EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DA ALGA VERMELHA *GRATELOUPIA TURUTURU*

Isabel Luísa de Avelar Cardoso

UNIVERSIDADE D COIMBRA

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Isabel Luísa de Avelar Cardoso

EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DA ALGA VERMELHA *GRATELOUPIA TURUTURU*

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada pelo Professor Doutor Leonel Carlos dos Reis Tomás Pereira e Professora Doutora Nádia Isabel Almeida Osório e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018

EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DA ALGA VERMELHA *GRATELOUPIA TURUTURU*

Isabel Luísa de Avelar Cardoso

Tese no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada pelo Professor Doutor Leonel Carlos dos Reis Tomás Pereira e Professora Doutora Nádia Isabel Almeida Osório e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018

Os trabalhos experimentais executados no âmbito desta tese tiveram o apoio de:
Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), através do projeto estratégico UID/MAR/04292/2013 concedido ao MARE (Centro de Ciências do Mar e do Ambiente)
e também teve o apoio da União Europeia através do projeto EASME Blue Labs – AMALIA (Algae-to-MAket Lab IdeAs) (EASME/EMFF/2016/1.2.1.4/03/SI2.750419)

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer a todos os professores do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, que durante a licenciatura e o mestrado me inspiraram a ser quem sou hoje e que me mostraram o quão bom todo o meu percurso poderia ser. Em especial, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Leonel Pereira por me ter mostrado, logo no meu segundo ano de licenciatura, o maravilhoso mundo das algas e por, através do seu entusiasmo, não me ter deixado esquecer isso quando tive de escolher um mestrado para seguir. Ainda a si, gostaria de agradecer pela sua disponibilidade e interesse que, ao longo do primeiro ano de mestrado, mostrou pelo projeto "Gratô" do qual fiz parte. Por fim, queria agradecer-lhe por este ano, pela sua disponibilidade e rapidez com que sempre me deu resposta, por me ter dado autonomia para fazer o meu trabalho, por me mostrar que este mundo da investigação não é fácil e que serão vários os obstáculos que terei de ultrapassar, mas que com esforço e dedicação tudo se consegue.

Um enorme "obrigada" à minha orientadora, Professora Doutora Nádia Osório, da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra. Não consigo colocar por palavras todo o apreço e carinho que lhe tenho. Foi sem dúvida uma das pessoas mais importantes e que mais me motivou ao longo deste ano. Agradeço em especial a confiança que depositou em mim, mesmo só me tendo conhecido em setembro, tendo eu caído de paraquedas no seu gabinete. Agradeço ainda por toda a orientação extra que me deu, as conversas sobre o que fazer a seguir, a partilha das suas histórias e experiências e também por ter sempre um espírito alegre, que mesmo nos dias mais difíceis me ajudava a continuar. Não me vou esquecer do nosso plano B com os polissacarídeos, caso isto da tese não corresse bem.

À Ana e ao Daniel que até ao fim defenderam o meu trabalho e mesmo quando a esperança parecia perdida, continuaram lá. Sem o vosso trabalho e a vossa boa disposição tudo isto teria custado muito mais. Tenho um enorme orgulho em poder dizer que foi ao lado de duas pessoas tão trabalhadoras e responsáveis que vi a minha tese a chegar a bom porto!

A quem mais me ajudou e a quem eu mais chateei com as minhas dúvidas, um enorme "obrigado" ao João Cotas e ao Rui Gaspar. E ainda ao João Nunes, obrigado por desesperares comigo.

A todos os meus amigos que festejaram comigo nos melhores momentos e riram comigo nos piores também. Ao pessoal do BM, e às intermináveis horas de almoço a jogar às cartas que serão sempre uma recordação. À Nádia e à Daniela, o que o "Gratô" juntou, ninguém há-de separar. Aos "meus meninos" do MBBV 2017 por me fazerem sentir a tal nostalgia típica de quem adorou o 1º ano de mestrado. Que para o ano percebam que tudo se consegue, o importante é terem à vossa volta pessoas que vos valorizam e que acreditam em vós. Aos meus amigos de Lisboa que mesmo longe

não deixaram de estar presentes. Ainda são alguns, mas em especial, ao Bruno, à Daniela e à Andreia.
Aos "sponsors" disto tudo, os meus pais. Sem vocês, nada disto teria sido possível. Obrigado, pelo esforço que fizeram ao longo destes anos, obrigado pela motivação que me deram para continuar e por acreditarem em mim quando vos disse que as algas seriam o futuro, por muito estranho que isso vos pudesse parecer. Um beijinho enorme ao meu irmão, por planear sempre os seus cafés a contar com a minha boleia e por confiar em mim para lhe responder a todas as dúvidas existenciais que possa ter. Também tu puxas pela nostalgia em mim, pelas saudades dos tempos que agora serás tu a passar, por invejar o que ainda tens pela frente.
Por fim, aos mais velhos e mais sábios, os meus avós, que sempre me deixaram ver nas suas caras o orgulho que tinham em mim, que sempre se entusiasmaram pelo meu percurso académico nem que fosse pelo encanto que eles próprios sentem por esta cidade maravilhosa que é Coimbra. Obrigado pelas visitas, pelas flores e pelos tupperwares. Obrigado ainda a quem já não está presente, mas que sei que continua, onde quer que esteja, a torcer por mim e a queixar-se das minhas "mãozinhas de trabalhadora", o maior obrigado, à minha bisavó que tanto me ensinou.
No geral, um obrigado a todos os que direta ou indiretamente, que por muito tempo ou por apenas um mês, fizeram parte deste meu percurso. Todo o vosso apoio foi essencial, todos os momentos fizeram até as piores partes valerem a pena. Olhando para trás, realmente, "Muito Obrigado" soa a pouco!
Um agradecimento final aos projetos e entidades que permitiram que este trabalho fosse possível. Ao projeto estratégico UID/MAR/04292/2013 concedido ao MARE (Centro de Ciências do Mar e do Ambiente) financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), ao projeto EASME Blue Labs – AMALIA (Algae-to-MAket Lab IdeAs) apoiado pela União Europeia, à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e, por fim, ao grupo do Paulo J. A. Ribeiro-Claro (CICECO, Universidade de Aveiro) pela ajuda fornecida na análise da biomassa seca por FTIR-ATR.

"Sonhei de mais com a viagem para que ela
não dê em nada" – Anaquim, em "A Estrada"

Resumo

O interesse na exploração das algas nas mais variadas áreas (como farmacêutica, nutracêutica, alimentação e cosmética) tem vindo a aumentar uma vez que são produtos naturais com variados potenciais naturais ainda pouco estudados. Deste modo, o seu estudo e dos seus compostos torna-se relevante.

Com este trabalho, foi avaliado o melhor método para o fracionamento e extração de compostos da alga vermelha *Grateloupia turuturu*, tendo em conta as gerações do seu ciclo de vida. Foi ainda avaliado o potencial antibacteriano e antifúngico dos vários extratos obtidos por diferentes solventes. E, por fim, foram analisadas em *Fourier transform infraref spectroscopy- attenuated total reflectance* (FTIR-ATR) amostras de alga seca, de modo a identificar alguns compostos presentes, assim como melhor caracterização dos seus polissacarídeos.

O método que nos propusemos otimizar foi o método de extração sequencial previamente descrito e utilizado, mas não especificamente para a alga em estudo. Para a extração dos compostos recorreu-se à utilização de vários solventes, nomeadamente *n*-hexano, etanol absoluto e água. Para o estudo da atividade antibacteriana e antifúngica, apenas foram testados os extratos de etanol e polissacarídeos. É de notar que foram feitos extratos para duas gerações do ciclo de vida da alga, geração tetrasporófita e geração gametófita frutificada. A capacidade antibacteriana dos extratos foi testada contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e a capacidade antifúngica foi testada contra *Candida albicans*. Os testes realizados tiveram por base o método de microdiluição e o ensaio de citotoxicidade foi feito com recurso à utilização de *Iodonitrotetrazolium chloride* (INT). Na análise em FTIR-ATR foi utilizado o equipamento *IFS 55 spectrometer, using a Golden Gate single reflection Diamond ATR system* e a leitura foi feita nos comprimentos de 500 a 1500 com posterior identificação dos picos mais relevantes, também foram comparadas as gerações do ciclo de vida da alga.

Após otimização do método de extração sequencial, foi através do protocolo C que obtivemos extratos com maior quantidade e estéreis. Nenhum extrato revelou capacidade antibacteriana e antifúngica total à concentração máxima usada (12,5mg/mL). Porém o extrato de etanol mostrou ser capaz de inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*

significativamente (32,7% e 22,5%, respetivamente), os extratos de polissacarídeos por sua vez mostraram efeito inibitório significativo sobre *E. coli* à mesma concentração (67,7%), contudo sem qualquer inibição sobre *S. aureus*. Para *C. albicans* verificou-se também efeito inibitório ligeiro (12.7%) não tendo, porém, significado estatístico.

Através das análises em FTIR-ATR observou-se que *G. turuturu* é composta maioritariamente por ésteres de sulfato e carragenana kappa, relativamente às diferenças entre gerações estas não são significativas sendo maioritariamente causada pela quantidade de agar.

Com este trabalho fizemos otimização do método de extração sequencial de compostos biativos de *G. turuturu*, verificámos que os extratos de etanol podem ser promissores na inibição do crescimento de estirpes bacterianas, como *E. coli* e *S. aureus*, que os extratos de polissacarídeos podem também ter relevância contra estirpes bacterianas como *E. coli* e o potencial antifúngico pode ser ainda mais explorado. Relativamente à composição os compostos polares parecem deter as propriedades antibacterianas mais relevantes, a nível dos polissacarídeos as carragenanas podem deter potencial antinfúngico, sendo também importante e relevante explorar a carragenana kappa, esteres de sulfato e a sua composição rica em agar, dados corroborados pela análise de compostos por FTIR-ATR.

PALAVRAS-CHAVE: *Grateloupia turuturu*; Atividade antibacteriana; Atividade antifúngica; Compostos bioativos.

Abstract

The interest in the exploitation of algae in the most varied areas (such as pharmaceuticals, nutraceuticals, food and cosmetics) has been increasing since they are natural products with varied natural potentials that have not yet been studied. In this way, your study and its compounds become relevant.

With this work, we evaluated the best method for the fractionation and extraction of compounds from the red algae Grateloupia turuturu, considering the generations of its life cycle. It was also evaluated the antibacterial and antifungal potential of the various extracts obtained by different solvents. Finally, we analyzed Fourier transform infraref spectroscopy-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) samples of dry algae to identify some compounds present, as well as better characterization of their polysaccharides.

The method we proposed to optimize was the sequential extraction method previously described and used, but not specifically for the alga under study. For the extraction of the compounds the use of various solvents, namely n-hexane, absolute ethanol and water was used. For the study of antibacterial and antifungal activity, only the extracts of ethanol and polysaccharides were tested. It should be noted that extracts were made for two generations of the algae life cycle, tetrasporophyte generation and fructified gametophyte generation. The antibacterial capacity of the extracts was tested against Escherichia coli and Staphylococcus aureus and the antifungal capacity was tested against Candida albicans. The tests performed were based on the microdilution method and the cytotoxicity assay was performed using Iodonitrotetrazolium chloride (INT). In the FTIR-ATR analysis, the IFS 55 spectrometer was used, using the Golden Gate single reflection Diamond ATR system and the reading was made in lengths from 500 to 1500 with subsequent identification of the most relevant peaks. life of seaweed.

After optimization of the sequential extraction method, it was through protocol C that we obtained extracts with more quantity and sterility. No extract showed total antibacterial and antifungal capacity at the maximal concentration used (12.5 mg / mL). However, the ethanol extract showed to be able to inhibit the growth of E. coli and S. aureus significantly (32.7% and 22.5%), the polysaccharide extracts in turn showed significant inhibitory effect on E. coli to the same concentration (67.7%), however without any inhibition on S. aureus.

For C. albicans, there was also a slight inhibitory effect (12.7%), but it did not have a statistical significance.

It was observed that G. turuturu is mainly composed of sulfate esters and kappa carrageenan, in relation to the differences between generations, these are not significant, being mainly caused by the amount of agar.

With this work we have done an optimization of the sequential extraction method of biative compounds of G. turuturu, we have verified that the ethanol extracts can be promising in inhibiting the growth of bacterial strains, such as E. coli and S. aureus, that the extracts of polysaccharides can also be relevant against bacterial strains such as E. coli and the antifungal potential may be further explored. Regarding the composition the polar compounds seem to have the most relevant antibacterial properties, carrageenans may have anti-fungal potential in the polysaccharides, and it is also important and relevant to exploit kappa carrageenan, sulfate esters and their agar-rich composition, as corroborated by the analysis of compounds by FTIR-ATR.

***KEYWORDS**: Grateloupia turuturu; Antibacterial activity; Antifungal activity; Bioactive compounds.*

Índice

Agradecimentos……..……...…….. **iv**

Resumo……...……. **vii**

Abstract..…….. **ix**

Lista de tabelas…….…….…….. **xv**

Lista de figuras……..…… **xvii**

Lista de abreviaturas…….……. **xix**

1. **Introdução**……..…….**13**

1.1. Biodiversidade algal……..13

1.1.1. Algas e o seu interesse económico…….15

1.2. *Grateloupia turuturu* Yamada…….. 16

1.2.1. Morfologia…… 17

1.2.2. Reprodução e desenvolvimento……..18

1.2.2.1. Ciclo de Vida……. 18

1.2.2.2. Desenvolvimento……20

1.2.3. Habitat……20

1.2.4. Potencial invasor……22

1.2.5. Composição química de *Grateloupia turuturu*……..……....23

1.2.5.1. Ficocolóides…….. 24

1.2.5.1.1. Carragenanas……..24

1.3. Extração e análise de compostos bioativos…….. 24

1.4. Interesse e aplicações biotecnológicas……... 26

1.4.1. Valor nutricional…… 27

1.4.2. Valor farmacêutico…… 28

1.4.2.1. Potencial antibacteriano e antifúngico……29

2. **Objetivos**……. **31**

2.1. Objetivo geral……31

2.1.1. Objetivos específicos……. 31

3. **Material e Métodos**……..…….. **33**

3.1. Amostragem da biomassa de *Grateloupia turuturu*……..33
3.2. Método de extração sequencial: obtenção de extratos bioativos……. .34
3.2.1. Protocolo A…….34
3.2.1.1. Extração com *n*-hexano (A)……....34
3.2.1.2. Extração com etanol (A)…….35
3.2.1.3. Extração aquosa (A)……....35
3.2.2. Protocolo B…….36
3.2.2.1. Extração com *n*-hexano (B)……....36
3.2.2.2. Extração com etanol (B)…….37
3.2.2.3. Extração aquosa (B)……37
3.2.3. Protocolo C…….... .38
3.2.3.1. Extração com *n*-hexano (C)……38
3.2.3.2. Extração com etanol (C)…….38
3.2.3.3. Extração aquosa (C)……38
3.3. Estudo da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos de *G. turuturu*…..39
3.3.1. Preparação e controlo de esterilidade dos extratos……..39
3.3.1.1. Preparação dos extratos……. 39
3.3.1.2. Controlo de esterilidade……..39
3.3.2. Caracterização das estirpes a testar…….40
3.3.3. Método de microdiluição……40
3.3.3.1. Pré ensaio……40
3.3.3.2. Ensaio…… 41
3.3.3.3. Ensaio de citotoxicidade…… 41
3.3.4. Análise estatística…….. 42
3.4. Análise da biomassa seca de *G. turuturu* por FTIR-ATR…… 42
3.4.1. Obtenção e tratamento das amostras…….. 42
3.4.2. Análise por FTIR-ATR……..... 43
4. **Resultados**……... **45**
4.1. Separação das gerações de *Grateloupia turuturu*……. 45
4.2. Comparação dos protocolos de extração……47

4.3. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos obtidos a partir do protocolo C de *G. turuturu*……48
4.3.1. Controlo de esterilidade dos extratos……. 48
4.3.2. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos no pré ensaio…….49
4.3.3. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos no ensaio e efeito citotóxico…….....49
4.3.3.1. Escherichia coli……..... 49
4.3.3.1.1. Extrato de etanol……49
4.3.3.1.2. Extrato de polissacarídeos……..... 50
4.3.3.2. Staphylococcus aureus……..... 51
4.3.3.2.1. Extrato de etanol…….....51
4.3.3.2.2. Extrato de polissacarídeos……..... 52
4.3.3.3. Candida albicans……53
4.3.3.3.1. Extrato de etanol…… 53
4.3.3.3.2. Extrato de polissacarídeos…….. 54
4.4. Análise da biomassa de *G. turuturu* por FTIR-ATR…… 55
5. **Discussão**……...…….. 59
5.1. Atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos extraídos de *G. turuturu*…….59
5.2. Análise dos compostos presentes na biomassa de *G. turuturu* por FTIR-ATR…63
6. **Conclusão**……...…….**65**
7. **Referências**……. **67**
8. **Anexos**……...…..**79**

Lista de Tabelas

Tabela I - Características distintivas das Macroalgas (adaptado de: Pereira & Neto 2015)……14

Tabela II - Comparação entre os protocolos de extração A, B e C……..47

Tabela III - Análise qualitativa de cada extrato por observação da sua contaminação…… 48

Tabela IV – Identificação dos compostos que constituem os polissacarídeos da geração tetrasporófita da alga *G. turuturu*……56

Tabela V – Identificação dos compostos que constituem os polissacarídeos da geração tetrasporófita da alga *G. turuturu*…….57

Tabela VI – Picos presentes nos espectros de FTIR de algas e as suas ligações correspondentes (adaptado de Chopin et al. 1999; Pereira et al. 2009; Souza et al. 2012)…….79

Tabela VII – Identificação dos tipos de carragenanas através de espectroscopia de infravermelhos (adaptado de Chopin & Whalen, 1993; Pereira, 2006)……80

Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição atual da *Grateloupia turuturu* pelo mundo (https://www.cabi.org/isc/datasheet/109142#567BC39B-F949-420A-8198-AEA1FE9C8E8A).....17

Figura 2 – Ciclo de vida da alga vermelha *Grateloupia turuturu*……19

Figura 3 - Distribuição geográfica da *Grateloupia turturu* em Portugal (adaptada de: Araújo *et al.* 2011)……21

Figura 4 (A e B) – Observação a olho nu de duas lâminas de *Grateloupia turuturu* em gerações diferentes do seu ciclo de vida…….45

Figura 5 (A e B) – Fotografia ao microscópio ótico de uma lâmina de *Grateloupia turuturu*, representativa da geração gametófita (onde é possível observar a geração carposporófita, parasita do gametófito)……..46

Figura 6 (A e B) – Fotografias ao microscópio ótico de uma lâmina de *Grateloupia turuturu*, representativas da geração tetrasporófita do seu ciclo de vida…….46

Figura 7 - Ensaio de citotoxicidade de *Escherichia coli* com extratos de etanol……... 50

Figura 8 - Ensaio de citotoxicidade de *Escherichia coli* com extratos com polissacarídeos…….51

Figura 9 - Ensaio de citotoxicidade de *Staphylococcus aureus* com extratos de etanol…….…….. 52

Figura 10 - Ensaio de citotoxicidade de *Staphylococcus aureus* com extratos com polissacarídeos…… 53

Figura 11 - Ensaio de citotoxicidade de *Candida albicans* com extratos de etanol…….... 54

Figura 12 - Ensaio de citotoxicidade de *Candida albicans* com extratos com polissacarídeos…….55

Figura 13 - Comparação dos espectros obtidos por FTIR-ATR das gerações tetrasporófita (T), a preto e gametófita frutificada (G), a vermelho, da alga *Grateloupia turuturu*……..57

Lista de Abreviaturas

ARA - Ácido araquidónico

CMI – Concentração mínima inibitória

CO2 – Dióxido de carbono

DMSO – Dimetilsulfóxido

ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*

EPA - Ácido eicosapentanoico

FTIR-ATR - *Fourier transform infraref spectroscopy- attenuated total reflectance*

HIV – *Human immunodeficiency virus*

INT - *Iodonitrotetrazolium chloride*

MHB - *Mueller-Hinton Broth*

OMS – Organização mundial de saúde

PUFA - *Polyunsaturated fatty acid*

TSA - *Trypticase Soy Agar*

TSB - *Trypticase Soy Broth*

1. Introdução

1.1.Biodiversidade algal

Vivemos num planeta em que cerca de 77% da sua superfície se encontra coberta por água (Yoshida, 2001); ao mesmo tempo, vivemos num planeta onde o oxigénio é indispensável aos seres vivos e onde tudo funciona com base em cadeias tróficas. Sem alimento e sem oxigénio, não existiria vida na Terra. Como consequência da elevada quantidade de água no planeta e da constante necessidade de produção de alimento e oxigénio, é possível observar uma vasta biodiversidade marinha, ao ponto de se acreditar conhecer apenas 5% de todo o ecossistema marinho embora seja este uma abundante fonte de produtores primários, nutrientes e ainda metabolitos secundários com interesse na investigação para novos compostos bioativos (Larsen *et al*., 2005).

A importância das algas encontra-se no facto de estas serem bastante abundantes, produtores primários dos ecossistemas marinhos e responsáveis por cerca de 80% do oxigénio presente na nossa atmosfera. Por tudo isto, têm sido alvos de vários estudos, alguns dos quais enfatizam o seu potencial como fonte de metabolitos secundários variados, produzidos durante fenómenos de adaptação a variações rápidas e constantes do meio, como a luz, a concentração de oxigénio e/ou dióxido de carbono (Takeshi *et al*., 2005; Kang *et al*., 2003; Plaza *et al*., 2008; Potin *et al*., 2002).

Assim, considera-se que estes organismos têm potencial de representar uma fonte importante de compostos com bioatividade, com capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana com inúmeras possibilidades de utilização, tanto pela indústria alimentar como farmacêutica (entre outras) (Matsukawa *et al*., 1997).

Estima-se que existam mais de 5000 espécies de algas espalhadas pelo planeta sendo que podem apresentar desde tamanhos microscópicos (as microalgas, no fitoplâncton) a tamanhos de florestas (até 60 metros de comprimento) mas de baixo de água (as macroalgas, neste caso em concreto, as florestas de *Kelps* (algas castanhas de grande porte da classe Phaeophyceae). Devido ao número elevado de espécies e às grandes variações em tamanho, é dedutível que também a sua estrutura celular, assim como a formação de

corpos multicelulares e os seus pigmentos fotossintéticos sejam diferentes entre espécies (Sze, 1998).

O termo "alga" vem do latim "planta marinha" e é o nome mais comum utilizado para referir um grupo diversificado de organismos fotossintéticos provenientes de ancestrais diferentes, mas que apresentam características semelhantes. Deste modo, com base na sua filogenia podemos distinguir vários Filos, sendo que o Filo Chlorophyta (algas verdes) é o que se encontra filogeneticamente mais próximo das plantas terrestres (Draisma *et al*. 2001). Outros Filos de considerável importância, no que toca às macroalgas, são: Rhodophyta (algas vermelhas) e Heterokontophyta (ou Ochrophyta) (onde integram as macroalgas castanhas, da classe Phaeophyceae).

Normalmente as algas são separadas pelo seu tamanho, em macro ou microalgas, contudo, esta classificação é apenas empírica visto que dentro do mesmo filo podemos encontrar algas dos dois tipos (Gundula *et al*. 2007)

Podem ainda ser separadas pela cor, mais propriamente pela composição e quantidade de pigmentos fotossintéticos que possuem, como pode ser observado na tabela 1. Nesse caso, estaremos a falar então dos filos: Chlorophyta (verdes), Rhodophyta (vermelhas), Heterokontophyta (ou Ocheophyta), em específico a classe Phaeophyceae (macroalgas castanhas). Estes três grupos de algas distinguem-se ainda pelos seus ciclos de vida, como evidenciado na tabela I.

Tabela I - Características distintivas das Macroalgas (adaptado de: Pereira & Neto, 2015)

	Chlorophyta	**Rhodophyta**	**Heterokontophyta**
Clorofilas	a, b	a, d	a, c
Carotenóides	β-caroteno, luteína, neoxantina, violoxantina, zeaxantina	β-caroteno, luteína, zeaxantina	β-caroteno, fucoxantina, violoxantina
Ciclo de Vida	Ciclo digenético isomórfico	Ciclo digenético heteromórfico, Ciclo trigenético isomórfico	Ciclo digenético isomórfico, Ciclo monogenético diplonte, Ciclo digenético heteromórfico

Considerando que estas diferenças entre os três grupos são de carácter fundamental, é de esperar que um conjunto de diferenças menos relevantes ou pouco notórias surjam também. Deste modo, ocorrem não só alterações na morfologia, mas também em todos os

constituintes dos organismos incluindo os seus metabolitos secundários. Assim, é estimado que diferentes grupos de algas apresentem diferentes compostos bioativos que podem ser estudados e utilizados nas mais variadas áreas (Cardoso *et al*. 2014; Barsanti e Gualtieri, 2006).

1.1.1. Algas e o seu interesse económico

Nos últimos anos tem-se verificado um interesse crescente pelas macro e microalgas marinhas devido ao seu potencial como fonte de produtos naturais ainda pouco estudados, conhecidos e com interesse económico (Pulz & Gross, 2004; Milledge 2011; Arad and Yaron, 1992)

O interesse foi despertado pela sua utilização popular nas mais variadas situações, quer fosse como biofertilizante (designados por "moliço" na zona de Aveiro, ou "sargaço" na zona Norte do país) quer como alimento (por exemplo a "Erva-patinha" consumida nos Açores) ou como ingrediente em medicinas ancestrais e tradicionais em diversas culturas como são os casos das algas dos géneros *Sacharina*, *Laminaria*, *Sargassum* (Phaeophyceae), *Gracilaria*, *Kappaphycus*, *Eucheuma* (Rhodophyta), entre outras (Sho, 2001; Hong *et al*., 2007).

Recentemente, através deste interesse e com o desenvolvimento de novas tecnologias, começou a ser possível de compreender que substâncias estão presentes nas algas e que lhes conferem essas propriedades bioativas variadas (Scheper *et al*., 2005).

Hoje em dia, tenta-se entender cada vez mais, conhecer, extrair e dar valor aos vários produtos obtidos através das algas de modo a poderem ter aplicação, como por exemplo, na agricultura, na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética e nutracêutica. Tal deve-se ao facto destas indústrias cada vez mais procurarem novas substâncias naturais, mais eficientes e menos prejudiciais à saúde e ao ambiente (Sloan, 1999; Bull *et al*., 2007).

Nos últimos anos tem-se observado a introdução no mercado de vários produtos à base de algas, estimulado pelo aumento no interesse económico e na curiosidade da própria população, tornando-se indispensável o contínuo estudo destes organismos e das suas potencialidades, através da aquisição de maior conhecimento sobre a sua complexidade

estrutural e química (Saranraj, 2014). Na indústria alimentar, as algas surgem como sendo um alimento natural com elevado valor nutritivo e baixo teor calórico. O seu interesse prende-se ainda com a sua elevada quantidade em minerais, proteínas (como aminoácidos essenciais), vitaminas (inclusive a B_{12} que não se encontra nos vegetais superiores), fibras e ainda, pelo seu baixo teor em gorduras (Pereira, 2007). Por outro lado, também já são conhecidos nas algas compostos terapêuticos naturais com variadas atividades biológicas como atividade antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antimalárica, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras (Mayer *et al*., 2009), sendo exemplo destes os terpenóides, ácido ribonucleico, proteínas, hidratos de carbono, lípidos e outros (Fusetani, 2000).

De modo a garantir a sua possível produção em larga escala e manutenção na qualidade dos subprodutos algais, é de grande importância e urgência entender os processos biológicos, os ciclos de vida e as estratégias de sobrevivência das várias espécies de algas. Apenas com este conhecimento do ponto de vista biológico e ecológico é que se torna possível o desenvolvimento da biotecnologia das algas de modo a permitir uma manipulação adequada dos seus compostos com interesse (Stengel & Walker, 2015)

1.2. Grateloupia turuturu Yamada.

A *Grateloupia turuturu* Yamada conhecida comummente por "*devil's tongue*" é uma alga vermelha, filo Rhodophyta, classe Florideophyceae e família Halymeniaceae. Proveniente da Ásia (primeiros registos em 1980: Japão, China, Coreia, Rússia) está atualmente espalhada por vários pontos do globo, incluindo Portugal (registada no início dos anos 2000, entre 1991 e 2002) (Advisory, 2006) (Figura 1). A sua recente distribuição a nível global tem vindo a preocupar a comunidade científica visto ter características típicas de organismo invasor (Araújo, *et al*. 2011).

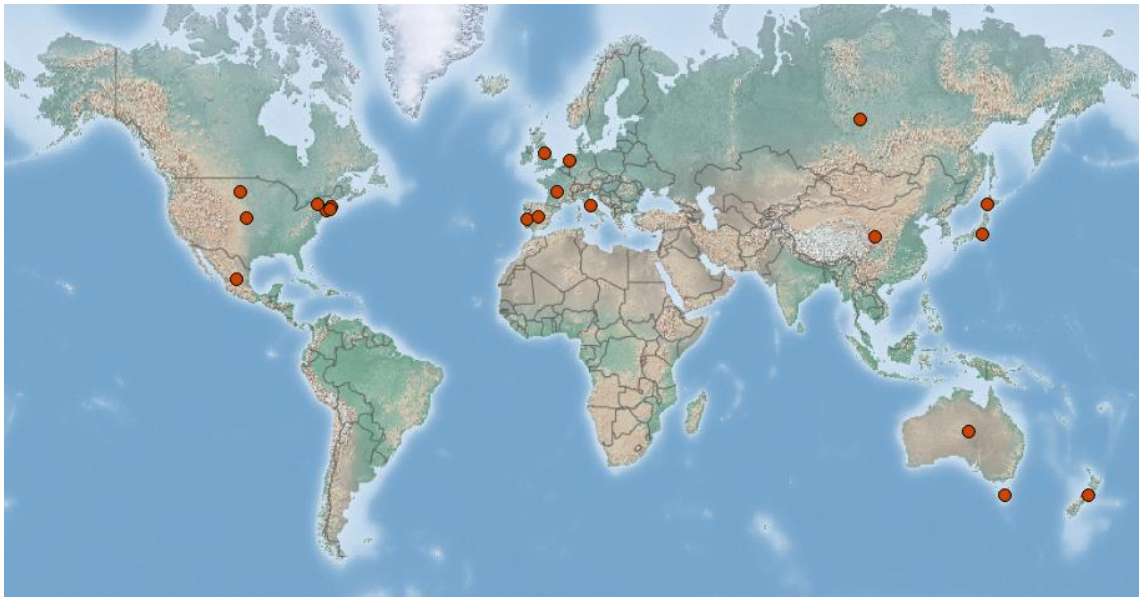

Figura 1 - Distribuição atual da *Grateloupia turuturu* pelo mundo (CABI, 2018).

Do género *Grateloupia*, são conhecidas 51 espécies (sendo o maior género na família *Halymeniacea*) e algumas destas são consideradas difíceis de definir e apenas com análises moleculares é possível fazer a distinção entre elas, como aconteceu com a *Grateloupia doryphora*, nome pelo qual a *G. turuturu* tem sido confundida na costa atlântica. (Gavio & Fredericq, 2017).

1.2.1. Morfologia

A *G. turuturu* caracterizada por ter um talo plano e membranoso, possui um estipe curto. Ao toque, a sua consistência varia entre gelatinosa a escorregadia, contudo, possui alguma firmeza. A sua cor encontra-se entre o violeta e o vermelho e, por vezes, pode ser esverdeada no topo do talo. Relativamente ao seu comprimento, a alga consegue atingir cerca de 50cm em zonas calmas, com ondulação fraca e ricas em nutrientes. Possui frondes simples que podem ser lineares ou largas-lanceoladas que podem surgir inteiras ou divididas irregularmente a partir da base alargando a partir desta.

1.2.2. Reprodução e desenvolvimento

Esta alga é monóica, significando que um mesmo indivíduo possui tanto estruturas reprodutoras masculinas como femininas. O seu ciclo de vida é anual, haplo-diplonte, trifásico e isomórfico. Deste modo, ao longo do ano, a alga apresentará uma fase haplóide (gametófita) e duas fases diplóides (carposporófita e tetrasporófita). As gerações gametófita e tetrasporófita são isomórficas (Umezaki, 1989), ou seja, de vida independente e morfologicamente semelhantes. Os indivíduos férteis (frondes gametófitas frutificadas e tetrasporófitas) ocorrem ao longo de todo o ano. Entenda-se por "geração gametófita frutificada" os indivíduos da geração gametófita (n) que, após fecundação, desenvolvem sobre si a geração parasita, geração carposporófita (2n) (Verlaque *et al*., 2005).
Esta alga é ainda conhecida por possuir várias estratégias de recrutamento, como: a germinação por esporos, crostas antigas, frondes antigas danificadas e novas crostas produzidas por antigas crostas ou frondes (Harlin & Yillalard-bohnsack, 2001):

1.2.2.1. Ciclo de vida:

O ciclo de vida da alga divide-se em três gerações (suprarreferidas) e caracteriza-se por uma das gerações ser parasita da outra (a geração carposporófita é parasita da geração gametófita). Para que haja um melhor entendimento desta alga é necessário aprofundar o conhecimento sobre o seu ciclo (CABI, 2018), conforme esquematizado na Figura 2.

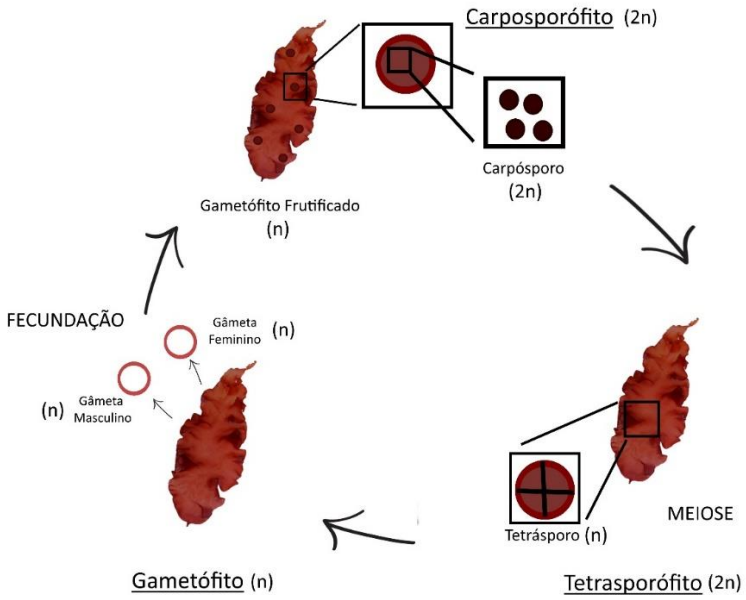

Figura 2 – Ciclo de vida da alga vermelha *Grateloupia turuturu*.

Geração tetrasporófita (2n), nesta geração o indivíduo adulto designa-se por tetrasporófito e produz tetrásporos por meiose, facilmente distinguíveis através de um microscópio ótico numa ampliação de 400x. Estas estruturas, dão origem, a 4 esporos (n) sendo que, cada um, dá origem a um indivíduo da geração seguinte (CABI, 2018). Os esporos têm dois tipos de desenvolvimento, desenvolvimento direto numa crosta discoide (caso mais comum) e o desenvolvimento indireto em que primeiro, os esporos se desenvolvem em filamentos. Dessas crostas surge a nova geração da alga, a geração gametófita (Shao *et al*., 2005).

Geração gametófita (n), esta geração é haploide e hermafrodita, ou seja, embora possua os dois sexos, não existem algas de sexos diferentes, as estruturas reprodutoras tanto masculinas como femininas encontram-se no mesmo indivíduo. O gametófito é então a estrutura hermafrodita desenvolvida a partir de filamentos formados por uma das quatro células de um tetrásporo. Possui gâmetas femininos e gâmetas masculinos que, após a fecundação entre estes, formam células 2n que se desenvolvem em carpósporos, dando início à geração carposporófita à sua superfície (CABI, 2018).

Geração carposporófita (2n), geração parasita da anterior. Desenvolve-se na lâmina do gametófito como sendo um conjunto de nódulos espalhados ao longo de toda a alga (cada nódulo designa-se por "carposporófito" e está protegido por uma estrutura formada por células do gametófito designada de "cistocarpo"). Do carposporófito são libertados esporos designados carpósporos (2n) que vão sendo gradualmente libertados ao longo do ano e que se desenvolvem para dar origem a tetrasporófitos, dando assim início à geração tetrasporófita (CABI, 2018).

1.2.2.2. Desenvolvimento

Ao longo do ano o desenvolvimento da alga é conhecido por ser variável, podendo ser separado em 3 fases, a fase de crescimento lento (ocorre no Inverno) com poucas variações em comprimento, biomassa, densidade e poucas diferenças nos tamanhos das frondes, a fase de crescimento rápido (ocorre na Primavera-Verão) com aumento de biomassa, de densidade e diferença de tamanhos e fase de morte (ocorre no fim do Verão) (Araújo *et al*. 2011).

Possui dois picos reprodutivos em janeiro e julho e o seu período de senescência vai de julho a setembro (meses que registam as temperaturas mais elevadas) (Araújo *et al*. 2011).

1.2.3. Habitat

Esta alga, pode ser encontrada tanto em áreas protegidas como em áreas expostas à ondulação, embora o seu crescimento seja comprometido por estas condições, apresentando maior comprimento em locais com pouca ondulação. É uma alga que tolera grandes variações de temperatura e salinidade e consegue adaptar-se bem a condições eutróficas.

Fixa-se em rochas situadas nas zonas "mid-intertidais" e é fácil de encontrar em poças (Araújo *et al*. 2011).

Segundo um estudo realizado em Portugal, a *G. turuturu* encontra-se maioritariamente em zonas dos portos (Porto de Leixões, de Aveiro, de Viana, da Figueira) (Araújo *et al*. 2011). Nesse mesmo estudo foram definidos os processos de dispersão, nomeadamente, dispersão primária que é favorecida por atividades humanas. Verifica-se, nestes casos, descontinuidade espacial entre o local de origem da alga e o ponto em que a nova população se fixou (exemplo do que se sucede no porto da Figueira). E dispersão secundária em que há dispersão em locais adjacentes (justifica toda a zona norte), Figura 3.

Figura 3 - Distribuiçã újo *et al.* 2011)

1.2.4. Potencial invasor

Acredita-se que esta alga, proveniente do Japão e atualmente dispersa por todo o globo, tenha um potencial invasor devido à sua facilidade em se espalhar por outros locais em condições ambientais menos propícias. Contudo, pensa-se que esta propagação tenha tido como percursores a importação de ostras e as atividades de aquacultura (Verlaque *et al*., 2005).

A preocupação com este assunto não é apenas limitada a um país, mas sim a todos aqueles onde começa a surgir esta alga e, por isso, vários estudos foram realizados na tentativa de dar resposta à questão "será a *G. turuturu* uma alga invasora ou estará apenas de passagem?" (D'Archino *et al*., 2007; Villalard-Bohnsack and Harlin, 1997; Harlin and Villalard-Bohnsack, 2001; Mathieson *et al.*, 2008; Verlaque *et al.*, 2005, Araújo *et al.*, 2011; Cecere *et al.*, 2011; Mulas & Bertocci, 2016)

Em Araújo, *et al*. 2011, os autores identificam nesta alga algumas características de potencial invasor como, a presença de lâminas reprodutoras todo o ano, a capacidade de aumentar a sua abundância em períodos de condições ambientais pouco favoráveis, a capacidade de criar populações densas e com elevada biomassa até ambos estarem no seu valor máximo e o aumento no nº de locais onde a espécie tem sido encontrada nos últimos 8 anos, o que indica a capacidade de dispersão.

Apesar das conclusões a que chegaram estes e outros autores de outros artigos, não só em Portugal como em França (Villalard-Bohnsack and Harlin 1997, Harlin & Villalard-Bohnsack 2001, Simon *et al.* 2001; Bárbara and Cremades, 2004), indicarem que a *G. turuturu* deve ser considerada uma ameaça e apesar da previsão de que esta se irá continuar a propagar em novos locais (Araújo *et al*. 2011), estudos mais recentes dizem algo contrapondo.

Em 2016, um trabalho realizado em Portugal veio fornecer uma nova visão sobre o comportamento desta alga. Neste estudo, os autores distinguem dois tipos de espécies não-nativas, aquelas que se aproveitam das alterações ecológicas provocadas por atividades humanas para se conseguirem estabelecer (espécie passageira) e aquelas que conduzem às alterações ecológicas (espécie invasora) (Mulas & Bertocci, 2016).

É de notar que os modelos não se excluem mutuamente e podem ocorrer situações intermédias. Contudo, esta bipartição permitiu aos investigadores concluir que a *G.*

turuturu não possuía um carater invasor visto não se detetarem alterações ecológicas provocadas pela sua presença, mas sim, um carácter passageiro, não danificando o ecossistema (aproveitando-se apenas de um já fragilizado) (Mulas & Bertocci, 2016). Este estudo veio dar força a um estudo mais antigo (em 2011) realizado no mediterrâneo em que também se concluiu que esta alga não tinha potencial invasor (Cecere *et al*., 2011).

1.2.5. Composição química de *Grateloupia turuturu*

G. turuturu é considerada uma boa fonte de nutrientes devido à sua composição em proteínas (as algas vermelhas são o grupo de algas com níveis mais elevados de proteínas), polissacarídeos de cadeia longa (que constituem 49,8% do peso seco da alga), neste caso em específicio, carragenana, mais concretamente um polissacarídeo híbrido agar-carragenana. É também rica em vitaminas como a E e K1 e detém elevadas quantidades de minerais (Rodrigues *et al.* 2015; Lordan 2011). Possui um baixo teor em lípidos (Kendel & Couzinet-mossion, 2013) embora os que possui sejam importantes pois não são produzidos pelo corpo humano. Estes lípidos pertencem ao grupo dos, comumente conhecidos, "PUFA's" que em português se traduz por ácidos gordos polinsaturados, mais especificamente, designados por ácido eicosapentanoico (EPA) e ácido araquidónico (ARA).

Outro composto produzido pela *G. turuturu* é a R-ficoeritrina conhecida por ser o principal pigmento fotossintético das algas vermelhas (Denis & Ledorze, 2009).

Esta alga tem ainda na sua composição fluridósido e ácido isetiónico que confere alguma capacidade antiaderente, impedindo os crustáceos de se fixarem nos cascos dos barcos (Simon-Colin *et al.*, 2002).

1.2.5.1. Ficocolóides

Ficocolóides são polissacarídeos de cadeias longas, constituídos por açúcares simples que, por possuírem estas características, impedem a sua digestão e assimilação por organismos. São encontrados nas paredes celulares e nos espaços intercelulares de um grande número de algas, principalmente em algas vermelhas e castanhas (Cardozo *et al*., 2007). Um ficocolóide pode ser entendido como um gel produzido por algas. Existem vários tipos de ficocolóides podendo estes ser separados pelos tipos de algas que os produzem, os alginatos são produzidos maioritariamente por algas castanhas (alginófitas), o agar é produzido por algas vermelhas (agarófitas), as carragenanas são produzidas por algas vermelhas da ordem *Gigartinales* (carragenófitas) (Chopin *et al*., 1999) e a laminarana é produzida por algumas algas castanhas.

1.2.5.1.1. Carragenanas

Apesar da carragenana ser produzida especificamente por algas vermelhas do filo *Gigartinales*, algas vermelhas de outros filos podem produzir polissacarídeos híbridos, como é o caso da *G. turuturu*. E embora todas as algas designadas "carragenófitas" produzam este polissacarídeo, existem três famílias distintas de carragenanas (família kappa, família iota e família lambda) (Pangestuti & Kim, 2015) e por isso nem todas as carragenófitas produzem exatamente o mesmo polissacarídeo.

1.3. Extração e análise de compostos bioativos

Dependendo do que se pretende ao utilizar uma alga, podem ser utilizados variados métodos de extração, desde métodos específicos para um determinado composto já conhecido e de interesse ou métodos gerais que extraem frações de compostos e que podem servir para dar início à descoberta de novas moléculas. São exemplos desses métodos a extração sobre alta-pressão, extração alcoólica, extração alcalina, extração com recurso a micro-ondas e extração com CO_2 supercrítico. (Booth, 1969; Rodriguez – Jasso *et al.*, 2011; Yokoya *et al.* 2010; Hytönen *et al*., 2009; Crampon *et al.*, 2011).

No caso em que a mistura de compostos é complexa, torna-se difícil estabelecer uma técnica específica para a separação dos seus constituintes, contudo, pode ser realizada uma separação de diferentes grupos de compostos recorrendo a vários solventes orgânicos como é o caso do metanol, etanol, diclorometano, n-hexano, água, entre outros (Hellio *et al*., 2001; Krish and Das, 2014; Rosaline *et al.*, 2012; Saritha *et al*., 2013; Karthikeyan *et al.*, 2015; Jaswir *et al.*, 2014). Embora, cada fração represente ainda uma mistura de compostos, esta mistura será menos complexa e permite deduzir, até certo ponto, que moléculas se podem encontrar em cada extrato obtido através de cada um dos solventes. Isto porque já existe informação sobre que compostos solubilizam em contacto com determinado solvente. No caso do n-hexano, sabe-se que normalmente podem ser isolados ésteres, éteres, terpenóides, esteróis, ácidos gordos, alcanos, entre outros. Por outro lado, com o metanol ou com o etanol é sabido que permitem isolar compostos polares, ou seja, taninas, alcaloides e glicosídeos (Sarker *et al.*, 2006).

Para analisar o potencial bioativo dos extratos, é comum recorrer-se a análises de citotoxicidade como por exemplo, testes de difusão em agar (em poço) ou em disco, testes para avaliar a concentração mínima inibitória (CMI) para casos em que os extratos inibem o crescimento dos organismos ou a leitura de citotoxicidade para casos em que ocorreu crescimento dos organismos, mas estes acabaram por morrer (Pérez et al., 2010).

Após os bioensaios, para que os compostos bioativos possam ser identificados, podem ser utilizadas várias técnicas como é o caso da cromatografia liquida, cromatografia gasosa, ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de absorção molecular e espectroscopia de massa. (Sarker *et al*., 2006; Bhakuni *et al*., 2005). Contudo, dependendo do trabalho, deve ser feita uma avaliação de qual será a melhor técnica. Análises como a cromatografia gasosa implicam um conhecimento mais aprofundado das moléculas que constituem a alga em estudo. Em casos em que não existe esse tipo de informação torna-se difícil usar técnicas assim, pelo que outras técnicas mais simples devem ser tidas em consideração para uma primeira tentativa de verificação dos compostos, uma já referida, a espectroscopia de infravermelhos, pode ser tida em consideração assim como a espectroscopia Raman (Pereira *et al*., 2013)

1.4. Interesse e aplicações biotecnológicas

Desde sempre que os produtos naturais têm servido como primeiro tratamento a doenças. A utilização de plantas para fins medicinais data do Neandertal e nas culturas orientais ainda hoje são praticadas tradições ancestrais (cerca de 2000 a.C.) onde se recorre ao uso de plantas para o tratamento de variadas patologias. Na atualidade, muitos destes tratamentos, continuam, de certa forma, a existir para situações como por exemplo o tratamento de inflamações, gripes, contaminações por parasitas ou constipações (Gad, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que da população mundial, atualmente, cerca de 80% ainda recorre à medicina tradicional para uma primeira abordagem ao tratamento de certas doenças, como é o caso de países como Singapura e a República da Coreia (Coreia do Sul) (WHO, 2014). Este conhecimento empírico tem levado ao reconhecimento dos recursos naturais como sendo uma boa aposta para futuras abordagens terapêuticas, uma boa forma de compreensão de várias vias metabólicas e da biologia celular e ainda como sendo recursos que estão constantemente presentes e que servem como ferramentas na química biológica e molecular (Scheper *et al*., 2005).

Embora se verifique um constante avanço no desenvolvimento de novos métodos terapêuticos, também se regista uma constante evolução dos organismos causadores de doenças, tornando-se um grande desafio para a medicina atual, solucionar formas novas de as combater.

O desenvolvimento de novas drogas tem tido por base apenas um pequeno número de moléculas, na sua maioria de origem natural (Cragg *et al*., 2005), contudo, 50% das drogas existentes no mercado são extraídas ou obtidas sinteticamente (exemplo da aspirina, morfina e penicilina) (Balandrin *et al*., 1993). Assim sendo, a maioria dos tratamentos contra microrganismos, não têm na sua base compostos novos, mas sim derivados das moléculas originais, tentativa esta de combater a resistência dos patógenos.

Associando toda esta informação ao facto de existirem focos problemáticos como o caso dos hospitais onde se encontram doentes cuja capacidade de combater infeções é reduzida se não forem administrados antibióticos e tendo em conta os dados estatísticos (reportados

pela ECDC) que 25 mil pessoas morrem por ano devido a infeções bacterianas e estima-se em 2050 ocorrerá 390 mil mortes na europa será de concluir mais uma vez que a luta para procurar novas soluções, novos tratamentos e novas moléculas, deve ser constante e célere (ECDC, 2018).

No geral as algas já começam a ser conhecidas por serem boas fontes de nutrientes (tanto na alimentação humana como animal) e, cada vez mais, pelas suas propriedades nutracêuticas, farmacêuticas e cosméticas (Pulz & Gross, 2004; Milledge 2011; Arad 1992) Sobre a *G. turuturu*, é sabido que tem, também, um elevado potencial como alimento direto ou processado assim como para aplicações nutracêuticas devido ao seu perfil nutritivo (Rodrigues *et al*. 2015).

1.4.1. Valor nutricional

Esta alga pode ser consumida diretamente ou processada e é uma boa fonte de nutrientes, por exemplo os "PUFA's" cujo consumo previne certos problemas de saúde, como problemas cardiovasculares e alguns tipos de cancro (Tapiero *et al*., 2002).

Também a R-ficoeritrina que produz (Denis *et al*. 2010) pode ser usada na alimentação, neste caso, como corante alimentar (Sekar and Chandramohan, 2008).

Apenas falando dos ficocolóides, onde se incluem as carragenanas que constituem a *G. turuturu*, podem ser usados na indústria alimentar como espessantes, gelificantes e estabilizadores de suspensões (Venugopal, 2008; Rodrigues *et al*. 2015).

1.4.2. Valor farmacêutico

Não sendo consumida diretamente, esta alga continua a ser relevante pelos compostos que detém com potencial para a saúde humana. É exemplo disto mesmo, o caso dos PUFA's já referidos anteriormente. Para além disso, é conhecido nesta alga, pelas suas propriedades antifúngicas, o ácido gordo 3-hidroxi (Kendel *et al*., 2013) e a capacidade de proteção

contra oxidação (Nagan & Zoeller, 2001). Alguns artigos indicam ainda o potencial inibidor desta alga contra bactérias patogénicas (Pang *et al*., 2006) e ainda contra o vírus *sindbis* (Kim *et al*., 1997). Também aqui a R-ficoeritrina tem a sua importância podendo ser usada como corante em análises de microscopia de fluorescência (Fleurence, 2003). Pelo seu elevado interesse, já foram escritos vários artigos sobre este pigmento extraído especificamente da G. turuturu e o seu valor comercial em 2013, em França era de 300€/mg (Munier *et al*. 2013).

As carragenanas, para além do efeito espessante, são polissacarídeos sulfatados e possuem propriedades antivirais (Chattopadhyay *et al*., 2007), anticoagulantes (Shanmugam *et al*., 2000), antitrombóticas (Sen Sr *et al*., 2002) e antitumorais (Pangestuti & Kim, 2015) (artigo de revisão). É-lhes reconhecida, ainda, a capacidade de redução do nível de colesterol no sangue, a sua utilidade no tratamento de úlceras gástricas (neutralizando a pepsina e reduzindo a acidez no estômago), a sua utilidade no tratamento dos cabelos (união do polissacarídeo com a queratina) e a sua capacidade de imobilizar em pequenas esferas (esferas de carragenanas) tanto enzimas como células e inclusivé microrganismos (Pangestuti & Kim, 2015).

Já é conhecido nas carragenanas do tipo Iota e Lambda a capacidade de inibir entre 80 a 100% o desenvolvimento do vírus *Herpes simplex* (Carlucci *et al*., 2004). Para além disso, sabe-se que as carragenanas interferem na fusão das células infetadas com o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) e também inibem a enzima retroviral "transcriptase reversa". Estes compostos constituem um potente anti-inflamatório e produzem efeitos prolongados no sistema imunitário. São vários os artigos já publicados que mostram o potencial das carragenanas no combate a vários vírus (Talarico *et al*., 2007; Carlucci *et al*., 2004; Wang, W. *et al*. 2012).

São também úteis em laboratório para a imobilização de bactérias, na produção de meios de cultura (Walker and Day, 1943; Bromke & Furiga, 1991).

1.4.2.1. Potencial antibacteriano e antifúngico

Segundo a literatura existente, pouco se sabe sobre esta espécie de *Grateloupia*, contudo, já foram observados resultados positivos, no que toca à bioatividade contra determinados microrganismos de interesse clínico e farmacológico, em espécies do mesmo género desta alga, como é o caso da *Grateloupia filicina* cujos extratos demonstraram ter capacidade contra bactérias gram positivas e gram negativas como *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Jiang *et al*. 2013) e ainda contra *Bacillus subtilis* (Kavita *et al*., 2014) assim como, apresentaram ter atividade contra várias espécies do género *Vibrio: Vibrio harveyi, V. alginolyticus, V. vulnificus, V. parahemolyticus* e *V. alcaligenes* (Manilal *et al*. 2010).

No caso dos fungos, a informação disponível relativamente à *G. turuturu* ou mesmo ao seu género é muito limitada é apenas conhecido o potencial em algas vermelhas, no geral. Como é o caso da alga *Odonthalia corymbifera* que demonstrou possuir capacidade antifúngica contra *Candida albicans, Aspergillus fumigatus, Trichophyton rubrum* e *Trychophyton mentagrophytes* (Oh *et al*., 2008), ou o exemplo da alga *Asparagopsis taxiformis*, sujos extratos etanólicos apresentaram atividade contra *Aspergillus* spp (*A. fumigatus, A. terreus e A. flavus*) (Genovese *et al*., 2013). Ainda um outro estudo veio provar que diversos extratos da alga *Hypnea musciformis* atuavam como antifúngicos contra dermatófitos (*Trychophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *M. gypseum*) e contra leveduras, em particular, *Candida albicans* (Guedes *et al*., 2012). Outros relatos sobre o potencial das carragenanas produzidas por *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* demonstram atividade inibitória contra *Aspergillus fumigatus* e *Alternaria infectoria* (Soares *et al.*, 2016)

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Considerando a importância dos organismos marinhos na produção de compostos com os mais variados interesses do ponto de vista tanto económico como ecológico e, deste modo, biotecnológico, e tendo em conta a pobre exploração das algas em Portugal, é objetivo deste trabalho avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico de uma alga, *Grateloupia turuturu*, assim como identificar alguns dos seus compostos de interesse, nomeadamente a nível dos seus polissacarídeos.

2.2. Objetivos Específicos

É pretendido a otimização do método de extração sequencial, de modo a reduzir situações de erro e contaminação ao longo do processo de obtenção de extratos com potencial bioativo.

Obtenção de extratos bioativos diferenciados pelos compostos presentes devido a níveis de polaridade distintos, utilizando, assim, solventes como o n-hexano, o etanol e a água, obtendo-se os respetivos extratos.

Análise do potencial antibacteriano contra *Echerichia coli* e *Staphylococcus aureus* e antifúngico contra *Candida albicans* dos extratos obtidos, determinação de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e estudo da redução de crescimento (efeito citotóxico) por método de microdiluição com *Iodonitrotetrazolium chloride* (INT).

Caracterização da biomassa da alga seca por FTIR para identificação de compostos com potencial bioativo e avaliação de diferenças entre os compostos e/ou concentração entre as gerações do ciclo de vida.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem da biomassa de *Grateloupia turuturu*

A biomassa de *Grateloupia turuturu* foi recolhida na praia de Buarcos, Figueira da Foz, procedendo-se à apanha de vários indivíduos adultos (com comprimentos superiores a 5 cm). As recolhas tiveram lugar no fim do Outono e Primavera (entre os meses de outubro e abril) nos períodos de baixa-mar, precisamente nos dias 06/10/2017, 19/11/2017, 17/01/2018 e 20/04/2018.

Toda a biomassa foi lavada com água do mar filtrada (obtida da mesma praia) de modo a minimizar a quantidade de impurezas assim como organismos epibiontes (em particular, epífitas). Seguidamente, foi separada em dois recipientes, de acordo com as características das suas lâminas (observadas a olho nu ou através da lupa e, em caso de dúvida, através do microscópio ótico de cortes transversais), com o objetivo de separar as gerações gametófita frutificada (e a respetiva geração carposporófita que a parasita) e a geração tetrasporófita.

Para um melhor processo de separação foram observadas as seguintes características: presença de nódulos visíveis a olho nu (geração carposporófita no gametófito frutificado) em contraste com lâminas lisas e sem nódulos (geração tetrasporófita) Em situações de dúvida, recorreu-se à observação à lupa ou no microscópio ótico (*Kern, Germany*) em ampliações (de 100 ou 400 vezes) procurando identificar carpósporos (pertencentes à geração carposporófita) ou tetrásporos (pertencentes à geração tetrasporófita) que são de fácil distinção uma vez que estes últimos apresentam-se como um conjunto de 4 células, distinta das restantes células da lâmina da alga.

Parte da biomassa obtida e previamente separada foi guardada em sacos hermeticamente fechados (devidamente identificados com o nome da alga, a data de apanha e a geração) e posteriormente congelada a uma temperatura de cerca de -22°C para estudos posteriores. Outra parte foi novamente lavada, mas desta vez com água destilada e de seguida foi-lhes retirada a maior parte da humidade recorrendo a papel absorvente. Foram pesadas e então

colocadas em caixas de Petri (previamente forradas com papel vegetal e bem identificadas com o nome da alga, a data de apanha e a geração o ciclo de vida). Por fim, foram colocadas na estufa a secar a uma temperatura constante de cerca de 40°C.

Após secagem, procedeu-se à sua moagem recorrendo a um moinho de café (*Taurus aromatic, Spain*) e finalmente foram armazenados os produtos secos em frascos estéreis (devidamente identificados com o nome da alga, a data de apanha e a geração do ciclo de vida) em local seco, escuro e à temperatura ambiente.

3.2. Método de Extração Sequencial: obtenção de extratos bioativos

Para cada geração do ciclo de vida (duas gerações) foram feitas três réplicas e, durante todo o processo os recipientes foram devidamente identificados com o nome da alga, a geração do ciclo de vida, o número da réplica (1,2 ou 3) e que reagente foi usado para obtenção dos extratos (*n*-hexano, etanol ou água).

Este método apesar de já ter sido usado por outros investigadores com intuito de obtenção de extratos biactivos, ainda não está descrito a sua utilização *Grateloupia turuturu*, por isso houve a necessidade de otimização. Os protocolos apresentados em A, B e C correspondem a um mesmo método, mas com modificações de otimização entre eles.

3.2.1. Protocolo A

3.2.1.1. Extração com *n*-hexano (A)

A partir de 1g de amostra de alga seca num gobelé foram adicionados 20mL de *n*-hexano. Foi feita a homogeneização por 20 minutos numa placa de agitação a 220rpm, à temperatura ambiente (*RS lab 11C, Rslab, Spain*). Após os 20 minutos, realizou-se a filtração a vácuo do conteúdo do gobelé recorrendo a um filtro em vidro com placa porosa de sílica G_3 acoplado a um quitasato. A solução filtrada foi recuperada para um outro balão e a amostra seca retida no filtro foi também recuperada para um novo gobelé. Ao gobelé

voltou-se a adicionar 20 mL de *n*-hexano e repetiu-se o processo até a solução de homogeneização ficar translúcida, indicando que não é possível extrair mais compostos apolares da amostra. A solução retida foi recuperada para o mesmo balão da primeira filtração e a amostra seca retida no filtro foi recuperada para um novo gobelé que foi usado no processo de extração seguinte (extração com etanol).

O extrato de *n*-hexano foi sujeito a evaporação e para tal recorreu-se ao evaporador rotativo (*Rotavapor R-3000, Buchi, Switzerland*), com banho-maria a 40°C. A solução foi retirada do evaporador quando esta aparentava ter um volume entre ½ a 1/3 do volume inicial. O extrato teve de seguida um dos dois destinos: (1) ou foi transferido para um tubo de falcon tapado com papel de alumínio e armazenado no congelador (-22 °C) ou (2) foi transferido para um frasco de vidro (sem tampa) e colocado na estufa a secar a 40 °C até estar seco e depois armazenado em frasco fechado, no escuro e à temperatura ambiente até aos estudos seguintes.

3.2.1.2. Extração com etanol (A)

A amostra seca recuperada do filtro G3 (do final do procedimento de extração com *n*-hexano), foi usada para dar inicio à extração com etanol. Semelhante à extração com *n*-hexano, o processo inicia-se adicionando 20 mL de etanol e procedendo-se à agitação durante 20 min. Todos os restantes passos são equivalentes ao procedimento de extração com *n*-hexano. Apenas de denotar que antes do processo de evaporação, foi adicionado ao extrato água na proporção de 1:1.

A amostra de alga que voltou a ficar retida no filtro foi reservada novamente para a última etapa da extração sequencial, a extração aquosa, para obtenção dos polissacarídeos.

3.2.1.3. Extração aquosa (A)

O processo de extração aquosa divide-se em duas partes: (1) cozedura em água destilada da amostra proveniente da extração anterior e (2) extração dos polissacarídeos com etanol.

Relativamente à cozedura em água destilada primeiramente foi colocado um gobelé com 100 mL de água destilada numa placa de aquecimento até levantar fervura, altura em que foi adicionada a amostra de alga. Deixou-se em fervura lenta a mistura durante duas horas, tendo sido por várias vezes controlado o volume da solução (adicionando-se água para garantir um volume constante de 100 mL). Ao fim das duas horas, com a solução ainda quente, procedeu-se à filtração a vácuo com recurso a um quitasato e a um funil de porcelana onde foi colocado gaze. A parte retida no filtro foi descartada e a solução que ficou no quitasato foi novamente filtrada, mas desta vez com um filtro de sílica G3. Seguidamente a solução filtrada foi colocada num balão do evaporador rotativo e foi a evaporar a 50 °C até ter cerca de ¼ do volume inicial.

No passo seguinte, relativo à extração dos polissacarídeos, mediu-se o volume da solução evaporada anteriormente obtida, de modo a calcular a quantidade de etanol absoluto necessário, sendo usada uma proporção de 2:1 (etanol:solução). A solução foi transferida para um novo gobelé e depois foi-lhe adicionado o volume de etanol. Imediatamente tornou-se visível a separação de duas fases distintas na solução, uma zona, de cor alaranjada e uma zona mais esbranquiçada na qual se encontravam os polissacarídeos. Os polissacarídeos foram retirados do gobelé com auxílio de uma vareta de vidro, os restantes foram recuperados após uma nova filtração a vácuo com recurso a um funil com gaze. O total de polissacarídeos recuperados foi colocado num novo gobelé onde estes foram deixados pelo menos 24h em etanol absoluto, a -4 °C.

Por fim, os extratos de polissacarídeos foram colocados a secar em estufa à temperatura constante de 40 ºC até não haver variação no seu peso.

3.2.2. Protocolo B

3.2.2.1. Extração com *n*-hexano (B)

As alterações efetuadas do protocolo A para o B relativamente à extração com *n*-hexano estiveram maioritariamente relacionadas com a quantidade de amostra inicial de biomassa da alga. Neste novo método (método B) em vez de 1 g de peso seco, utilizou-se 3 g. Assim, foi necessário aumentar a quantidade de solventes (em vez de 20 mL de *n*-hexano, passou-

se a utilizar 60 mL). O tempo de agitação e rotação foram mantidos em cada repetição, porém a adição de solvente e a sua agitação não foi repetida até o solvente estar translúcido mas sim apenas adição de solvente 2 vezes.

A última alteração efetuada face ao protocolo A, foi relativamente ao processo de evaporação em que, neste caso, apenas se retirava a solução do evaporador rotativo quando esta aparentava ter um volume entre os 2 mL e os 5 mL.

3.2.2.2. Extração com etanol (B)

Na extração com etanol as alterações feitas no protocolo B para *n*-hexano foram aqui mantidas, apenas usando-se o solvente etanol. Relativamente ao protocolo A apenas no momento de evaporação aqui foi retirada a adição de água que estava contemplada no referido protocolo.

3.2.2.3. Extração aquosa (B)

Uma vez que neste protocolo (B) se começou com uma quantidade de biomassa de alga de 3g, também aqui ocorreram alterações no volume de água destilada usada na cozedura, tendo sido utilizados 300 mL.

Enquanto que, no protocolo A houve uma filtração com um filtro de sílica G3 e de seguida uma evaporação da solução filtrada até ¼ do volume inicial, no protocolo B estas etapas foram eliminadas.

No protocolo B, a recuperação dos polissacarídeos foi realizada de forma diferente aquando da adição de etanol absoluto. Neste caso, parte dos polissacarídeos foram colhidos imediatamente com uma vareta de vidro e colocados num novo recipiente com etanol absoluto para lavagem. Mas os polissacarídeos de cadeia mais curta não foram retidos pela vareta ficaram na solução durante 24h a 4 ºC, de forma a depositarem no fundo para depois serem mais facilmente recolhidos por remoção do sobrenadante. Foram seguidamente adicionados aos anteriormente recolhidos para lavagem em etanol durante 24h a 4 ºC, para posterior secagem.

3.2.3. Protocolo C

3.2.3.1. Extração com *n*-hexano (C)

Neste protocolo fez-se alteração ao tempo de agitação, passou de 20 minutos a 1h30min, com uma repetição.

Outra alteração foi a nível da evaporação dos extratos até 25 mL, de seguida foram transferidos para tubos de falcon estéreis e foram sujeitos a liofilização no equipamento VaCo2 (*Zirbus Technology, Germany*).

3.2.3.2. Extração com etanol (C)

As alterações efetuadas foram similares as referidas no protocolo C para extração com *n*-hexano.

3.2.3.3. Extração aquosa (C)

Neste protocolo não houve a preocupação de tentar manter um volume de água constante, após a cozedura, era medido o volume de solução para se adicionar o etanol na proporção de 2:1. Apenas foram recuperados os polissacarídeos que se separaram logo da solução com o uso da vareta, colocando-os num recipiente com etanol durante 24h a -4 °C.

3.3.Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de *G. turuturu*

3.3.1. Preparação e controlo de esterilidade dos extratos

3.3.1.1. Preparação dos extratos

18 amostras foram obtidas para análise correspondendo às duas gerações do ciclo de vida da alga, aos três agentes de solubilização usados e triplicados de cada. Os extratos secos foram solubilizados em dimetilsulfóxido estéril (DMSO) 0,2% até obtenção de uma concentração final de 50 mg/mL. Contudo, devido à dificuldade na pesagem do extrato liofilizado de *n*-hexano, à totalidade foi adicionado a cada réplica a mesma quantidade de DMSO a 0,2% (1 mL).

Para aumentar o poder de solubilização, foi necessário, após 5 minutos de homogeneização, sujeitá-los a uma incubação a 45 °C por 15 minutos em banho seco e posterior homogeneização por mais 5 minutos. De seguida, foram ainda expostos a sonicação em ultrassom *(Ultrasons, PSelecta, Spain)* durante 2 minutos. Finalmente, realizou-se uma nova homogeneização de 2 minutos seguida de centrifugação a 13000xg por 1 minuto. O conteúdo solúvel foi separado por alíquotas sujeito a 20 min de luz ultravioleta e armazenado a -32 °C até posterior utilização.

3.3.1.2. Controlo de esterilidade

Para analisar a esterilidade dos extratos, a cada extrato foram retirados 10 µL que foram seguidamente inoculados em meio *Mueller-Hinton Broth* (*MHB*, 1000µL) (*Merck, Germany*), com incubação a 35 °C por um período de 24 horas. Após este tempo, foram inoculados 5 µL de cada suspensão em meio *Trypticase Soy Agar* (*TSA*) (*Prolabo, Belgium*) incubados a 24h a 35+/-2 ºC com posterior observação de ausência ou presença de crescimento.

Os extratos que apresentavam algum tipo de contaminação foram eliminados dos estudos seguintes.

3.3.2. Caracterização das estirpes a testar

Para testar a capacidade antibacteriana e antifúngica dos extratos foram utilizadas as seguintes estirpes: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 90028 (*American Type Culture Collection, Rockville, MD*).

No caso das bactérias, as estirpes encontravam-se criopreservadas e como tal, foram crescidas em *Trypticase Soy Broth* (*TSB, Merck, Germany*), *overnight* a 35 ºC ± 2 ºC e, de seguida, as suspensões bacterianas crescidas foram inoculadas em *Trypticase Soy Agar* (*TSA, Prolabo, Belgium*) para obtenção de colónias isoladas e puras.

No caso do fungo, a estirpe criopreservada foi crescida em *Trypticase Soy Broth* (*TSB*) (*Merck, Germany*), e de seguida, a partir da suspensão crescida *overnight*, colónias isoladas e puras foram obtidas em meio de *Sabouraud Dextrose Agar* (*Himedia, India*).

3.3.3. Método de microdiluição

3.3.3.1. Pré ensaio

Inicialmente foi realizado um pré ensaio em que foram feitas diluições sucessivas dos extratos de *G. turuturu* de modo a obter concentrações nos extratos de etanol e polissacarídeos entre 4.9 μg/mL e 10000μg/mL no meio de *MHB* (Muller-Hinton Broth).

Para testar a bioatividade dos extratos, tanto as bactérias com o fungo, foram suspendidos em soro fisiológico a 0,5 McFarland, ou seja, a $1x10^8$ CFU/mL. Deste modo, a cada micropoço adicionou-se uma concentração final de $4x10^5$ CFU/mL.

Foram realizados controlos positivos das estirpes, assim como controlos negativos do meio de cultura e controlos negativos dos extratos.

O ensaio foi realizado em duplicado, as microplacas foram incubadas a 35 ºC ± 2 ºC, *overnight* e, após esse período, foi determinada a densidade ótica de cada microplaca a 600nm de modo a avaliar o crescimento microbiano (Valgas *et al*., 2007).

3.3.3.2. Ensaio

Com base nos resultados obtidos no pré-ensaio, voltou a ser realizada a técnica de microdiluição, mas neste caso para concentrações fixas de 5, 7.5, 10 e 12.5 mg/mL para os extratos de etanol e polissacarídeos. Os extratos de *n*-hexano, apresentavam uma concentração desconhecida e foram, por isso, testados na mesma proporção de diluição dos restantes extratos. Todo o processo foi semelhante ao pré ensaio, mas sem diluição sucessiva.

Relativamente aos controlos, foram efetuados controlos das três estirpes, controlo negativo do meio (*MHB*) e controlos negativos dos extratos às diferentes concentrações que foram testadas. Tudo foi realizado em duplicado. O período de incubação foi de 24h a 35 ± 2 ºC. No fim, as microplacas foram lidas à densidade ótica a 600 nm de modo a avaliar o crescimento (Valgas *et al*., 2007).

3.3.3.3. Ensaio de citotoxicidade

Para observar a redução no crescimento bacteriano ou fúngico, adicionou-se a cada poço *Iodonitrotetrazolium chloride 95% (INT)* até uma concentração de 0,5 mg/mL no poço. Deste modo, tornou-se possível detetar o número de células viáveis na amostra através da metabolização do *INT* cuja cor inicial é amarela e ao ser metabolizado pelos microrganismos vivos, altera para rosa. De modo a que este processo de metabolização fosse visível, a incubação, realizou-se durante 30 minutos a 35 ± 2 ºC. De seguida realizou-se a leitura das microplacas a 570 nm e posteriormente determinou-se a % de células viáveis, usando a seguinte fórmula (Valgas *et al*., 2007):

$$\%\ Células\ Viáveis = \frac{D.O.Extrato - C.N.Extrato}{C.P.Estirpe - C.N.Meio} x100$$

D.O. Extrato – Média da densidade ótica das duas leituras obtidas por medição espetrofotométrica a 570 nm após incubação do extrato com uma dada concentração e a estirpe em *MHB*;

C.N. Extrato – Média da densidade ótica das duas leituras obtidas por medição espetrofotométrica a 570 nm após incubação do extrato com uma dada concentração em *MHB*;

C.P. Estirpe – Média da densidade ótica das duas leituras obtidas por medição espetrofotométrica a 570 nm após incubação da estirpe em *MHB*;

C.N. Meio – Média da densidade ótica das duas leituras obtidas por medição espetrofotométrica a 570 nm após incubação de *MHB*.

3.3.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram introduzidos e analisados recorrendo ao *software GraphPad Prism* versão 7.04 para Windows *(GraphPad Software, San Diego, California, USA)* relacionando as variáveis em estudo através do teste estatístico one-way ANOVA associado ao teste complementar *Dunnett's multiple comparisons test*. As diferenças foram consideradas significativas quando o pvalue ≤0,05.

3.4. Análise da biomassa seca de *G. turuturu* por FTIR-ATR

3.4.1. Obtenção e tratamento das amostras

Para análise por FTIR-ATR (*Fourier transform infraref spectroscopy- attenuated total reflectance*), a obtenção e o tratamento feito à biomassa da alga em estudo foi semelhante ao anteriormente descrito. As algas foram separadas pelas duas gerações (tetrasporófita e gametófita frutificada) e secas na estufa a cerca de 40 °C. De seguida, foram moídas num moinho até obtenção de um pó fino, o qual foi sujeito a análise direta (Pereira *et al.*, 2003; Pereira e Mesquita, 2004).

3.4.2. Análise por FTIR-ATR

O FTIR-ATR é um método de espetroscopia de infravermelhos, bastante utilizado para estudar e caracterizar ficocolóides (entre outros compostos) presentes nas algas (Pereira *et al*., 2013).

O aparelho utilizado foi o *IFS 55 spectrometer, using a Golden Gate single reflection Diamond ATR system* com aquisições dos 0 aos 4000 cm^{-1}. Contudo, para a análise e caracterização de polissacarídeos apenas são relevantes os comprimentos de onda entre 500 cm^{-1} e 1500 cm^{-1}.

4. Resultados

4.1. Separação das gerações de Grateloupia turuturu

De modo a separar facilmente as gerações em estudo (geração tetrasporófita e geração gametófita frutificada) foram tidas em conta determinadas características previamente descritas no Material e Métodos. A observação foi feita tendo em conta a presença/ausência de nódulos (visíveis a olho nu), como podemos observar na figura 4; presença/ausência de carpósporos (visíveis ao microscópio ótico em ampliação de 100x), como observado na figura 5; presença/ausência de tetrásporos (visíveis ao microscópio ótico em ampliação de 400x), como observado na figura 6.

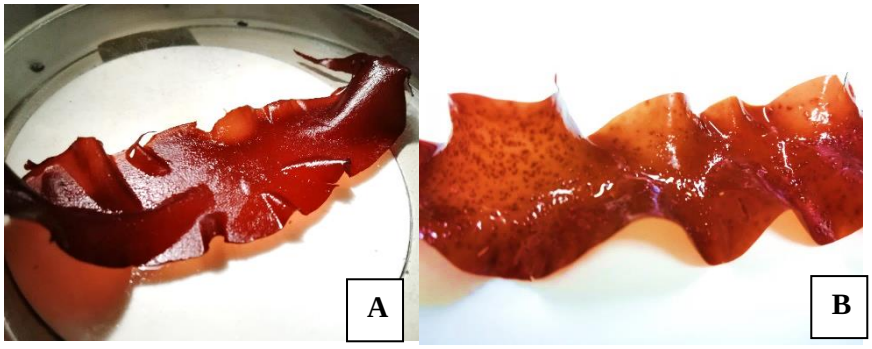

Figura 4 (A e B) – Observação a olho nu de duas lâminas de *Grateloupia turuturu* em gerações diferentes do seu ciclo de vida. (A) Tetrasporófito – ausência de nódulos; (B) Gametófito frutificado (parasitado pela geração Carposporófita) – presença de nódulos.

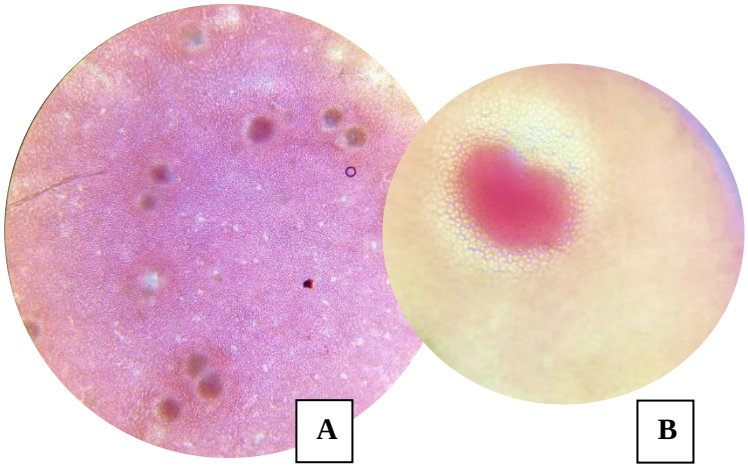

Figura 5 (A e B) – Fotografia ao microscópio ótico de uma lâmina de *Grateloupia turuturu*, representativa da geração gametófita (onde é possível observar a geração carposporófita, parasita do gametófito). (A) Ampliação a 100x, onde podem ser observadas vários carpósporos (pontos rosa). (B) Ampliação a 400x de um dos carpósporos, embora difícil de registar em fotografia, trata-se de um aglomerado de células formando uma estrutura relativamente esférica.

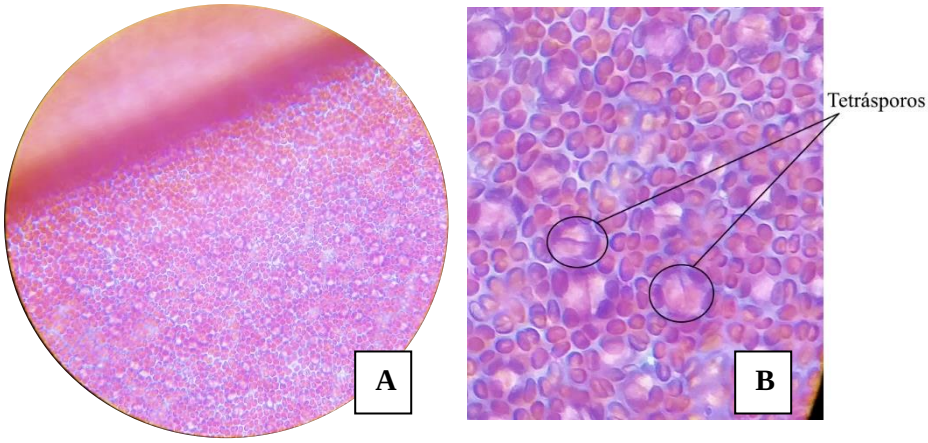

Figura 6 (A e B) – Fotografias ao microscópio ótico de uma lâmina de *Grateloupia turuturu*, representativas da geração tetrasporófita do seu ciclo de vida. (A) Lâmina fotografada com uma ampliação de 400x, onde é visível a heterogeneidade celular, podendo ser observadas células de maiores dimensões; (B) Ampliação da mesma fotografia e identificação dos tetrásporos (células que apresentam 4 divisões, embora não sejam visíveis as quatro em simultâneo uma vez que estão em planos diferentes).

4.2. Comparação dos protocolos de extração

As tentativas de otimização foram divididas nos protocolos A, B e C. Na tabela II são apresentadas as diferenças entre características dos procedimentos de modo a ser possível compará-los.

Tabela II - Comparação entre os protocolos de extração A, B e C

	Protocolos		
	A	**B**	**C**
Tempo de execução (tempo médio gasto em horas)	4h e 30min	4h e 30 min	9h
Quantidade de reagentes (volume em L de solventes)	0,23L	0,5 L	0,5 L
Número de etapas	20	15	11
Dificuldade de execução	Muito difícil	Difícil	Fácil
Contaminação dos extratos	+	+	+/-

Legenda: "+" – contaminação de todos ou da maioria dos extratos; "+/-" – número reduzido de extratos contaminados; "-" – ausência de contaminação.

Quando postos em comparação, verificou-se que dos três protocolos, o protocolo com mais vantagens para a extração de compostos da alga foi o protocolo C no qual as maiores diferenças ao protocolo inicial foram ao nível do controlo de contaminações, ao nível do aumento na quantidade de extrato, ao nível do tempo de todo o processo e ao nível da extração dos polissacarídeos. No protocolo C, verificou-se que, para controlar as contaminações, era vantajosa a liofilização dos extratos depois destes serem levados ao evaporador. Para aumentar a quantidade de extrato, observou-se ser importante usar, de cada vez, 3 g de biomassa, fazer cada extração durante 3 horas (1:30h para cada repetição) apesar de se ter reduzido o número de repetições para apenas 1. Para reduzir o tempo de todo o processo, constatou-se que a melhor opção seria deixar de adicionar água ao extrato de etanol, e, em específico no momento da extração dos polissacarídeos, reduzir o número de filtrações do extrato aquoso para apenas uma, permitir que a água evapore naturalmente sem que haja controlo de um volume constante de modo a evitar o uso do evaporador rotativo e, por fim, recuperar apenas os polissacarídeos possíveis no momento de extração.

Outra alteração que se verificou ser optimizadora de todo o processo foi a definição de um volume mais ou menos fixo, de aproximadamente 20ml dos extratos após serem evaporados por garantir uma maior homogeneidade entre extratos e para facilitar a liofilização.

4.3. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos obtidos a partir do protocolo C de *G. turuturu*

4.3.1. Controlo de esterilidade dos extratos

Para avaliar a esterilidade dos extratos foram observadas as placas onde estes tinham sido inoculados e verificou-se a presença de contaminantes nos seguintes extratos: 3 réplicas do extrato de etanol obtido através da geração tetrasporófita, réplica 1 do extrato de hexano da geração gametófita frutificada, réplica 2 do extrato de hexano da geração tetrasporófita e réplica 1 do extrato de polissacarídeo da geração gametófita frutificada, tabela III.

Tabela III - Análise qualitativa de cada extrato por observação da sua contaminação.

Geração	Extrato	Réplica	Contaminação
Tetrasporófita	Hexano	1	-
		2	+
		3	-
	Etanol	1	+++
		2	+++
		3	+++
	Polissacarídeo	1	-
		2	-
		3	-
Gametófita frutificada	Hexano	1	+++
		2	-
		3	-
	Etanol	1	-
		2	-
		3	-
	Polissacarídeo	1	+

Legenda: " - " : ausência de crescimento; " + " : crescimento fraco; " ++ " : crescimento moderado; " +++ " : crescimento elevado.

4.3.2. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos no pré ensaio

No fim do pré ensaio verificou-se crescimento microbiano em todos os extratos testados (hexano, etanol e polissacarídeo) para ambas as gerações em análise e para todas as concentrações testadas (4.9 μg/mL a 10000 μg/mL). Nenhum extrato às concentrações testadas tem atividade antimicrobiana de eliminação total.

Dado que os extratos de *n*-hexano foram testados a uma concentração inicial conhecida e tendo em conta que à menor diluição testada não eliminam nenhuma das estirpes testadas, estes extratos foram excluídos do ensaio para as concentrações fixas.

4.3.3. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos no ensaio e efeito citotóxico

4.3.3.1. *Escherichia coli*

4.3.3.1.1. Extrato de etanol

Relativamente à atividade antimicrobiana dos extratos de etanol na presença de *E. coli*, verificou-se que, a uma concentração de 10 mg/mL, ocorreu um crescimento da bactéria superior ao do controlo positivo. Contudo, a uma concentração superior, neste caso a 12,5 mg/mL, ocorreu uma redução no crescimento da bactéria em comparação ao controlo positivo da estirpe, apresentando uma redução no crescimento de 32,7% (% células viáveis em EC 12,5 de 67,3% ± 22,9), tendo esta redução significado estatístico (*pvalue*≤ 0.01) (Figura 7).

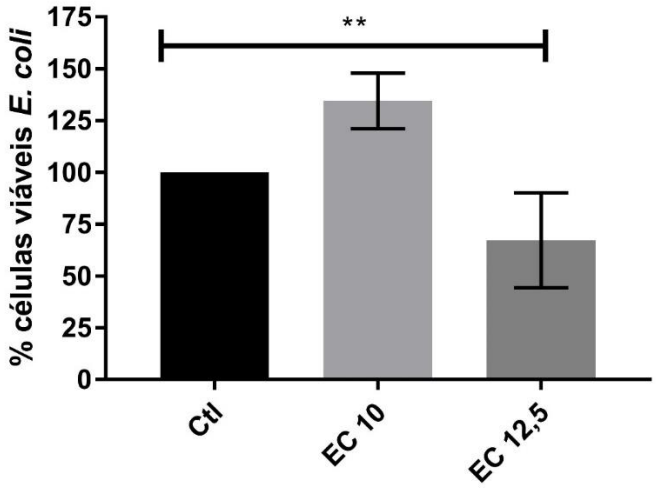

Figura 7 -Ensaio de citotoxicidade de *Escherichia coli* com extratos de etanol. Legenda: E: Extrato de etanol; C: Geração carposporófita (gametófita frutificada); 10 e 12,5: Concentrações de extrato testadas; Ctl: Controlo positivo da estirpe; **pvalue ≤ 0.01.

4.3.3.1.2. Extrato de polissacarídeos

Os extratos de polissacarídeos, a uma concentração de 7,5 mg/mL, mostraram não ter efeito redutor no crescimento de *E. coli*. Contudo, a concentrações mais elevadas (10 mg/mL e 12,5 mg/mL) o crescimento foi gradualmente reduzindo, ocorrendo reduções de 51,5% (% células viáveis em PT 10: 48,5 ± 8,6) e de 67,7% (% células viáveis em PT 12,5: 32,3 ± 15,1), respetivamente. Ambas as reduções no crescimento apresentam significado estatístico (pvalue ≤ 0,0001) (Figura 8).

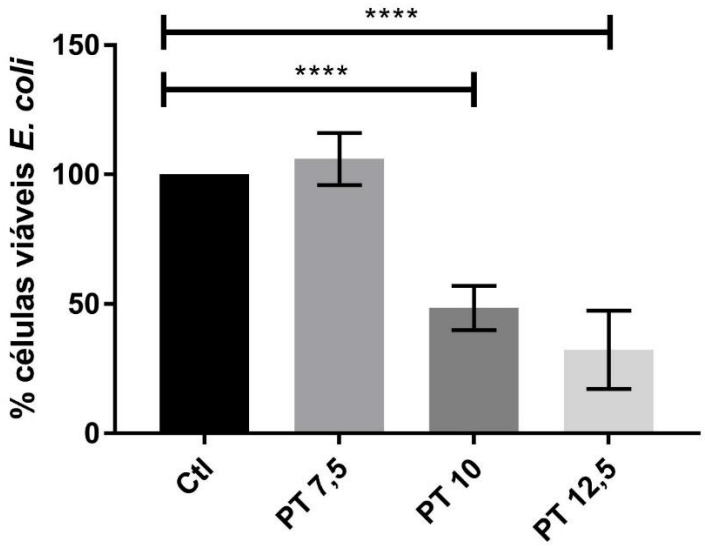

Figura 8 - Ensaio de citotoxicidade de *Escherichia coli* com extratos com polissacarídeos. Legenda: P: Extrato com polissacarídeos; T: Geração tetrasporófita; 7,5, 10 e 12,5: Concentrações de extrato testadas; Ctl: Controlo positivo da estirpe; ****pvalue ≤ 0,0001.

4.3.3.2. *Staphylococcus aureus*

4.3.3.2.1. Extrato de etanol

Os extratos de etanol a uma concentração de 10 mg/mL, mostraram não ter efeito redutor no crescimento de *S. aureus*. Apesar disso, a uma concentração superior, de 12,5 mg/mL, verificou-se uma redução significativa de 22,5% (% células viáveis em EC 12,5: 77,5 ± 13,1). Também neste caso, estes valores representam significado estatístico (pvalue≤ 0.01) (Figura 9).

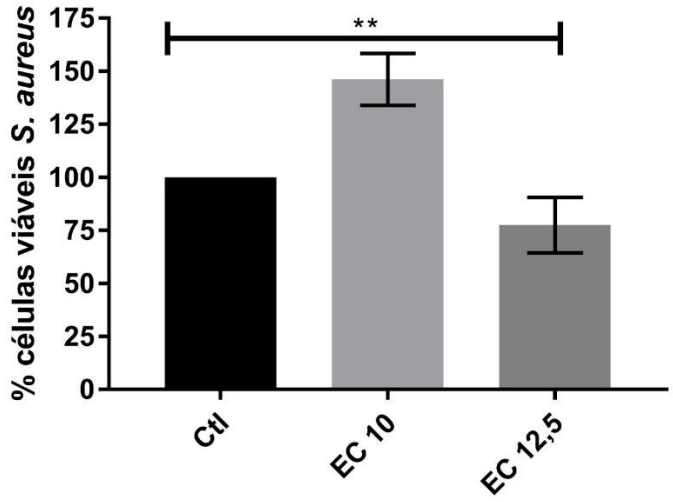

Figura 9 - Ensaio de citotoxicidade de *Staphylococcus aureus* com extratos de etanol. Legenda: E: Extrato de etanol; C: Geração carposporófita (gametófita frutificada); 10 e 12,5: Concentrações de extrato testadas; Ctl: Controlo positivo da estirpe; **pvalue ≤ 0.01.

4.3.3.2.2. Extrato de polissacarídeos

O extrato de polissacarídeos contra esta estirpe, não mostrou reduzir o crescimento a nenhuma concentração das testadas. Mesmo na concentração mais elevada, 12,5 mg/mL, observou-se uma % de células viáveis de 127,7 ± 14,3, ou seja, um crescimento superior ao do controlo positivo da estirpe (Figura 10).

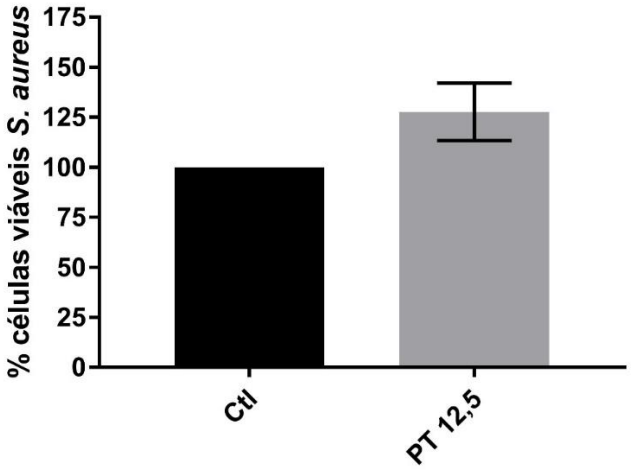

Figura 10 - Ensaio de citotoxicidade de *Staphylococcus aureus* com extratos com polissacarídeos. Legenda: P: Extrato com polissacarídeos; T: Geração tetrasporófita; 12,5: Concentração de extrato testada; Ctl: Controlo positivo da estirpe.

4.3.3.3. *Candida albicans*

4.3.3.3.1. Extrato de etanol

Relativamente à capacidade antifúngica dos extratos da alga, os resultados mostram que os extratos de etanol não reduzem o crescimento de *C. albicans.* Pelo contrário, foi possível observar um crescimento, na presença da maior concentração de extrato testada, bastante superior ao seu controlo positivo, sendo a % de células viáveis (em EC 12,5) de 268,8 ± 52,9% (Figura 11).

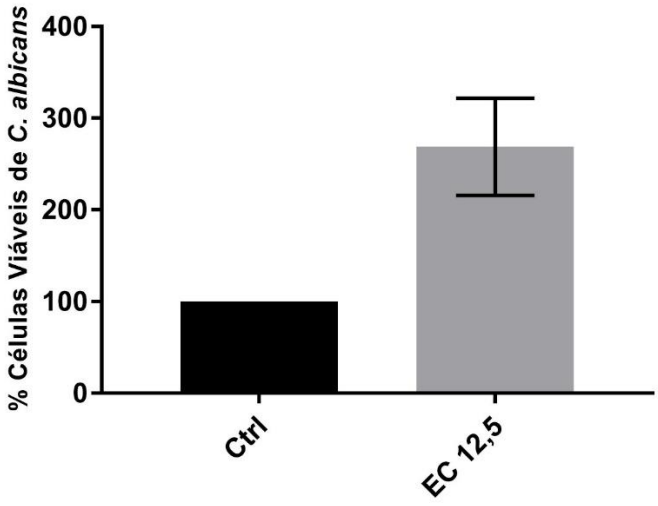

Figura 11 - Ensaio de citotoxicidade de *Candida albicans* com extratos de etanol. Legenda: E: Extrato de etanol; C: Geração carposporófita (gametófita frutificada); 12,5: Concentração de extrato testada; Ctl: Controlo positivo da estirpe.

4.3.3.3.2. Extrato de polissacarídeos

Os extratos de polissacarídeos, a uma concentração de 10 mg/mL (% de células viáveis em EC 10: 202,0 ± 30,8), mostraram não reduzir o crescimento. Na presença do extrato a estirpe cresce mais do que o controlo positivo, contudo foi registado, a uma concentração mais elevada, de 12,5 mg/mL uma redução no crescimento de 12,7% (% de células viáveis em EC 12,5: 87,3 ± 8,7), embora não exista significado estatístico nesta redução do crescimento face ao controlo (Figura 12).

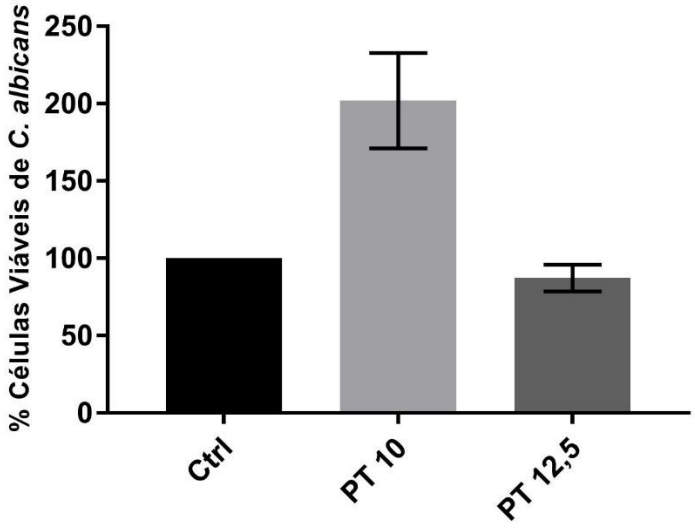

Figura 12 - Ensaio de citotoxicidade de *Candida albicans* com extratos com polissacarídeos. Legenda: P: Extrato com polissacarídeos; T: Geração tetrasporófita; 10 e 12,5: Concentração de extrato testada; Ctl: Controlo positivo da estirpe.

4.4.Análise da biomassa de *G. turuturu* por FTIR-ATR

Com base nas tabelas de Chopin & Whalen, 1993; Pereira, 2006; Chopin *et al*. 1999; Pereira *et al*. 2009; Souza *et al.* 2012 (ver "Anexos") e através da análise dos espetros e observação dos seus picos, foi possível elaborar tabelas que facilitassem a identificação de compostos nas amostras de alga seca (Tabelas IV e V). Através dos resultados observados foi possivel verificar a presença de vários picos (de grande intensidade) de ésteres de sulfato assim como picos correspondentes à presença de carragenana kappa, com número de onda 935 cm^{-1} (que é atribuído às vibrações do C-O-C de 3,6-anidrogalactose). Para além desta, podem ser ainda encontrados vestígios de carragenana iota e, no caso específico do espectro da geração gametófita, a presença de um pico de número de onda 741 cm^{-1} (que é atribuído ao modo de flexão das ligações glicosídicas de agar C-S/C-O-O), que indica a presença de vestígios de agar.

As amostras analisadas por FTIR encontravam-se separadas por cada geração do ciclo de vida da alga e, através da comparação das tabelas e dos seus espectros, foi possível avaliar

a composição da biomassa seca testada de *G. turuturu* para cada geração. Verificou-se que as diferenças dos picos obtidos entre gerações eram reduzidas. As diferenças detetadas foram, em específico, nos picos com número de onda 609 e 687 cm^{-1}, presentes no espetro da geração tetrasporófita e ausentes no espetro da geração gametófita frutificada e no pico, que indica a presença de vestígios de agar, com número de onda 741 cm^{-1} (que é atribuído ao modo de flexão das ligações glicosídicas de agar C-S/C-O-O), presente no espetro da geração gametófita e ausente na geração tetrasporófita (Figura 13). Em nenhum dos espectros foram detetadas carragenanas da família lambda.

Tabela IV - Identificação dos compostos que constituem os polissacarídeos da geração tetrasporófita da alga *G. turuturu*.

Picos	*Intensidade*	*Tipo de Ligação*	
525	++++		
575	++++	S-O	Galactanos sulfatados
609	++++		
687	+++		
820	++	C-S-SO3 no C6 da galactose	Galactose sulfatada em C6 (G/D6S)
897	+	B-D-galactose não-sulfatada	(G/D)
935	++	C-O do 3,6-anidrogalactose	(DA)
1016	++++	S=O	Ester de Sulfato
1149	++		Vibração simétrica de C-O associada a um C-O-SO3 de heterofucanos
1223	+++	S=O	Ester de Sulfato
1416	++		Amido III de proteínas

Legenda: "+" – intensidade vestigial; "++" – reduzida intensidade; "+++" – média intensidade; "++++" – elevada intensidade

Tabela V - Identificação dos compostos que constituem os polissacarídeos da geração gamtófita frutificada da alga *G. turuturu*.

Picos	*Intensidade*	*Tipo de Ligação*	
517	++++		
575	++++	S-O	Galactanos sulfatados
741	+++	C-S/C-O-C	Modo de curvatura C-S / C-O-C em ligações glicosídicas de agar
820	++	C-S-SO3 no C6 da galactose	Galactose sulfatada em C6 (G/D6S)
899	+	B-D-galactose não-sulfatada	(G/D)
935	+	C-O do 3,6-anidrogalactose	(DA)
1016	++++	S=O	Ester de Sulfato
1149	++	S=O	Ester de Sulfato
1223	+++	S=O	Ester de Sulfato
1414	+		Amido III de proteínas

Legenda: "+" – intensidade vestigial; "++" – reduzida intensidade; "+++" – média intensidade; "++++" – elevada intensidade

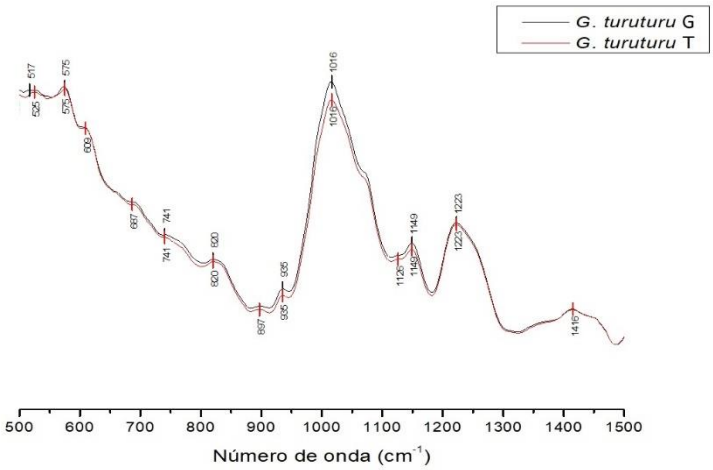

Figura 13- Comparação dos espectros obtidos por FTIR-ATR das gerações tetrasporófita (T), a preto e gametófita frutificada (G), a vermelho, da alga *Grateloupia turuturu*.

5. Discussão

A procura por novas moléculas com potencial antibiótico não é recente. Ao longo dos tempos tem-se observado uma necessidade cada vez maior de encontrar compostos (em especial, compostos naturais) que venham dar resposta a problemas como a dispersão de microrganismos multirresistentes ou para situações de doenças cujo tratamento ou cura são difíceis ou inexistentes. Além disso, nas mais variadas áreas, seja na cosmética, farmacêutica, nutracêutica ou até alimentar, é notória uma procura constante de novos produtos que venham a dar resposta a tendências e/ou a melhorar a qualidade de vida das pessoas. Por outro lado, desde sempre que se reconhece a utilização de algas na medicina tradicional, como tratamento de primeira instância para certos problemas e, por ser um conhecimento empírico, em muitos dos casos ainda não são percetíveis os mecanismos por trás do efeito que apresentam (Pereira, 2018).

Assim, este trabalho visa explorar o potencial antibacteriano e antifúngico de compostos de *Grateloupia turuturu*.

O trabalho dividiu-se em duas grandes partes, sendo a primeira o tratamento da biomassa e otimização do método de extração para avaliação da atividade antimicrobiana de *G. turuturu* e a segunda parte a identificação de compostos presentes na biomassa de *G. turuturu* nas diferentes gerações do ciclo de vida em estudo. Para a obtenção de extratos com maior quantidade de compostos solúveis e estéreis foi necessário recorrer à otimização do método de extração sequencial aplicando alterações protocolares (protocolo A, B e C).

5.1. Atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos extraídos de *G. turuturu*

Dos extratos testados de *G. turuturu* correspondentes a extrações com solventes diferentes e separados pelas duas gerações do seu ciclo de vida (geração tetrasporófita e gametófita frutificada), é de referir que às concentrações testadas nenhum dos extratos elimina

totalmente as estirpes testadas. Porém verificou-se que alguns dos extratos detém alguma capacidade antimicrobiana reduzindo significativamente ou não o crescimento das mesmas.

Os extratos de etanol mostraram reduzir o crescimento das duas estirpes bacterianas testadas, Para *E. coli* a redução de crescimento foi de 32.7% e para *S. aureus* foi de 22,5% quando o extrato usado tinha uma concentração de 12,5 mg/mL. Estes resultados sugerem que, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, os compostos polares extraídos com etanol podem possuir, de facto, algumas propriedades antibacterianas relevantes. Quando comparamos estes resultados com outros estudos semelhantes já realizados verifica-se que em trabalhos similares compostos polares, por norma presentes neste tipo de extrato etanólico, como é o caso de ácidos gordos (ácido palmitoleico, ácido oleico…), glicosídeos e alcalóides, se associam, de facto à capacidade antibacteriana observada contra estas duas estirpes (Jiang *et al*., 2013; Plaza *et al*., 2009; Pinteus, 2011)

Estudo em outras algas do mesmo género *Grateloupia*, como o caso da *Grateloupia lívida*, também já foram descritos resultados similares ao do nosso trabalho (Jiang *et al*., 2013).

Estudos realizados especificamente em *G. turuturu* existe apenas uma referência em que erradamente designam a alga *G. turuturu* por *Grateloupia doryphora*, onde também observaram a presença de propriedades antibacterianas dos seus extratos etanólicos contra *S. aureus* (Magallanes *et al*., 2003).

Relativamente à atividade antifúngica dos extratos de etanol contra *C. albicans*, os resultados por nós observados não revelam qualquer redução no crescimento da estirpe. Em estudos similares há registo de resultados concordantes aos nossos onde extratos etanólicos de outras algas foram também testados em *Candida* spp. e também não apresentam nenhuma capacidade inibitória. São exemplos disto mesmo os testes realizados com extratos etanólicos das algas vermelhas *Hypnea musciformis* (Guedes *et al*., 2012), *Jania rubens* (Karabay-Yavasoglu *et al*., 2018; Gonzalez del Val *et al*., 2001) e *Laurencia* spp. (Erika *et al*., 2011). Porém contraditoriamente há também registos na literatura de estudos que demonstram o resultado oposto, como o caso do estudo realizado com *Digenea simplex* em que os extratos de etanol mostraram ter capacidade inibitória contra *Candida* spp., sendo o seu valor de Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 8.0 µg/ml (Guedes *et*

al., 2012) ou como o estudo nas algas vermelhas *Corallina officinalis* e *Ceramium ciliatum*, que demosntram potencial inibitório para a mesma levedura, mas neste caso com valores de CMI superiores a 10 e 5 mg/ml, respetivamente (Erturk and Tas, 2011).

Além dos extratos de etanol, também os extratos de polissacarídeos foram testados nas mesmas estirpes bacterianas e fungo. Neste caso, entre as duas estirpes bacteriana testadas há resultados opostos, uma vez que, os extratos na presença de *E. coli* apresentaram capacidade inibitória contra a bactéria a concentrações de 10 mg/ml e 12,5 mg/ml (inibição de crescimento cerca de 51.5% e 67,7%, respetivamente), contudo, em *S. aureus,* o mesmo não se verificou.

Com base nestes resultados, é importante referir que a concentração total de polissacarídeos nas algas varia de 4% a 76% do seu peso seco, sendo que alguns destes apresentam atividade biológica como é o caso do agar, das carragenanas e das fucanas (Rodrigues *et al*., 2015). É também conhecido que o principal componente das algas vermelhas são as carragenanas (polissacarídeos sulfatados de cadeia longa) e que estas já se encontram associadas à capacidade inibitória contra variados microorganismos, como por exemplo *E. coli* e *S. aureus* (Perez *et al*., 2016; Amorim *et al*., 2012; Pin *et al*., 2013; Pierre *et al*., 2011), embora para *G. turuturu* tenhamos observado capacidade inibitória bastante significativa para *E. coli*, mas não se verifique o mesmo para *S. aureus*. Esta contradição no resultado para *S. aureus* pode ser justificada pelas diferenças estruturais das duas bactérias em estudo, pois uma é um coco Gram positivo e apresenta uma parede celular mais espessa e a outra (*E. coli)* é morfológica e estruturalmente distinta, podendo tais características, influenciar a difusão/ação dos extratos dos polissacarídeos. Contudo, têm de ser tidos em conta outros fatores que podem também estar na base desta oposição, são estes, a quantidade de carragenana que possa ser necessária para inibir esta bactéria em específico e o próprio tipo de carragenana presente nos polissacarídeos desta alga em particular, uma vez que existem várias famílias de carragenanas e vários híbridos formados a partir destas, que podem deter um potencial antibacteriano distinto (Soares *et al*., 2016).

Relativamente aos extratos de polissacarídeos contra *C. albicans,* foi visível, a uma concentração de 12,5 mg/mL, uma redução no crescimento de 12,7%, face ao seu controlo positivo, apesar de não ser estatisticamente significativa.

Contra determinados fungos, os extratos de polissacarídeos obtidos a partir de outras algas também já demonstraram ter efeito inibitório no crescimento. São exemplos disso mesmo os extratos de polissacarídeos obtidos da alga vermelha *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* onde foi visível a atividade antifúngica contra duas espécies de *Aspergillus* spp. (*A. fumigatus* e *A. infectoria*) (Soares *et al*., 2016). Outro estudo, que corrobora os resultados, foi feito na alga vermelha *Hypnea musciformis* contra *C. albicans* (IC_{50} = 147,3 μg/mL; 102 to 214 μg/mL) (Souza *et al*., 2018).

Quando comparamos a bioatividade dos extratos de *G. turuturu* a extratos de outras algas similares ou filogeneticamente próximas contra as mesmas estirpes bacterianas e/ou fúngicas, é possível observar variações no resultado obtido, quer em concentração, quer em efeito inibitório. Vários são os fatores que contribuem para estas diferenças, que vão desde a variação de compostos entre gerações da mesma alga, variação de compostos entre indivíduos da mesma espécie de alga, mas em que a altura do ano de apanha foi diferente, variação de compostos entre algas diferentes embora evolutivamente próximas (como são os casos de algas do mesmo género, mas que não apresentam os mesmos resultados inibitórios, ou casos em que se compara a bioatividade entre algas vermelhas). Há que ter em consideração também o local e momento de colheita das algas uma vez que fatores abióticos (clima, localização, salinidade, temperatura, poluição) podem influenciar a produção e concentração de compostos bioativos (Perez *et al*., 2016).

Sobre as diferentes gerações do ciclo de vida da *G. turuturu* analisadas, não foi possível realizar comparações entre extratos uma vez que, para os extratos de etanol, todos os correspondentes à geração tetrasporófita se apresentavam contaminados e por isso não foram testados, apenas se realizaram testes para os extratos etanólicos da geração gametófita frutificada. Em contraste, para os polissacarídeos apenas foi possível testar os extratos da geração tetrasporófita e nenhum da geração gametófita frutificada. Contudo, embora não seja possível realizar uma comparação entre gerações, estes resultados podem indicar que diferentes gerações possuem compostos ou concentrações de compostos diferentes levando a que compostos/concentrações deles, tornem os extratos mais suscetíveis à presença de contaminantes.

5.2. Análises dos compostos presentes na biomassa de *G. turuturu* por FTIR-ATR

De modo a tentar conhecer melhor a alga em estudo e com o objetivo de caracterizar melhor o tipo de polissacarídeos que possui, ou seja, que famílias de carragenanas são possíveis encontrar na *G. turuturu*, recorreu-se à técnica de espectroscopia de infravermelhos, FTIR-ATR.

Olhando para a literatura, são já conhecidos comprimentos de onda específicos para as diferentes famílias de carragenanas, sendo que a comprimentos de onda próximos de 935 cm^{-1} é possivel identificar carragenana do tipo kappa, a comprimentos de onda próximos de 805 cm^{-1} indentifica-se carragenana do tipo iota e em comprimentos de onda entre os 815 e 830 cm^{-1} pode ser identificada carragenana do tipo lambda (Pereira & Ribeiro-claro, 1993).Deste modo, comparando com os resultados obtidos neste trabalho onde foi possivel identificar nos espectros um pico com comprimento de onda 935 cm^{-1}, conclui-se que a alga *G. turuturu*, possui na sua composição carragenana hibrida do tipo kappa/iota. Ainda sobre a caracterização das carragenanas encontradas, foi possível encontrar na geração gametófita frutificada, um pico (741 cm^{-1}) que indica a presença de vestígios de agar na mistura complexa de polissacarídeos presentes em *G. turuturu*. Contudo, não é aconselhado concluir que a presença deste ficocolóide apenas ocorra nesta geração do ciclo de vida da alga, uma vez que a ausência de agar no espectro da geração tetrasporófita pode ser justificado pela sobreposição de picos de maior intensidade que podem camuflar picos de menor intensidade de comprimento de onda próximo ou apenas o problema de, na geração tetrasporófita, o pico de agar poder ser, de facto, de baixa intensidade e não ter sido detetado no espectro, devido à pequena quantidade presente deste hidrocolóide.

Um estudo onde foram comparados espetros obtidos por FTIR de várias algas, permitiu concluir que o espetro de *G. turuturu* apresenta semelhanças com *Grateloupia filicina* e *Gracilaria gracilis*, ambas algas onde também já foi encontrado na sua composição agar (Rodrigues *et al*., 2015).

Informação já publicada na literatura (Usov *et al.*, 1975, Craigie, 1990; Denis, 2009) confirma a presença, na *G. turuturu*, de carragenanas do tipo kappa e iota e está de acordo com um estudo já realizado em que se detetou, não só a presença destas duas carragenanas,

mas também de celulose e de agar na parede celular da alga. Ainda na discussão de outro artigo (Rodrigues *et al.*, 2015), são referidos vários estudos relativos à presença de agar em espécies do género *Grateloupia* spp. e é sugerido que, esta alga em particular, *Grateloupia turuturu* produza um polissacarídeo híbrido agar-carragenana.

Embora não sejam conhecidas propriedades antibacterianas ou antifúngicas do agar, característica distinta deste género de carragenófita, os resultados obtidos nos bioensaios não deixam de ser corroborados pela análise por FTIR uma vez que nas carreganas identificadas nesta alga já são conhecidas propriedades relativas à capacidade inibitória que possuem no crescimento de certas bactérias e certos fungos (Rodrigues *et al*., 2015; Perez *et al*., 2016; Amorim *et al*., 2012; Pin *et al*., 2013; Pierre *et al*., 2011). Em adição, é já conhecida a importância da composição de sulfatos para conferir bioatividade (Pereira *et al*., 2005), pelo que, a capacidade inibitória desta alga é justificada pela intensidade e o número de picos onde se podem identificar vários ésteres de sulfato.

Quando comparados, os espetros das duas gerações, foi possível observar que apresentavam apenas diferenças ligeiras, sendo apenas relevante a presença de agar na geração gametófita frutificada. Tal pode indicar que não serão significativas as diferenças a registar no que toca à produção de compostos (nem no que diz respeito ao tipo de compostos nem à sua quantidade produzida).

6. Conclusão

Este trabalho permitiu a otimização do método de extração sequencial de compostos bioativos presente em *G. turuturu*. Os extratos obtidos mostraram deter efeito inibitório sobre *E. coli, S. aureus* e *C. albicans*. Para concentrações de 12,5mg/mL o extrato de etanol revelou uma redução significativa no crescimento de 32,7% e de 22,47% para *E. coli* e *S. aureus*, respetivamente.

Os extratos de polissacarídeos desta alga revelaram inibir significativamente o crescimento de *E. coli* a partir de uma concentração de 10 mg/mL. Porém não mostrou deter qualquer efeito sobre *S. aureus*.

Em *C. albicans* os extratos de polissacarídeos demonstraram deter um feito inibitório no seu crescimento, porém a concentração de 12,5 mg/mL a mesma redução não foi significativa (12,7%).

Da análise da biomassa da alga seca por FTIR-ATR, conclui-se a elevada concentração e presença de ésteres de sulfato. Não havendo diferenças significativas entre gerações do seu ciclo de vida com exceção da presença de agar na geração gametófita frutificada. Porém a existência deste composto numa carragenófita não deixa de ser interessante e a elevada presença de ésteres de sulfato, por se conhecer o seu papel bioativo, revela ter algum interesse.

Futuramente seria interessante a obtenção de extratos de maiores concentrações, nomeadamente os de etanol e polissacarídeos, seria também relevante testar outras bactérias e fungos com diferentes características não só morfológicas, mas também de virulência e resistência. Assim como analisar e identificar os compostos presentes nos extratos por FTIR-ATR.

Com este trabalho, pela primeira vez foi explorado simultaneamente o potencial antibacteriano e antifúngico de *G. turuturu*, assim como foi feita uma abordagem à identificação de compostos de interesse presentes. É de salientar a necessidade de continuidade deste estudo, assim como avaliar também outras propriedades como antioxidantes, anticancerígenas, entre outras, que podem ser de extrema importância em áreas como saúde e alimentação.

Referências

Advisory, I. (2006). ICES WGITMO Report 2006 Working Group on Introductions and Transfers of Marine Organisms (WGITMO), (March), 16–17.

Amorim R, Rodrigues J, Lima M, Quinderé A, Paula R, Maria V, et al. (2012). Antimicrobial Effect of a Crude Sulfated Polysaccharide from the Red Seaweed Gracilaria ornata. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2012; 55:171-81.

Arad, S. M.; Yaron, A (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. Trends Food Sci. Technol. 1992, 3, 92– 97.

Araújo R., Violante J., Pereira R., Abreu H., Arenas F. and Sousa-Pinto I. (2011). Distribution and population dynamics of the introduced seaweed Grateloupia turuturu (Halymeniaceae, Rhodophyta) along the portuguese coast. Phycologia 50: 392–402. DOI: 10.2216/10-65.1

Balandrin, M. F., Kinghorn, A. D., Farnsworth, N- R. (1993). Plant-derived natural produtcts in drug discovery and development – An Overview. American Chemical Society.1: 2-12.

Bárbara, I., & Cremades, J. (1989). (Gigartinales, Rhodophyta) en la Península Ibérica, 61(2), 103–118.

Barsanti, L. Gualtieri, P. (2006). Algae – Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. CRC Press, Taylor & Francis Group. New York. USA.

Bhakuni, D. S., Rawat, D.S. (2005). Bioactive Marine Natural Products. Springer, New York, USA.

Booth B. (1969). The manufacture and properties of liquid seaweed extracts, Proceedings International Seaweed Symposium, 1969, 6, 655–662

Bromke, B. J., & Furiga, M. (1991). Carrageenan is a desirable substitute for agar in media growing Trichomonas vaginalis, 13, 61–65.

Bull, A. T., & Stach, J. E. M. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery, 15(11). https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.004

Cardoso, S. M.; Carvalho, L. G.; Silva, P. J.; Rodrigues, M. S.; Pereira, O. R.; Pereira, L. (2014) - Bioproducts from seaweeds: a review with special focus on the Iberian Peninsula. Current Organic Chemistry. ISSN 1385-2728. 18:7, p. 896-917. Avaiable at: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1385-2728&volume=18&issue=7&spage=896

Cardozo, K.H., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., and Colepicolo, P. (2007) Metabolites from algae with economical impact. Comp. Biochem. Physiol. C, 146, 60–78.

Carlucci, M.J.; Scolaro, L.A.; Noseda, M.D.; Cerezo, A.S.; Damonte, E.B. (2004) Protective effect of a natural carrageenan on genital Herpes simplex virus infection in mice. Anti-viral Res. 2004, 64, 137–141.

Cecere, E., Moro, I., Wolf, M. A., Petrocelli, A., & Verlaque, M. (2011). The introduced seaweed Grateloupia turuturu (Rhodophyta, Halymeniales) in two Mediterranean transitional water systems, 54, 23–33. https://doi.org/10.1515/BOT.2011.009

Chattopadhyay, K., C.G. Mateu, P. Mandal, C.A. Pujol, E.B. Damonte and B. Ray. (2007). Galactan sulfate of Grateloupia indica: isolation, structural features and antiviral activity. Phytochemistry 68: 1428–1435.

Chopin, T. and Whalen, E. 1993. A new and rapid method for carrageenan identification by FT-IR diffuse-refl ectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. Carbohydrate Research 246: 51–59.

Chopin, T., Kerin, B. F., & Mazerolle, R. (1999). Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinalis, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. Phycological Research, 47, 167–198.

Cragg, G.M., Newman, D.J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure Appl. Chem. 77:7-24.

Craigie, J.S. (1990). Cell Walls. In: (K.M. Cole and R.G. Sheath, eds) The biology of the red algae. Cambridge University, New York. pp. 221–257.

Crampon Ch., Boutin O., Badens E. (2011) Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Molecules of Interest from Microalgae and Seaweeds, Industrial & Engineering Chemistry Research, 2011, 50(15), 8941–8953

D'Archino, R., Nelson, W. A. & Zuccarello, G. C. (2007) Invasive marine red alga introduced to New Zealand waters: First record of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta), New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 41:1, 35-42, DOI: 10.1080/00288330709509894

Denis, C. (2009). Effect of enzymatic digestion on thallus degradation and extraction of hydrosoluble compounds from Grateloupia turuturu Effect of enzymatic digestion on thallus

degradation and extraction of hydrosoluble compounds from Grateloupia turuturu, (April). https://doi.org/10.1515/BOT.2009.035

Denis, C., & Ledorze, C. (2009). Comparison of different procedures for the extraction and partial purification of R-phycoerythrin from the red macroalga Grateloupia turuturu, 52, 278–281. https://doi.org/10.1515/BOT.2009.034.

Denis, C., Morançais, M., Li, M., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Collin, G., … Fleurence, J. (2010). Study of the chemical composition of edible red macroalgae Grateloupia turuturu from Brittany (France). Food Chemistry, 119(3), 913–917. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.07.047.

Draisma, S.G.A. et al. (2001). A reassessment of phylogenetic relationships within the phaeophyceae based on rubisco large subunit and ribosomal dna sequences 1., 603 (march), pp.586-603.

Erika MSP, Colepicolo; Felipe, A. K. Afonso; Mutue, T. Fujii (2011). Screening for antifungal activities of extracts of the brazilian seaweed genus Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta). Rev Bras Farmacogn. 2011;21(2):290-5.

Erturk Ö, Tas B. (2011). Antibacterial and Antifungal Effects of Some Marine Algae. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2011;17(Suppl A): S121-S4.

Fleurence, J. (2003). R-phycoerythrin from red macroalgae: Strategies for extraction and potential application in biotechnology. Applied Biotechnology, Food Science and Policy, 1, 63–68.

Fusetani, N. (2000). Drugs from The Sea. Karger. Tokyo. Japan

Gad, S. C. (2005). Drug Discovery Handbook. Wiley-Interscience. New Jersey. USA.

Gavio, B., & Fredericq, S. (2017). *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct name of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora*, 262(April).

Genovese G, Leitner S, Minicante SA, Lass-Florl C. (2013). The Mediterranean red alga Asparagopsis taxiformis has antifungal activity against Aspergillus species. Mycoses. 2013;56(5):516-9. Epub 2013/02/27.

Gonzalez del Val A, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, et al. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology. 2001;4(1):35-40. Epub 2002/01/05.

Guedes EA, Araujo MA, Souza AK, de Souza LI, de Barros LD, Maranhao FC, et al. (2012). Antifungal activities of different extracts of marine macroalgae against dermatophytes and Candida species. Mycopathologia. 2012;174(3):223-32. Epub 2012/04/25.

Gundula Eller, Kerstin Töbe, Linda K. Medlin (2007). Hierarchical probes at various taxonomic levels in the Haptophyta and a new division level probe for the Heterokonta, Journal of Plankton Research, Volume 29, Issue 7, 1 January 2007, Pages 629–640, https://doi.org/10.1093/plankt/fbm045

Hall, M.A.L.-V., Box, A.T.A., Blok, H.E.M., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J. (2001). Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant enterobacteriaceae in a clinical setting. The Journal of Infectious Diseases. 186:49-56.

Harlin, M. M., & Yillalard-bohnsack, M. (2001). Seasonal dynamics and recruitment strategies of the invasive seaweed *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Narragansett Bay and Rhode Island Sound, Rhode Island, USA, 40(December), 468-474.

Hellio, C.; De La Broise, D.; Dufossé, L.; Le Gal, Y.; Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extract of macroalgae: Potential use for environmentally friendly paints. Mar. Environ. Res. 2001, 52, 231–247.

Hong, D. D., Hien, H. M., & Son, P. N. (2007). Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer, 817–826. https://doi.org/10.1007/s10811-007-9228-x.

Hytönen T., Elomaa P., Moritz T., Junttila O. (2009). Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (Fragaria x ananassa Duch), BMC Plant Biology 2009, 9(18), 1471–2229.

Jaswir, I.; Tope, A.H.T.; Raus, R.A.; Monsur, H.A.; Ramli, N. (2014). Study on anti-bacterial potentials of some Malaysian brown seaweeds. Food Hydrocoll. 2014, 42, 275–279.

Jiang Z, Chen Y, Yao F, Chen W, Zhong S, Zheng F, et al. (2013). Antioxidant, antibacterial and antischistosomal activities of extracts from *Grateloupia livida* (Harv). Yamada. PloS one. 2013;8(11): e80413.

Kang, K., Park, Y., Hwang, H.J., Kim, S.H., Lee, J.G., Shin, H.-C. (2003). Antioxidant properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive against vascular risk factors. Arch Pharm Res. 6: 286-293.

Karabay-Yavasoglu, NU., Sukatar, A., Ozdemir, G., Horzum, Z., (2018). Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga Jania rubens. - PubMed - NCBI.

Ncbi.nlm.nih.gov. Retrieved 8 August 2018, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128433.

Karthikeyan, K.; Shweta, K.; Jayanthi, G.; Prabhu, K.; Thirumaran, G. (2015). Antimicrobial and antioxidant potential of selected seaweeds from Kodinar, Southern Coast of Saurashtra, Gujarat, India. J. Appl. Pharm. Sci. 2015, 5, 35–40.

Kavita, K.; Singh, V.K.; Jha, B. (2014). 24-branched delta 5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. Microbiol. Res. 2014, 169, 301–306.

Kendel, M., & Couzinet-mossion, A. (2013). Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*, 425–432. https://doi.org/10.1007/s10811-012-9876-3.

Kendel, M., Barnathan, G., & Rabesaotra, V. (2013). Non-methylene Interrupted and Hydroxy Fatty Acids in Polar Lipids of the Alga *Grateloupia turuturu* Over the Four Seasons, 535–545. https://doi.org/10.1007/s11745-013-3783-5.

Kim, J. H., Hudson, J. B., Huang, A. M., Bannister, K., Jin, H., Choi, T. J., Dewreede, R. E. (1997). Biological activities of seaweed extracts from British Columbia, Canada, and Korea. I. Antiviral activity, 1660, 1656–1660.

Krish, S.; Das, A. (2014) In-vitro bioactivity of marine seaweed, Cladophora rupestris. Int. J. Pharm. Biol. Sci. 2014, 5, 898–908.

Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielson, K., F., Hansen, M., E., Frisvad, J. C. (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. Natural Products Reports. 22: 672-695.

Lordan S, Ross RP, Stanton C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. Mar Drugs 2011; 9:1056–100.

Magallanes C, Córdova C, Orozco R. (2003). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. Rev peru biol. 2003; 2:125-32.

Manilal, A.; Sujith, S.; Selvin, J.; Kiran, G.S.; Shakir, C.; Lipton, A.P. (2010). Antimicrobial potential of marine organisms collected from the southwest coast of India against multiresistant human and shrimp pathogens. Sci. Mar. 2010, 74, 287–296.

Mathieson, A. C., Dawes, Æ. C. J., Pederson, J., Gladych, Æ. R. A., & Carlton, J. T. (2008). The Asian red seaweed *Grateloupia turuturu* (Rhodophyta) invades the Gulf of Maine, 985–988. https://doi.org/10.1007/s10530-007-9176-z

Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidante activity in seaweeds. Journal of Applied Phycology. 9, 29-35.

Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G.S. and Hamann, M.T. (2009). Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antibuberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. Biochimica et Biophysica Acta. 1790: 283-308.

Milledge, J. J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review, 31–41. https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7.

Mulas, M., & Bertocci, I. (2016). Devil's tongue weed (Grateloupia turuturu Yamada) in northern Portugal: Passenger or driver of change in native biodiversity? Marine Environmental Research, 118, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.04.007.

Munier, M., Dumay, J., Morançais, M., Jaouen, P., & Fleurence, J. (2013). Variation in the Biochemical Composition of the Edible Seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada Harvested from Two Sampling Sites on the Brittany Coast (France): The Influence of Storage Method on the Extraction of the Seaweed Pigment R-Phycoerythrin, 2013.

Nagan, N., & Zoeller, R. A. (2001). Plasmalogens: biosynthesis and functions (Vol. 40).

Oh KB, Lee JH, Chung SC, Shin J, Shin HJ, Kim HK, et al. (2008). Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2008;18(1):104-8. Epub 2007/12/07.

Pang, S. J., Xiao, T., Shan, T. F., Wang, Z. F., & Gao, S. Q. (2006). Evidences of the intertidal red alga *Grateloupia turuturu* in turning Vibrio parahaemolyticus into non-culturable state in the presence of light. Aquaculture, 260(1–4), 369–374. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.008.

Pangestuti, R., & Kim, S. (2015). An Overview of Phycocolloids: The Principal Commercial, 319–330.

Pereira, L. (2007). As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. Departamento de Botânica – Universidade de Coimbra.

Pereira, L. (2018). Therapeutic and Nutritional Uses of Algae. Science Publishers' (SP), An Imprint of CRC Press / Taylor & Francis Group. 560 pp. ISBN 9781498755382.

Pereira, L. 2006. Identification of phycocolloids by vibrational spectroscopy. In: Critchley A.T., M. Ohno and D.B. Largo (eds.). World Seaweed Resources—An Authoritative Reference

System. ETI Information Services Ltd, Amsterdam, The Netherlands, Hybrid Windows and Mac DVD-ROM. ISBN: 90-75000-80-4.

Pereira, L. e Mesquita, J.F. (2004). Population studies and carrageenan properties of Chondrachantus teedei var. lusitanicus (Gigartinaceae, Rhodophyta). J Appl Phycol 16(5): 369-383.

Pereira, L., Amado, A.M., Critchley, A.T., Van de Velde, F., and Ribeiro-Claro, P.J. (2009). Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). Food Hydrocolloids, 23, 1903–1909.

Pereira, L., Gheda, S. F., & Ribeiro-claro, P. J. A. (2013). Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed with Potential Use in Food, Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food, Pharmaceutical, and Cosmetic Industries, (May 2014). https://doi.org/10.1155/2013/537202.

Pereira, L., & Ribeiro-claro, P. J. A. (1993). Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed with Potential Use in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries.

Pereira, L., Sousa, A.; Coelho, H.; Amado, A.M. e Ribeiro-Claro, P.J.A. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and 13C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. Biomol Eng 20(4-6): 223-228.

Pereira MG, Benevides NMB, Melo MRS, Valente AP, Melo FR, Mourão PAS. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, Gelidium crinale. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? Carbohydr Res. 2005; 340(12): 2015-2023.

Pereira, L., & Neto, J.M., 2015. Marine Algae Biodiversity, Taxonomy, Enviromental Assessment, and Biotechnology, CRC Press is na imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business.

Pérez, L., Álvarez, B., Codony, F., Fittipaldi, M., Adrados, B., Peñuela, G. and Morató, J. (2010), A new microtitre plate screening method for evaluating the viability of aerobic respiring bacteria in high surface biofilms. Letters in Applied Microbiology, 51: 331-337. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02902.x.

Perez, M.J., Falque, E., Dominguez, H. (2016). Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. Marine drugs. 2016;14(3). Epub 2016/03/24.

Pierre, G., Sopena, V., Juin, C., Mastouri, A., Graber, M., Maugard, T. (2011). Antibacterial Activity of a Sulfated Galactan Extracted from the Marine Alga *Chaetomorpha aerea* Against Staphylococcus aureus. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2011; 16:937-45.

Pin, T.S., McLoughlin, P., O'Sullivan, L., Prieto, M., Gardiner, G., Lawlor, P., et al. (2013). Development of a novel antimicrobial seaweed extract-based hydrogel wound dressing. Int J Pharmaceut. 2013.

Pinteus, S.F.G. (2011). Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioactivos com elevado potencial biotecnológico.: Instituto Politécnico de Leiria; 2011.

Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. Trends in Food Science & Technology. 19: 31-39.

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G.G., Herrero, M., Senõráns, F.J., et al. (2009). Screening for bioactive compounds from algae. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2009; 51:450-5.

Potin, P., Bouarab, K., Salaün, J.P., Pohnert, G., Kloareg, B. (2002). Biotic interactions of marine algae. Current Opinion in Plant Biology. 5:1-10.

Pulz, M. O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae, 635–648. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x.

Rodrigues, D., Freitas, A., Pereira, L., Rocha-Santos T., Vasconcelos M., Roriz M., et al. (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. Food chemistry. 2015; 183:197-207. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.057.

Rodriguez – Jasso, R.M., Mussatto, S.I., Pastrana, L., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A. (2011). Microwave – assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed, Carbohydrate Polymers, 2011, 86, 1137–1144.

Rosaline, S.D., Sakthivelkumar, S., Rajendran, K., Janarthanan, S. (2012). Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2012, 2, S140–S146.

Saranraj, P. (2014). Pharmacological Importance of Seaweeds: A Review. World Journal of Fish and Marine Sciences. 6. 1 - 15. 10.5829/idosi.wjfms.2014.06.01.76195.

Saritha, K., Mani, A.E., Priyalaxmi, M., Patterson, J. (2013). Antibacterial activity and biochemical constituents of seaweed *Ulva lactuca*. Glob. J. Pharmacol. 2013, 7, 276–282.

Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. (2006). Natural Product Isolation. Methods in Biotechnology. 2nd Edition. Humana Press. New Jersey.

Scheper, T., Gal, Y.L., Ulber, R. (2005). Marine Biotechnology I – Advances in Biochemical engineering/Biotechnology. V.96. Springer. Berlin. Germany.

Sekar, S. and Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and com- mercialization. J. Appl. Phycol. 20: 113–136. Simon.

Sem, Sr. A.K., A.K. Das, K.K. Sarkar, A.K. Siddhanta, R. Takano, K. Kamei and S. Hara. (2002). An agaroid-carrageenan hybrid type backbone structure for the antithrombotic sulfated polysaccharide from *Grateloupia indica* Boergensen (Halymeniales, Rhodophyta). Bot. Mar. 45: 331–338.

Shanmugam, M. and Mody, K.H. (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. Curr. Sci. 79: 1672–1683.

Shao, K., Wang, J., & Zhou, B. (2005). Production and application of filaments of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta), (2004), 431–437. https://doi.org/10.1007/s10811-005-5503-x.

Sho, H. (2001). History and characteristics of Okinawan longevity food, 10(January), 159–164.

Simon, C., Ar Gall, E. & Deslandes, E. (2001) Expansion of the red alga *Grateloupia doryphora* along the coasts of Brittany (France). Hydrobiologia (2001) 443: 23. https://doi.org/10.1023/A:1017587918604.

Simon-Colin, C., Bessières, M.A., Deslandes, E. (2002). Characterization of N-methyl-methionine sulfoxide and isethionic acid from the red alga *Grateloupia doryphora*. Phycol Res 50: 125 – 128.

Sloan, E. (1999). The new market: foods for the not-so-healthy. Food Technol; 53:54-60.

Soares, F., Fernandes, C., Silva, P., Pereira, L., Goncalves, T. (2016). Antifungal activity of carrageenan extracts from the red alga *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*. J Appl Phycol (2016) 28: 2991. https://doi.org/10.1007/s10811-016-0849-9.

Souza, B.W.S., M.A. Cerqueira, A.I. Bourbon, A.C. Pinheiro, J.T. Martins, J.A. Teixeira, M.A. Coimbra and A.A. Vicente. 2012. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. Food Hydrocolloids 27: 287–292.

Souza, R.B., Frota, A.F., Silva, J., Alves, C., Neugebauer, A.Z., Pinteus, S., et al. (2018). In vitro activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga Hypnea musciformis: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. International journal of biological macromolecules. 2018; 112:1248-56. Epub 2018/02/11.

Stengel, D.B. & Walker, J.M. (2015). Natural Products from Marine Algae, Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2684-8.

Sze, P. (1998). A Biology of the Algae. McGraw-Hill Companies. 3rd Edition. Boston. United States of America.

Takeshi, S., Yumiko, Y. S., Joko, S. (2005). Mineral components and anti-oxidant activities of tropical seaweeds. Journal of Ocean University of China. 4: 205–208.

Talarico, L.B.; Damonte, E.B. (2007). Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. Virology **2007**, 363, 473–485.

Tapiero, H., Nguyen G. Ba, Couvreur P., Tew, K.D. (2002). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies, Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 56, Issue 5, 2002, Pages 215-222, ISSN 0753-3322, https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00193-2.

Umezaki, I. (1989). Life History Types of the Florideophyceae (Rhodophyta) and their Evolution, Publications Of The Seto Marine Biological Laboratory (1989), 34(1-3): 1-24.

Usov, A.I., Miroshnikova, L.I. and Barbakadze, V.V. (1975). Polysaccharides of the algae. 17. Water-soluble polysaccharides of the red algae *Grateloupia divaricata* and *Grateloupia turuturu*. Zh. Obshch. Khim. 45: 1583–1587 (in Russian).

Valgas, C., Machado de Souza, S., Smânia, E., Smânia, Jr. A. (2007). Screening Methods to Determine Antibacterial Activity Of Natural Products. Brazilian Journal of Microbiology. 2007; 38:369-80.

Venugopal, V. (ed) (2008). Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean, CRC Press and Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.

Verlaque, M., Brannock, P.M., Brannock, T., Villalard-Bohnsack, M. and Marston, M. (2005). The genus Grateloupia C. Agardh (Halymeniaceae, Rhodophyta) in the Thau Lagoon (France, Mediterranean): a case study of marine plurispecific introductions. Phycologia 44: 477–496.

Villalard-Bohnsack, M. and Harlin, M. (1997). The appearance of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) on the northeast coast of North America. Phycologia 36: 324–328.

Walker, A.W. and Day, A.A. (1943). Extracts from Irish moss as a substitute for agar in bacteriological culture media. Food Res. 8, 435-443.

Wang, W., Zhang, P., Yu, G., Li, C., Hao, C., Qi, X., Zhang, L., Guan, H. (2012). Preparation and anti-influenza A virus activity of κ-carrageenan oligosaccharide and its sulfated derivatives. Food Chem. **2012**, 133, 880–888.

Yokoya, N.S., Stirk, W.A., Staden, J., Novák, O., Turecková, V., Pencik, A., Strnad, M. (2010). Endogenous cytokinins, auxins, and abscisus acid in red algae from Brazil, Journal of Phycology, 2010, 46(6), 1198–1205.

Yoshida, N. (2001). Hydrogen and oxygen Isotopes in Hydrology. International hydrological Programme. Hydrospheric Atmospheric Research Center, Educational Scientific and Cultural Organization. Nagoya University. United Nations.

Referências online:

CABI, 2018. *Grateloupia turutru* - Invasive Species Compendium. Available online at: https://www.cabi.org/isc/datasheet/109142#567BC39B-F949-420A-8198AEA1FE9C8E8A.

WHO Traditional Medicine Strategy 2014 - 2023 (2014). Available at:http://www.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1.

ECDC Policy Briefing, 2018. Available at: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antibiotic-resistance-policy-briefing.pdf.

Anexos

Tabela VI – Picos presentes nos espectros de FTIR de algas e as suas ligações correspondentes (adaptado de Chopin *et al*. 1999; Pereira *et al*. 2009; Souza *et al.* 2012)

Wave numbers (cm^{-1})	**Bonds/Assignments**
3500	O-H
2960	CH_2
2900–2920	C-H (good reference for total sugar content)
2845	$O-CH_3$ (shoulder on the band at 2920 in highly methylated agars)
1725	COOH
1690–1695	Amide I from proteins
1640–1650	H_2O and proteins CO-NH/amide II from proteins
1605	Carboxylate anion of pyruvate
1450	Ester-sulfate
1420	Amide III from proteins
1370–1320	Ester-sulfate
1210 <1240 <1260	S=O of ester-sulfate (good indicator for total sulfate content)
1180	P-O-C (alkyl substituent's suggesting organic phosphates)
1150	Ester-sulfate
1040–1080	Skeleton of galactans
1070	C-O of 3,6-anhydrogalactose (shoulder)
1065	Gelling type carrageenans
1040	C-O of ester-sulfate and hydroxyl
1037–1071	Symmetric C-O vibration associated with a $C-O-SO_3$ of heterofucans
1020	Non-gelling type carrageenans
1000–1200	Sulfates and floridean starch
970–975	Galactose: peak with alkali modified iota carrageenan, small peak with unmodified iota, and also present in agars
930–940	Vibrations of the C-O-C of 3,6-anhydrogalactose
905	$C-O-SO_4$ on C_2 of 3,6-anhydrogalactose (shoulder)
890–900	Unsulfated β-D-galactose (or with 6–0-methylgalactose or with pyruvate); agar specific band
867	$C-O-SO_4$ on C_6 of galactose (shoulder, indicates precursors)
845–850	$C-O-SO_4$ on C_4 of galactose/floridean starch
825–830	$C-O-SO_4$ on C_2 of galactose (narrow when xi-carrageenan present)
820	Galactose 6-sulfate
815–820	$C-O-SO_4$ on C_6 of galactose
805	$C-O-SO_4$ on C_2 of 3,6-anhydrogalactose
790	Characteristic of agar-type in second derivative spectra
730–750	C-S/C-O-C bending mode in glycosidic linkages of agars
717	Characteristic of agar-type in second derivative spectra/C-O-C bending mode in glycosidic linkages of agars
705	$C-O-SO_4$ on C_4 of galactose
580	S-O in sulfated galactans

Tabela VII – Identificação dos tipos de carragenanas através de espectroscopia de infravermelhos (adaptado de Chopin & Whalen, 1993; Pereira, 2006).

Wavenumbers (cm^{-1})	Bond(s)/group(s)	Letter code	Type of carrageenan							
			Kappa (κ)	Mu (μ)	Iota (ι)	Nu (ν)	Beta (β)	Theta (θ)	Lambda (λ)	Xi (ξ)
1240–1260	S=O of sulphate esters		+	++	++	+++	−	++	+++	++
1070	C–O of 3,6-anhydrogalactose	DA	+	−	+	−	+	+	−	−
970–975	Galactose	G/D	+	s	+	s	+	+	−	−
930	C–O of 3,6-anhydrogalactose	DA	+	−	+	−	+	+	−	−
905	C–O–SO_3 on C2 of 3,6-anhydrogalactose	DA2S	−	−	+	−	−	+	−	−
890–900	Unsulphated β-D-galactose	G/D	−	−	−	−	+	−	−	−
867	C–O–SO_3 on C6 of galactose	G/D6S	−	+	−	+	−	−	+	−
845	C–O–SO_3 on C4 of galactose	G4S	+	+	+	+	−	−	−	−
825–830	C–O–SO_3 on C2 of galactose	G/D2S	−	−	−	+	−	+	+	n
815–820	C–O–SO_3 on C6 of galactose	G/D6S	−	+	−	+	−	−	+	−
805	C–O–SO_3 on C2 of 3,6-anhydrogalactose	DA2S	−	−	+	−	−	+	−	−

−, Absent; +, medium; ++, strong; +++, very strong; s, shoulder peak; n, narrow peak.