

**Universidade de Lisboa Faculdade
de Farmácia**



APLICAÇÃO DE EXTRATOS DA MACROALGA *BIFURCARIA BIFURCATA* EM FORMULAÇÕES DERMATOLÓGICAS

Juan David Verdugo Rosero

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora Helena Margarida Marques Ribeiro e da Doutora Alice Isabel Mendes Martins

Mestrado Ciências Biofarmacêuticas

2024

**Universidade de Lisboa Faculdade
de Farmácia**



**APLICAÇÃO DE EXTRATOS DA MACROALGA
BIFURCARIA BIFURCATA EM FORMULAÇÕES
DERMATOLÓGICAS**

Juan David Verdugo Rosero

**Trabalho Final de Mestrado em Ciências Biofarmacêuticas apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa**

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora
Helena Margarida Marques Ribeiro e da Doutora Alice Isabel Mendes
Martins

2024

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha sincera gratidão a todos os que me apoiaram ao longo deste percurso e contribuíram para a conclusão desta tese.

Em primeiro lugar, e acima de tudo, gostaria de agradecer à minha família pelo seu apoio inabalável, amor e encorajamento. A sua crença constante em mim tem sido a força motriz das minhas realizações. Estou especialmente grato à minha mãe, que, apesar de não estar aqui comigo, a sua memória e o seu espírito têm sido a minha luz orientadora, e é a ela que dedico esta tese.

Estou profundamente grato às minhas orientadoras, a Professora Doutora Helena Margarida Marques Ribeiro e a Professora Doutora Alice Isabel Mendes Martins, pela sua orientação, experiência e inestimável contributo ao longo do processo de investigação. A sua dedicação e empenho no meu crescimento académico foram fundamentais para dar forma às minhas ideias e aperfeiçoar o meu trabalho. Gostaria ainda de expressar a minha gratidão à Professora Doutora Susete Filipa Gonçalves Pintéus e à Professora Doutora Joana Marques Marto, que também me prestaram uma valiosa assistência e apoio.

Gostaria também de expressar o meu apreço aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa por me terem proporcionado um ambiente académico estimulante e o acesso aos recursos necessários para a minha investigação. Também sou grato ao Politécnico de Leiria pela possibilidade de desenvolver parte do meu trabalho experimental nos laboratórios do MARE- Centro de Ciências do Mar e do Ambiente.

Finalmente, quero reconhecer e estender a minha gratidão a todos os indivíduos e organizações que contribuíram de alguma forma para esta tese. A sua ajuda, grande ou pequena, teve um impacto significativo no resultado deste trabalho.

Mais uma vez, agradeço do fundo do coração a todos os que participaram neste projeto. O vosso apoio foi inestimável e estou verdadeiramente grato a todos e a cada um de vós.

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

Esta dissertação investiga a aplicação tópica de extratos da macroalga *Bifurcaria bifurcata*, visando desenvolver formulações bioativas para benefícios da saúde da pele. Inicialmente, prepararam-se extratos de glicerol, etanol e etanol:água (80:20) a partir da biomassa seca e pulverizada.

Avaliou-se a capacidade antioxidante dos extratos pelo método FRAP e o conteúdo fenólico total (TPC) pelo método de Folin-Ciocalteu. Também se estudou a atividade antimicrobiana dos extratos contra microrganismos do microbioma da pele: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Cutibacterium acnes* e *Malassezia furfur*.

O perfil químico do extrato mais promissor foi analisado por ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN) e selecionado para estudar mecanismos de ação, como danos no ADN e efeitos na permeabilidade da membrana bacteriana. Avaliou-se a segurança dos extratos em formulações tópicas testando a toxicidade *in vitro* em queratinócitos humanos (HaCat) pelo método MTT.

Em concentrações não tóxicas, os extratos foram usados em duas formulações (hidrogel e emulsão O/A), caracterizadas quanto a propriedades organolépticas, pH, tamanho e distribuição das gotículas, parâmetros reológicos e controlo microbiológico. O extrato de glicerol e a fração apolar do extrato hidroetanólico apresentaram a melhor capacidade antioxidante, sendo que este último também demonstrou a melhor atividade antimicrobiana. Este extrato induziu a permeabilidade da membrana bacteriana e provocou danos no ADN, possivelmente devido à alta concentração de terpenos lineares.

Os extratos, em concentrações não citotóxicas, afetaram a preparação das formulações e a distribuição das gotículas, mas não alteraram significativamente as propriedades reológicas, exceto a fração apolar do extrato hidroetanólico. Os extratos não proporcionaram proteção significativa às formulações contra microrganismos, conforme os métodos TAMC (ISO 21149:2017) e TYMC (ISO 16212:2017).

Concluindo, os extratos de *B. bifurcata* têm potencial em formulações tópicas devido às suas atividades antioxidantes e antimicrobianas, oferecendo alternativas naturais e sustentáveis para produtos cosméticos e farmacêuticos voltados ao cuidado da pele.

Palavras-chave: *Bifurcaria bifurcata*, extrato de macroalga, antimicrobiano, antioxidante,

formulações tópicas.

Abstract

This dissertation investigates the topical application of extracts from the brown macroalga *Bifurcaria bifurcata*, aiming to develop bioactive formulations for skin health benefits. Initially, glycerol, ethanol, and ethanol:water (80:20) extracts were prepared from dried and pulverised biomass.

The antioxidant capacity of the extracts was evaluated using the FRAP method, and the total phenolic content (TPC) was assessed using the Folin-Ciocalteu method. The antimicrobial activity of the extracts was also studied against skin microbiome microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Cutibacterium acnes*, and *Malassezia furfur*.

The chemical profile of the most promising extract was analyzed by proton nuclear magnetic resonance (¹HNMR) and selected to study mechanisms of action, such as DNA damage and effects on bacterial membrane permeability. The safety of the extracts in topical formulations was evaluated by testing in vitro toxicity in human keratinocyte cell lines (HaCat) using the MTT method.

At non-toxic concentrations, the extracts were used in two formulations (hydrogel and O/W emulsion), characterized for their organoleptic properties, pH, droplet size and distribution, rheological parameters, and microbiological control. The glycerol extract and the apolar fraction of the hydroethanolic extract exhibited the best antioxidant capacity, with the latter also showing the best antimicrobial activity. This extract induced bacterial membrane permeability and caused DNA damage, possibly due to the high concentration of linear terpenes.

The extracts, at non-cytotoxic concentrations, affected the preparation of the formulations and droplet distribution but did not significantly alter rheological properties, except for the apolar fraction of the hydroethanolic extract. The extracts did not provide significant protection to the formulations against microorganisms, as assessed by the TAMC (ISO 21149:2017) and TYMC (ISO 16212:2017) methods.

In conclusion, *B. bifurcata* extracts have potential in topical formulations due to their significant antioxidant and antimicrobial activities, offering natural and sustainable alternatives for cosmetic and pharmaceutical products aimed at skin care.

Keywords: *Bifurcaria bifurcata*, macroalga extract, antimicrobial, antioxidant, topical

formulations.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract	iv
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
1.Introdução.....	1
1.1 A macroalga <i>Bifurcaria bifurcata</i>	1
1.2 Potencial antioxidante.....	2
1.3 Potencial antimicrobiano	4
1.4 Desenvolvimento de formulações	5
2.Materiais e Métodos	9
2.1. Recolha e preparação da alga	9
2.2. Extração da alga.....	9
2.3. Atividade biológica dos extratos	10
2.3.1. Atividade antioxidante	10
2.3.2. Atividade antimicrobiana.....	11
2.3.3. Estudo dos mecanismos de ação	12
2.4. Caraterização química dos extratos	13
2.5. Avaliação da citotoxicidade dos extratos.....	13
2.5.1. Cultura e manutenção celular.....	13
2.5.2. Viabilidade celular	14
2.6. Preparação das formulações	14
2.7. Avaliação das formulações.....	16
2.7.1 Avaliação das características organolépticas	16
2.7.2 Determinação do pH.....	17
2.7.3 Determinação do tamanho da gotícula das emulsões.....	17
2.7.4 Determinação de parâmetros reológicos das formulações	17
2.8. Controlo microbiológico das formulações.....	17
2.9. Tratamento de dados e análise estatística	18
3.Resultados	18
3.1. Atividade antioxidante.....	18
3.2. Atividade antimicrobiana.....	19
3.3. Mecanismos de ação	21

3.3.1 Danos no ADN.....	21
3.3.2. Análise da permeabilidade da membrana.....	22
3.4. Caraterização química dos extratos bioativos.....	23
3.5. Citotoxicidade em queratinócitos humanos.....	24
3.6. Avaliação das características organolépticas e determinação de pH	25
3.7 Determinação do tamanho da gotícula das emulsões	27
3.8 Determinação da viscosidade e oscilatório das formulações	31
3.9. Controlo microbiológico das formulações.....	33
4. Discussão.....	34
5. Conclusão	43
6. Bibliografia.....	44

Índice de Figuras

Figura 1. Imagem ilustrativa de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	1
Figura 2. Imagem ilustrativa do efeito antioxidante.....	3
Figura 3. Imagem ilustrativa do efeito das ROS	4
Figura 4. Cultura de <i>Staphylococcus epidermidis</i> em placa.....	5
Figura 5. Esquema de emulsão estabilizada por tensoativos	6
Figura 6. Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Bifurcaria bifurcata</i> (1000 µg/mL) contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> (A), <i>Staphylococcus aureus</i> (B), <i>Staphylococcus hominis</i> (C), <i>Cutibacterium acnes</i> (D) e <i>Malassezia furfur</i> (E). 20	20
Figura 7. Electroforese em gel de agarose de ADN plasmídeo exposto a extratos de <i>Bifurcaria bifurcata</i> (E2 e E4), DMSO e ciprofloxacina.	22
Figura 8. Análise da permeabilidade da membrana de <i>S. aureus</i> (A) e <i>S. epidermidis</i> (B) em presença dos extratos E2 e E4 de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	23
Figura 9 Espectro de ¹ H RMN (400.13 MHz) em CDCl ₃ do extrato E4 de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	24
Figura 10 Viabilidade celular (células HaCaT) após 24 h de incubação com os extratos E2 e E4 (1000 µg/mL) de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	25
Figura 11. Imagens dos geles e das emulsões.....	26
Figura 12. Medição do tamanho da gotícula do extrato de glicerina após 48 h de preparação das emulsões.....	28
Figura 13. Medição do tamanho da gotícula do extrato apolar após 48 h de preparação das emulsões.....	28
Figura 14. Medição do tamanho da gotícula após 48 h de preparação das emulsões	29
Figura 15. Determinação da viscosidade de cada uma das emulsões e geles	32
Figura 16. Determinação do oscilatorio de cada uma das emulsões e geles	32
Figura 17. Cultura da formulação de Solagum apolar (E4) com contaminação fúngica	34

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição da emulsão placebo.....	15
Tabela 2. Pré-formulação da emulsão com extrato apolar (E4).....	15
Tabela 3. Pré-formulação da emulsão placebo do extrato apolar (E4).....	16
Tabela 4. Composição do gel placebo do extrato de glicerol	16
Tabela 5. Valores do pH das formulações	27
Tabela 6. Valores do Span, D 0,1, D 0,5 e D 0,9 de cada uma das emulsões (µm).....	30

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

CH – Grupo metino

CH₂ – Grupo metileno

CH₃ - Grupo metilo

CO₂ - Dióxido de carbono

DMSO - Dimetilsulfóxido

DSMZ – Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas de Células (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*)

FeSO₄ - Sulfato de ferro

FRAP – Capacidade de redução do íão férrico (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

¹H RMN - Espetroscopia de ressonância magnética nuclear de próton

INCI - Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos

MIC - Concentrações mínimas inibitórias

MTT - 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazólio

PBS - Tampão fosfato-salino

pH - Potencial hidrogeniônico

ROS - Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

SDA - Sabouraud dextrose agar

TAMC - Contagem total de microrganismos aeróbios

TMD – Dano total de membrana (*Total membrane damage*)

TPC - Conteúdo fenólico total (*Total Phenolic Content*)

TYMC - Contagem total de bolores e leveduras (*Total Yeast and Mold Count*)

UFC - Unidades formadoras de colônias

ZI - Zonas de inibição

1. Introdução

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano e cumpre diversas funções, entre elas a proteção contra agentes externos como a radiação ultravioleta (UV), temperatura, microrganismos e contaminantes ambientais. Por outro lado, com o aumento da esperança média de vida, a sociedade moderna enfrenta novos desafios médicos, sociais e económicos, juntamente com uma crescente pressão em relação à aparência estética. Assim, é importante manter a pele saudável, o que se consegue através de uma correta higiene e aplicação de produtos cosméticos e dermatológicos.

Com a atual consciencialização para questões de sustentabilidade ambiental, nos últimos anos tem-se registado um aumento na procura de novos ingredientes naturais para a indústria cosmética. Neste contexto, as algas marinhas têm-se revelado uma biomassa de interesse dado o seu elevado conteúdo em compostos bioativos com propriedades benéficas para a saúde cutânea (Berthon et al., 2017).

1.1 A macroalga *Bifurcaria bifurcata*

Entre as diversas espécies de algas marinhas, a *Bifurcaria bifurcata* é uma macroalga castanha (Figura 1) que se encontra comumente nas costas da Europa e África. Morfologicamente, possui um talo longo e ramificado que pode atingir até 40 cm de comprimento. Os ramos são achatados e bifurcados, daí o seu nome científico. Cada ramo tem uma forma semelhante a uma colher, com uma extremidade mais larga e arredondada. Esta alga adere às rochas por meio de um disco basal, que atua como um órgão de fixação. O disco basal secreta uma substância adesiva que permite que ela permaneça firmemente ligada às superfícies rochosas, mesmo em condições de correntes fortes (Ross, 1958).



Figura 1. Imagem ilustrativa de *Bifurcaria Bifurcata* (Fonte: Guiry, 2023)

A macroalga *B. bifurcata* tem reprodução sexual e assexual. A reprodução sexual ocorre pela liberação de gâmetas masculinos e femininos na água, onde ocorre a fertilização, enquanto a reprodução assexual ocorre pela formação de esporos que germinam para dar origem a novos indivíduos (Ross, 1958).

Esta alga desempenha um papel importante nos ecossistemas costeiros. Ela fornece abrigo e alimento para uma variedade de organismos marinhos, como moluscos, crustáceos e peixes. Além disso, ajuda a estabilizar os sedimentos e proteger as costas da erosão causada pelas ondas e correntes (Muñoz et al., 2013; Pereira, 2015).

Esta alga tem sido objeto de estudo (Alves et al., 2016) devido ao seu potencial uso na indústria farmacêutica e cosmética. Contém uma ampla variedade de compostos bioativos tais como: terpenos, carotenoides, polifenóis, flavonoides, ácidos gordos, polissacarídeos, entre outros, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais (Alves et al., 2018).

1.2 Potencial antioxidante

Num estudo anterior (Jimenez-Escrig et al., 2012) foram avaliados a composição química e o potencial antioxidante de várias espécies de macroalgas marinhas, entre elas a *B. bifurcata*. Os resultados indicaram que esta macroalga continha altas concentrações de polifenóis, flavonoides e carotenoides, o que lhe conferia uma elevada capacidade antioxidante.

Os antioxidantes são moléculas que têm uma vasta gama de aplicações como agentes redutores, prevenindo processos de oxidação indesejáveis ao interagirem com os radicais

livres e neutralizando-os (Figura 2). Os antioxidantes constituem, portanto, poderosas defesas contra a oxidação dos lípidos e das proteínas, prevenindo os danos celulares e mutações. Estas características conferem às moléculas antioxidantes uma grande variedade de utilizações em diferentes indústrias, como a farmacêutica, a cosmética e a alimentar.

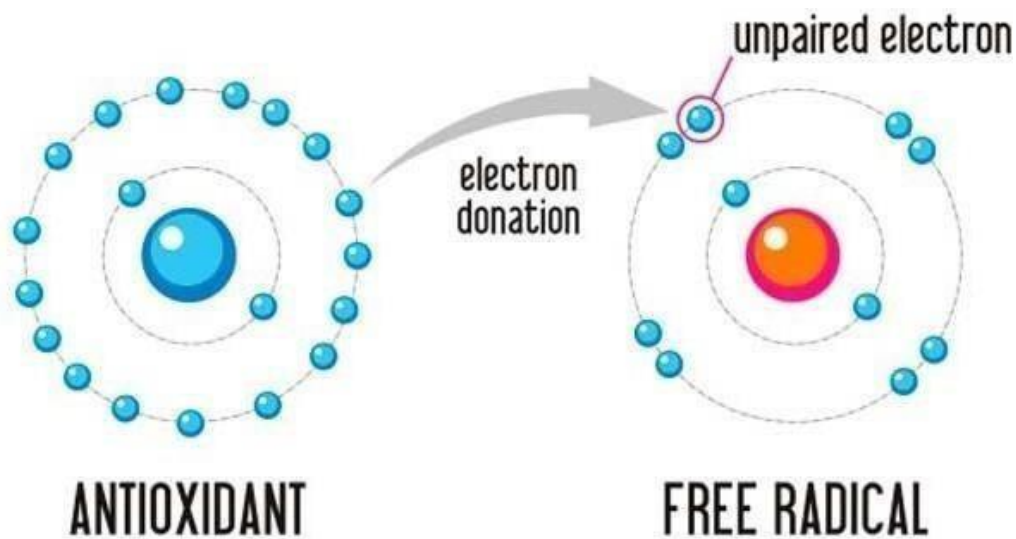


Figura 2. Imagem ilustrativa do efeito antioxidante (Fonte: Chicharro, 2020)

Ao longo da vida, a pele está exposta a agressões químicas geradas pelo seu próprio metabolismo e pelo ambiente, principalmente poluição, substâncias químicas e radiação ultravioleta. Para contrabalançar essas agressões, a pele possui as suas próprias estratégias de defesa que incluem uma série de mecanismos antioxidantes envolvendo moléculas enzimáticas e não enzimáticas (Rippa et al., 2019). Embora seja muito eficaz, esse sistema de defesa muitas vezes fica sobrecarregado, levando à acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionando o stress oxidativo que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade do organismo em neutralizá-las com sistemas antioxidantes endógenos. As ROS podem danificar as células (Figura 3) e contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas como cancro, doenças cardiovasculares e envelhecimento prematuro (Birben et al., 2012).

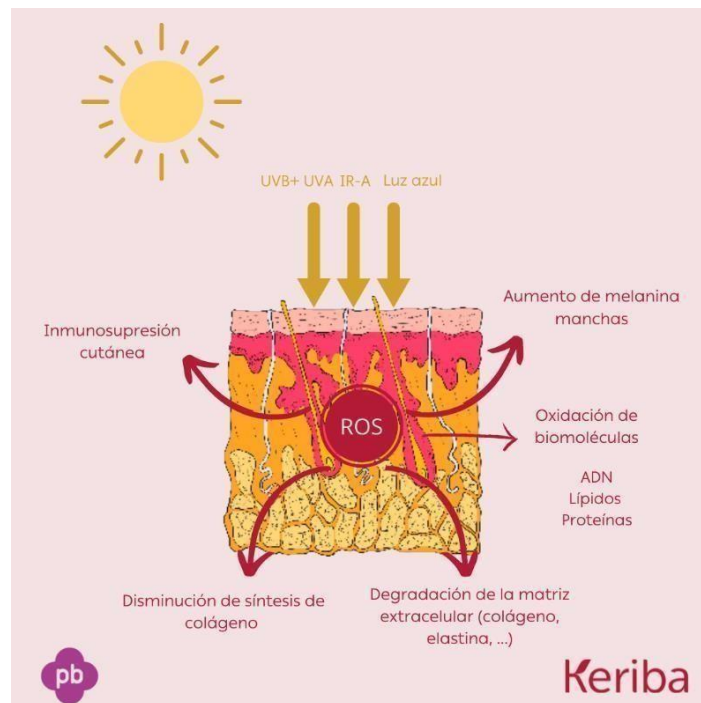


Figura 3. Imagem ilustrativa do efeito das ROS (Fonte: Gosch, 2010)

Os antioxidantes podem ajudar a proteger a pele dos efeitos nocivos do sol e de outras agressões físicas, combatendo os danos causados pelos radicais livres, responsáveis pelos sinais visíveis e invisíveis do envelhecimento. Eles também desempenham um papel crucial na reparação e cicatrização celular, estimulando o crescimento de células e tecidos e auxiliando o organismo no seu processo de autorreparação (Reinke & Sorg, 2012).

Extratos de *B. bifurcata* demonstraram atividade antioxidante em estudos *in vitro*, protegendo as células contra danos oxidativos induzidos por ROS (Martínez et al., 2023). Além disso, tem sido sugerido que os compostos antioxidantes presentes em algas castanhas podem ter propriedades anti-inflamatórias e de antienvelhecimento (Susano et al., 2021). Assim, o estudo dos compostos antioxidantes da *B. bifurcata* representa uma área promissora para a pesquisa no campo da saúde e das formulações dermatológicas.

1.3 Potencial antimicrobiano

Uma pele saudável é constituída por milhares de microrganismos que vivem num equilíbrio simbiótico, formando o microbioma da pele. Estes microrganismos têm um papel fundamental na defesa contra patógenos externos. No entanto, devido a fatores externos ou internos, este microbioma pode ficar desequilibrado levando ao

desenvolvimento de patologias como acne, dermatites, seborreia, etc. (Byrd et al., 2018). Nestes casos, é muitas vezes necessária a aplicação de formulações dermatológicas com propriedades antimicrobianas que promovam um microbioma equilibrado.

Neste trabalho, avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos de *B. bifurcata* em alguns microrganismos da pele (Figura 4), tais como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*, *Cutibacterium acnes* e *Malassezia furfur*. Esses microrganismos são conhecidos por causarem infecções cutâneas, como acne e dermatite seborreica, sendo que, o desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir o crescimento destes e outros microrganismos é uma necessidade urgente, dada a crescente ameaça da resistência bacteriana e fúngica aos agentes antimicrobianos convencionais. Neste sentido, o desenvolvimento de preparações farmacêuticas para aplicação tópica será uma mais-valia no tratamento de condições de desequilíbrio da pele como irritação, inflamação e infecções cutâneas.



Figura 4. Cultura de *Staphylococcus epidermidis* em placa

1.4 Desenvolvimento de formulações

As emulsões cutâneas são um grupo cada vez mais popular de formulações cosméticas devido à sua capacidade única de integrar óleos e água para hidratar eficazmente a pele. São constituídas por 2 fases: a fase oleosa e a fase aquosa (Figura 5). As emulsões são

sistemas heterogêneos estabilizados por tensoativos (agentes emulsificantes), partículas sólidas, viscosantes, conservantes, antioxidantes entre outros. (Marto et al., 2016; Melanie et al., 2021).

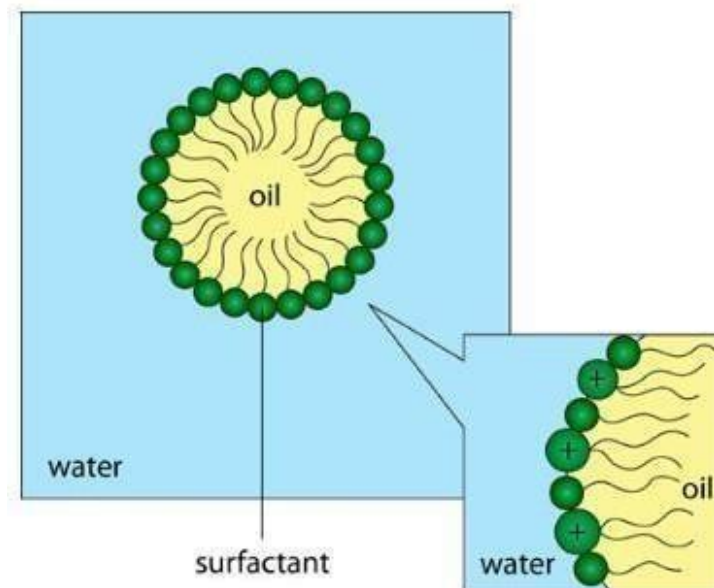


Figura 5. Esquema de emulsão estabilizada por tensoativos (Fonte: Marto et al., 2016)

Os tensoativos têm a capacidade de reduzir a tensão superficial, entre os líquidos não miscíveis, permitindo que eles se misturem de maneira estável. Isso resulta na formação de pequenas gotas de um líquido disperso no outro, criando uma emulsão. Após a formação da emulsão, os tensoativos ajudam a evitar que as fases dispersas coalesçam ou se separem. Isto ocorre porque os tensoativos dispõem-se na interface, formando uma película que impede que as gotas se aglomerem ou se separem. Os tensoativos também desempenham um papel na manutenção do tamanho das gotículas da fase interna, pois evitam gotas menores coalesçam, o que pode melhorar a estabilidade e a aparência da emulsão.

Em resumo, os tensoativos desempenham um papel crítico na formação, estabilização e controle de propriedades de emulsões, permitindo que dois líquidos não miscíveis se misturem de forma estável e homogênea.

Dependendo da concentração e do tipo de tensoativo usado, é possível ajustar a viscosidade da emulsão. Isso é útil em muitas aplicações, como alimentos, produtos cosméticos e farmacêuticos.

Isto levou à incorporação de vários polímeros na formulação para ajudar a estabilizar a emulsão (Morales, 2009).

Uma das principais vantagens da utilização de polímeros nas emulsões cutâneas é a sua capacidade de funcionarem como agentes espessantes, criando uma textura mais luxuosa e cremosa na mistura. Além disso, os polímeros podem ajudar a regular a libertação de ingredientes ativos ao longo do tempo, melhorando assim a eficácia da emulsão durante longos períodos de utilização. As formulações poliméricas para cuidados com a pele podem aumentar o prazo de validade do produto, melhorando a estabilidade da mistura bifásica, garantindo que os ingredientes ativos na emulsão permaneçam potentes (Aranberri et al., 2006).

Podem ser utilizados vários tipos de polímeros na produção de emulsões cutâneas tais como ácidos policarboxílicos, homopolímeros e copolímeros de ácido acrílico, ácido hialurónico, celuloses, gomas, etc.

Os geles são sistemas semissólidos em que uma fase líquida está confinada dentro de uma matriz polimérica tridimensional em que um elevado grau de reticulação (*crosslinking*) físico-química pode estar envolvido. Os polímeros usados para preparar geles incluem as gomas naturais adraganta, pectina, carrageno, agar, ácido algínico e outros materiais sintéticos e semissintéticos como a metilcelulose, a hidroxietilcelulose, a carboximetilcelulose, e os carbómeros, que são polímeros sintéticos de vinilo com grupos carboxílicos ionizáveis. Os geles são preparados por um processo de fusão ou por um procedimento especial requerido pelas características de gelificação do polímero (agente gelificante) (Lachman et al., 2001). Um dos sistemas mais versáteis para veicular ativos topicamente que pode ser formulado é o gel. Estes são excelentes veículos de substâncias ativas para várias vias de administração e são compatíveis com uma grande variedade de substâncias diferentes.

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa (9.7, 2011) os geles são constituídos por líquidos gelificados com agentes gelificantes apropriados. Os geles lipófilos (oleogeles) são preparações cujo excipiente é geralmente constituído por parafina líquida adicionada de compostos polietilénicos, ou óleos gordos gelificados pela sílica coloidal, ou sabões de alumínio ou de zinco. Os geles hidrófilos (hidrogeles) são preparações cujos excipientes são habitualmente a água, a glicerina e o propilenoglicol gelificados com agentes gelificantes apropriados, como os poloxâmeros, amido, os derivados da celulose,

os carbómeros ou os silicatos de magnésio-alumínio. Trata-se de sistemas semirrígidos nos quais o movimento do meio dispersante se encontra restrito pelo entrelaçamento tridimensional entre as partículas ou macromoléculas solvatadas da fase dispersa. O aumento da viscosidade causado pelo entrelaçamento e consequente fricção interna é responsável pelo estado semissólido. Um gel pode consistir em cadeias de macromoléculas emaranhadas e torcidas sobre si próprias e interligadas por forças de Van der Waals para formar regiões amorfas e cristalinas ao longo do sistema (exemplo: goma tragacanta e carboximetilcelulose) (Allen, 2008).

Durante o desenvolvimento e produção é necessário o controlo de qualidade das matérias primas e do material de embalagem bem como o controlo do processo e do produto acabado. Estes controlos incluem: análises físico-químicas, análises microbiológicas e estudos de estabilidade (durante o desenvolvimento). Dentro destas análises, e a título de exemplo, podem ser avaliadas as características organolépticas, a viscosidade, pH, tamanho das partículas dispersas, o doseamento de algumas substâncias, etc.

O principal objetivo desta dissertação foi avaliar o efeito de extratos da macroalga *Bifurcaria bifurcata* no crescimento de alguns microrganismos pertencentes ao microbioma da pele, nomeadamente, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*, *Cutibacterium acnes* e *Malassezia furfur*, com vista ao desenvolvimento e caracterização de formulações bioativas para aplicação dermatológica.

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver formulações dermatológicas contendo extratos obtidos da alga castanha *B. bifurcata* recolhida na costa de Peniche. Para tal, foram realizadas diferentes extrações, usando como solventes água, glicerol e etanol: água (80:20). O potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos foi avaliado por diversos ensaios *in vitro*. A citotoxicidade dos extratos mais bioativos foi avaliada numa linha celular da pele (células HaCaT) e o seu perfil químico analisado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN).

Espera-se que os resultados deste estudo possam contribuir para a colocação no mercado de novas formulações de aplicação tópica com extratos de *B. bifurcata* com funções adequadas e benéficas para o cuidado da pele.

2. Materiais e Métodos

2.1. Recolha e preparação da alga

A macroalga *Bifurcaria bifurcata* foi recolhida na Praia do Baleal (39°37'68.32" N 9°34'01.12" W) Peniche, Portugal, sendo imediatamente transportada para o laboratório de Biologia do MARE-Politécnico de Leiria. A macroalga foi então lavada com água do mar de modo a remover organismos invertebrados, areia e detritos e, posteriormente, com água destilada. Após a lavagem, a macroalga foi pesada, embalada, congelada a -20 °C (Thermo, Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, EUA) e liofilizada (Scanvac Cool Safe, LaboGene, Lyngø, Denmark). Seguiu-se a trituração (moinho Moulinex 123, Moulinex Portugal, Lisboa) e armazenamento da biomassa em local fresco e seco e ao abrigo da luz, até se dar início ao processo de extração.

2.2. Extração da alga

A macroalga *B. bifurcata* foi submetida a diferentes metodologias de extração, partindo-se de alga seca pulverizada, sendo a razão biomassa: solvente de 1:10 (p/v). Para a obtenção do extrato aquoso, usou-se água ultrapura obtida num sistema MilliQ (Advantage A10 Milli-Q, Merck, Darmstadt, Alemanha). A extração decorreu sob agitação constante a cerca de 25 °C, durante 4 horas. Seguiu-se uma filtração em papel de filtro nr. 4 (Filter-Lab, Barcelona, Espanha) e, posteriormente, o filtrado foi centrifugado (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 4000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante aquoso foi congelado a -20 °C e liofilizado obtendo-se o extrato aquoso (E1). O mesmo procedimento foi usado para a obtenção do extrato de glicerol (Scharlab, Barcelona, Espanha). Após centrifugação (4000 rpm, 4 °C, 10 min), o sobrenadante contendo o extrato de glicerol (E2) foi refrigerado a 5 °C.

O extrato hidroalcoólico foi obtido com etanol (AGA, Prior Velho, Portugal) e água ultrapura (80:20), decorrendo a extração à temperatura ambiente, durante 4 horas, sob agitação constante. Após este período, o extrato foi filtrado (papel de filtro nr. 4) e levado à secura, sob vácuo e baixa temperatura (40 °C), em evaporador rotativo (IKA HB10, VWR International, Alfragide, Portugal). O extrato hidroalcoólico seco foi ressuspenso em água quente (75 °C) e filtrado, de onde resultou uma fração líquida aquosa e uma fração sólida insolúvel retida no filtro. A fração aquosa foi congelada a -20 °C e liofilizada,

obtendo-se o extrato aquoso seco (E3). Por sua vez, a fração insolúvel retida no filtro foi seca no *Speed-Vac* (Eppendorf Concentrator Plus, Leicestershire, UK), obtendo-se um extrato seco lipofílico (E4).

Para os bioensaios, o extrato E1 foi dissolvido em água ultrapura a uma concentração de 100 mg/mL, E2 foi igualmente dissolvido em água, mas com uma diluição de 1:1. Os extratos E3 e E4 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 100 mg/mL.

2.3. Atividade biológica dos extratos

2.3.1. Atividade antioxidante

O potencial antioxidante de *B. bifurcata* foi avaliado através do método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) que estima a capacidade dos extratos em reduzir o íon Fe^{3+} a Fe^{2+} (Benzie & Strain, 1996). A capacidade antioxidante foi relacionada com o conteúdo de fenóis totais, TPC (*Total Phenolic Content*), determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) com algumas modificações, de acordo com Freitas et al. (2020).

Para realizar o ensaio, foi feita uma diluição de cada extrato na proporção de 1:10, exceto o extrato E3, que foi diluído para metade. Em seguida, foram adicionados 2 μL das amostras a 158 μL de água destilada em uma microplaca de 96 poços, seguido da adição de 10 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e, finalmente, 30 μL de Na_2CO_3 a 20% (p/v). A mistura foi deixada em incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. A absorvância foi medida a 755 nm no leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek® Instruments, Winooski, Vermont, EUA). Para a curva de calibração, o floroglucinol foi usado como padrão e o teor em fenóis totais expresso em equivalentes de floroglucinol por grama de extrato seco (mg PE/g de extrato).

O método FRAP foi realizado como descrito previamente (Benzie & Strain, 1996), com pequenas modificações adaptadas para microescala (Freitas et al., 2020). O método é baseado na redução do íon férrico por doação de elétrons, normalmente mediada pela presença de compostos antioxidantes, formando uma cor azul na presença desses compostos. O reagente FRAP foi preparado com 2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina (TPTZ) (10 mM) em HCl 40 mM, tampão acetato 300 mM (pH 3,6) e cloreto de ferro III (FeCl_3)

20 mM, sendo utilizado como solução férrica na proporção de 10:1:1 e incubado a 37 °C durante 30 minutos, no escuro. Cada um dos extratos (2 µL) de *B. bifurcata* foi adicionado ao reagente FRAP (198 µL) numa microplaca de 96 poços. Após o tempo de incubação, a absorvância foi medida a 593 nm usando o leitor de microplacas acima referido. O FeSO₄ foi utilizado como padrão para a curva de calibração, sendo os resultados expressos em equivalentes µM de FeSO₄ por grama de extrato seco (µM de FeSO₄/g de extrato).

2.3.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos de *B. bifurcata* foi avaliada em quatro bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (DSM 1104), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 1798), *Staphylococcus hominis* (DSM 20328), *Cutibacterium acnes* (DSM 1897) e num fungo, *Malassezia furfur* (DSM 6170) adquiridos ao biobanco do Instituto Leibniz DSMZ-Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (DSMZ). As condições e meios de cultura utilizados foram distintas e descrevem-se de seguida.

O crescimento de *S. aureus* ocorreu em meio Luria-Bertani (LB) (VWR-BDH Chemicals-Prolabo, Lovain, Bélgica) a 37 °C. Os microrganismos *S. epidermidis* e *S. hominis* foram cultivados em meio de tripticase soja (VWR-BDH Chemicals-Prolabo, Lovain, Bélgica) com extrato de levedura (VWR-BDH Chemicals-Prolabo, Lovain, Bélgica) (TSYE), a 37 °C, assim como *C. acnes*, mas esta última sob condições anaeróbicas com a ajuda de um kit de anaerobiose (Millipore, Darmstadt, Alemanha). O fungo *M. furfur* foi cultivado a 30 °C em meio Leeming-Notman. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e a atividade antimicrobiana de cada extrato (200 µg/mL) foi determinada durante a fase exponencial de cada microrganismo, sendo esse crescimento acompanhado espectrofotometricamente a 600 nm. Como controlos positivos usou-se ciprofloxacina para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. hominis*, oxitetraciclina para *C. acnes*, e anfotericina B para *M. furfur*. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição do crescimento em relação ao controlo, sendo que, para o extrato E1, o controlo foi o meio de crescimento com microrganismo, para E2 foi o meio de crescimento com microrganismo e glicerol e, finalmente, para os extratos E3 e E4, o controlo foi o meio de crescimento com microrganismo e DMSO. Para os extratos que inibiram o crescimento dos microrganismos em mais de 50% foi determinada a curva dose-resposta (1000, 300, 100, 30, 10 µg/mL).

2.3.3. Estudo dos mecanismos de ação

2.3.3.1 Danos no ADN

O potencial para promover danos no ADN foi realizado de acordo com a metodologia descrita em Pinteus et al. (2020). Os extratos que apresentaram um maior potencial em inibir o crescimento microbiano (E2 e E4) foram testados quanto aos seus possíveis mecanismos de ação. Para tal, foram adicionados 5 μL de DNA plasmídeo (100 ng/mL) a 2 μL de extrato de alga e 13 μL de água. Como controlos negativos foram usados água ou DMSO nas mesmas proporções e, como controlo positivo, ciprofloxacina nas concentrações de 1, 0.1 e 0.01 $\mu\text{g/mL}$. Estas misturas foram incubadas a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, adicionaram-se 4 μL de “*Loading dye*” e foi realizada uma electroferese em gel de agarose (0.8%) com 5 μL de “*Red safe*” (Thermofisher, Waltham, Estados Unidos) durante 45 min a 85 V.

2.3.3.2 Análise da permeabilidade da membrana

A análise dos danos membranares foi efetuada de acordo com Pinteus et al. (2020). Culturas “*overnight*” de *S. aureus* e *S. epidermidis*, foram centrifugadas a 4000 rpm durante 5 min para remover o meio de cultura e lavadas suavemente duas vezes com solução salina estéril a 0.85%. A seguir, foi preparada uma solução onde a absorvância da cultura do microrganismo foi ajustada para $\text{Abs}_{600} = 0,5-0,6$ com a utilização de solução salina estéril a 0.85%.

Para realizar o teste, foram adicionados 10 μL de extrato a 990 μL de solução bacteriana. O controlo negativo foi realizado com 10 μL de DMSO e 990 μL de solução bacteriana, sendo os brancos preparados com solução salina e os extratos de alga. Para cada um deles realizou-se diluição sucessiva e posterior incubação a 37 °C durante 4 horas. Foi efetuado um controlo positivo, submetendo a solução teste a um tratamento térmico (100 °C, 10 min) para induzir a permeabilidade total da membrana. Todas as suspensões foram transferidas para uma microplaca preta e incubadas com 1 μL de *Sytox Green* durante 10 minutos, no escuro. Com a ajuda de um leitor de microplacas de fluorescência foi quantificada a fluorescência resultante do corante ligado ao ADN, com comprimentos de onda excitação/emissão de 535/595 nm. O dano na membrana (*membrane damage*) foi

determinado utilizando as seguintes equações:

$$(1) TMD (\%) = \left[\left(\frac{F_{sample} - F_{blank}}{F_{ctr(+)}} \right) \right] \times 100$$

$$(2) BMD (\%) = \left[\left(\frac{F_{ctr(-)}}{F_{ctr(+)}} \right) \right] \times 100$$

$$(3) Membrane Damage (\%) = \%TMD - \%BMD$$

sendo: *TMD*, o dano da membrana provocado pelos extratos; *F_{sample}*, a fluorescência da solução bacteriana com extratos; *F_{blank}*, a fluorescência dos extratos em solução salina; *F_{ctr (+)}*, a fluorescência do controlo positivo; *BMD*, o dano basal resultante do processo (com glicerol ou DMSO); *F_{ctr(-)}*, a fluorescência da solução bacteriana.

2.4. Caracterização química dos extratos

O perfil químico dos extratos com maior potencial bioativo foi analisado por ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN). As amostras foram dissolvidas (5 mg/mL) em solventes deuterados (CDCl₃, MeOD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e os espectros obtidos a 25 °C num equipamento Bruker Avance 400 (Bruker, Madrid, Espanha) a 400.13 MHz. Os desvios químicos (δ) são expressos em ppm e referenciados ao sinal residual do solvente.

2.5. Avaliação da citotoxicidade dos extratos

2.5.1. Cultura e manutenção celular

A linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT-300493, Cell Lines Services, Alemanha) foi cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium- high glucose*) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS) e 1% de uma solução de antibiótico/antimicótico (anfotericina B, 0.25 mM; penicilina, 60 mM; estreptomina, 100 mM). O crescimento decorreu numa câmara a 37 °C com 5% CO₂ e 95% humidade. Após atingirem a confluência, as células foram dissociadas com tripsina-EDTA. A subcultura foi realizada de acordo com as instruções do biobanco após as células atingirem 80–85% de confluência.

2.5.2. Viabilidade celular

A citotoxicidade das frações bioativas de *B. bifurcata* foi avaliada através do ensaio colorimétrico 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazólio (MTT) como descrito por Freitas et al. (2020). Este ensaio baseia-se na redução dos sais de tetrazólio (cor amarela) por desidrogenases metabolicamente ativas (células viáveis) a cristais de formazano (cor roxa).

As células HaCat foram semeadas em placas de 96 poços (4×10^4 células/poço) e as amostras (100 μ L, 1000 μ g/mL) foram incubadas com as células durante 24 h a 37 °C, em câmara com 5% de CO₂. Findo o período de incubação, o meio foi removido e as células lavadas com 200 μ L de tampão PBS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Após lavagem, adicionaram-se 100 μ L de MTT (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (0,5 mg/mL) às células e as mesmas foram incubadas no escuro, durante 1 h, na incubadora de CO₂. Findo este período, aspirou-se o MTT e adicionaram-se 100 μ L de DMSO de modo a solubilizar os cristais de formazano produzidos. Os resultados foram obtidos após a dissolução total dos cristais, através da leitura de absorvância a um comprimento de onda de 570 nm num leitor de microplacas (Epoch, BioTek® Instruments, Winooski, VT, EUA). Os resultados são apresentados em percentagem de células viáveis em relação ao controlo.

2.6. Preparação das formulações

A produção de emulsões cutâneas requer várias etapas. Em primeiro lugar, as fases oleosa e aquosa (Tabela 1) são aquecidas em banho-maria a 80 °C. Após aquecimento e homogeneização, a fase oleosa é adicionada gradualmente à fase aquosa sob agitação até se obter uma emulsão a qual é homogeneizada (Ultra Turrax durante 30 segundos) e agitada até total arrefecimento.. Finalmente a emulsão é acondicionada em boiões para posteriores análises.

Tabela 1. Composição da emulsão placebo

Nome comercial	INCI	% (100 gr)
TegoCare PSC3 (O)	Polyglyceryl-3 Dicitrate/Stearate	3
TegoAlkanol 1618 (O)	Cetearyl Alcohol	7
Parafina líquida (O)	Paraffinum liquidum	2.5
TegoSoft DO (O)	Decyl Oleate	4.5
Óleo amêndoas (O)	<i>Prunus amygdalus dulcis</i> Oil	5
Nipazol (O)	Propylparaben	0.02
Glicerina (A)	Glycerin	5
Água purificada (A)	Water	72.8
Nipagin (A)	Methylparaben	0.18

(O) fase oleosa; (A) fase aquosa.

No caso das emulsões que contêm os extratos promissores de *B. bifurcata* (E2 e E4), o procedimento para cada uma delas é diferente devido à sua solubilidade. Assim, o extrato E2, sendo um extrato líquido solúvel, é adicionado (1%) diretamente na emulsão quando esta já está homogeneizada.

Por outro lado, para E4, sendo um extrato sólido, foi feita uma pré-formulação (Tabela 2) para que o extrato seja solubilizado. Esta pré-formulação foi incorporada na Emulsão Placebo (Tabela 3), para se poder comparar os dois. No final, foi retirado 1% da pré-formulação e adicionado à emulsão homogeneizada. O peso do extrato é compensado tirando essa percentagem de água.

Tabela 2. Pré-formulação da emulsão com extrato apolar (E4)

Nome comercial	INCI	% (100 gr)
Parafina líquida	Paraffinum liquidum	30
Glicerina	Glycerin	20
TAGAT CH40	PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	20
Água purificada	Water	20
Extrato Apolar – E4	-	10

Tabela 3. Pré-formulação do extrato apolar (E4).

Nome comercial	INCI	% (100 gr)
Parafina líquida	Paraffinum liquidum	30
Glicerina	Glycerin	20
TAGAT CH40	PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	20
Água purificada	Water	20

No caso dos geles, o processo é diferente: o agente gelificante (Solagum TARA) é adicionado lentamente, sob agitação contínua, às restantes matérias-primas apresentadas na Tabela 4. Neste caso, também o extrato de glicerol (1%) é adicionado diretamente quando o gel estiver formado.

Tabela 4. Composição do gel placebo do extrato de glicerol

Nome comercial	INCI	% (100 gr)
Solagum TARA	Caesalpinia Spinosa Gum	1.5
Água estéril	Água	85.3
Glicerina	Glycerin	8
Etanol	Alcohol	5
Nipagin	Methylparaben	0.18
Nipasol	Propylparaben	0.02

Para o extrato apolar (0.1%), foi incorporada no gel a pré-formulação apresentada na Tabela 3, tal como na emulsão.

2.7. Avaliação das formulações

2.7.1 Avaliação das características organolépticas

A avaliação organoléptica das formulações dermatológicas envolve a avaliação das propriedades sensoriais, como o odor, a cor, a textura e o aspeto do produto. Estas características organolépticas foram testadas 48 h depois de serem feitas e comparadas as formulações placebo com as que têm extrato para garantir que as propriedades sensoriais são avaliadas de forma consistente.

2.7.2 Determinação do pH

As determinações do pH foram feitas por leitura direta, com recurso ao potenciómetro equipado com um eléctrodo de vidro combinado (pH Meter 700).

2.7.3 Determinação do tamanho da gotícula das emulsões

Para medir o tamanho das gotículas das emulsões cutâneas é utilizado o Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido). O Mastersizer 2000 utiliza a difração laser. A amostra é dispersa numa solução aquosa uniforme e projetada com um laser. A luz dispersa é detetada em diferentes ângulos, e as flutuações na intensidade da luz permitem determinar o tamanho das partículas. Estes dados são depois analisados para calcular o tamanho das partículas que criaram o padrão de dispersão.

2.7.4 Determinação de parâmetros reológicos das formulações

A viscosidade e elasticidade aparente foram avaliadas com recurso a um reómetro. Este instrumento é utilizado para medir a viscosidade e a elasticidade de amostras viscoelásticas e permite a obtenção de valores numéricos que refletem as propriedades das amostras. O procedimento foi realizado com a utilização de um cone CP4-40, com temperatura de 25 °C, com os parâmetros de 0,1, a 100 s⁻¹, e 10 amostras por década e os valores obtidos são analisados para determinar a viscosidade. Para medir a elasticidade, foi inicialmente feito um varrimento da amplitude da deformação para verificar quando G' (aquoso) e G'' (sólido) se encontra de maneira paralela. Seguidamente, a elasticidade foi determinada, submetendo as amostras a uma percentagem de tensão de corte de 0.15%.

2.8. Controlo microbiológico das formulações

O controlo microbiológico foi realizado de acordo com as normas ISO em vigor. A contagem total de microrganismos aeróbios (TAMC) foi determinada segundo a norma ISO 21149:2017, enquanto a contagem total de bolores e leveduras (TYMC) foi determinada segundo a norma ISO 16212:2017.

Para efetuar as contagens microbianas, pesaram-se 5 g da amostra e diluíram-se (1/10) em 50 mL de meio de cultura Eugon Broth. A mistura foi agitada durante 30 minutos a 37 °C e, em seguida, 100 uL da mistura foram espalhados, utilizando o método de espalhamento superficial em meio de cultura Eugon Agar para TAMC e meio de cultura Sabouraud dextrose agar para TYMC.

O meio de cultura Eugon agar foi incubado durante 72 horas a 30-35 °C, enquanto o meio de cultura SDA foi incubado durante 5 dias a 20-22 °C. Após a incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e a contagem microbiana foi calculada com base no fator de diluição.

Os meios de cultura utilizados foram da marca Biokar. Eugon agar lote# 0060987, Eugon Broth lote# 006944, e SDA lote# 0076745.

2.9. Tratamento de dados e análise estatística

Diferenças estatísticas entre as amostras e cada um dos controles foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) com os testes de comparação múltipla de Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 0.05 ($p < 0.05$). Foram realizados triplicados para cada amostra em três ensaios independentes. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM).

3. Resultados

3.1. Atividade antioxidante

Os extratos de glicerol (E2) e aquoso (E1) apresentaram o maior teor em fenóis totais, com 352.39 mg PE/g extrato e 323.89 mg PE/g extrato, respetivamente, logo seguidos pela fração apolar (E4) do extrato hidroalcoólico (257.22 mg PE/g extrato). Já a fração aquosa (E3) proveniente do extrato hidroalcoólico foi a que apresentou menor conteúdo fenólico (77.99 mg PE/g extrato). No ensaio FRAP, a maior capacidade de redução do ião Fe^{3+} foi evidenciada pelos extratos E4 (238.50 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g extrato}$) e E1 (205.50 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g extrato}$), tendo os extratos E2 e E3 uma capacidade antioxidante inferior, mas muito próxima (188.83 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g extrato}$).

3.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos quatro extratos de *B. bifurcata* foi avaliada em alguns microrganismos que fazem parte da microbiota da pele, as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis* e *Cutibacterium acnes*, e o fungo *Malassezia furfur*. Os resultados obtidos encontram-se evidenciados na Figura 6.

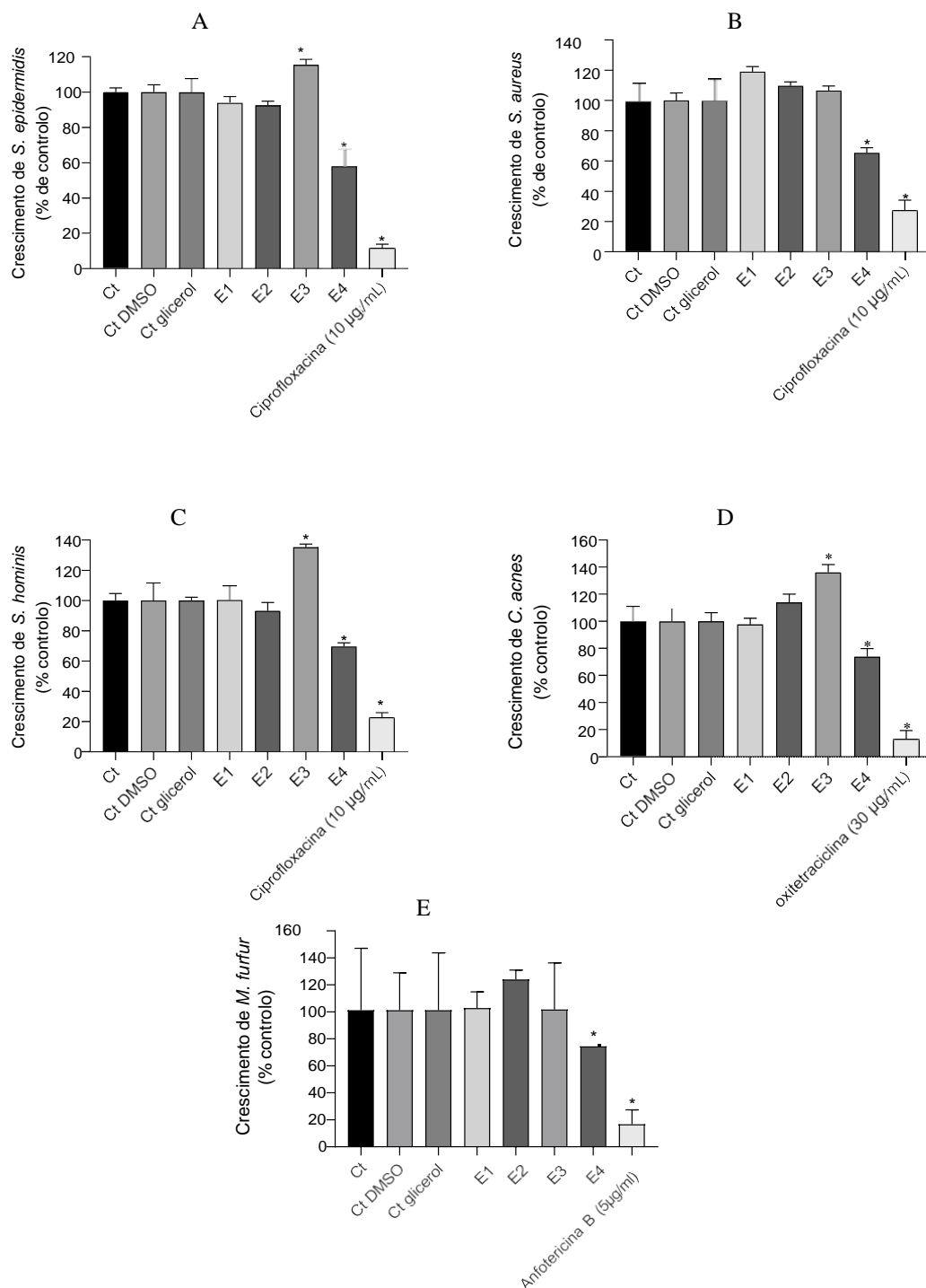


Figura 6. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Bifurcaria bifurcata* (1000 µg/mL) contra *Staphylococcus epidermidis* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Staphylococcus hominis* (C), *Cutibacterium acnes* (D) e *Malassezia furfur* (E). Os resultados são expressos como porcentagem do controle. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média (SEM) (n=3). * representa diferenças significativas (ANOVA, Teste Dunnett, $p < 0,05$), quando comparadas com o controle.

O extrato apolar (E4) apresentou resultados promissores, mostrando uma inibição de 42% contra *S. epidermidis*, enquanto E3 promoveu o crescimento do microrganismo em 15%.

Foi também observada uma ligeira inibição do crescimento promovida pelos extratos E1 e E2 em 6% e 8%, respectivamente.

O extrato E1 não apresentou atividade antimicrobiana contra *C. acnes*, tendo o extrato E3 promovido o crescimento desta bactéria em 35%. Apenas o extrato E4 inibiu o crescimento deste microrganismo em cerca de 26%. Este extrato inibiu igualmente o crescimento de *S. aureus* e de *S. hominis* em cerca de 33% e 32%, respectivamente.

Em relação ao fungo *M. furfur*, os extratos de *B. bifurcata* não foram tão efetivos contra este microrganismo, já que E1, E2 e E3 não tiveram qualquer efeito. Apenas o extrato E4 revelou combater o crescimento do fungo em cerca de 27%.

Em suma, a fração mais lipofílica (E4) do extrato hidroetanólico destacou-se pelo seu efeito inibidor nos cinco microrganismos testados. Assim, o extrato E4 prosseguiu para novos ensaios com o objetivo de estudar o seu mecanismo de ação.

3.3. Mecanismos de ação

3.3.1 Danos no ADN

Um dos possíveis mecanismos de ação de um agente antimicrobiano é a degradação do ADN dos microrganismos. Neste estudo, a amostra com maior potencial antimicrobiano foi avaliada quanto à sua capacidade de promover danos no ADN dos microrganismos estudados. Os resultados estão apresentados na Figura 7.

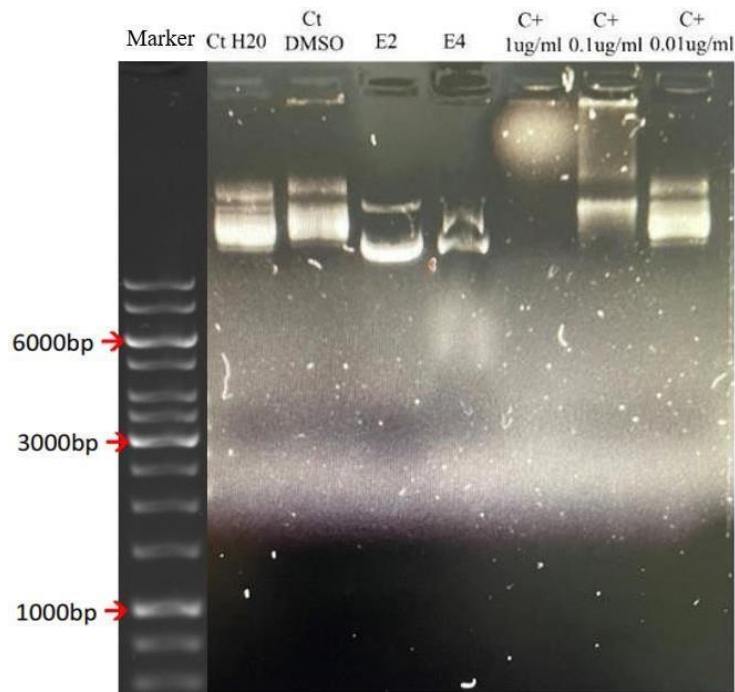


Figura 7. Electroforese em gel de agarose de ADN plasmídeo exposto a extratos de *Bifurcaria bifurcata* (E2 e E4), DMSO e ciprofloxacina. O gel foi visualizado após coloração com *Red safe* e irradiação UV. O controlo negativo foi feito com ADN exposto a DMSO. As linhas C+ correspondem ao ADN plasmídeo exposto à ciprofloxacina.

Na Figura 7 pode observar-se que o extrato apolar induziu quebras no ADN dado que as bandas são muito menos intensas, comparativamente ao controlo com DMSO e com água, observando-se uma névoa que corresponde a pequenos fragmentos que foram arrastados ao longo da eletroforese.

3.3.2. Análise da permeabilidade da membrana

Para perceber os possíveis mecanismos de ação associados ao potencial antimicrobiano dos extratos ativos (E2 e E4) foi realizada uma análise de permeabilidade da membrana com o fluoróforo *Sytox Green*. Neste método, caso a membrana celular esteja afetada, este fluoróforo consegue penetrar a membrana e liga-se ao ADN emitindo fluorescência. Os resultados são apresentados na Figura 8.

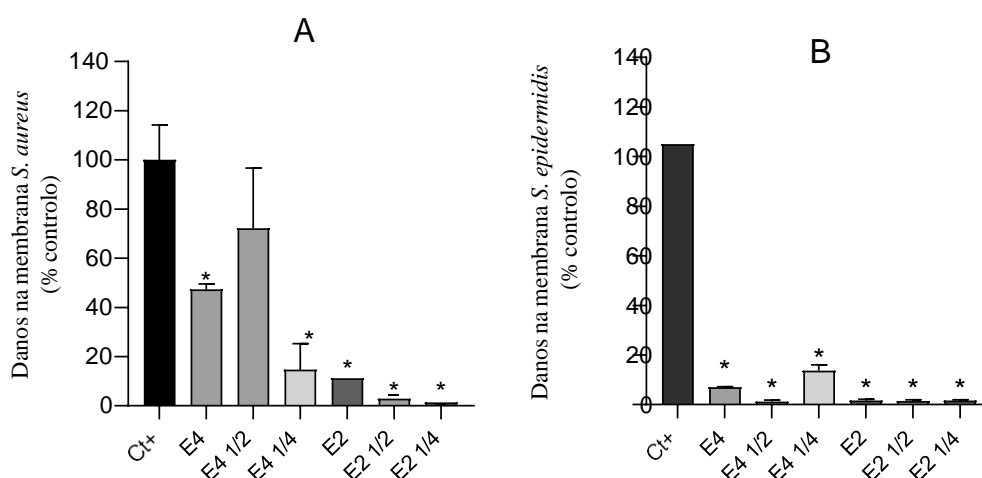


Figura 8. Análise da permeabilidade da membrana de *S. aureus* (A) e *S. epidermidis* (B) em presença dos extratos E2 e E4 de *Bifurcaria bifurcata*, sendo E4 $\frac{1}{2}$ a metade da concentração inicial, e E4 $\frac{1}{4}$ a concentração inicial diluída 4 vezes. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de dois ensaios independentes. Os símbolos (*) representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste de Dunett, $p < 0,05$) quando comparados ao controlo (danos decorrentes do procedimento e DMSO).

Na Figura 8 pode observar-se que o extrato E4 (fração lipofílica) induziu danos significativos na membrana em *S. aureus* e em *S. epidermidis*. No caso de *S. aureus*, o extrato E4 (1 mg/mL) induziu danos de membrana em cerca de 42% comparativamente ao controlo, tendo E4 $\frac{1}{2}$ provocado o maior dano percentual (72%). Relativamente ao extrato de glicerol (E2), os maiores danos na permeabilidade da membrana foram induzidos pela concentração de IC₅₀ (10.4% danos), seguido por $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (2.5% danos).

Relativamente a *S. epidermidis*, E4 ($\frac{1}{4}$ IC₅₀) induziu cerca de 13.7% de danos de membrana, sendo que o extrato E2 não induziu danos.

3.4. Caraterização química dos extratos bioativos

Recorreu-se à espetroscopia de ressonância magnética nuclear de protão para uma caraterização preliminar do perfil químico do extrato mais promissor (E4) proveniente da fração mais apolar do extrato hidroetanólico. O espetro obtido encontra-se ilustrado na Figura 9.

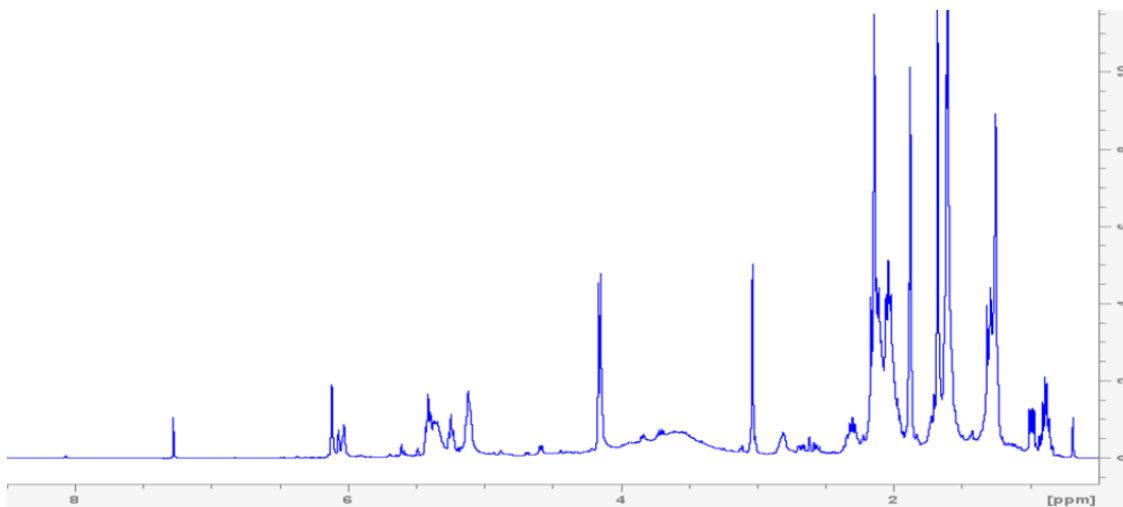


Figura 9. Espectro de ^1H RMN (400.13 MHz) em CDCl_3 do extrato E4 de *Bifurcaria bifurcata*

Observaram-se sinais intensos atribuídos a prótons de grupos metilo ($-\text{CH}_3$), entre 0.9-1.9 ppm, metileno ($-\text{CH}_2$) a 2.0-4.1 ppm, e metino ($-\text{CH}$) a 4.1-6.2 ppm característicos de diterpenos lineares tais como, eleanolone, eleanonal ou eleanodiol (Smyrniotopoulos et al., 2020; Silva et al., 2019; Culioli et al., 1999). Estes compostos são reconhecidos como sendo majoritários, não apenas nesta espécie, mas também em outras espécies do género *Bifurcaria*.

Também o extrato de glicerol (E2) foi analisado por ^1H RMN, no entanto, a fraca intensidade dos sinais obtidos, sobretudo na região dos prótons aromáticos (6.0-8.0 ppm) característicos de polifenóis, sugere que estes compostos se encontram em concentrações muito baixas em relação aos sinais intensos do glicerol.

3.5. Citotoxicidade em queratinócitos humanos

O efeito citotóxico dos dois extratos mais promissores de *B. bifurcata* foi avaliado *in vitro* em células HaCaT, com recurso ao método MTT.

À concentração máxima (1000 $\mu\text{g/mL}$), e nas condições do ensaio, nenhum dos dois extratos apresentou citotoxicidade na linha celular testada (Figura 10).

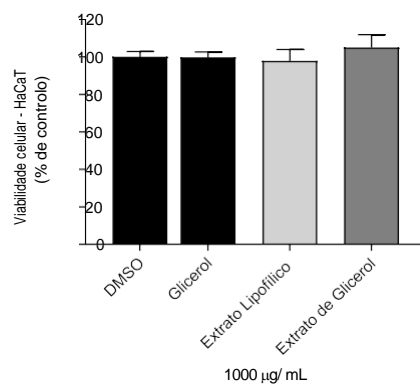


Figura 10. Viabilidade celular (células HaCaT) após 24 h de incubação com os extratos E2 e E4 (1000 µg/mL) de *Bifurcaria bifurcata*. Os valores em cada coluna são representativos da média ± o erro padrão da média de três ensaios independentes feitos em triplicado.

3.6. Avaliação das características organolépticas e determinação de pH

A avaliação organoléptica das formulações dermatológicas envolve a avaliação das propriedades sensoriais da formulação, como o odor, o aspeto, a textura e a cor. Estas características foram avaliadas após um período de tempo de 48 h, para garantir que estão estabelecidas e são consistentes. Além disso, as formulações com placebo são comparadas com as que contêm os extratos para garantir uma avaliação exata e consistente das propriedades sensoriais.

Depois passadas as 48 h quando comparadas as formulações placebo com as que contem extrato (Figura 11) corroborou-se que as formulações apresentaram um estado homogêneo, cor brilhante, odor agradável, e uma textura suave depois da aplicação por via tópica, existiram diferenças na cor pois os extratos tinham a cor característica da alga.

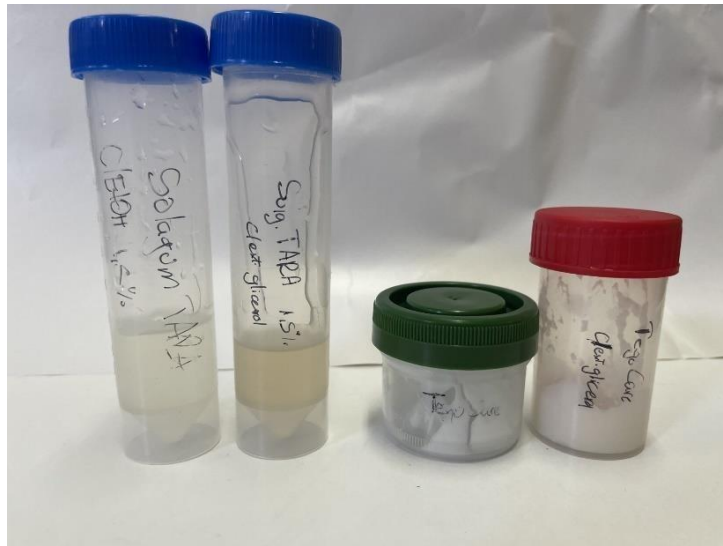


Figura 11. Imagens dos geles e das emulsões (fonte própria)

Para o valor do pH das formulações é importante lembrar que a pele humana tem um pH naturalmente ácido, com um pH entre 4.5 e 5.5. Portanto, as formulações dermatológicas devem ter um pH semelhante nesse intervalo para não comprometer a barreira protetora da pele. Se a formulação tiver um pH superior a 5.5 como na primeira medição, pode-se adicionar um ácido para diminuir o pH, como por exemplo ácido cítrico, ácido láctico ou ácido glicólico.

Tabela 5. Valores do pH das formulações.

Formulação	pH inicial	pH final
Emulsão placebo glicerina (E2)	8.44	4.90
Emulsão (E2)	8.64	5.13
Emulsão placebo apolar (E4)	8.60	5.26
Emulsão (E4)	8.47	5.04
Gel placebo glicerina (E2)	8.97	5.45
Gel (E2)	8.74	5.33
Placebo apolar (E4)	8.94	5.49
Gel (E4)	8.63	5.37

Pode-se ver na Tabela 5 que os valores do pH das formulações placebo e com extrato não mudaram, o que quer dizer que o extrato não é um fator que desestabilize o pH da formulação, então é importante adicionar os ingredientes corretos em quantidades adequadas e ajustar o pH lentamente para evitar alterações bruscas que possam prejudicar a estabilidade da formulação. Neste caso foi utilizado uma gota de ácido cítrico para que o pH final das formulações fique de acordo com o pH fisiológico da pele.

3.7 Determinação do tamanho da gotícula das emulsões

O tamanho da gotícula das emulsões foi analisado para saber a estabilidade de cada uma das emulsões, como é apresentado na Figura 12.

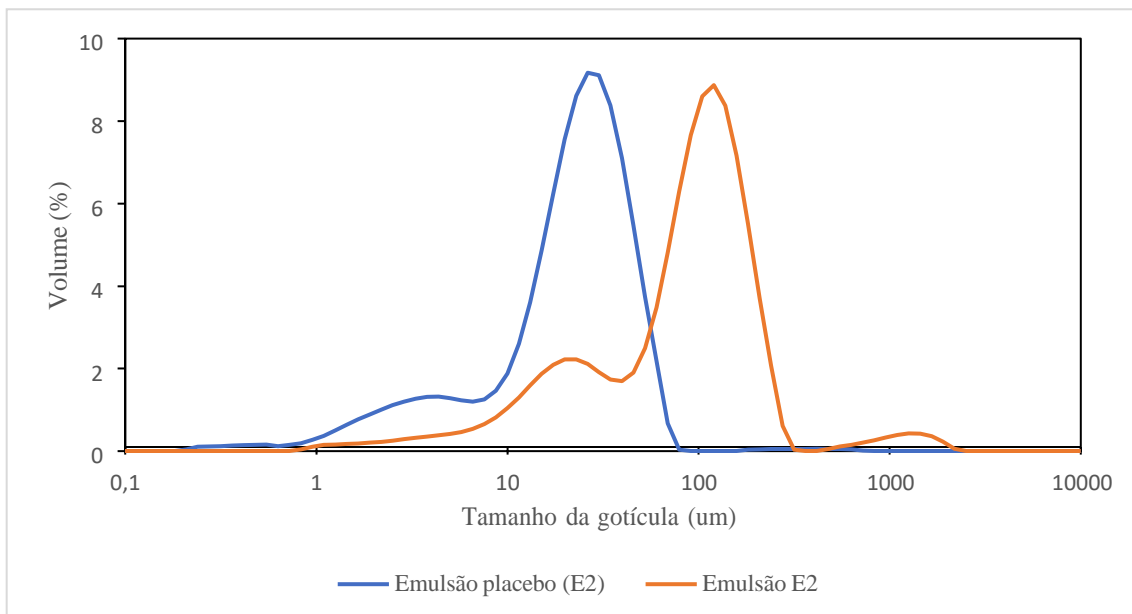


Figura 12. Medição do tamanho da gotícula do extrato de glicerina após 48h de preparação das emulsões

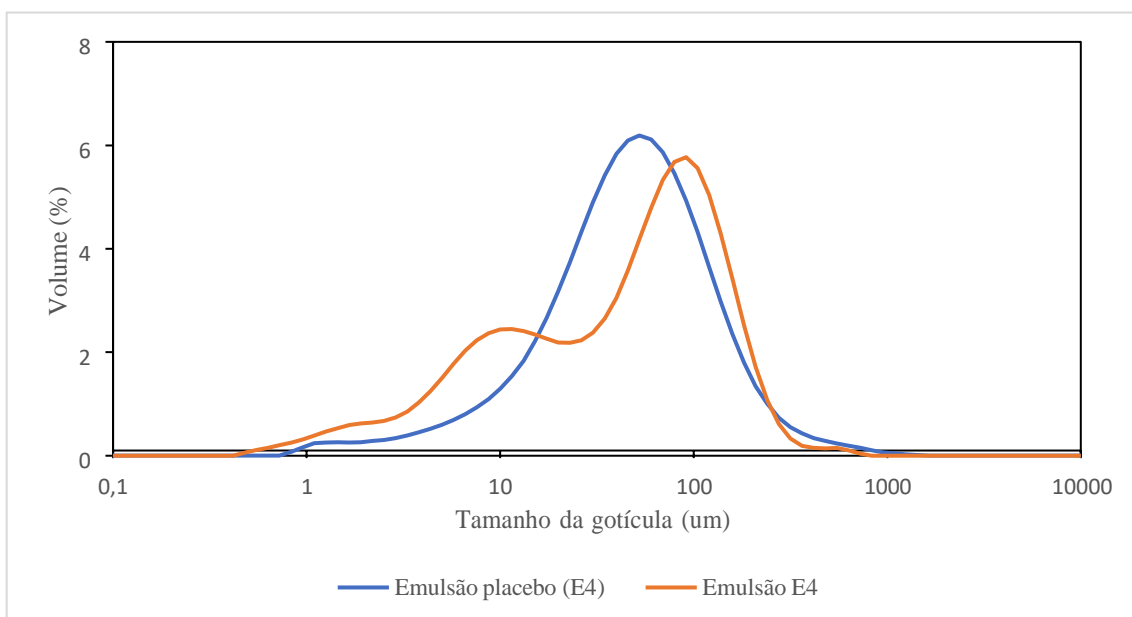


Figura 13. Medição do tamanho da gotícula do extrato apolar após 48h de preparação das emulsões

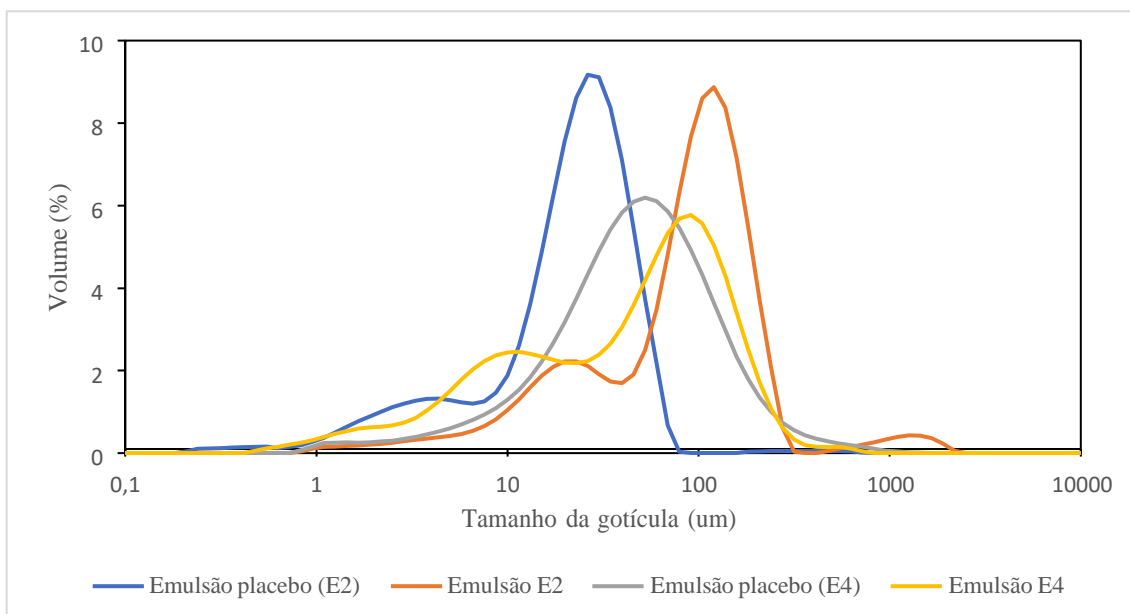


Figura 14. Medição do tamanho da gotícula após 48h de preparação das emulsões

Ao comparar os perfis das Figuras 12, 13 e 14, podemos observar que as emulsões preparadas com o extrato E2 apresentam um perfil de tamanho de gotícula idêntico, mas diferente do perfil das emulsões desenvolvidas para o extrato E4.

Na Figura 14, é possível observar que a emulsão placebo do extrato de glicerina apresenta gotículas de menor tamanho, indicando uma maior estabilidade. Em seguida, a emulsão placebo do extrato apolar também mostra um perfil de tamanho de gotícula relativamente baixo. Isso sugere que essas emulsões serão mais estáveis e menos propensas a se separarem nos seus componentes individuais.

O Span é um parâmetro que indica a uniformidade do tamanho das gotículas em uma emulsão. Quanto menor o valor do Span, mais estável e homogênea é considerada a emulsão. Já o D 0,5 representa o tamanho das gotículas em que 50% do volume da fase interna é ocupado (Tabela 6).

Tabela 6. Valores do tamanho e distribuição das partículas das emulsões (Span, D 0,1, D 0,5 e D 0,9 decada uma das emulsões (µm))

Amostra	Span	D 0,1	D 0,5	D 0,9
Emulsão placebo glicerina (E2)	1,788	3,57	21,627	42,236
Emulsão E2	1,878	13,576	88,016	178,873
Emulsão placebo apolar (E4)	2,78	10,798	44,802	135,35
Emulsão E4	2,853	4,859	47,464	140,264

Comparando os valores da Tabela 6, podemos observar que a emulsão placebo do extrato de glicerina apresenta um valor de D 0,5 menor em comparação com as outras emulsões, indicando um tamanho de gotícula menor. Isso confirma a maior estabilidade dessa emulsão em relação às demais.

Portanto, tanto os perfis das figuras quanto os valores da tabela indicam que a emulsão placebo do extrato de glicerina apresenta um tamanho de gotícula menor e, conseqüentemente, uma maior estabilidade em comparação com as outras emulsões.

A inclusão dos extratos provoca um aumento do tamanho médio das gotículas das emulsões o que poderá suscitar algumas dúvidas relativamente à estabilidade das emulsões.

A composição dos extratos E2 e E4 pode interferir potencialmente com o tamanho das gotículas nas emulsões. O extrato E2 é um extrato líquido e o extrato E4 é um extrato sólido. A presença destes extratos na formulação da emulsão pode afetar a estabilidade da emulsão e as interações entre as fases óleo e água.

No caso do extrato E2, sendo um extrato líquido, pode ser facilmente incorporado na formulação da emulsão. O extrato de E2 pode interagir com os componentes da emulsão e afetar o tamanho das gotículas. Dependendo da concentração do extrato de E2 e das condições de formulação, pode promover a formação de gotículas mais pequenas ou levar à coalescência das gotículas, resultando em gotículas de maiores dimensões. O impacto específico do extrato de E2 no tamanho das gotículas depende de vários factores, incluindo a concentração do extrato, a formulação da emulsão e o método de emulsificação (Cizauskaite et al., 2016).

Por outro lado, o extrato E4, sendo um extrato sólido, pode exigir uma etapa de pré-formulação para o solubilizar antes de o incorporar na formulação da emulsão. A solubilidade e a dispersão do extrato de E4 na emulsão podem influenciar o tamanho das gotículas. Se a solubilidade e a dispersão do extrato de E4 não forem ótimas, pode levar à formação de gotículas maiores ou mesmo à aglomeração das partículas do extrato, afetando a distribuição geral do tamanho das gotículas na emulsão (Hoang et al., 2021).

É importante notar que o impacto dos extratos E2 e E4 no tamanho das gotículas em emulsões depende de outros componentes da formulação e das condições de processamento. A concentração dos extratos, o tipo e a concentração dos emulsionantes, o método de emulsificação e a estabilidade global da formulação podem influenciar o tamanho das gotículas nas emulsões que contêm estes extratos.

3.8 Determinação da viscosidade e oscilatório das formulações

A análise reológica das emulsões e os geles foi conduzida por meio de testes que incluíram varredura de frequência de oscilação e medições de viscosidade rotacional e dinâmica. Os experimentos de corte contínuo avaliaram a capacidade de cada sistema em resistir à ruptura estrutural durante um procedimento de corte padronizado. Observou-se que todas as formulações apresentaram um comportamento de afinamento por cisalhamento não-newtoniano, uma vez que os valores de viscosidade diminuíram à medida que a taxa de corte aumentou (Figura 15).

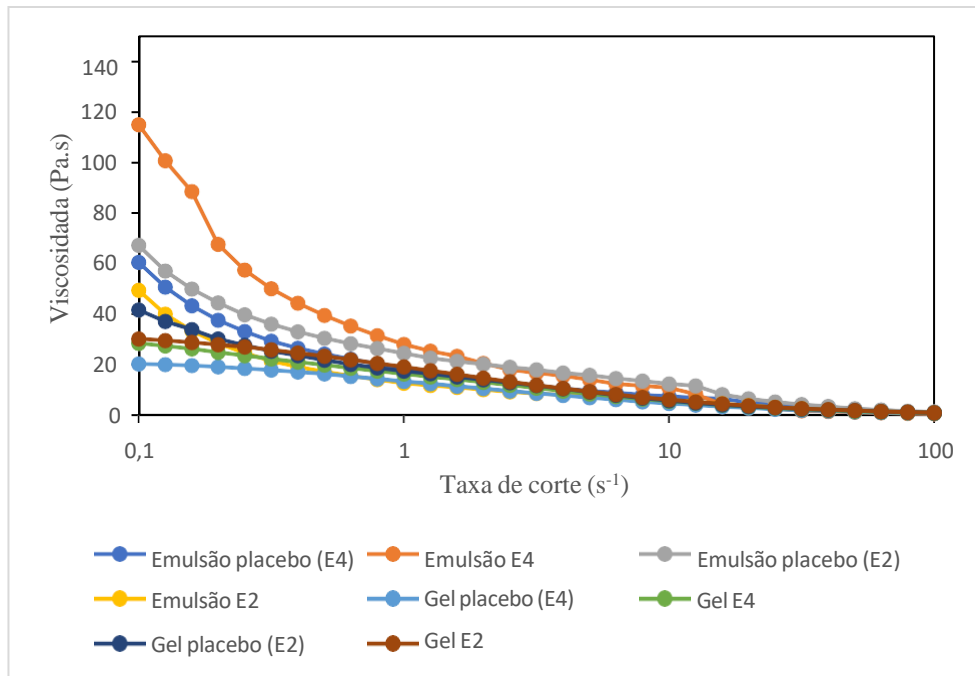


Figura 15. Resultados da viscosidade em função da taxa de corte de cada uma das emulsões e geles

A inclusão dos diferentes extratos não teve impacto significativo nos elementos estruturais de todas as formulações, excetuando a emulsão do extrato apolar que teve um aumento significativo da viscosidade quando a tensão de corte (*shear rate*) é igual a 0,1.

Os resultados da frequência de oscilação são apresentados como módulos G' e G'' em função da frequência (Figura 16).

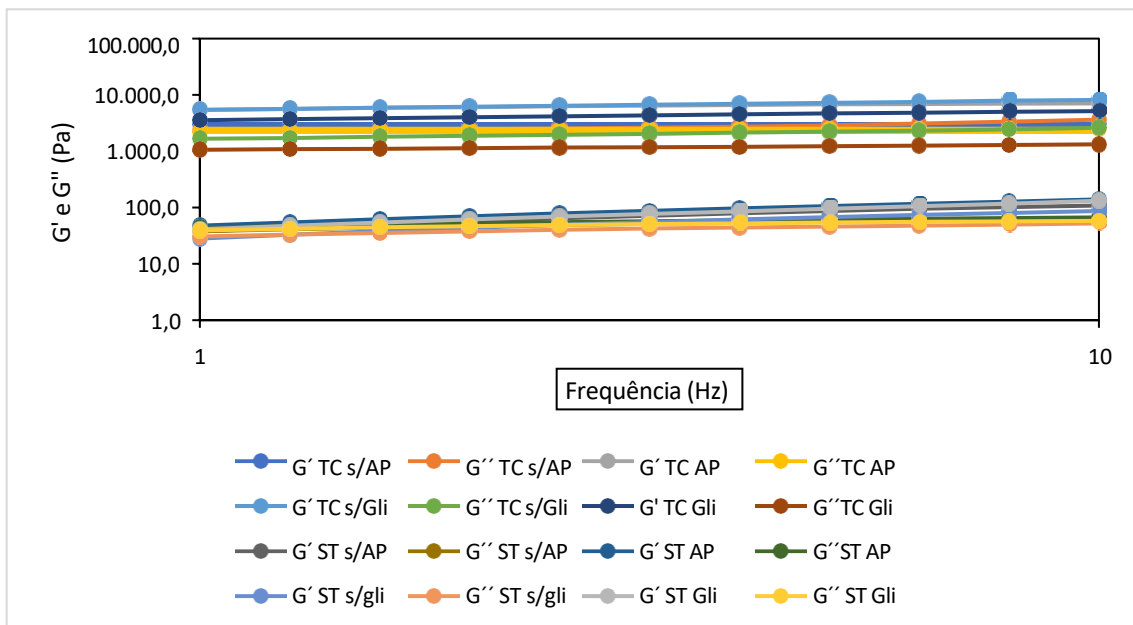


Figura 16. Resultados da análise oscilatória de cada uma das emulsões e geles.

Para todas as emulsões, os módulos de armazenamento (G') foram superiores aos módulos de perda (G''), mostrando um comportamento predominantemente "sólido", evidenciando uma viscoelasticidade predominante, o que está em acordo com as medições de viscosidade. No caso dos geles o valor de G'' é maior que o G' , o que significa que o material exibe um comportamento viscoelástico, com maior tendência a dissipar energia em forma de calor ou deformação plástica.

3.9. Controlo microbiológico das formulações

Foi realizado o controlo microbiológico das formulações apresentadas, tendo sido obtidos os seguintes resultados:

O Tegocare placebo apolar (E4), o Solagum placebo apolar (E4) e o Tegocare apolar (E4) apresentaram uma contagem microbiana aeróbia total (TAMC) e uma contagem total de leveduras e bolores (TYMC) de <10 ufc/g.

No entanto, na formulação de Solagum apolar (E4), que visualmente apresentava alguns pontos negros, foi observada contaminação fúngica (Figura 17). Os resultados obtidos foram os seguintes:

TAMC: <10 ufc/g

TYMC: $3,8 \times 10^3$ ufc/g

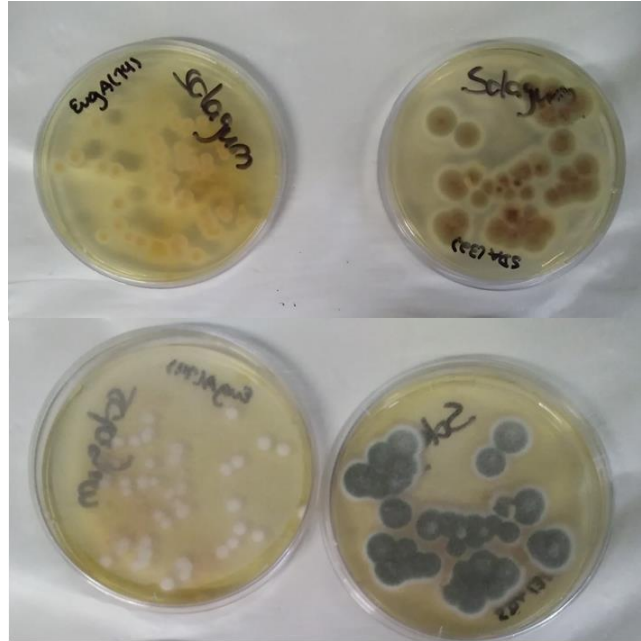


Figura 17. Fotografia da caixa de Petri referente ao gel apolar (E4) com contaminação fúngica

Os extratos não evidenciaram a proteção destas formulações aos microrganismos testados.

Estes resultados sugerem que a presença de extrato na formulação de Solagum apolar (E4) poderá ter contribuído para a contagem mais elevada de TYMC e pode ter sido um fator de contaminação fúngica. Poderá ser necessária uma investigação mais aprofundada para determinar a causa da contaminação e para implementar medidas correctivas adequadas. Outras possíveis causas de contaminação fúngica incluem factores ambientais, tais como condições de armazenamento, equipamento de processamento ou procedimentos inadequados de limpeza e saneamento (Dalie et al., 2010) (Pitt & Hocking, 2009).

Poderá ser necessária uma investigação e análise mais aprofundadas das amostras e do processo de produção para determinar a causa principal da contaminação fúngica e implementar ações corretivas adequadas para evitar futuras contaminações.

4. Discussão

As algas marinhas são uma fonte rica em moléculas bioativas que podem atuar como agentes antioxidantes e antimicrobianos. Na avaliação da atividade antioxidante, procedeu-se à determinação do conteúdo fenólico total (TPC) dos extratos, já que este grupo de compostos está diretamente correlacionado com o elevado potencial antioxidante de diversas matrizes naturais. No caso particular da macroalga *B. bifurcata*, bem como em outras espécies de algas castanhas, é possível encontrar florotaninos, um grupo de compostos fenólicos quase exclusivamente biosintetizados por algas castanhas. Além de demonstrarem uma forte capacidade antioxidante, a produção destes compostos está também relacionada com a defesa contra bactérias e fungos (Shibata et al., 2004).

No presente estudo, a amostra que apresentou maior teor de fenólicos totais foi o extrato de glicerol (E2), apesar de os sinais característicos destes compostos não serem claramente visíveis no espectro de RMN, devido à baixa intensidade dos sinais na zona dos prótons aromáticos. No entanto, alguns polifenóis têm características bipolares (Manach et al., 2004), justificando a razão pela qual o extrato menos polar (E4) apresentou também um significativo conteúdo fenólico total. De notar que o método de Folin-Ciocalteu não quantifica apenas compostos fenólicos, podendo o ácido fosfomolibdotungstico oxidar outros compostos presentes nos extratos e, ao ser reduzido por moléculas antioxidantes, aumentar a absorbância no ensaio colorimétrico de Folin.

Cada método de extração utilizado no processo de obtenção de extratos de *B. bifurcata* pode ter um impacto na composição dos mesmos. Diferentes solventes e métodos de extração podem produzir extratos com diferentes perfis químicos e concentrações de compostos bioativos. Por exemplo, um estudo anterior (Alves et al., 2018) comparou a composição de extratos obtidos de *B. bifurcata* usando diferentes solventes, incluindo água, etanol e acetato de etilo. Os resultados mostraram que a escolha do solvente afetou a extração de compostos bioativos, tanto a nível qualitativo como quantitativo. De igual modo, o estudo de Pinteus et al. (2020) comparou a composição e a bioatividade dos extratos de *B. bifurcata* obtidos por extração com fluido supercrítico e extração convencional com solventes. Os resultados mostraram que o método de extração influenciou a composição dos extratos qualitativa e quantitativamente. Em suma, a escolha do solvente e do método de extração pode afetar a eficiência da extração, a seletividade e a composição dos extratos. Assim, é importante ter em conta estes fatores ao conceber

protocolos de extração em *B. bifurcata* para obter extratos com os perfis químicos desejados.

A capacidade antioxidante dos extratos de *B. bifurcata* foi avaliada através do método FRAP que mede a capacidade dos extratos em reduzir o complexo amarelo férrico a um complexo azul ferroso através da doação de elétrons em condições ácidas. De um modo geral, todos os extratos evidenciaram potencial antioxidante, embora a maior capacidade de reduzir o íon Fe^{3+} a Fe^{2+} tenha sido exibida pelo extrato E4 (238,5 μM FeSO_4/g). Este, apesar de não ter apresentado o maior teor em fenólicos totais, foi o que teve a maior capacidade de reduzir o íon férrico, sugerindo que a atividade antioxidante deste extrato possa ser devida a diversos compostos de natureza bipolar. É importante notar que a atividade antioxidante de uma amostra não é determinada apenas pelo seu teor fenólico, uma vez que outros compostos, como os flavonóides e os carotenóides, também podem contribuir para a capacidade antioxidante global. Por conseguinte, o extrato E4 pode conter uma combinação de diferentes compostos com propriedades antioxidantes, o que explica o resultado no ensaio FRAP. Estudos anteriores (Chew et al., 2008; Farvin & Jacobsen, 2013), usando metodologias de extração distintas com a mesma alga, evidenciaram que os extratos de polaridade intermédia possuíam a melhor capacidade antioxidante.

A macroalga *B. bifurcata* pode ser uma fonte de compostos antimicrobianos, o que, juntamente com a grande abundância desta alga marinha na costa portuguesa, aponta esta espécie como um recurso muito valioso para a extração de compostos naturais com vista ao desenvolvimento de novas terapêuticas antimicrobianas frente a patógenos humanos como *S. aureus* e *S. epidermidis*, entre outros.

As bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. hominis*, membros das bactérias coagulase negativa do género *Staphylococcus* são microrganismos comumente encontrados como comensais inofensivos na pele humana e animal. No entanto, como muitos outros estafilococos coagulase-negativo, *S. hominis* pode ocasionalmente causar infeção em pacientes com sistemas imunitários comprometidos, tendendo a colonizar áreas com numerosas glândulas apócrinas, como as axilas e a região púbica. Por outro lado, a maioria das infeções causadas por *S. epidermidis* começa com a introdução de bactérias na pele durante a inserção de um dispositivo médico no paciente, o mesmo sucedendo com *S. aureus*. No entanto, a capacidade deste último em coagular o sangue, produzindo coagulase, distingue-o de várias espécies de estafilococos coagulase-negativo menos

virulentas. Também as infecções causadas pela bactéria *C. acnes* e pelo fungo *M. furfur* são um dos problemas cutâneos mais comuns em todo o mundo, ocorrendo sobretudo em adultos jovens (Otto, 2009; Cheung et al., 2021; Severn et al., 2022; Prohi et al., 2016).

No presente trabalho, o extrato que apresentou maior capacidade antibacteriana contra todos os microrganismos avaliados foi a fração apolar (E4) do extrato hidroetanólico na concentração de 1 mg/mL, inibindo o crescimento de *S. epidermidis* (42%), *S. aureus* (33%), *S. hominis* (32%) e *C. acnes* (26%). Estes resultados poderão estar associados ao facto de que no extrato E4, devido à sua hidrofobicidade, os compostos mais apolares poderão interagir com os lípidos da membrana dos microrganismos estudados, provavelmente afetando a permeabilidade da mesma. Tal como acima referido, a análise por ¹H RMN deste extrato evidenciou a presença de compostos lipofílicos, incluindo diterpenos lineares. Efetivamente, um artigo de revisão recente (Pais et al., 2020) reporta a atividade antimicrobiana de extratos e de diterpenos lineares isolados de *B. bifurcata*. Em particular, o composto eleganolone e seus derivados (0.075-2 mg/mL) inibiram o crescimento de diversas espécies de bactérias como *Mycobacterium* sp., *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC6538 e *Escherichia coli* ATCC25922. Os autores referem também que extratos desta macroalga potenciam o efeito de antibióticos como a gentamicina, tetraciclina ou rifampicina, tendo este último diminuído significativamente os valores das concentrações mínimas inibitórias (MIC), quando testados em conjunto com os extratos, contra *Staphylococcus aureus* ATCC43300 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Este sinergismo entre extratos e antibióticos pode ser explorado com vista a ultrapassar o problema crescente da resistência microbiana aos antibióticos. Também Silva et al. (2019) estudaram o efeito antimicrobiano dos extratos de metanol e de diclorometano de *B. bifurcata*, expressando o resultado em zonas de inibição (ZI). Ambos os extratos foram ativos contra *Escherichia coli* ATCC 10536 (7.0; 8.3 mm) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (11.3; 8.3 mm), enquanto o extrato de metanol inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (7.0 mm), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (6.7 mm) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (6.7 mm).

Recentemente, Susano et al. (2022b) reportaram a capacidade de inibição do crescimento de *S. epidermidis* por extratos da alga castanha *Sargassum muticum*, destacando igualmente o poder inibitório da fração menos polar. Esta alga demonstrou também ter capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus*. Outros autores (Spavieri et al., 2010; Jimenez-Escrig et al., 2012; Horta et al., 2014) reportaram uma elevada atividade

antibacteriana de extratos de *B. bifurcata*, verificando inibição de crescimento bacteriano, provavelmente devido a danos no interior da membrana. Outros estudos realizados anteriormente (Culioli et al., 2001; Culioli et al., 2004; Gallé et al., 2013) já haviam demonstrado que a macroalga *B. bifurcata* possui atividade antioxidante e antimicrobiana, corroborando os resultados obtidos neste estudo.

O microrganismo que apresentou menor sensibilidade ao efeito dos extratos foi o fungo *M. furfur*, pois não se observou inibição ou aumento no crescimento na presença dos extratos E1 e E3, tendo este último promovido o crescimento de *C. acnes* (34%), *S. aureus* (22%), *S. hominis* (15%) e *S. epidermidis* (9%). Também o extrato de glicerol (E2) estimulou o seu crescimento, provavelmente devido à elevada concentração de glicerol, já que não se procedeu à remoção deste solvente, ao contrário dos restantes extratos. Ainda assim, o extrato que teve maior eficácia contra *M. furfur* foi novamente o extrato E4, reduzindo o seu crescimento em cerca de 27%. No estudo realizado por Susano et al. (2022a) apenas a fração lipofílica de *S. muticum* apresentou capacidade de inibir o crescimento deste microrganismo, o que pode estar relacionado com a alta resistência de estirpes de leveduras aos agentes antimicrobianos, uma vez que as leveduras apresentam uma barreira adicional para se defenderem de agentes químicos. Estes microrganismos representam um verdadeiro desafio para a medicina e, devido à grande semelhança de alguns processos biológicos comuns a humanos e fungos, drogas que são tóxicas para fungos também são tóxicas para humanos. Consequentemente, as opções terapêuticas para infeções fúngicas são muito mais limitadas do que para infeções bacterianas.

Embora estudos anteriores (Culioli et al., 2004; Spavieri et al., 2010; Gallé et al., 2013) tenham sido realizados para compreender o potencial de *B. bifurcata* como fonte de compostos antimicrobianos, são poucos os que se focaram na investigação dos mecanismos envolvidos no efeito inibitório dos seus metabolitos.

No presente trabalho, selecionou-se o extrato mais promissor (E4) para avaliar se o mecanismo associado à inibição do crescimento bacteriano estaria associado a danos no ADN e efeitos na integridade da membrana citoplasmática. De facto, confirmou-se que este extrato induziu danos significativos na membrana e degradou o ADN bacteriano. De modo a relacionar o efeito biológico do extrato E4 com o seu perfil químico, foi efetuada uma análise preliminar por ressonância magnética nuclear de protão. O espectro de RMN evidenciou a presença de sinais característicos de diterpenos lineares como sendo os compostos maioritários presentes neste extrato. De acordo com Sanchez et al. (2009), uma

alta concentração de terpenos em óleos essenciais, poderá ser responsável pela sua elevada atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo esta atividade provocada pela perturbação da bicamada lipídica da membrana plasmática, ocasionando uma alteração na permeabilidade e danos no ADN.

Existem diferentes mecanismos pelos quais os compostos podem afetar o ADN das bactérias sem comprometer a viabilidade das suas membranas. Uma das vantagens do método *Sytox Green* é a sua facilidade de uso e capacidade de fornecer resultados rápidos e quantitativos. Além disso, ele é compatível com diferentes tipos de células e pode ser usado tanto em células aderentes como em células em suspensão. Também oferece uma boa sensibilidade, podendo detetar células mortas em concentrações muito baixas (Roth et al., 1997).

O padrão observado na eletroforese em gel de ADN revela que este extrato tem potencial para induzir danos no ADN bacteriano. Esta habilidade, juntamente com a sua capacidade para induzir danos de membrana, sugere que o potencial antimicrobiano exibido por este extrato poderá ser mediado por estes mecanismos.

Estudos anteriores (Lence, 2015; Shannon & Abu-Ghannam, 2016) sugerem que os compostos bioativos de *B. bifurcata* podem intercalar-se entre as bases nitrogenadas do ADN bacteriano, interferindo na sua estrutura tridimensional e na estabilidade da dupla hélice. Essa intercalação pode levar à distorção da estrutura do ADN e à inibição da replicação e transcrição, comprometendo assim as funções vitais da célula bacteriana.

É importante destacar que o mecanismo exato pelo qual os extratos de *B. bifurcata* causam danos no ADN bacteriano ainda não foi completamente elucidado, sendo necessárias mais pesquisas para compreendê-lo com detalhe. No entanto, foi já sugerido (Nichols & Katiyar, 2010) que os compostos bioativos presentes nos extratos, como polifenóis, carotenoides e flavonoides, poderiam ser responsáveis por essa atividade.

Os mecanismos de ação implícitos na inibição do crescimento associados a danos no ADN e também a danos membranares abrem uma janela de oportunidades para o desenvolvimento de terapêuticas antimicrobianas baseadas em produtos naturais, tendo o mesmo ou maior efeito que os fármacos já existentes, minimizando desta forma o aparecimento de estirpes resistentes. Assim, o efeito antimicrobiano da fração mais lipofílica de *B. bifurcata* é um desafio para investigar a sua composição química de forma mais detalhada e realizar estudos de relação estrutura/atividade no futuro. Além disso, esta alga castanha é uma

fonte reconhecida de compostos antioxidantes, vitaminas, terpenos e polissacarídeos que ajudam a hidratar, nutrir e proteger a pele. Estas características podem trazer vantagens adicionais com benefícios duplos através do desenvolvimento de uma formulação com propriedades antimicrobianas e antioxidantes capaz de controlar o crescimento microbiano sem afetar a homeostasia da pele.

A partir dos estudos realizados no presente trabalho com os extratos da macroalga *B. bifurcata*, surgiu a necessidade de explorar a aplicação desses extratos em formulações dermatológicas. A capacidade antioxidante dos extratos pode contribuir para a proteção da pele contra danos oxidativos causados pelos radicais livres, enquanto a sua atividade antimicrobiana pode ajudar no combate a infecções cutâneas, promovendo a saúde da pele.

Com base nos resultados fornecidos, podemos observar que a emulsão placebo do extrato de glicerina possui gotículas de menor tamanho em comparação com a emulsão placebo do extrato apolar. Isso indica uma maior estabilidade da emulsão do extrato de glicerina ao longo do tempo, tornando-a menos propensa a se separar em seus componentes individuais (Santos et al., 2022). Estas emulsões têm frequentemente uma combinação de óleos e líquidos aquosos, o que torna a sua estabilidade e eficácia altamente dependentes do tamanho das suas gotículas. É por isso que o *Mastersizer 2000* é uma ferramenta eficiente para medir o tamanho das partículas destas emulsões.

A estabilidade física das emulsões é influenciada pela distribuição do tamanho das gotículas, afetando a reologia, a taxa de cremagem e a microestrutura (Santos et al., 2022). Além disso, a distribuição do tamanho das gotículas também desempenha um papel importante na estabilidade oxidativa das emulsões (Nakaya et al., 2005). Emulsões com gotículas menores apresentam uma maior estabilidade oxidativa, com menor conteúdo de hidroperóxidos e oxigênio residual, além de produzirem níveis mais baixos de hexanal, um subproduto da oxidação (Nakaya et al., 2005).

No contexto de emulsões estabilizadas com zeína, a concentração do emulsificante zeína está correlacionada com o tamanho das gotículas. Num estudo anterior, foi encontrada uma correlação positiva entre o tamanho das gotículas e o inverso da concentração de zeína em emulsões óleo-em-água (Sohn et al., 2017). Portanto, é possível inferir que a emulsão placebo do extrato de glicerina, com gotículas menores, possa ter uma concentração mais adequada de zeína para promover sua estabilidade (Sohn et al., 2017).

Com base nos resultados e nas informações deste estudo, a emulsão placebo do extrato de

glicerina parece ser a mais estável, devido ao menor tamanho das gotículas em comparação com a emulsão placebo do extrato apolar. Isso sugere que a emulsão placebo do extrato de glicerina será mais estável ao longo do tempo e menos propensa a se separar nos seus componentes individuais (Santos et al., 2017).

As propriedades reológicas de todas as emulsões que continham extrato de alga não apresentaram diferenças significativas em comparação com as emulsões de placebo. A essência da análise viscoelástica é testar várias estruturas na amostra, desde que o método não destrua a estrutura. A variação da frequência da forma de onda aplicada em amplitudes baixas fará com que os elementos respondam quando os seus tempos característicos coincidirem com a taxa de mudança de tensão associada a uma frequência específica. Os resultados dos testes de frequência são apresentados como módulos G' e G'' em função da frequência (Gore et al., 2018; Sidding et al., 2006).

De acordo com a pesquisa, a análise reológica das emulsões e dos geles foi conduzida através de testes que incluíram varrimento de frequência de oscilação e medições de viscosidade rotacional e dinâmica (Geremias et al., 2016). As experiências de corte contínuo foram realizadas para avaliar a capacidade de cada sistema em resistir à rutura estrutural durante um procedimento de corte padronizado. Foi observado que todas as formulações apresentaram um comportamento reológico não-newtoniano, onde os valores de viscosidade diminuiram à medida que a taxa de cisalhamento (corte) aumentou, sendo assim classificados com reofluidificantes, o que traduz num comportamento adequado à aplicação tópica (Geremias et al., 2016).

Em relação à inclusão de diferentes extratos, não houve um impacto significativo nos elementos estruturais de todas as formulações, com exceção da emulsão com o extrato apolar, que apresentou um aumento significativo da viscosidade quando a taxa de cisalhamento foi igual a $0,1 \text{ (s}^{-1}\text{)}$. Isso indica que o extrato apolar possui propriedades espessantes e é capaz de aumentar a viscosidade da emulsão sob certas condições (Ferreira et al., 2021). No entanto, as outras formulações não mostraram variações significativas na viscosidade com a inclusão dos extratos.

Esses resultados sugerem que o extrato apolar pode ser um aditivo promissor para melhorar a estabilidade e a textura de emulsões gelificadas (Zou et al., 2019). No entanto, são necessários estudos adicionais para compreender completamente os mecanismos envolvidos e otimizar as condições de formulação. Além disso, outras propriedades, como

capacidade de estabilização e compatibilidade com outros ingredientes, devem ser consideradas ao desenvolver emulsões gelificadas para aplicações específicas (Jiang et al., 2022).

O fato de os módulos de armazenamento (G') terem sido consistentemente superiores aos módulos de perda (G'') em todas as amostras de emulsões sugere um comportamento predominantemente "sólido". Isso significa que estas formulações têm uma maior capacidade de armazenar a energia aplicada durante a deformação e, portanto, exibem uma rigidez mais proeminente. Esse comportamento está de acordo com a observação de que há uma viscoelasticidade predominante nas emulsões, ou seja, elas apresentam características de materiais viscoelásticos, capazes de combinar características elásticas e viscosas (Bastos, 2013).

A coerência entre os resultados dos módulos G' e G'' e as medições de viscosidade é um ponto interessante. As medições de viscosidade podem oferecer informações sobre a resistência de um fluido ao fluxo, enquanto os módulos G' e G'' fornecem uma visão mais abrangente sobre como o material responde a diferentes níveis de deformação. O fato de que os módulos G' serem maiores do que os G'' pode sugerir que essas amostras de emulsões possuem uma estrutura molecular que permite uma resistência significativa à deformação, mas também uma capacidade de dissipar energia viscosa (Pontes, 2014).

A observação de que o valor do módulo de perda (G'') é maior que o módulo de armazenamento (G') nos geles é interessante e indica um comportamento viscoelástico mais acentuado. Isso sugere que esses geles têm uma tendência maior a dissipar energia do que a armazená-la de forma elástica. Essa característica é um indicativo de que os geles são mais "macios" e suscetíveis a deformações viscosas, resultando em uma maior dissipação de energia na forma de calor ou deformação plástica, em oposição a uma recuperação elástica significativa (Agboola et al., 2023).

Em geral, a análise dos módulos G' e G'' em função da frequência oferece uma compreensão abrangente das propriedades viscoelásticas das amostras estudadas. A diferença na relação entre esses módulos entre emulsões e geles ressalta a importância da estrutura e da composição do material na determinação de seu comportamento mecânico.

5. Conclusão

A presente dissertação teve como objetivo avaliar o potencial de utilização de extratos de *Bifurcaria bifurcata* em formulações dermatológicas. A avaliação incluiu a análise das atividades antioxidante e antimicrobiana de diferentes extratos, bem como a avaliação da sua citotoxicidade em queratinócitos humanos e caracterização do perfil químico do extrato mais promissor por ressonância magnética nuclear de próton.

A avaliação da atividade antioxidante através do método FRAP revelou um potencial antioxidante significativo, como demonstrado pela capacidade de alguns extratos em reduzir os íons férricos, sugerindo que os extratos de *B. bifurcata* podem proteger a pele dos danos oxidativos causados pelos radicais livres, que se sabe contribuírem para o envelhecimento prematuro e para várias doenças da pele.

Em termos de atividade antimicrobiana, os extratos foram avaliados contra vários microrganismos da pele, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Cutibacterium acnes* e *Malassezia furfur*. Os extratos mostraram efeitos antimicrobianos promissores, particularmente contra espécies de *Staphylococcus* e *Cutibacterium acnes*. Os efeitos inibitórios dos extratos sobre o crescimento destes microrganismos foram atribuídos à sua capacidade de induzir a permeabilidade das membranas e causar danos no ADN. Estes mecanismos de ação contribuem para as suas propriedades antimicrobianas.

A avaliação da citotoxicidade utilizando células HaCaT demonstrou que os extratos não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas, indicando a sua segurança para aplicação tópica. Este facto é importante, uma vez que o desenvolvimento de produtos de cuidados para a pele requer ingredientes que sejam simultaneamente eficazes e seguros para utilização dermatológica.

Recorrendo à técnica de ^1H RMN foi possível detetar no extrato mais promissor a presença de compostos lipofílicos, em particular diterpenos lineares, que se julga serem os responsáveis pelas atividades biológicas observadas. Estes compostos podem oferecer uma alternativa sustentável e natural para o desenvolvimento de produtos de cuidados da pele, confirmando ainda mais o seu potencial em formulações dermatológicas.

As atividades antioxidante e antimicrobiana, juntamente com a sua não citotoxicidade, tornam estes extratos candidatos promissores para produtos de cuidados da pele

destinados a combater o stress oxidativo, as infeções microbianas e outras condições relacionadas com o equilíbrio cutâneo.

O desenvolvimento de formulações que incorporam extratos de *B. bifurcata* mostrou resultados promissores. As emulsões e geles preparados demonstraram características desejáveis, tais como níveis de pH adequados, parâmetros reológicos estáveis e boa dispersão de gotículas de pequenas dimensões. Estas formulações têm potencial para aplicações tópicas, nomeadamente em produtos de cuidados da pele.

A caracterização das formulações também incluiu testes de controlo microbiológico, que confirmaram a ausência de contaminação microbiana, exceto no gel com o extrato apolar (E4), o que pode ser tido causado por um erro humano. Isto é crucial para garantir a segurança e a eficácia dos produtos. Em termos gerais, o desenvolvimento destas formulações bioativas utilizando extratos de *B. bifurcata* oferece uma alternativa sustentável e natural para a indústria cosmética e farmacêutica, fornecendo potenciais soluções para várias condições da pele e promovendo práticas de cuidados da pele mais saudáveis.

A investigação futura poderá centrar-se na otimização do processo de extração, na investigação da estabilidade dos extratos em formulações e na realização de ensaios clínicos para avaliar a sua eficácia em seres humanos, conduzindo à criação de soluções inovadoras e eficazes derivadas de recursos naturais marinhos para o cuidado da pele.

6. Bibliografia

- Agboola, A., Nowak, A., Duchnik, W., Kucharski, Ł., Story, A., Story, G., Struk, L., Antosik, A., & Ossowicz-Rupniewska, P. (2023). Emulsion-based gel loaded with ibuprofen and its derivatives. *Gels*, 9(5):391.
- Ainsworth, E., & Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877.
- Allen, L. (2008). *The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding*. Washington, D.C: *American Pharmacist Association*.
- Alves, C., Pinteus, S., Simões, T., Horta, A., Silva, J., Tecelão, C., & Pedrosa, R. (2016). *Bifurcaria bifurcata*: a key macroalga as a source of bioactive compounds and functional ingredients. *International Journal of Food, Science and Technology*, 51(7), 1638-1646.
- Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., Alpoim, M., Botana, L., & Pedrosa, R. (2018). From marine origin to therapeutics: the antitumor potential of marine algae-derived compounds. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 777.
- Aranberri, I., Binks, B., Clint, J., & Fletcher, P. (2006). Elaboracion y caracterización de emulsiones estabilizadas por polimeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 7(3). 211-231.
- Bastos, E. (2013). *Propriedades reológicas e de estabilização de emulsões do fucopol*. Lisboa: *Universidade Tecnica de Lisboa*. Dissertação de mestrado.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power". *The FRAP assay*. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berthon, J., Nachat-Kappes, R., Bey, M., Cadoret, J. P., Renimel, I., & Filaire, E. (2017). Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radical Research*, 51(6), 555-567.
- Bhowmick, S., Mazumdar, A., Moulick, A., & Adam, V. (2020). Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. *Biotechnology Advances*, 43, 107571.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.
- Byrd, A., Belkaid, Y., & Segre, J. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143-155.
- Carter, H. (2022). *Popsugar*. <https://www.popsugar.com/beauty/what-are-gums-in-skincare-48802618>. Consultado em 20/07/2023
- Cheung, G, Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547–569.

- Chew, Y., Lim, Y., Omar, M., & Khoo, K. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 41(6), 1067–1072.
- Chicharro, J. (2020). Fisiologia del ejercicio. <https://www.fisiologiadelejercicio.com/no-se-recomienda-suplementacion-con-antioxidantes-asociada-al-entrenamiento-de-fuerza-2/> Consultado em 10/02/2023
- Cizauskaite, U., Ivanauskas, L., Jakštas, V., Marksiene, R., Jonaitiene, L., & Bernatoniene, J. (2016). *Rosmarinus officinalis* L. extract and some of its active ingredients as potential emulsion stabilizers: a new approach to the formation of multiple (W/O/W) emulsion. *Pharmaceutical Development and Technology*, 21(6), 716–724.
- Cosmetics - Microbiology - Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria (ISO 21149:2017).
- Cosmetics - Microbiology - Enumeration of yeast and mould (ISO 16212:2017).
- Culioli, G., Daoudi, M., Ortalo-Magné, A., Valls, R., & Piovetti, L. (2004). (S)-12-hydroxygeranylgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*, 57(4), 529-535.
- Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Daoudi, M., Thomas-Guyon, H., Valls, R., & Piovetti, L. (2001). Trihydroxylated linear diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*, 65(14), 2063–2069.
- Culioli, G., Daoudi, M., Mesguiche, V., Valls, R., & Piovetti, L. (1999). Geranylgeraniol-derived diterpenoids from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*. 52 (8), 1447-1454.
- Dalie, D., Deschamps, A., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins. A review. *Food Control*, 21(4), 370-380.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
- Eom, S., Kim, Y., & Kim, S. (2012). Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(9), 3251-3255.
- Farmacopeia Portuguesa 9.7. (2011). In: *Infarmed*. Lisboa: Infarmed.
- Farvin, K. & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1670–1681.
- Ferreira, M., Magalhaes, M., Oliveira, R., Sousa-Lobo, J., & Almeida, I. (2021). Trends in the use of botanicals in anti-aging cosmetics. *Molecules*, 26(12), 3584.
- Freitas, R., Pinteus, S., Martins, A., Silva, J., Alves, C., Alves, J., Teodoro, F., Ribeiro, H., Gonçalves, L., Petrovski, Z., Branco, L., & Pedrosa, R. (2020). Highlighting the

- biological potential of the brown seaweed *Fucus spiralis* for skin applications. *Antioxidants*, 9(7), 611.
- Gallé, J. B., Attioua, B., Kaiser, M., Rusig, A. M., Lobstein, A., & Vonthron-Sénécheau, C. (2013). Eleganolone, a diterpene from the French marine alga *Bifurcaria bifurcata* inhibits the growth of the human pathogens *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. *Marine Drugs*, 11(3), 599-610.
- Geremias, I., Souki, N., Moraes, I., & Pinho, S. (2016). Rheology of emulsion-filled gels applied to the development of food materials. *Gels*, 16, 2(3)22.
- Gonzalez, M. (2013). Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial . *Revista Cubanade Pediatría*, 85(4), 414-417.
- Gore, E., Picard, C., & Savari, G. (2018). Spreading behavior of cosmetic emulsions: Impact of the oil phase. *Biotribology*, 16, 17-24.
- Gosch, M. (2010). Rol del estrés oxidativo en el envejecimiento de la piel. *Revista Chilena de Dermatología*, 26(4), 351-357.
- Gran Velada S.L. (2023). Granvelada. <https://www.granvelada.com/blog/diferencias-entre-las-crema-base/> Consultado em 19/06/2023
- Guiry, M. (2023). The Seaweed Site: information on marine algae: *Bifurcaria bifurcata* https://www.seaweed.ie/descriptions/Bifurcaria_bifurcata.php. Consultado em 29/11/2022
- He, F., Yang, Y., Yang, G., & Yu, L. (2010). Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control*, 21(9), 1257-1262.
- Hoang, H.T., Moon, J.-Y., & Lee, Y.-C. (2021) Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: recent applications, challenges and perspectives. *Cosmetics*, 8, 106.
- Horta, A., Pinteus, S., Alves, C., Fino, N., Silva, J., Fernandez, S., Rodrigues, A., & Pedrosa, R. (2014). Antioxidant and antimicrobial potential of the *Bifurcaria bifurcata* epiphytic bacteria. *Marine Drugs*, 12(3), 1676-1689.
- Jiang, J., Wang, Z., Wang, C., Shi, L., Hou, J., & Zhang, L. (2022). Model emulsions stabilized with nonionic surfactants: structure and rheology across catastrophic phase inversion. *ACS Omega*, 7(48), 44012–44020.
- Jimenez-Escrig, A., Gomez-Ordoñez, E., & Ruperez, P. (2012). Brown and red seaweeds as potential sourcer of antioxidant nutraceuticals. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1123-1132.
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33, 300-305.
- Koh, L. F., Ong, R. Y., & Common, J. E. (2022). Skin microbiome of atopic dermatitis. *Allergology International*, 71(1), 31-39.

- Kohanski, M., Dwyer, D., & Collins, J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-435.
- Lachman, L., Lieberman, H., & L.Kanig, J. (2001). Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: *Fundação Calousete Gulbenkian*.
- Lence, R. (2015). Consumo de algas marinas: su influencia en el valor nutritivo de la dieta y en diversos parámetros fisiológicos. Santiago de Compostela: *Universidad Santiago de Compostela*. Tese de doutoramento.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Martínez, M., Aedo, H., Lopez-Torres, B., Maximiliano, J., Martínez-Larrañaga, M., Anadón, A., Martínez, M., Peteiro, C., Cueto, M., Rubino, S., Hortos, M., & Ares, I. (2023). *Bifurcaria bifurcata* extract exerts antioxidant effects on human Caco- 2 cells. *Environmental Research*, 231, 116141.
- Martins, G., Monteiro, A., do Amaral, F., & da Silva, A. (2021). A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract. *Journal of Food Science and Technology*, 58(12), 4693–4702.
- Marto, J., Ascenso, A., Simoes, S., Almeida, A., & Ribeiro, H. (2016). Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(8), 1093-1107.
- Matias, M., Pinteus, S., Martins, A., Silva, J., Alves, C., Mouga, T., Gaspar, H., & Pedrosa, R. (2022). Gelidiales are not just agar-revealing the antimicrobial potential of *Gelidium Corneum* for skin disorders. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(4), 481.
- Melanie, H., Taarji, N., Zhao, Y., & Khalid, N. (2021). Formulation and characterisation of O/W emulsions stabilised with modified seaweed polysaccharides. *Institute of Food Science & Technology*, 55(1), 211-221.
- Mishra, A. (2018). *Sargassum*, *Gracilaria* and *Ulva* exhibit positive antimicrobial activity against human pathogens. *Open Access Library Journal*, 5(1), 1-11
- Morales, C. (2009). W/O emulsions: formulation, characterization and destabilization. Tese de doutoramento. *University of Technology Cottbus-Senftenberg*.
- Muñoz, J., Culioli, G., & Köck, M. (2013). Linear diterpenes from the marine brown alga *Bifurcaria bifurcata*: a chemical perspective. *Phytochemistry Reviews*, 12(3), 407–424.
- Nakaya, K., Ushio, H., Matsukawa, S., Shimizu, M., & Ohshima, T. (2005). Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids*, 40(5), 501-507.
- Nichols, J., & Katiyar, S. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302(2), 71-83.
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews*.

Microbiology, 7(8), 555–567.

- Pais, J., Tavares, D., & Xavier, N. (2020). Some insights into the antimicrobial potential of macroalgae from the Azores. *Marine Drugs*, 18(3), 163.
- Pereira, L. (2015). Seaweed flora of the European North Atlantic and Mediterranean. *Hb25_Springer Handbook of Marine Biotechnology*, 65-178 Springer Handbook of Marine Biotechnology. *Springer* (pp. 65-178). Berlin.
- Pinteus, S. (2021). Adding value to the marine invaders *Asparagopsis armata* and *Sargassum muticum*. Tese de doutoramento. *Universidade de Aveiro*.
- Pinteus, S., Celso, A., Horta, A., Silva, J., & Pedrosa, R. (2022). *Fucus spiralis* tissue culture for sustainable phlorotannins production. *Aquatic Botany*, 179, 103512.
- Pinteus, S., Lemos, M., Alves, C., Silva, J., Gaspar, H., Martins, A., Simões, M., Rodrigues, A., & Pedrosa, R. (2020). Marine invasive species for high-value products' exploration – Unveiling the antimicrobial potential of *Asparagopsis armata* against human pathogens. *Algal Research*, 52, 102091.
- Pitt, J. & Hocking, A. (2009). Fungi and food spoilage. *Springer*. 519, 388
- Pontes, M. (2014). Avaliação estrutural e reológica de emulsões preparadas com óleo de *Dipterix alata* Vog. (Baru), estabilizadas com goma arábica e quitosana. Dissertação de mestrado. Goiânia. *Universidade Federal de Goiás*.
- Prohic, A., Jovovic Sadikovic, T., Krupalija-Fazlic, M., & Kuskunovic-Vlahovljak, S. (2016). *Malassezia* species in healthy skin and in dermatological conditions. *International Journal of Dermatology*, 55(5), 494–504.
- Reinke, J. & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Europeennes*, 49(1), 35-43.
- Rippa, A., Kalabusheva, E., & Vorotelyak, E. (2019). Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*, 8(6), 607.
- Ross, R. (1958). The type species of *Bifurcaria* Stackhouse. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 55, 753-754.
- Roth, B., Poot, M. Y., & Millard, P. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2421-2431.
- Sanchez, J., Morales, J., & Stashenko, E. (2009). Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 231-235.
- Santos, J., Trujillo-Cayado, L., Carrillo, F., López-Castejón, M., & Alfaro-Rodríguez, M. (2022). Relation between droplet size distributions and physical stability for zein microfluidized emulsions. *Polymers*, 14, 2195.
- Santos, S., Trindade, S., Oliveira, C., Parreira, P., Rosa, D., Duarte, M., Ferreira, I., Cruz,

- M., Rego, A., Abreu, M., Roche, S., & Silvestre, A. (2017). Lipophilic fraction of cultivated *Bifurcaria bifurcata* R. Ross: Detailed composition and in vitro projection of current challenging bioactive properties. *Marine Drugs*, 15(11), 340.
- Severn, M. M., Williams, M., Shahbandi, A., Bunch, Z., L. L., Nguyen, A., Zaramela, L., Todd, D., Zengler, K., Cech, N., Gallo, R., & Horswill, A. (2022). The ubiquitous human skin commensal *Staphylococcus hominis* protects against opportunistic pathogens. *mBio*. 13(3), e00930-22.
- Shannon, E. & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14(4), 81.
- Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K., & Nakamura, T. (2004). Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 16, 291-296.
- Sidding, M., Radiman, S., Jan, L., & Muniandy, S. (2006). Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucohone (APG) surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 276, 15–21.
- Silva, A., Rodrigues, C., Garcia-Oliveira, P., Lourenco, C., Silva, S., Garcia, P., Carvalhalo, A., Domingues, V., Barroso, M., Matos, C., Gandara, J., & Prieto, M (2021). Screening of bioactive properties in brown algae from the northwest Iberian peninsula. *Foods*, 10(8), 1915.
- Silva, J., Alves, C., Freitas, R., Martins, A., Pinteus, S., Ribeiro, J., Gaspar, H., Alfonso, A., & Pedrosa, R. (2019). Antioxidant and neuroprotective potential of the brown seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an in vitro Parkinson's Disease Model. *Marine Drugs*, 17(2), 85.
- Singleton, L. & Rossi, A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sohn, B., Olenskyj, A., & Feng, Y. (2017). Correlation between emulsifier concentration and emulsion droplet size in. *I-aces 3(1)*.
- Spavieri, J., Allmendinger, A., Kaiser, M., Casey, R., Wilson, S., Lalvani, A., & Guiry, M. (2010). Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (Phaeophyceae) from british and irish waters. *Phytotherapy Research*, 24(11), 1724–1729.
- Susano, P., Alves, C., Silva, J., Martins, A., Pinteus, S., Gaspar, H., Goettert, M., & Pedrosa, R. (2022a). *Saccorhiza polyschides*-A source of natural active ingredients for greener skincare formulations. *Molecules*, 27(19), 6496.
- Susano, P., Silva, J. A., Martins, A., Pinteus, S., Gaspar, H., Goettert, M., & Pedrosa, R. (2022b). Mitigating the negative impacts of marine invasive species – *Sargassum muticum* - a key seaweed for skincare products development. *Algal Research*, 62, 102634.

- Susano, P., Silva, J., Alves, C., Martins, A., Gaspar, H., Pinteus, S., Mouga, T., Goettert, M., Petrovski, Z., Branco, L & Pedrosa, R. (2021). Unravelling the Dermatological Potential of the Brown Seaweed *Carpomitra costata*. *Marine Drugs*, 19(3). Páginas???
- Zou, Y., Thijssen, P.-P., Yang, X., & Scholten, E. (2019). The effect of oil type and solvent quality on the rheological behavior of zein stabilized oil-in-glycerol emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, 91, 57-65.