato de etilo pode levar à perda de compostos com propriedades anti-inflamatórias.

3.4 Desenvolvimento de um iogurte Funcional

3.4.1 Ensaios prévios

Foram realizados ensaios prévios para testar a dissolução do extrato da macroalga no iogurte natural. Para elaboração de 1 L de iogurte utilizou-se um copo de iogurte natural de 125g e 1 L de leite meio gordo à temperatura ambiente. Procedeu-se à homogeneização de forma a garantir a mistura apropriada à fermentação (43°C).

Inicialmente a incorporação de extrato foi realizada sem a presença de nenhum solvente. As características do extrato impossibilitaram a homogeneização do mesmo na mistura. Este apresentou uma consistência viscosa e pegajosa, a alternativa passou por dissolver o extrato com etanol (figura 11), de forma a possibilitar a incorporação do mesmo nos iogurtes.



Figura 11- Extrato da macroalga *Ericaria selaginoides* dissolvido em etanol

3.4.2 Preparação do iogurte funcional

Foram preparados, no total, 3 L de iogurte natural nas proporções descritas no ponto 3.4.1., utilizou-se 1L para cada um dos 3 iogurtes formulados:

- C- iogurte de controlo, natural sem adição de extrato.
- I1- iogurte com menor concentração de extrato, com adição de 4 mL de extrato diluído em etanol na concentração de 225mg/mL, correspondendo a 0,9 g de extrato seco.
- I2- iogurte com maior concentração de extrato onde adicionou-se o dobro do extrato, correspondendo a 1,8 g de extrato seco, adicionado como anteriormente na sua forma diluída, 8 mL de extrato diluído em etanol.

O processo de fermentação ocorreu em copos de vidro, a uma temperatura de 43°C, em estufa durante cerca de 5 horas. Findo o tempo de fermentação os iogurtes foram colocados em refrigeração a 5±1 °C até posterior análise. Antes da homogeneização necessária para efetuar a análise sensorial os iogurtes C, I1 e I2 apresentavam aspeto diferente entre si como se verifica na figura 12.

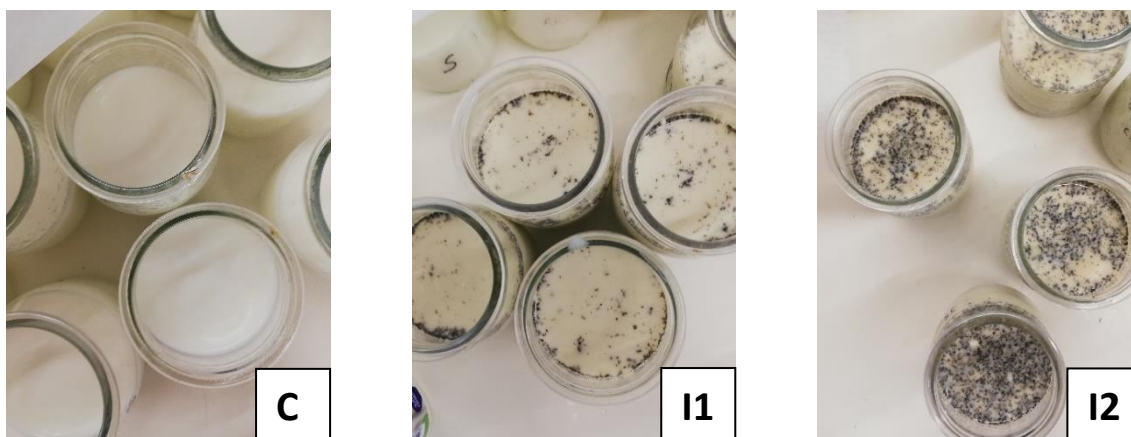


Figura 12- iogurtes formulados: C- iogurte Natural sem extrato; I1- iogurte com menor concentração de extrato; I2- iogurte com maior concentração de extrato

3.4.3 Controlo analítico

3.4.3.1 Análise Sensorial

A Análise Sensorial permite avaliar, por meio dos órgãos dos sentidos as características organoléticas de determinado produto (ISO 6658:2005). É a identificação, medição científica,

análise e interpretação dos atributos de determinado produto alimentar por meio dos 5 sentidos como o paladar, a visão, a audição, o tato e o olfato (Carpenter *et al.*, 2000).

Sendo um método científico os procedimentos devem ser elaborados com rigor. As amostras devem ser preparadas e apresentadas em condições padronizadas para que não existam fatores variáveis a alterar os resultados obtidos (Caldeira *et al.*, 2015) Para que se verifique um impacto positivo da análise sensorial no produto final é necessário a colocação das questões certas, bem como a escolha da população e das condições mais apropriadas para uso nas provas. (Carpenter *et al.*, 2000) Na indústria alimentar é importante recorrer à análise alimentar uma vez que esta permite a melhoria e o desenvolvimento de produtos, bem como permite reduzir o custo associado a matérias-primas e avaliar a aceitabilidade e preferência do por parte dos consumidores (Caldeira *et al.*, 2015)

Existem 3 tipos de testes utilizados com maior frequência para a avaliação sensorial dos produtos alimentares, os testes discriminativos, descritivos e hedónicos. Os testes discriminativos permitem determinar a probabilidade de diferença ou semelhança entre produtos. Através dos testes descritivos é possível detetar, descrever e quantificar as características dos produtos por um painel de provadores treinado. Por sua vez, os testes hedónicos são utilizados para perceber se os consumidores gostam ou não do produto e até que ponto, e o que preferem quando em comparação a outros produtos. Estes testes são muito aplicados por exemplo em comparação de produtos com outros concorrentes e na otimização e formulação de novos produtos (ISO 11136:2014; ISO 6658:2017)

Caracterização do painel e local de provas

Para a avaliação sensorial dos iogurtes elaborados utilizou-se um teste hedónico, tendo sido apresentadas três amostras em separado, respetivamente codificadas. O painel foi constituído por 50 elementos com idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos, dos quais

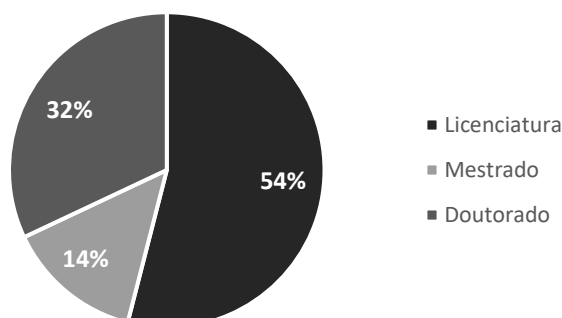


Figura 13- Percentagem de provadores em função da escolaridade: Licenciatura; Mestrado e Doutoramento

66% eram do sexo feminino e 33% do sexo masculino. Os provadores foram na sua maioria estudantes e funcionários do Instituto Superior de Agronomia do IPMA, tendo sido as duas provas realizadas no mesmo dia. Como é possível verificar através da figura 13 os provadores apresentam escolaridade ao nível do ensino superior, sendo que 54% possui ou está em vias de terminar uma licenciatura, 32% um doutoramento e 14% um mestrado.

Realização da prova

A ficha de prova, (figura 20, anexo), contempla atributos como a Aparência/aspecto; Sabor amargo; Cheiro/odor; Apreciação global e o Sabor/aroma numa escala estruturada com 9 níveis: A escala de 9 respostas foi composta por Gosto extremamente, Gosto muito, Gosto moderadamente, Gosto ligeiramente, Não gosto nem desgosto, Desgosto ligeiramente, Desgosto moderadamente, Desgosto muito e Desgosto extremamente. À escala utilizada foram atribuídos valores numéricos de 1 a 9. Sendo o 9 correspondente a Gosto extremamente e o 1 a Desgosto extremamente.

Na mesma ficha de prova foi avaliada a Intenção de compra, por meio de uma escala de atitude com 5 níveis de respostas que compreendia as opções de Certamente compraria; Provavelmente compraria; Talvez comprasse/talvez não comprasse e Provavelmente não compraria e Certamente não compraria. A esta foi também atribuída numeração onde 1 corresponde a certamente não compraria e 5 a certamente compraria. A ficha apresentava ainda uma secção para qualquer comentário adicional.

A prova foi realizada com a distribuição das amostras em copos de papel devidamente codificados. Para cada uma das provas a folha de prova foi entregue e seguidamente recolhida antes da entrega da próxima amostra, impossibilitando a alteração de respostas previamente entregues. Sem conhecimento do painel as amostras foram entregues em função da percentagem crescente de extrato incorporado.

O primeiro iogurte a ser apresentado foi o controlo, sem adição de extrato, seguindo-se o iogurte I1 e depois o iogurte I2, com maior percentagem de incorporação de extrato (figura 14). No início da prova e entre amostras foi pedido ao provador que bebesse água, foi ainda disponibilizada bolacha de água e sal de forma a eliminar evidências do sabor anterior.



Figura 14- Iogurtes C, I1 e I2 ordenados para a prova de análise sensorial em função da percentagem crescente de extrato incorporado da esquerda para a direita

3.4.3.2 Caracterização da atividade Biológica do iogurte

O objetivo inicial passou por comparar as bioatividades analisadas no extrato às bioatividades analisadas no iogurte com e sem incorporação de extrato. Após dificuldades para obtenção de quantidades suficientes de extrato bem como de incorporação do extrato e aceitação por parte do consumidor a percentagem de extrato de *E.selaginoides* adicionada foi consideravelmente inferior.

Para realização do estudo de bioatividades utilizou-se seis amostras de cada um dos três iogurtes C, I1 e I2. Para a preparação dos extratos homogeneizou-se vigorosamente cada iogurte a ser analisado de forma a garantir amostras com semelhante percentagem de extrato. Após homogeneização pesou-se 1,25 g de iogurte para tubos de centrifuga aos quais adicionou-se 25 mL de acetato de etilo. Procedeu-se então à centrifugação durante 10 minutos a 4°C e 5000 x g. Terminada a centrifugação removeu-se cuidadosamente os tubos de forma a garantir a separação do resíduo da fase líquida que foi recolhida para balões volumétricos de 25 mL onde se fez o volume com acetato de etilo. As amostras foram armazenadas a - 80°C para posterior utilização.

Após os resultados obtidos nos métodos para análise do teor de polifenóis totais, da atividade antioxidante, avaliada com os métodos ABTS e FRAP optou-se pela não realização do método para avaliar as propriedades anti-inflamatórias. Este método foi descartado uma vez que a deteção das restantes atividades foi consideravelmente inferior quando comparada à avaliada nos extratos de *E.selaginoides* e a avaliação desta atividade exige a utilização de um kit de elevado custo.

Foi avaliado o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante (FRAP e ABTS) segundo os métodos descritos anteriormente para o extratos de iogurte.

3.4.4 Resultados e Discussão

3.4.4.1 Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial realizada como descrita anteriormente (3.4.3.1) para os 3 iogurtes formulados estão apresentados na figura 15. De forma a se obter um valor representativo para cada um dos atributos avaliados como Aparência/Aspetto; Sabor; Apreciação Global; Cheiro e Sabor amargo utilizou-se uma escala hedónica a variar entre gosto extremamente e desgosto extremamente. Com a atribuição de algarismos de 9 a 1, respetivamente, foi possível avaliar as respostas obtidas nos gráficos.

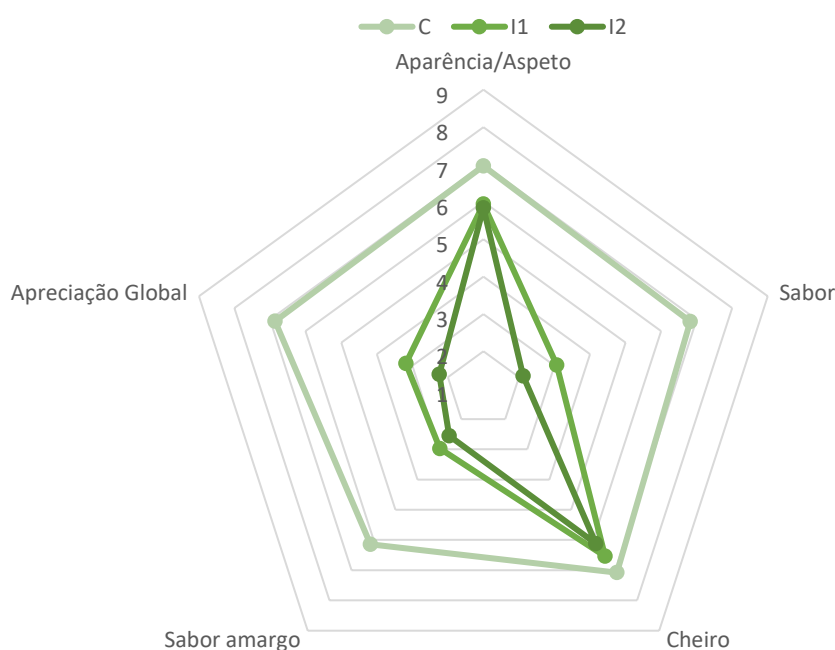


Figura 15 – Resposta média dos provadores (n=50) para o iogurte controlo (C), o iogurte com 0,9g de extrato (I1) e iogurte com 1,8g extrato (I2) (9-Gosto extremamente; 8-Gosto muito; 7-Gosto moderadamente; 6-Gosto ligeiramente; 5-Não gosto nem desgosto; 4-Desgosto ligeiramente; 3-Desgosto moderadamente; 2- Desgosto muito e 1- Desgosto extremamente)

Através da análise da figura 15 é possível verificar que quanto maior a adição de extrato ao iogurte formulado, maior o número de provadores que define os atributos avaliados com conotações menos positivas.

Apesar de se verificar uma descida na avaliação geral dos atributos em função da presença e aumento da incorporação de extrato, no atributo que diz respeito à Aparência/Aspetto do iogurte I1 cerca de 30% dos consumidores diz gostar ligeiramente e 24%

gostar moderadamente. Em relação ao iogurte I2 24% dos consumidores diz gostar ligeiramente (linha 6) e outros 24 % dizem gostar moderadamente (linha 7) da Aparência/Aspetto que o mesmo apresenta.

Quanto à apreciação global a maior parte dos provadores, 36%, afirma gostar moderadamente do iogurte controlo. No que respeita o iogurte I1 30 % dos provadores afirma desgostar moderadamente. Ao passo que para o iogurte I2 a maior percentagem de provadores, 36%, diz desgostar extremamente.

Quanto à intenção de compra, como seria de esperar, também acompanhou a avaliação dos atributos com a diminuição da intenção de compra com o aumento da adição de extrato. É possível verificar, através da figura 16, a percentagem de provadores que escolheu determinada intenção de compra para cada um dos iogurtes.

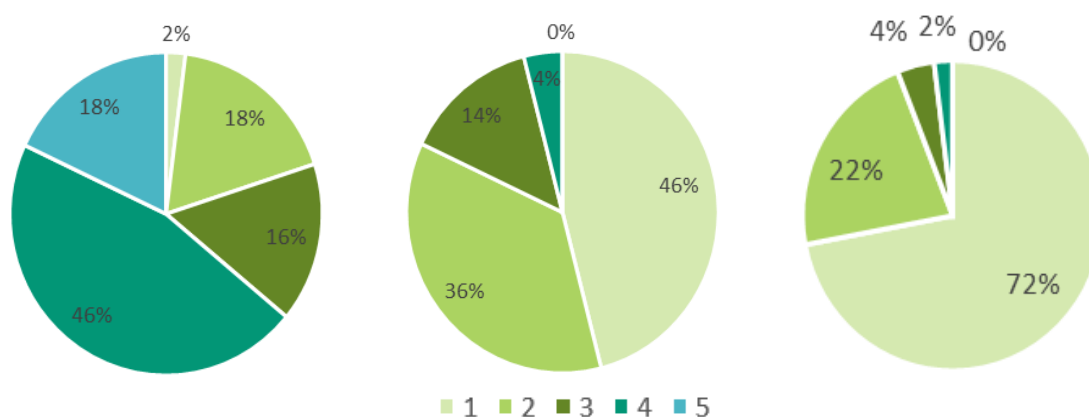


Figura 16- Intenção de compra dos iogurtes sem e com extrato da macroalga *E.selaginoides* (N=50)
 Legenda: 5-Certamente compraria; 4-Provavelmente compraria; 3-Talvez comprasse/talvez não comprasse 2-Provavelmente não compraria; 1-Certamente não compraria

Cerca de 46% dos provadores afirmou que provavelmente compraria o iogurte controlo sem adição de extrato e apenas 2 % disse que provavelmente não compraria. A percentagem de provadores que provavelmente compraria diminuiu para 4% no que respeita ao iogurte I1 e para 2% no iogurte I2. A maioria dos provadores (46%), aquando a prova do iogurte I1 seleccionou que certamente não compraria. Esta percentagem é ainda superior para o iogurte I2 em que 72% dos provadores afirma que certamente não compraria. De salientar que os iogurtes não foram adicionados de qualquer edulcorante ou aromatizante. Perante os resultados será equacionar a adição de edulcorantes e, no caso do extrato, o encapsulamento.

3.4.4.2 Caracterização da Atividade Biológica do iogurte

Após a determinação dos fenóis totais e das atividades antioxidantes por meio dos métodos FRAP e ABTS. Apenas foi possível ter em contra os resultados obtidos pelo método FRAP uma vez que para os restantes métodos os valores observados foram inferiores à sensibilidade do método, mesmo após repetição, o que evidencia a baixa atividade biológica do iogurte.

Os dados referentes à atividade antioxidante avaliada por meio do método FRAP estão apresentados na tabela 6. No iogurte usado como controlo sem adição de extrato (C) a atividade antioxidante não foi detetada pelo método usado. Para o iogurte I1 o valor obtido foi de 0,43 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ de matéria seca de iogurte. Já para o iogurte I2 o valor foi de 2,47 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ ms de iogurte formulado, valor que é significativamente diferente daquele que se obteve para o iogurte de I1. Estes valores estão de acordo com o esperado uma vez que mostram que o aumento da presença de extrato reflete-se no aumento da atividade antioxidante.

Tabela 6 - Atividade antioxidante avaliada no matéria seca dos iogurtes c- controlo; I1- e I2 quantificado pelo método FRAP ($\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g}$ matéria seca). Os valores são apresentados como média das amostras \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas em cada linha correspondem a diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre cada iogurte.

	iogurte	
	C	0 ± 0^a
FRAP ($\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g ms}$)	I1	$0,43 \pm 0,1^{ab}$
	I2	$2,47 \pm 0,26^b$

4 Conclusões e Perspetivas Futuras

A crescente procura por produtos funcionais com propriedades benéficas para a saúde do consumidor exige da indústria alimentar constante inovação e procura de alternativas que, além de apreciadas pelo consumidor, garantam a sustentabilidade e valorização dos recursos disponíveis. As macroalgas têm sido alvo de estudos que, de forma geral, comprovam o seu potencial biotecnológico, sendo naturalmente uma boa alternativa para incorporação em alimentos previamente familiares aos consumidores, como é o caso dos iogurtes. Contudo, a vasta variedade inerente às algas, a falta de métodos universais e standardizados e de literatura apropriada, são desafios no que concerne o seu estudo e comparação de subsequentes resultados. Com este trabalho, caracterizou-se a alga edível *Ericaria selaginoides*, o método mais eficiente para a extração compatível com a adição numa matriz alimentar e procedeu-se ainda à avaliação sensorial de um iogurte funcional após incorporação do extrato da macroalga.

O presente trabalho compreendeu 2 etapas, a seleção do método de extração da macroalga *Ericaria selaginoides* e análise do extrato e o desenvolvimento do iogurte com funcionalidade acrescida, das quais é possível tirar as seguintes conclusões:

- Em relação aos métodos avaliados, utilizando o acetato de etilo como solvente, em termos de rendimento de extração selecionou-se o uso de homogeneizador para a fragmentação do material, bem como a dupla extração (método M3) uma vez que verificaram-se mais eficientes. O rendimento de 7,8% é superior ao verificado na bibliografia o que se poderá dever ao método de extração e solvente usado. A eficácia dos métodos de extração não teve impacto significativo na percentagem de ácidos gordos obtido.
- O teor de fenóis totais foi mais elevado no extrato comparativamente à biomassa. O valor obtido de 84,18 mg GAE/g ms de extrato é relativamente alto para as macroalgas castanhas e está dentro do que seria esperado para a alga estudada.
- A atividade antioxidante do extrato da macroalga *Ericaria selaginoides* pelos métodos FRAP e ABTS é de, respetivamente, 3211,68 $\mu\text{mol Eq Fe}^{2+}/\text{g/ms}$ e 379,01 $\mu\text{mol Eq Trolox}/\text{g ms}$, indicadores de atividade antioxidante considerável.
- A percentagem de inibição da COX-2 avaliada foi superior nos extratos etanólicos da biomassa (94%) em comparação aos extratos obtidos através do

extrato de acetato de etilo (79%), contudo ambos apresentam atividade anti-inflamatória relevante.

- A análise sensorial permitiu inferir que com o aumento da adição de extrato ao iogurte, ocorreu diminuição na avaliação positiva geral dos atributos percebidos pelo consumidor. Por sua vez a decisão de compra foi também afetada pela adição do extrato. Para os dois iogurtes em que se adicionou extrato, a resposta selecionada pelo maior número de consumidores foi “Certamente não compraria”.
- Os iogurtes formulados foram também analisados quanto à sua atividade biológica, contudo o único método possível de aplicar foi o FRAP. Tal como seria de esperar, os valores da atividade antioxidante aumentam com o aumento da adição de extrato ao iogurte, contudo continuam relativamente baixos. Para um maior benefício seria necessário a adição de uma percentagem de extrato superior, o que por sua vez impediria o consumo do iogurte pelo consequente aumento de atributos sensoriais negativos. Uma maior adição de extrato levantou também dificuldades de incorporação, aspeto desagradável e poderia levar à inibição da fermentação.

Verificados os benefícios da macroalga *Ericaria selaginoides* seria oportuno de futuro estudar outras opções de incorporação do extrato. Exemplo da microencapsulação do extrato com uso de *spray-drying*. Com recurso a este método poderia ser possível mascarar o sabor do extrato. Dado o grande interesse que esta alga demonstra e o desafio que representa a sua extração, em estudos futuros seria de interesse recolher maior quantidade de material.

5 Bibliografia

- Abdul, Q. A., Choi, R. J., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2016). Health benefit of fucosterol from marine algae: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(6), 1856–1866. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7489>
- Afonso, C., Guarda, I., Mourato, M., Martins, L. L., Fonseca, I., Gomes, R., Matos, J., Gomes, A., Bandarra, N. M., & Cardoso, C. (2020). *Treptacantha abies-marina* (S.G. Gmelin) Kützinger: Characterization and Application as a Whole Food Ingredient. <https://doi.org/10.1080/10498850.2020.1826617>
- Afonso, N., Catarino, M. D., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2019). Brown macroalgae as valuable food ingredients. *Antioxidants*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090365>
- Agregán, R., Munekata, P. E., Domínguez, R., Carballo, J., Franco, D., & Lorenzo, J. M. (2017). Proximate composition, phenolic content and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under. *Food Research International*, *99*, 986–994. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.009>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., & Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, *138*(2–3), 1764–1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bischof, K., Gómez, I., Molis, M., Hanelt, D., Karsten, U., Lüder, U., Roleda, M. Y., Zacher, K., & Wiencke, C. (2006). Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *5*(2–3), 141–166. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-0002-3>
- Boundir, Y., Haroun, R., Sanchez de Pedro, R., Hasni, M., Quazzani, N., Mandi, L., Rafiq, F., Weinberger, F., & Cherifi, O. (2022). Biomonitoring of heavy metal pollution using the brown seaweed *Ericaria Selaginoides* along the Atlantic coast of Morocco. *Applied Ecology and Environmental Research*, *20*(1), 21–41.
- Čagalj, M., Skroza, D., Razola-Díaz, M. D. C., Verardo, V., Bassi, D., Frleta, R., Mekinić, I. G., Tabanelli, G., & Šimat, V. (2022). Variations in the Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Cystoseira compressa* during Seasonal Growth. *Marine Drugs*, *20*(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/md20010064>
- Caldeira, I., Garcia, A. S. C., & Barros, P. (2015). Análise Sensorial. In Edições Técnicas (Ed.), *Química enológica- métodos analíticos* (pp. 469–482). PUBLINDUSTRIA.
- Campos, A. M., Matos, J., Afonso, C., Gomes, R., Bandarra, N. M., & Cardoso, C. (2019). Azorean macroalgae (*Petalonia binghamiae*, *Halopteris scoparia* and *Osmundea pinnatifida*) bioprospection: a study of fatty acid profiles and bioactivity. *International Journal of Food Science and Technology*, *54*(3), 880–890. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14010>

- Cardoso, S., Carvalho, L., Silva, P., Rodrigues, M., Pereira, O., & Pereira, L. (2014). Bioproducts from Seaweeds: A Review with Special Focus on the Iberian Peninsula. *Current Organic Chemistry*, 18(7), 896–917. <https://doi.org/10.2174/138527281807140515154116>
- Carpenter, R. P., Lyon, D. H., & Hasdell, T. A. (2000). *Guidelines for Sensory Analysis In Food Product Development and Quality Control*. Springer US. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-4447-0_3
- Chakraborty, K., Praveen, N. K., Vijayan, K. K., & Rao, G. S. (2013). Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to *Turbinaria* spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(1), 8–16. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60016-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60016-7)
- Custódio, L., Silvestre, L., Rocha, M. I., Rodrigues, M. J., Vizetto-Duarte, C., Pereira, H., Barreira, L., & Varela, J. (2016). Methanol extracts from *Cystoseira tamariscifolia* and *Cystoseira nodicaulis* are able to inhibit cholinesterases and protect a human dopaminergic cell line from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1687–1696. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1123278>
- De La Fuente, G., Fontana, M., Asnaghi, V., Chiantore, M., Mirata, S., Salis, A., Damonte, G., & Scarfi, S. (2021). The remarkable antioxidant and anti-inflammatory potential of the extracts of the brown alga *cystoseira amentacea* var. *stricta*. *Marine Drugs*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/md19010002>
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach* (John Wiley and Sons (ed.); 2ª Edição).
- Duarte, C. V. G. (2016). *Biomedical properties of Cystoseira species: Insights into nutra- and pharmaceutical applications* [Universidade do Algarve]. <http://hdl.handle.net/10400.1/9004>
- EFSA. (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3), 1–107. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1461>
- Fernando, I. P. S., Nah, J. W., & Jeon, Y. J. (2016). Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.023>
- Fernando, I. P. S., Sanjeewa, K. K. A., Samarakoon, K. W., Lee, W. W., Kim, H.-S., & Jeon, Y.-J. (2018). Squalene isolated from marine macroalgae *Caulerpa racemosa* and its potent antioxidant and anti-inflammatory activities. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5), e12628. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12628>
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1), 25–28. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00015-1)
- Fleurence, J., & Levine, I. (2016). Seaweed in Health and Disease Prevention. In *Seaweed in Health and Disease Prevention*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128027721000142>
- Francisco, J., Horta, A., Pedrosa, R., Afonso, C., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & Gil, M. M. (2020). Bioaccessibility of antioxidants and fatty acids from *fucus spiralis*. *Foods*, 9(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods9040440>
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of

- edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543–597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
- Hori, K., Matsubara, K., & Miyazawa, K. (2000). Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*11The sequence data of this paper have been submitted to the sequence data bank and are available under the accession numbers of JC5773 for hypnin A-1 and JC5774 for hypnin . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1474(2), 226–236. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(00)00008-8)
- Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 703–709. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6023>
- Jaswir, I., & Monsur, H. A. (2011). *Anti-inflammatory compounds of macro algae origin : A review*. 5(33), 7146–7154. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.018>
- Klnc, B., Cirik, S., Turan, G., Tekogul, H., & Koru, E. (2013). Seaweeds for Food and Industrial Applications. In *Food Industry* (Vol. 33, Issue 9, pp. 475–482). InTech. <https://doi.org/10.5772/53172>
- Krause-Jensen, D., & Duarte, C. M. (2016). Substantial role of macroalgae in marine carbon sequestration. *Nature Geoscience*, 9(10), 737–742. <https://doi.org/10.1038/ngeo2790>
- 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>
- Lopes-Costa, E., Abreu, M., Gargiulo, D., Rocha, E., & Ramos, A. A. (2017). Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(13–15), 776–787. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357297>
- Lopes, D., Melo, T., Rey, F., Meneses, J., Monteiro, F. L., Helguero, L. A., Abreu, M. H., Lillebø, A. I., Calado, R., & Domingues, M. R. (2020). Valuing Bioactive Lipids from Green, Red and Brown Macroalgae from Aquaculture, to Foster Functionality and Biotechnological Applications. *Molecules*, 25(17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25173883>
- Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs*, 9(6), 1056–1100. <https://doi.org/10.3390/md9061056>
- Lorenzo, J., Agregán, R., Munekata, P., Franco, D., Carballo, J., Şahin, S., Lacomba, R., & Barba, F. (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>
- Mabeau, S., & Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. In *Trends in Food Science & Technology* (Vol. 4, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90091-N](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90091-N)
- Mansur, A. A., Brown, M. T., & Billington, R. A. (2020). The cytotoxic activity of extracts of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss, against cancer cell lines

- changes seasonally. *Journal of Applied Phycology*, 32(4), 2419–2429.
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-02016-z>
- Martins, A. C., Bukman, L., Vargas, A. M. M., Barizão, É. O., Moraes, J. C. G., Visentainer, J. V., & Almeida, V. C. (2013). The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. *Food Chemistry*, 138(1), 574–580.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.143>
- McHugh, D. J. (2003). *A guide to the seaweed industry* (No. 441; FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER). <https://www.fao.org/3/y4765e/y4765e00.htm>
- Mišurcová, L., Kráčmar, S., Klejdus, B., & Vacek, J. (2010). Nitrogen content, dietary fiber, and digestibility in algal food products. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(No. 1), 27–35.
<https://doi.org/10.17221/111/2009-CJFS>
- Miyashita, K., Mikami, N., & Hosokawa, M. (2013). Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1507–1517. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.019>
- Moussa, H., Quezada, E., Viña, D., Riadi, H., & Gil-Longo, J. (2020). Redox-Active Phenolic Compounds Mediate the Cytotoxic and Antioxidant Effects of *Carpodesmia tamariscifolia* (= *Cystoseira tamariscifolia*). *Chemistry and Biodiversity*, 17(7).
<https://doi.org/10.1002/cbdv.202000121>
- Murphy, C., Hotchkiss, S., Worthington, J., & McKeown, S. R. (2014). The potential of seaweed as a source of drugs for use in cancer chemotherapy. *Journal of Applied Phycology*, 26(5), 2211–2264. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0245-2>
- Novoa, E.A.M., Guiry, M. (2020). *Reinstatement of the genera Gongolaria Boehmer and Ericaria Stackhouse (Sargassaceae, Phaeophyceae)*. *Notulae Algarum*. 172:1-10.
<https://img.algaebase.org/pdf/AC1F2AC91dd6c1D68BNM6EDA199A/65399.pdf>.
- Orellana, S., Hernández, M., & Sansón, M. (2019). Diversity of *Cystoseira* sensu lato (Fucales, Phaeophyceae) in the eastern Atlantic and Mediterranean based on morphological and DNA evidence, including *Carpodesmia* gen. emend. and *Treptacantha* gen. emend. *European Journal of Phycology*, 54(3), 447–465.
<https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1590862>
- Papenfuss, G. F. (1950). Review of the genera of algae described by Stackhouse. *Hydrobiologia*, 2(3), 181–208. <https://doi.org/10.1007/BF00046555>
- Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizetto-Duarte, C., Polo, C., Rešek, E., Aschwin, E., & Varela, J. (2012). Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: Potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*, 10(9), 1920–1935. <https://doi.org/10.3390/md10091920>
- Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science and Technology*, 19(1), 31–39.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.012>
- Pomin, V. H., & Mourao, P. A. S. (2008). Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*, 18(12), 1016–1027.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwn085>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free*

Radical Biology and Medicine, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Rodrigues, D. (2016). *Functional foods with innovative ingredients from seaweeds and mushrooms sources*. Universidade de Aveiro Departamento de Química.

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

Ruberto, G., Baratta, M. T., & Biondi, D. M. (2001). Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *Journal of Applied Phycology*, 403–407. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1023/A:1011972230477>

Russo, R., Gallelli, L., Cannataro, R., Perri, M., Calignano, A., Citraro, R., Russo, E., Gareri, P., Corsonello, A., & De Sarro, G. (2016). When Nutraceuticals Reinforce Drugs Side Effects: A Case Report. *Current Drug Safety*, 11(3), 264–266. <https://doi.org/10.2174/1574886311666160201152047>

Santos, F., Monteiro, J. P., Duarte, D., Melo, T., Lopes, D., da Costa, E., & Domingues, M. R. (2020). Unraveling the lipidome and antioxidant activity of native *bifurcaria bifurcata* and invasive *sargassum muticum* seaweeds: A lipid perspective on how systemic intrusion may present an opportunity. *Antioxidants*, 9(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox9070642>

Santos, S. A. O., Félix, R., Pais, A. C. S., Rocha, S. M., & Silvestre, A. J. D. (2019). The quest for phenolic compounds from macroalgae: A review of extraction and identification methodologies. *Biomolecules*, 9(12), 1–56. <https://doi.org/10.3390/biom9120847>

Soobrattee, M., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1–2), 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>

Stadnik, M. J., & Freitas, M. B. De. (2014). *Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers*. 39(2), 111–118.

Van Ginneken, V. J. T., Helsper, J. P. F. G., De Visser, W., Van Keulen, H., & Brandenburg, W. A. (2011). Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in Health and Disease*, 10, 4–11. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-104>

Vizetto-Duarte, C., Custódio, L., Acosta, G., Lago, J. H. G., Morais, T. R., Bruno de Sousa, C., Gangadhar, K. N., Rodrigues, M. J., Pereira, H., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Barreira, L., Rauter, A. P., Albericio, F., & Varela, J. (2016). Can macroalgae provide promising anti-tumoral compounds? A closer look at *Cystoseira tamariscifolia* as a source for antioxidant and anti-hepatocarcinoma compounds. *PeerJ*, 4(2), e1704. <https://doi.org/10.7717/peerj.1704>

Vizetto-Duarte, C., Pereira, H., De Sousa, C. B., Rauter, A. P., Albericio, F., Custódio, L., Barreira, L., & Varela, J. (2015). Fatty acid profile of different species of algae of the *Cystoseira* genus: A nutraceutical perspective. *Natural Product Research*, 29(13), 1264–1270. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.992343>

- Wang, H.-M. D., Li, X.-C., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2017). Potential biomedical applications of marine algae. *Bioresource Technology*, *244*(1), 1407–1415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.198>
- Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., & Song, S. (2019). Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Marine Drugs*, *17*(3), 183. <https://doi.org/10.3390/md17030183>
- Xie, Q. W., Whisnant, R., & Nathan, C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, *177*(6), 1779–1784. <https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1779>
- Yan, X., CHUDA, Y., SUZUKI, M., & NAGATA, T. (1999). Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a Common Edible Seaweed. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *63*(3), 605–607. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.605>
- Yang, E. J., Moon, J. Y., Kim, M. J., Kim, D. S., Lee, W. J., Lee, N. H., & Hyun, C. G. (2010). Anti-inflammatory effect of *Petalonia binghamiae* in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2. *International Journal of Agriculture and Biology*, *12*(5), 754–758.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis* (4th ed.). Prentice Hall.

6 Anexos

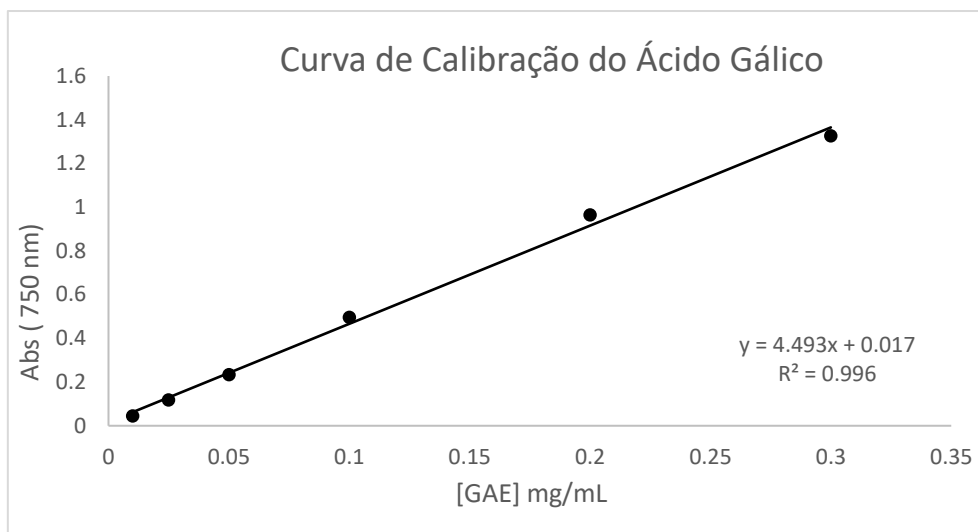


Figura 17- Curva de calibração do ácido gálico para quantificação do teor total de fenóis.

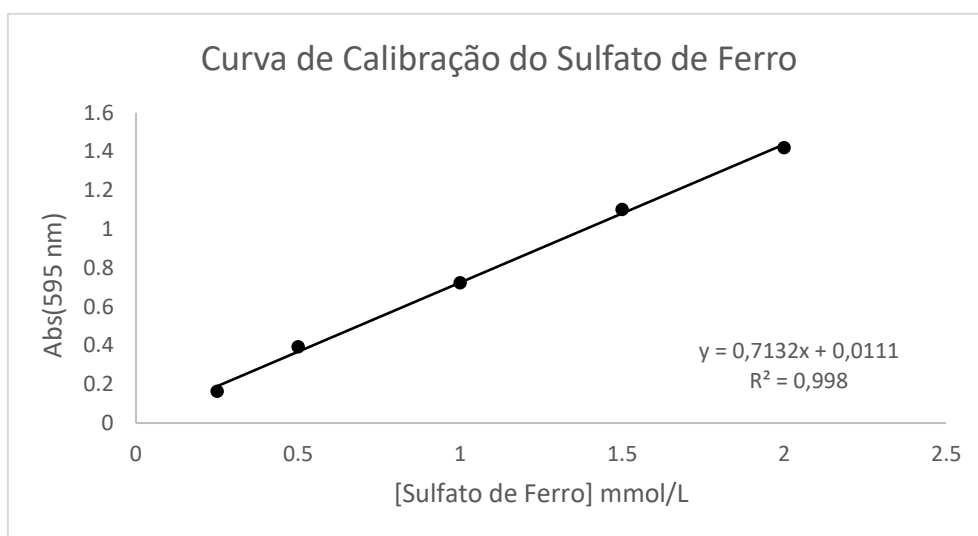


Figura 18- Curva de calibração do sulfato de ferro para quantificação da atividade antioxidante pelo método FRAP.

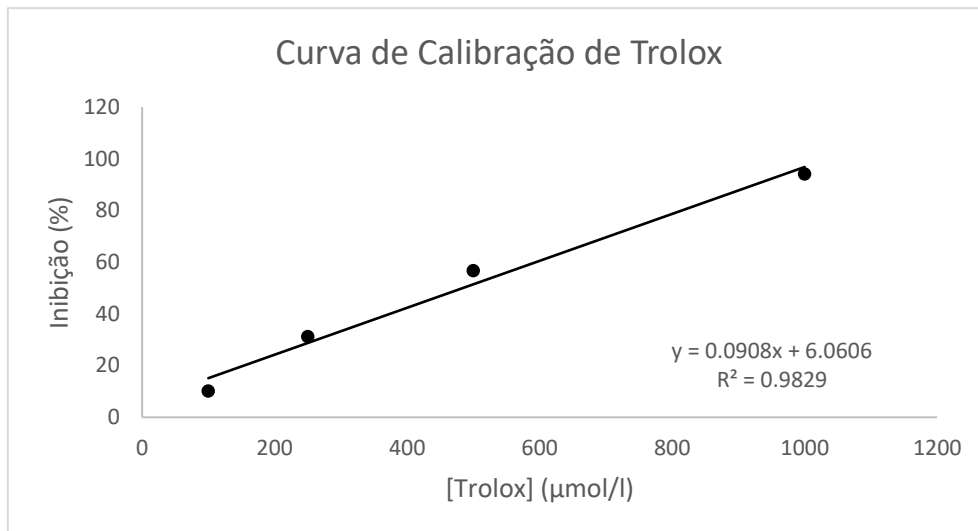


Figura 19- Curva de calibração de trolox para quantificação da atividade antioxidante pelo método ABTS.

Tabela 7 - Perfil relativo de ácidos gordos (%) do extrato de *E.selaginoides* para cada um dos métodos de extração. Os valores são apresentados como média das amostras.

% de Ácidos Gordos Totais				
Ácidos Gordos	Métodos			
	M1	M2	M3	M5
14:0	6,36	7,61	7,70	5,93
16:0	14,66	16,60	17,19	15,11
18:0	1,43	1,68	1,49	1,39
Σ SFA	27,62	31,72	32,12	27,90
16:1 ω9	0,08	0,09	0,07	0,11
16:1 ω7	3,07	3,48	3,48	3,28
18:1 ω9	17,33	15,69	16,45	15,91
18:1 ω7	0,24	0,35	0,25	0,21
18:1 ω5	0,04	0,04	0,06	0,00
Σ Mufa	22,51	21,16	21,61	20,58
18:2 ω6	6,90	5,99	5,77	7,18
18:3 ω3	3,65	3,43	3,40	3,98
18:4 ω3	2,87	2,62	2,43	3,08
20:4 ω6	16,31	16,40	19,55	19,13
20:5 ω3	4,55	4,61	5,12	5,21
22:6 ω3	0,11	0,00	0,00	0,05
Σ PUFA	36,67	35,00	38,09	41,06
EPA+DHA	4,67	4,61	5,12	5,26
Σ ω3	12,44	11,78	11,91	13,59
Σ ω6	23,71	22,81	25,84	26,93
Razão ω3/ω6	0,52	0,52	0,46	0,50

Análise Sensorial de iogurtes

Ficha de Prova : Mestrado em Engenharia

Alimentar

Idade:

Formação:



Para esta prova de análise sensorial de iogurtes suplementados com extrato de macroalga marinha *Cystoseira carpodesmia*, caracterize o produto que lhe é apresentado, marcando com uma cruz (X) o termo que mais se adequa à sua apreciação. Beba um pouco de água antes de iniciar a prova e entre a prova das amostras.

Código da Amostra:

Aparência/Aspetto

- Gosto extremamente
- Gosto muito
- Gosto moderadamente
- Gosto ligeiramente
- Não gosto nem desgosto
- Desgosto ligeiramente
- Desgosto moderadamente
- Desgosto muito
- Desgosto extremamente

Amargo

- Gosto extremamente
- Gosto muito
- Gosto moderadamente
- Gosto ligeiramente
- Não gosto nem desgosto
- Desgosto ligeiramente
- Desgosto moderadamente
- Desgosto muito
- Desgosto extremamente

Cheiro/Odor

- Gosto extremamente
- Gosto muito
- Gosto moderadamente
- Gosto ligeiramente
- Não gosto nem desgosto
- Desgosto ligeiramente
- Desgosto moderadamente
- Desgosto muito
- Desgosto extremamente

Apreciação Global

- Gosto extremamente
- Gosto muito
- Gosto moderadamente
- Gosto ligeiramente
- Não gosto nem desgosto
- Desgosto ligeiramente
- Desgosto moderadamente
- Desgosto muito
- Desgosto extremamente

Sabor/Aroma

- Gosto extremamente
- Gosto muito
- Gosto moderadamente
- Gosto ligeiramente
- Não gosto nem desgosto
- Desgosto ligeiramente
- Desgosto moderadamente
- Desgosto muito
- Desgosto extremamente

Intenção de compra

- Certamente compraria
- Provavelmente compraria
- Talvez comprasse/talvez não comprasse
- Provavelmente não compraria
- Certamente não compraria

Obrigada!

Figura 20 – Ficha de prova da análise sensorial de iogurtes