



***Estudo da Biologia Reprodutiva e do Potencial  
Biotecnológico e Alimentar de holotúrias da costa de  
Peniche***

Rita Figueiras Alves dos Santos

[2013]





***Estudo da Biologia Reprodutiva e do Potencial  
Biotecnológico e Alimentar de holotúrias da costa de  
Peniche***

Rita Figueiras Alves dos Santos

Dissertação para a Obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sobre a orientação da Doutora Ana Pombo e do  
Doutor Rui Pedrosa

[2013]

Título: Estudo da Biologia Reprodutiva e do Potencial Biotecnológico e Alimentar de holotúrias da costa de Peniche

Copyright © Rita Figueiras Alves dos Santos  
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche  
Instituto Politécnico de Leiria  
2013

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais e irmã  
Aos meus avós  
À Eliana  
À memória da Shiva



## **Agradecimentos**

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda e o apoio incondicional de um conjunto de pessoas a quem devo o meu mais profundo agradecimento. Assim,

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Pombo, pelo entusiasmo com que aceitou orientar este trabalho, mesmo sabendo as possíveis dificuldades, dada a escassez de literatura sobre o tema. Um muito obrigado por toda a ajuda, apoio incondicional, pela partilha de ideias, incentivo constante e pelas valiosas sugestões.

Ao meu orientador, Professor Doutor Rui Pedrosa, quero agradecer ter aceitado fazer parte deste projeto, mesmo sabendo as minhas grandes limitações na área da biotecnologia. Um muito obrigado pelo apoio e incentivo constante!

Não poderia deixar de agradecer à Professora Doutora Susana Mendes, não só pela ajuda estatística, mas também pelos valiosos comentários e “puxão de orelhas” mais do que merecidos, que sem dúvida melhoraram imenso este trabalho. Um muito obrigado à amizade sempre presente!

Um grande, grande, GRANDE obrigado à Professora Doutora Susana Ferreira, pela paciência e entusiasmo na revisão de alguns resultados e ajuda no tratamento das fotos da histologia. Muito obrigada pelo carinho sempre demonstrado e valiosíssimas sugestões!

Aos técnicos de laboratório, nomeadamente à Técnica Vera Severiano, um muito obrigado pela disponibilidade sempre demonstrada quando necessitava de materiais.

À Professora Doutora Susana Pereira da Universidade do Porto e à minha eterna “professora do andar”, Maria Inês, um muito obrigada pelos comentários e sugestões dadas, mas mais do que isso, à eterna amizade e carinho. Obrigada por fazerem parte da minha vida, hoje e sempre!

Ao André Horta e Tiago Simões, por toda a ajuda dispensada e valiosos conselhos.

Um grande, GRANDE agradecimento aos “meus orientadores do coração”, Susete Pinteus, Celso Alves e Joana Silva! Sem vocês, uma parte substancial desta tese não teria sido possível e do fundo do meu coração, agradeço-vos a paciência, a amizade, o

tempo dispendido comigo e o incentivo constante, nunca me deixando ir a baixo. Obrigada por me terem acompanhado desde o início até ao fim. Vocês são únicos!!! ☺

Por último, mas não menos importante, à minha família, por me terem proporcionado este Mestrado, por terem sempre acreditado em mim, pelo apoio constante e por serem os pilares da minha existência. Obrigado por terem entendido o porquê das minhas ausências ao fim-de-semana. No final valeu a pena!

À Eliana, sem ti esta tese, em todas as suas vertentes, não teria sido possível! Obrigada pelo apoio e presença constante, por toda ajuda e pelos maravilhosos cortes e colorações, bem melhores que os meus!;) Enfim acho que é um obrigado por tudo: Esta Tese é Nossa!!! :D



Até ao momento, deste trabalho resultou um póster científico no Congresso Europeu de Biotecnologia em Bratislava, 2013 e uma publicação em forma de resumo na revista científica “*Current Opinion in Biotechnology*”:

Póster científico:

- **Santos, R.**, Silva, J., Pinteus, S., Alves, C., Pombo, A. and Pedrosa, R. (2013). Sea cucumbers from the Peniche coast (Portugal) exhibit new promising antitumor activity against HepG-2 cell line. *European Biotechnology Congress, 2013 in Bratislava*.

Publicação:

- **Santos, R.**, Pinteus, S., Pombo, A. and Pedrosa, R. (2013). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of sea cucumbers from the Peniche coast (Portugal). *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 24, Supplement 1, pages S97.



**Resumo**



## Resumo

---

A biologia reprodutiva de duas espécies de holotúrias foi estudada através da avaliação do Índice Gonadossomático e análises histológicas aos túbulos das gónadas. O potencial biotecnológico foi realizado pela avaliação da capacidade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral de extratos orgânicos e a avaliação do perfil lipídico foi efetuada através da quantificação da gordura total e perfil em ácidos gordos, para as três espécies.

A avaliação do Índice Gonadossomático (GI) e análises histológicas revelaram que a altura de fevereiro – abril corresponde ao pico de maturação da gónada, para as duas espécies, com GI de 11.72% e 14.73% para fêmeas e machos de *Holothuria forskali* e 13.87% e 14.11% para fêmeas e machos de *Holothuria mammata*.

A espécie *Holothuria forskali* (fração metanólica) apresentou uma maior atividade antioxidante, com  $0.168 \pm 0.016$  mg de EAG  $g^{-1}$  de extrato, uma percentagem de redução do radical DPPH de  $29.33\% \pm 0.002$  ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) e  $81.0 \pm 3.38$   $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox  $g^{-1}$  de extrato.

Na avaliação da capacidade antimicrobiana, apenas para *Staphylococcus aureus* ocorreu a redução do crescimento, promovido por extratos de *Holothuria forskali* (fração diclorometano) ( $51.85\%$ ;  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ). A avaliação da atividade antifúngica para *S. cerevisiae*, revelou que *Stichopus regalis* (fração metanólica) apresentou um maior potencial de redução do crescimento ( $62.80\%$ ;  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Para *C. albicans*, o maior potencial foi demonstrado por *Stichopus regalis* e *Holothuria forskali* (frações metanólicas) com  $86.20\%$  e  $85.32\%$  ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ), respetivamente. Os valores de  $IC_{50}$ , para *C. albicans*, foram de  $475.4 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $271.0 - 834.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e  $233.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $168.2 - 323.4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), respetivamente.

Na redução da viabilidade e proliferação celular, para *Holothuria forskali* (fração metanólica) na linha celular MCF-7, ocorreu uma redução de  $100\%$  ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$  - método de MTT). Relativamente à linha celular HepG-2, a redução da viabilidade e proliferação celular foi de  $91.30\%$  e  $95.15\%$  ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ; extrato metanólico – método de MTT), respetivamente. Na viabilidade celular, o  $IC_{50}$  (extrato metanólico) foi de  $238.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $182.3 - 311.4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e  $396.0 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $284.7 - 550.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), para MCF-7 e HepG-2, respetivamente. Na proliferação celular, o  $IC_{50}$  foi de  $260.3 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $186.7 - 362.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e  $218.7 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $149.4 - 320.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ , método de MTT), para MCF-7 e HepG-2, respetivamente.

Foi obtida, para *Holothuria forskali*, *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis*,  $4.83\%$ ,  $1\%$  e  $3.36\%$  de gordura total, respetivamente. No perfil em ácidos gordos, a *Holothuria forskali* apresentou os valores mais elevados em C16:0 ( $9.96\%$ ) e ARA ( $20.36\%$ ). A *Holothuria mammata* apresentou a maior quantidade total em PUFA e a espécie *Stichopus regalis* apresentou a maior

## Resumo

---

quantidade em C18:0 (12.43%), C18:1 n-7 (5.13%), EPA (12.49%) e DHA (7.35%).

As espécies estudadas apresentam características que nos levam a sugerir o seu potencial para cultivo e podem assim ser tidas como novas espécies para a aquacultura em Portugal e Europa. Além disso, apresentam elevado potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico, além de possuírem ácidos gordos de relevância para a saúde humana, pelo que se abrem janelas para a purificação e identificação de novas moléculas com potencial biotecnológico e alimentar relevante.

Palavras-chave: Holotúrias; Biologia reprodutiva; Potencial Biotecnológico; Compostos bioativos; Perfil lipídico.

## **Abstract**





## Abstract

---

The reproductive biology of two species of sea cucumbers was studied by evaluating the Gonadosomatic index and histological analyzes to the tubules of the gonads. The biotechnological potential was performed by evaluation of the antioxidant, antimicrobial and antitumor activities of organic extracts (methanol and dichloromethane) and the lipid profile was performed by measuring the total fat and fatty acid profile, for the three species.

The evaluation of the Gonadosomatic index (GI) and histological analyzes revealed that the range from February to April corresponds to the peak of gonad maturation, for both species, with GI values of 11.72% and 14.73% for females and males of *Holothuria forskali* and 13.87% and 11.14% for females and males of *Holothuria mammata*.

*Holothuria forskali*, in the methanolic fraction, showed the highest antioxidant activity, with  $0.168 \pm 0.016$  mg of EAG  $g^{-1}$  extract, a percentage reduction of DPPH of  $29.33\% \pm 0.002$  ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) and  $81.0 \pm 3.38$   $\mu\text{mol}$  of trolox equivalents  $g^{-1}$  extract.

In evaluating the antimicrobial capacity, only *Staphylococcus aureus* growth was reduced by dichloromethane extracts of *Holothuria forskali* (51.85%;  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ). The methanolic fraction of *Stichopus regalis* showed the greatest antifungal potential against *S. cerevisiae* growth (reduction of 62.80%,  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ). For *C. albicans*, the percentage of growth reduction was greater for the methanolic fraction of *Stichopus regalis* and *Holothuria forskali*, with values of 86.20% and 85.32% ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ), respectively. The  $IC_{50}$  values for *C. albicans* were  $475.4 \text{ mg ml}^{-1}$  (271.0 to  $834.0 \text{ mg ml}^{-1}$ ) and  $233.2 \text{ mg ml}^{-1}$  (168.2 to  $323.4 \text{ mg ml}^{-1}$ ) for both species, respectively.

In the evaluation of cell reduction viability and proliferation, for *Holothuria forskali* (methanolic fraction) in cell line MCF-7, there was a reduction of 100% ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$  - MTT method). Regarding cell line HepG-2, reduction of cell viability and proliferation was 91.30% and 95.15% ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ; methanolic extract - MTT method), respectively. On cell viability, the  $IC_{50}$  (methanol extract) was  $238.2 \text{ mg ml}^{-1}$  (182.3 -  $311.4 \text{ mg ml}^{-1}$ ) and  $396.0 \text{ mg ml}^{-1}$  (284.7 -  $550.8 \text{ mg ml}^{-1}$ ) for MCF-7 and HepG-2 cells line, respectively. In cell proliferation, the  $IC_{50}$  was  $260.3 \text{ mg ml}^{-1}$  (186.7 -  $362.9 \text{ mg ml}^{-1}$ ) and  $218.7 \text{ mg ml}^{-1}$  (149.4 -  $320.0 \text{ mg ml}^{-1}$  MTT method), for MCF-7 and HepG-2 cells line, respectively.

The total fat for *Holothuria forskali*, *Holothuria mammata* and *Stichopus regalis*, was 4.83%, 1% and 3.36%, respectively. Regarding the fatty acid profile, *Holothuria forskali* showed the highest values in C16:0 (9.96%) and ARA (20.36%). *Holothuria mammata* had the highest total amount of PUFA and *Stichopus regalis* showed the highest amount in C18:0 (12.43%), C18:1 n-7 (5.13%), EPA (12.49%) and DHA (7.35%).

## Abstract

---

These species have characteristics that lead us to suggest the potential for cultivation and can thus be regarded as new species for aquaculture in Portugal and Europe. Also, they have high potential antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities, besides having fatty acids of relevance for human health. Moreover, these findings open new windows for the purification and identification of novel molecules with biotechnological potential.

Key words: Sea cucumbers; Reproductive Biology; Biotechnological Potential; Bioactive compounds; Fatty acid profile.

## **Índice**



# Índice

---

<b>Resumo</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>3</b>
1.1. Biologia das espécies estudadas e sua distribuição geográfica .....	3
1.2. Aquacultura de holotúrias: estado atual do tema .....	5
1.3. Potencial biotecnológico de holotúrias .....	7
1.4. Holotúrias, um novo recurso alimentar de alto valor nutricional .....	9
<b>Objetivos</b> .....	<b>11</b>
2.1. Objetivo Geral .....	11
2.2. Objetivos Específicos .....	11
<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>15</b>
3.1. Amostragem biológica e determinação do Índice Gonadossomático (GI) .....	15
3.2. Análises histológicas .....	16
3.3. Preparação dos extratos .....	16
3.4. Avaliação da capacidade antioxidante .....	17
3.4.1. Quantificação Total de Polifenóis .....	17
3.4.2. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH .....	17
3.4.3. Avaliação da capacidade de captação do radical peróxido (ROO°) - Método ORAC .....	18
3.5. Avaliação da capacidade antimicrobiana .....	19
3.5.1. Preparação dos meios de cultura .....	19
3.5.2. Avaliação da capacidade antibacteriana .....	19
3.5.3. Avaliação da capacidade antifúngica .....	20
3.6. Avaliação do potencial citotóxico .....	21
3.6.1. Ensaio de proliferação celular e viabilidade celular nas células MCF-7 e HepG-2 .....	21
3.6.1.1. Método de 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) .....	22
3.6.1.2. Método de calceína – AM .....	22
3.7. Quantificação da gordura total e avaliação do perfil em ácidos gordos das espécies em estudo .....	23
3.8. Análise estatística .....	24
<b>Resultados</b> .....	<b>29</b>
4.1. Amostragem biológica e Índice Gonadossomático das duas espécies em estudo .....	29
4.2. Morfometria dos Túbulos das Gónadas e Análises Histológicas .....	33

# Índice

---

4.3. Avaliação da capacidade Antioxidante .....	42
4.3.1. Quantificação Total de Polifenóis .....	42
4.3.2. Capacidade de redução do radical DPPH.....	43
4.3.3. Capacidade de captação do radical peróxilo (ROO°) - Método ORAC ..	44
4.4. Avaliação da capacidade antimicrobiana .....	44
4.4.1. Capacidade antibacteriana .....	44
4.4.2. Capacidade Antifúngica.....	46
4.5. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de holotúrias sobre os modelos celulares MCF-7 e HepG-2.....	49
4.5.1. Efeitos de toxicidade dos extratos de holotúrias nas linhas celulares MCF-7 e HepG-2.....	49
4.5.2. Efeito dos extratos de holotúrias sobre a proliferação celular nas linhas celulares MCF-7 e HepG-2.....	53
4.6. Quantificação da gordura total e avaliação do perfil em ácidos gordos das três espécies de holotúrias .....	57
<b>Discussão e Conclusão.....</b>	<b>61</b>
<b>Perspetivas Futuras.....</b>	<b>77</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>81</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>89</b>

## **Introdução**





## Introdução

---

Nas últimas décadas tem-se vindo a assistir a um crescente interesse económico e de exploração das populações de holotúrias a nível mundial. Este interesse está maioritariamente centrado em países como a China, Japão, Indonésia, Austrália, entre outros, onde as holotúrias são conhecidas e consumidas como *bêche – de – mer, trepang ou haisom*. *Bêche – de – mer* é o nome dado às holotúrias que foram sujeitas a um processo contínuo de cozedura, limpeza, secagem e, em alguns casos, sujeitas a fumaça (Anderson *et al.*, 2011; Sicuro e Levine, 2011; Purcell *et al.*, 2012).

A fácil obtenção de holotúrias por pescadores locais, que os pescam à mão, apneia ou utilizando equipamentos simples, como uma vara com uma jaula na extremidade, bem como o interesse decorrente das grandes metrópoles no mercado das exportações, tem levado a uma severa depleção dos *stocks* naturais. Aliado a este fator, a natureza sésil das holotúrias e a facilidade de produção de *bêche – de – mer*, exigindo pouca ou nenhuma tecnologia associada, tem sido apontada como um dos principais recursos de subsistência das pequenas comunidades rurais costeiras de países subdesenvolvidos na região asiática. Tal tem acarretado um ganho económico para estas populações, através da exportação das holotúrias (na forma seca, fresca ou congelada) maioritariamente para a China (mais concretamente para o porto de Hong Kong) e Singapura (Bell *et al.*, 2008; Ochiewo *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2011; Friedman *et al.*, 2011).

No hemisfério Norte e particularmente na Europa, ainda se encontra muito pouco desenvolvida a pesca de holotúrias, sendo apenas dominada por um conjunto pequeno de espécies como: *Cucumaria frondosa*, *Stichopus regalis*, *Holothuria mammata*, *Holothuria polii*, *Holothuria tubulosa*, *Parastichopus californicus*, entre outras (Sicuro e Levine, 2011).

Todas estas espécies têm como destino o mercado asiático, sendo exportadas na sua forma seca, congelada ou fresca e tendo como principais países exportadores a Turquia, França e Espanha. O total de holotúrias exportadas pela Turquia em 2007 foi de 77.238 toneladas (Vannuccini, 2004; Aydin, 2008; Sicuro e Levine, 2011).

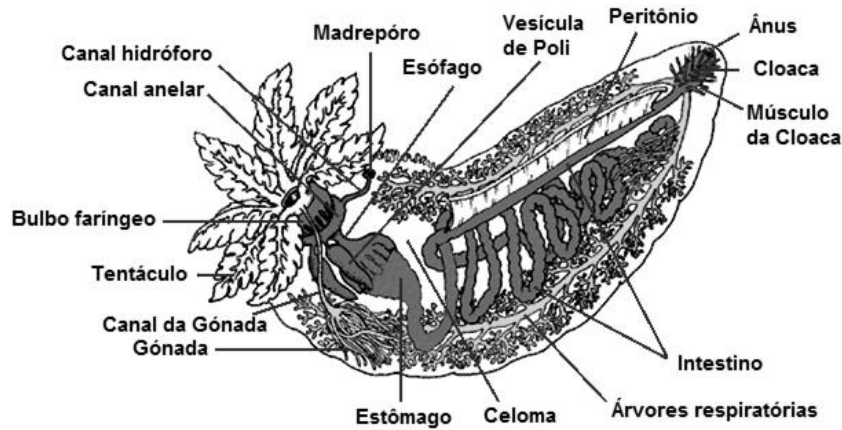
### 1.1 *Biologia das espécies estudadas e sua distribuição geográfica*

As holotúrias são uma das cinco grandes classes de equinodermes. Pertencem também a este filo, as estrelas-do-mar e ouriços-do-mar. Existem cerca de 1.500 espécies de holotúrias distribuídas em 6 ordens e 25 famílias (Conand, 1990).

Estes organismos apresentam em média, um tamanho típico entre 10 – 50 cm de comprimento. O seu corpo apresenta uma forma aproximadamente cilíndrica e não têm braços (que são encontrados em outros equinodermes como as estrelas - do -

## Introdução

mar). O esqueleto é reduzido a espículas microscópicas existentes na parede do corpo e têm pés ambulacrários. A boca é anterior, cercada por tentáculos refracteis, intestino longo, ânus posterior e cloaca, apresentando órgãos respiratórios (figura 1) (Conand, 1990; Saldanha, 1995).



**Figura 1.** Anatomia e forma geral do corpo de uma holotúria (Adaptado de [www.asturnatura.com](http://www.asturnatura.com)).

As holotúrias podem ser encontradas em todo o ambiente marinho, desde o intertidal e águas rasas, até aos fundos abissais. A maior diversidade de espécies ocorre no Oceano Índico e Pacífico.

A reprodução pode ser sexuada ou assexuada, sendo a maioria das espécies dióicas (sexos separados) mas não apresentando dimorfismo sexual. As larvas apresentam a forma plantónica e só na fase de juvenil, ao ocorrer a metamorfose, é que adquirem hábitos bentónicos (Conand, 1993; Battaglene, 1999).

As espécies existentes na costa portuguesa não são tão diversificadas como as existentes nas regiões do Pacífico e Índico. No entanto, possuem uma grande abundância e densidade populacional.

A espécie *Holothuria forskali* apresenta uma distribuição geográfica típica de uma espécie Atlântica - Mediterrânica, podendo ser encontrada em toda a costa portuguesa até às ilhas da Madeira, Açores e Desertas. É possível também ser encontrada desde a Escandinávia e ilhas Britânicas até às ilhas Canárias e Marrocos (Tuwo e Conand, 1992). Relativamente à espécie *Holothuria mammata*, esta pode ser encontrada em toda a região do Mar Mediterrâneo e também na região nordeste do Oceano Atlântico, estando ainda presente no conjunto das ilhas Macaronésias (Açores, Madeira e Canárias). Ambas as espécies supracitadas são espécies típicas da zona intertidal, sendo ainda possível encontrá-las na zona subtidal até aos 50 metros de profundidade. Por último, a espécie *Stichopus regalis* apresenta uma distribuição geográfica similar às espécies anteriormente

## Introdução

descritas, sendo ainda possível ser encontrada no Golfo do México e na costa nordeste de Cuba e Ilhas Virgens, sendo no entanto uma espécie de fundo, entre os 10 e os 800 metros (Tabela I) (Pawson *et al.*, 2009; Ramón *et al.*, 2010; Borrero-Pérez, *et al.*, 2011).

**Tabela I.** Taxonomia de algumas espécies existentes na costa portuguesa (Adaptado de WoRMs – World Register of Marine Species).

### Taxonomia

	<i>Holothuria forskali</i> (Delle Chiaje, 1823)	<i>Holothuria</i> <i>mammata</i> (Grube, 1840)	<i>Stichopus regalis</i> (Cuvier, 1817)
Reino	Animalia	Animalia	Animalia
Filo	Equinodermata	Equinodermata	Equinodermata
Classe	Holothuroidea	Holothuroidea	Holothuroidea
Ordem	Aspidochirotida	Aspidochirotida	Aspidochirotida
Família	Holothuriidae	Holothuriidae	Stichopodidae
Género	<i>Holothuria</i>	<i>Holothuria</i>	<i>Stichopus</i>
Espécie	<i>Holothuria forskali</i> (Delle Chiaje, 1823)	<i>Holothuria</i> <i>mammata</i> (Grube, 1840)	<i>Stichopus regalis</i> (Cuvier, 1817)

### 1.2 Aquacultura de holotúrias: estado atual do tema

A aquacultura tem vindo a apresentar-se como uma indústria rentável com vista à preservação das espécies. O seu objetivo está maioritariamente centrado no cultivo de espécimes para repovoamento de *stocks*, tendo já produzido toneladas de juvenis para repovoamento de locais, onde se verifica uma depleção das habituais espécies nativas, sendo também produzidas uma grande quantidade de holotúrias para o mercado de exportação para fins alimentares (Bell *et al.*, 2008).

O cultivo de holotúrias em sistemas de aquacultura surgiu na China em 1950, com a produção de juvenis de *Stichopus japonicus*, em culturas *pen*. Estas continuam a ser utilizadas em muitas províncias e caracterizam-se pela cultura de juvenis e adultos em águas marinhas calmas e de baixa profundidade, com estacas e redes a delimitar o espaço. Se no início o cultivo surgiu por forma a repovoar os *stocks* desta espécie de alto valor comercial, com o evoluir da tecnologia associada à aquacultura, foram introduzidas novas espécies e novos sistemas de cultivo *indoor* e *outdoor*. Atualmente são já algumas as espécies cultivadas em aquacultura, como por exemplo, *Holothuria scabra*, *Holothuria fuscogilva*, entre outras de elevado valor económico (Battaglione, 1999; Chen, 2004).

No entanto, existem ainda lacunas no estudo da reprodução de várias espécies. A espécie *Holothuria scabra* é das poucas cuja

## Introdução

---

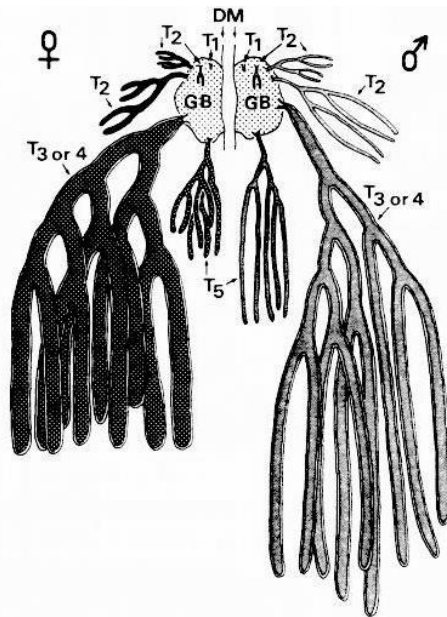
tecnologia de cultivo se encontra bem estudada, fundamentada e aplicada (Morgan, 2000; Ramofafia *et al.*, 2003; Ivy *et al.*, 2006).

O estudo da biologia reprodutiva de determinada espécie é o primeiro passo para que seja possível a realização do seu cultivo em aquacultura. A reprodução é regulada por fatores endógenos mas é afetada por fatores exógenos, como por exemplo a temperatura, salinidade, disponibilidade de alimento, fatores de *stress*, ciclos lunares, entre outros. Assim, existem diferenças de sincronização no período em que as gónadas estão maduras e prontas para a desova, entre espécies de zonas tropicais e temperadas, e mesmo entre determinadas regiões geográficas à mesma latitude (Tuwo e Conand, 1992; Battaglione, 1999; Ramofafia *et al.*, 2003; Shiell e Uthicke, 2006).

O estado de maturação das gónadas é avaliado e descrito segundo cinco estágios fundamentais de desenvolvimento: I – indeterminado, II – crescimento, III – maduro, IV – parcialmente desovado e V – desovado. Estes estágios são avaliados segundo o Índice Gonadossomático e tendo por base vários critérios relativos aos túbulos das gónadas: cor, comprimento dos túbulos, diâmetro dos túbulos, presença de ramificações, morfologia e histologia. A histologia permite avaliar o estado de oogénese e espermatogénese e, através de microfotografia, é possível observar esses estados de maturação (Ramofafia *et al.*, 2003).

As gónadas, apresentando a forma de túbulos, constituem a primeira linha de avaliação do estado de maturação. Uma gónada madura apresenta túbulos com uma grossura considerável, não sendo necessariamente demasiado longos em comprimento. No entanto, gónadas maduras são sinónimas de túbulos com um diâmetro considerável e onde é possível ver a olho nu os oócitos (fêmeas) ou ver um interior opaco, característico de um lúmen preenchido por espermatozoa (espermatócitos maduros) (machos). Pelo contrário, túbulos finos ou demasiado translúcidos e cores pálidas, são sinónimo de gónadas em desenvolvimento ou desovadas, estando a confirmação destes estados, dependente de análises histológicas (figura 2) (Tuwo e Conand, 1992).

## Introdução



**Figura 2.** Anatomia dos ovários e testículos da espécie *Holothuria forskali*, com os respetivos estágios de desenvolvimento dos túbulos. **T1**: primeiros túbulos; **T2**: túbulos secundários; **T3,T4**: túbulos maduros, **T5**: túbulos desovados, **GB**: estrutura da gônada, **DM**: mesentério dorsal (Adaptado de Tuwo e Conand, 1992).

### 1.3 Potencial biotecnológico de holotúrias

Os organismos marinhos e as holotúrias em particular representam um grupo de excelência na obtenção de compostos bioativos. As holotúrias, dada a sua natureza sésil e ausência de estruturas que lhes confirmam algum tipo de proteção, possuem nos seus corpos moles, mecanismos de adaptação às condições ambientais adversas e de proteção contra predadores. Ao habitarem o intertidal, muitas espécies estão frequentemente expostas a situações de *stress*, como a prolongada exposição à radiação solar, falta de oxigénio, alterações de salinidade e pH. Assim, estes organismos desenvolveram, obrigatoriamente, mecanismos de adaptação, que lhes conferissem resistência a estas perturbações, nomeadamente ao nível da redução do *stress* oxidativo, resultado da longa exposição aos UV (raios ultravioletas), enterrarem-se na areia e baixarem o seu metabolismo, para resistir à falta de oxigénio e alterações de salinidade, resultantes de ciclos de maré (Kijjoa e Sawangwong, 2004; Bordbar *et al.*, 2011).

Além das pressões físicas, estes organismos marinhos também estão sujeitos a pressões ecológicas, como a competição pelo espaço e a predação, levando-os a desenvolver estratégias que lhes permitam sobreviver, tais como processos físicos (enterrarem-se no substrato) e químicos. Estes processos químicos consistem, fundamentalmente, na produção de moléculas tóxicas pelo organismo, que sirvam para a sua defesa face a potenciais ameaças, lesando o predador. Na grande maioria das

## Introdução

---

espécies, estas moléculas tóxicas são produzidas como metabolitos secundários, não estando diretamente envolvidas nas atividades vitais do organismo, como a respiração, digestão, excreção, entre outros (Bordbar *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, tem-se vindo a assistir a uma constante procura de novos produtos naturais, com interesse em diferentes áreas, como por exemplo a alimentar, a cosmética e a farmacêutica, existindo um particular interesse nos organismos marinhos. Este interesse está intimamente relacionado com os compostos secundários que estes produzem. Foi já demonstrado que estas moléculas podem possuir diferentes atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antitumoral, entre outras (Duan *et al.*, 2006; Mayer e Gustafson, 2008). As holotúrias neste campo têm desempenhado um papel de destaque, com os seus metabolitos secundários a serem continuamente estudados e apresentando um grande potencial nas atividades acima descritas (Abraham *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Althunibat *et al.*, 2009; Van Dyck *et al.*, 2010; Bordbar *et al.*, 2011).

Os glicosídeos triterpénicos, também conhecidos por saponinas ou no caso das holotúrias, holoturinas; são a maior classe de metabolitos secundários produzidos por estes organismos. Estas saponinas estão reportadas na literatura como sendo possuidoras de um largo espetro de efeitos farmacológicos, como: atividades anti – inflamatórias, antitumorais, antioxidantes, antimicrobianas, antivirais, entre outras (Zhang *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Van Dyck *et al.*, 2009; Bordbar *et al.*, 2011; Careaga *et al.*, 2011). A sua estrutura química é do tipo lanosterol, com uma cadeia de 18 lactonas e uma cadeia de açúcar ligada ao carbono 3 do aglicone 3 (Zhang *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Van Dyck *et al.*, 2009).

Estudos anteriores revelaram que não só as saponinas são responsáveis por várias atividades já descritas, mas também os polissacarídeos, isolados de várias espécies de holotúrias, possuem efeitos antioxidantes e antitumorais.

Como já foi anteriormente referido, a maior parte das espécies de holotúrias estão sujeitas a ciclos de maré, ficando expostas à radiação solar durante longos períodos de tempo. Assim, e isto é particularmente verdade para as espécies tropicais, onde a radiação UV é mais intensa, não é de estranhar que muitas espécies tenham adquirido formas de se proteger do *stress* oxidativo.

O interesse nas holotúrias como fonte de compostos bioativos não conhece barreiras, sendo inúmeras as potencialidades destes organismos (tabela II). No entanto, há que referir que atualmente o uso das moléculas identificadas como responsáveis por determinada atividade, ainda se encontra nas fases de *screening* (estudo/identificação) e ensaios pré – clínicos.



## Introdução

Recentemente, cientistas japoneses patentearam os seus resultados científicos, relativos ao uso de sulfato de condroitina extraído de holotúrias, que provou ter resultados encorajadores no tratamento de doentes com HIV (vírus da imunodeficiência humana) (Chen *et al.*, 2010).

**Tabela II.** Interesse farmacêutico e medicinal de compostos bioativos extraídos de holotúrias (adaptado de Bordbar *et al.*, 2011).

Espécies	Compostos bioativos	Atividades farmacológicas/medicinais
<i>Holotúria scabra</i>	Glicosídeos triterpénicos	
<i>Holothuria leucospilota</i>	Oligoglicosídeos triterpénicos	Anticancerígeno
<i>Cucumaria frondosa</i>	Glicolípidos	
<i>Stichopus variegatus</i>		
<i>Theleonota ananas</i>	Sulfato de condroitina fucosilada	Anticoagulante
<i>Actinopyga echinites</i>	Glicosídeos triterpénicos	
<i>Actinopyga miliaris</i>	Saponinas esteróides	
<i>Holothuria atra</i>	Glicosídeos triterpénicos sulfatados	Antimicrobiano, Antibacteriano e antifúngico
<i>Holothuria scabra</i>	Peptídeos bioativos	
<i>Holothuria polii</i>		
<i>Cucumaria frondosa</i>		
<i>Psolus patagonicus</i>		
<i>Cucumaria frondosa</i>	Fenóis e flavonóides	Antioxidante
<i>Stichopus japonicus</i>	Peptídeos colagénios	
<i>Holothuria scabra</i>	Proteínas hidrosiladas	
<i>Holothuria forskali</i>	Saponinas	Antitumoral
<i>Cucumaria japonica</i>	Glicoproteínas	
<i>Holothuria nobilis</i>	Polissacarídeos sulfatados	Regeneração de feridas
<i>Holothuria tubulosa</i>	Ácidos gordos polinsaturados	
<i>Holothuria mammata</i>		
<i>Holothuria polii</i>		

### 1.4 Holotúrias, um novo recurso alimentar de alto valor nutricional

O uso de holotúrias como recurso alimentar, desde há muitas décadas que se encontra implementado, em países como a China, Japão, Indonésia, Singapura, Filipinas, Austrália, entre outros. Estas, como já foi referido, são conhecidas por *bêche – de – mer* (Wen *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2011; Sicuro e Levine, 2011).

O interesse alimentar surgiu primeiramente devido à sua fácil obtenção pelas comunidades locais piscatórias. Sendo, se for

## Introdução

---

visto à luz de décadas passadas, um recurso com uma grande abundância (Anderson *et al.*, 2011).

Aliado ao interesse alimentar reconhecido, está o fator preponderante pela qual são consumidos. As holotúrias, sob o ponto de vista nutricional, são ideais para serem introduzidas nas dietas alimentares, pois são ricas em proteínas e baixas em gorduras, possuindo um elevado teor em ácidos gordos essenciais como EPA (ácido eicosapentaenóico), DHA (docosahexaenóico) e ARA (ácido araquidónico) (Zhong *et al.*, 2007; Aydin *et al.*, 2011; Yahyavi *et al.*, 2012).

As propriedades nutricionais das holotúrias estão intimamente relacionadas com o seu interesse a nível da medicina. A sua utilização na cura de feridas internas e externas, através da regeneração dos tecidos como por exemplo resultantes de uma cesariana, estão particularmente associados à presença de altos níveis de EPA e glicosaminoglicanos (cadeias lineares de polissacarídeos, constituídos por subunidades repetidas de dissacarídeos). Têm como característica importante a sua carga negativa, que faz com que retenham sódio, que por sua vez vai levar a uma melhor retenção de água), que apresentam propriedades já reportadas na cura de feridas (Liu *et al.*, 2010; Aydin *et al.*, 2011).

Os ácidos gordos essenciais como os EPA (ácido eicosapentaenóico), DHA (ácido docosahexaenóico) e ARA (ácido araquidónico) não se encontram naturalmente sintetizados no corpo humano, pelo que têm de ser suplementados pela via nutricional. Estes estão presentes em elevadas concentrações em organismos fitoplantónicos como as microalgas. Ao serem filtradores ativos, as holotúrias alimentam-se de várias espécies de microalgas.

São escassos os estudos centrados na composição nutricional das holotúrias, a nível global. No entanto, alguns autores têm vindo a dedicar-se a esta temática.

Em Portugal, o consumo de holotúrias é inexistente. No entanto, em Espanha, mais precisamente na região da Catalunha, a espécie *Stichopus regalis* (pepino real) é considerada uma iguaria *gourmet* e constitui um dos produtos marinhos mais caros do mercado, atingindo preços da ordem dos 130 euros kg<sup>-1</sup>. O seu interesse e alto valor comercial estão associados ao facto do músculo ser considerado uma iguaria e de não ser uma espécie de fácil acesso (habita profundidades desde 10 a 800 metros) (Pawson *et al.*, 2009; Ramón *et al.*, 2010).



# Objetivos

---

## 2.1 Objetivo geral

A aquacultura tem vindo a apresentar-se como a indústria de excelência para a preservação das espécies. As tecnologias de cultivo têm sido melhoradas, no sentido da otimização da produção. No entanto, para que esta indústria continue a ser rentável, estudos sobre a biologia reprodutiva de várias espécies terão de ser realizados.

As holotúrias possuem ainda potencialidades reconhecidas no campo da biotecnologia, ao sintetizarem inúmeros compostos secundários com importantes atividades funcionais. Estes compostos têm vindo a ser estudados tendo em vista a implementação de novas terapias e desenvolvimento de novos fármacos.

A nível alimentar, são amplamente consumidas na região asiática onde são consideradas uma iguaria, e cujo valor nutricional é de excelência para a saúde humana, dado os seus altos níveis em ácidos gordos essenciais como EPA, DHA e ARA.

Neste contexto, tivemos como objetivo geral aprofundar os conhecimentos da biologia reprodutiva de duas das espécies de holotúrias com maior distribuição na nossa costa. Além do objetivo anterior também nos propusemos avaliar o potencial biotecnológico e o perfil lipídico das três espécies, *Holothuria forskali*, *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis*.

Desta forma, os objetivos deste trabalho consistem em:

- a) Estudar a biologia reprodutiva de duas espécies de grande distribuição e abundância na costa portuguesa e especificamente em Peniche, *Holothuria forskali* e *Holothuria mammata*;
- b) Avaliar o potencial biotecnológico de três espécies existentes na costa de Peniche, *Holothuria forskali*, *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis*, relativamente às suas atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica;
- c) Avaliar o perfil lipídico das três espécies supracitadas.

## 2.2 Objetivos específicos

Este trabalho assume assim duas vertentes distintas, mas que estão interligadas, na aquisição de novos conhecimentos sobre uma dada espécie.

Na vertente da aquacultura, pretende-se estudar a biologia reprodutiva das duas espécies descritas no ponto a), através de:

- Avaliação do Índice Gonadossomático;
- Identificação do estado de maturação dos túbulos das gónadas;
- Análises histológicas.

Na vertente da biotecnologia, aproveitando as holotúrias capturadas para as análises histológicas e através da captura

## Objetivos

---

de *Stichopus regalis* por pescadores locais, pretende-se extrair compostos bioativos, com recurso a solventes orgânicos de diferentes polaridades (metanol e diclorometano). Estes extratos serão utilizados posteriormente para:

a) Avaliação do potencial antioxidante, por três métodos:

- Quantificação Total de Polifenóis (QTP), pelo método de *Folin – Ciocalteu*;
- Avaliação da capacidade de redução do Radical DPPH;
- Avaliação da capacidade de captação do radical peróxido ( $\text{ROO}^\circ$ ), pelo método ORAC.

b) Avaliação da capacidade antimicrobiana:

- Avaliação da capacidade antibacteriana através da avaliação do crescimento de bactérias *gram+* e *gram-* referência na presença e ausência de extratos;
- Avaliação da capacidade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, na presença e ausência de extratos;
- Realização de ensaios de dose-resposta (dependência de concentração), nas frações que exibirem maior potencial, para determinação da concentração capaz de reduzir 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) na redução do crescimento dos microrganismos.

c) Avaliação da capacidade citotóxica:

- Realização de estudos de viabilidade celular e de proliferação celular em células HepG-2 (carcinoma hepatocelular de fígado humano) e MCF-7 (carcinoma da mama), pelo método de fluorescência (desesterificação da calceína – AM) e pelo método espectralométrico (redução do MTT);
- Realização de ensaios de dose-resposta (dependência de concentração) para determinação do  $\text{IC}_{50}$ , nas frações que exibirem maiores efeitos na redução da viabilidade e proliferação celular das linhas tumorais em estudo.

d) Avaliação do perfil lipídico:

- Quantificação da gordura total e perfil em ácidos gordos pelos métodos de Bligh e Dyer (1959) e Lepage e Roy (1986), respetivamente.

## **Materiais e Métodos**



## Materiais e Métodos

---

### 3.1 Amostragem biológica e determinação do Índice Gonadossomático (GI)

O período experimental decorreu de 29 de setembro de 2012 a 29 de junho de 2013, tendo sido obtidos um total de 137 indivíduos da espécie *Holothuria forskali* e 73 indivíduos da espécie *Holothuria mammata*. As amostragens realizaram-se duas vezes por mês (à exceção do mês de dezembro e março em que apenas foi possível uma única recolha de organismos, devido às condições meteorológicas adversas verificadas na zona, sendo de referir que a espécie *Holothuria mammata* apenas começou a ser recolhida em novembro, uma vez que primeiramente o estudo centrou-se apenas na espécie *Holothuria forskali*), mais precisamente no início e no final de cada mês, 10 a 15 indivíduos de *Holothuria forskali* e 10 a 15 indivíduos de *Holothuria mammata* foram recolhidos aleatoriamente na região intertidal (zona “entre marés”).

As holotúrias foram recolhidas na praia do Quebrado e do Portinho da Areia Norte, Peniche (Portugal) e foram devidamente acondicionadas em recipientes de plástico, com água salgada e transportadas vivas para o Laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche. Aqui, foram efetuadas pesagens individuais, pesando-se inicialmente o indivíduo inteiro, de seguida foi pesado o indivíduo eviscerado (remoção de todo o seu conteúdo interno desde árvores respiratórias, intestino, estômago, etc.) e posteriormente, o peso total da gónada (quando presente), tendo sido calculado o Índice Gonadossomático (GI), expresso em percentagem do peso húmido da gónada pelo peso húmido eviscerado do indivíduo (equação 1):

$$GI = \frac{Pg}{P} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

- Pg: peso da gónada (gramas);
- P: peso húmido eviscerado do indivíduo (gramas).

As gónadas quando presentes foram fotografadas.

Nos indivíduos com presença de gónada foram efetuadas as seguintes medições e anotações:

- 1) Comprimento dos túbulos;
- 2) Presença de ramificações;
- 3) Diâmetro dos túbulos.

Estas medições foram realizadas recorrendo a uma Lupa binocular (Lupa Binocular Zeiss, Stemi Dv4, Lentes Carl Zeiss).

As gónadas foram posteriormente recolhidas e fixadas em formol tamponado a 10%, durante 24 horas, até serem sujeitas a desidratação e incluídas em parafina.

Foram utilizados 10 indivíduos da espécie *Holothuria forskali* e 10 indivíduos da espécie *Holothuria mammata* para as análises biotecnológicas. Estas foram embaladas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Thermo, Electron Corporation) até posterior utilização.

## Materiais e Métodos

---

Foi também realizado um contacto com pescadores locais na Docapesca de Peniche, tendo estes capturado 10 indivíduos da espécie *Stichopus regalis*, que foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , depois de efetuadas as respetivas pesagens e remoção de todo o seu conteúdo interno (evisceração).

### 3.2 Análises histológicas

Após o período de 24 horas em formol tamponado a 10%, as gónadas foram dissecadas e, devidamente identificadas, foram colocadas no processador de tecidos (Leica, TP1020), sendo sujeitas a um programa de desidratação de tecidos, utilizando diferentes concentrações de álcoois (Anexo I). Findo o período decorrente da desidratação, as amostras foram incluídas em parafina (Leica EG 1120,  $58 - 62^{\circ}\text{C}$ ).

Os cortes histológicos foram efetuados a  $8\mu\text{m}$  no micrótomo (Sakura Accu – cut SRM 200) tendo sido obtidos 5 cortes histológicos para cada gónada. Estas preparações foram coradas com Hemotoxilina – Eosina (Anexo II) e observadas ao microscópio ótico (Axostar Plus, lentes Carl Zeiss) para medição dos oócitos e para verificação da presença de espermátócitos. Foram registadas medições de 5 oócitos de cada uma das 5 lâminas de cada indivíduo, sendo estas fotografadas (câmara fotográfica Canon Powershot G5).

Estes registos foram efetuados no sentido de, à semelhança do que foi realizado para os túbulos das gónadas, definir 5 estágios de gametogénese: recuperação, crescimento, maduro, parcialmente desovado e desovado, de acordo com a técnica realizada por outros autores (Sewell e Bergquist 1990; Tuwo e Conand 1992; Ramofafia *et al.* 2000).

Foi também realizado um contacto com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) no sentido da facultação de dados sobre a agitação marítima e a temperatura superficial da água (Anexo III), observados no período experimental decorrido. Este pedido foi gentilmente acedido pelo referido Instituto, tendo sido obtidos os dados com algumas lacunas resultantes de períodos de não medição devido a manutenção das bóias. Os dados referentes à agitação marítima foram recolhidos em Peniche. No entanto, os dados referentes à temperatura superficial da água do mar foram recolhidos na estação mais próxima que é a estação da Nazaré.

### 3.3 Preparação dos extratos

Na preparação dos extratos de holotúrias, além das duas espécies utilizadas nas análises histológicas, foi adicionada mais uma, *Stichopus regalis*. Os extratos de holotúrias foram preparados de acordo com o método adaptado por Mayachiew e seus colaboradores (2008). As holotúrias, previamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram liofilizadas (Liofilizador de bancada Scanvac CoolSafe) durante 2 dias a  $-60^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente foram trituradas (separadamente). A esta biomassa seca foi adicionado 200 ml de metanol num gobelé (um para cada espécie) ( $>99\%$ , Fisher Scientific, UK) que foi deixado em agitação *overnight*, protegido

## Materiais e Métodos

---

da luz. Posteriormente estas soluções foram filtradas e evaporadas num rotavapor (Laborata 4000 Heidolph) a 40°C, obtendo-se assim as frações metanólicas para cada espécie. Realizou-se o mesmo procedimento para o solvente diclorometano (99.8%; Fisher Scientific, UK), para serem obtidas as frações diclorometano de cada espécie.

As frações foram então solubilizadas em DMSO (Dimetilsulfóxido) (99.9%, Sigma, Steinheim, Germany) e mantidas a -20°C até posterior utilização.

### 3.4 Avaliação da capacidade antioxidante

#### 3.4.1 Quantificação Total de Polifenóis

Os compostos fenólicos ou polifenóis são antioxidantes com um elevado potencial já reportado por vários autores e que estão presentes em alimentos como legumes, frutas, óleo de peixe, vinho, plantas, algas, entre outros (Stern *et al.*, 1996; Mamelona *et al.*, 2007; Onofrejová *et al.*, 2010). A importância de uma dieta à base de antioxidantes prende-se com os seus benefícios para a saúde, ao reduzir o risco de doenças crónicas e degenerativas relacionadas com a oxidação de biomoléculas vitais (DNA, proteínas, lípidos, etc.), como por exemplo Alzheimer, cancro, doenças cardiovasculares, aterosclerose, entre outras. A sua proteção contra o *stress* oxidativo interno é conferida através de vários processos, como a regeneração *in situ* de moléculas antioxidantes (vitaminas e enzimas) ou direta neutralização de compostos oxidativos (Mamelona *et al.*, 2007).

A Quantidade Total de Polifenóis (QTP) foi avaliada através do método de *Folin – Ciocalteu*, adaptado a partir do trabalho realizado por Yu e seus colaboradores (2002). Num microtubo adicionou-se 790 µl de água destilada, 10 µl de amostra e 50 µl de reagente de *Folin – Ciocalteu* (Fluka Biochemika, Sigma, Switzerland). Após 2 minutos adicionou-se 150 µl de carbonato sódio, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20% (p/v) (Merck, Darmstadt, Germany). Posteriormente, a reação foi incubada à temperatura ambiente, no escuro durante 1 hora. Findo este período, procedeu-se à medição das absorvâncias a um comprimento de onda de 755 nm, num espectrofotómetro de absorção molecular (Helios α, Thermo Electron Corporation).

De modo a extrapolar os resultados utilizou-se o ácido gálico (Sigma, Steinheim, Germany) como padrão, sendo realizada uma curva de calibração com diferentes concentrações (0.01; 0.03; 0.1 e 0.3 mg ml<sup>-1</sup>). A quantidade total de polifenóis foi expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (EAG g<sup>-1</sup> extrato) e todas as amostras foram analisadas em triplicados.

#### 3.4.2 Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

A capacidade de redução do radical DPPH (Sigma, Steinheim, Germany) pelas amostras em estudo foi avaliada a partir do método reportado por Duan e seus colaboradores (2006).

## Materiais e Métodos

Começou-se por preparar uma solução de DPPH 0.1 mM em etanol. De seguida, num microtubo, juntou-se 10 µl de amostra a 990 µl da solução de DPPH, tendo-se vortexado. Incubou-se durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente e mediu-se a absorvância num espectrofotómetro de absorção molecular (Helios α, Thermo Electron Corporation), a um comprimento de onda de 517 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicados. A capacidade de redução do radical DPPH foi calculada através da seguinte equação (Equação 2):

$$\% \text{ Redução} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controlo}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

- Abs<sub>controlo</sub>: absorvância de DPPH;
- Abs<sub>amostra</sub>: absorvância de 990 µl de DPPH + 10 µl de extrato;
- Abs<sub>branco</sub>: absorvância de 990 µl de etanol + 10 µl de extrato.

### 3.4.3 Avaliação da capacidade de captação do radical peróxilo (ROO°) - Método ORAC.

A capacidade de captação do radical peróxilo (ROO°) tem sido referida como "Capacidade de absorção de radicais de oxigénio" (método ORAC) (Cao *et al.*, 1993). O método ORAC consiste na monitorização da oxidação de uma sonda fluorescente pelo radical peróxilo (ROO°), traduzida pela diminuição da intensidade da sua fluorescência. A inibição dessa oxidação, por uma substância antioxidante é, no método ORAC, uma medida da capacidade antioxidante dessa substância perante o radical. A particularidade do método ORAC é que a reação entre a sonda e o radical é levada até ao fim, ou seja até à completa inibição da fluorescência, sendo a quantificação da inibição conseguida pelo cálculo da área abaixo da curva (AUC) da reação. Este cálculo permite combinar o tempo e o grau de inibição dos radicais pelo antioxidante (Huang *et al.*, 2002).

A fluoresceína é uma molécula fluorescente que tem vindo a ser utilizada neste tipo de metodologias. A sua fluorescência diminui após oxidação por espécies reativas, nomeadamente pelo radical peróxilo (ROO°) (Huang *et al.*, 2002). Em geral, o radical peróxilo (ROO°) é um forte agente oxidante. Este radical tem a capacidade de remover H° de outras moléculas, constituindo uma reação importante na peroxidação lipídica (Menéndez, 2001; Spiteller, 2003)

Este teste foi realizado a partir do método descrito por Dávalos e seus colaboradores (2004). Numa placa de 96 poços, colocou-se 20 µl de cada amostra e adicionou-se 120 µl de fluoresceína previamente diluída em tampão fosfato a 75nM. Foi realizada uma leitura durante 15 minutos a 37 °C num leitor de espectrofluorimetria (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek) e, após esse período, colocou-se 60 µl de AAPH (Dicloridrato de 2.2'-azobis-2-amidinopropano) (Aldrich Sigma, Steinheim, Germany) (32 mM) em cada poço e procedeu-se à leitura da fluorescência durante uma cinética de 4 horas e 15 minutos, com leituras realizadas a cada minuto. A leitura foi realizada a 483 nm e 528



## Materiais e Métodos

---

nm, como comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente (37 °C).

De modo a extrapolar os resultados obtidos utilizou-se trolox (Aldrich - Sigma, Steinheim, Germany) como padrão, sendo realizada uma curva de calibração com diferentes concentrações de trolox (0; 5; 10; 20; 40 e 80  $\mu\text{M ml}^{-1}$ ). A capacidade antioxidante foi expressa em micromolar de equivalentes de trolox por grama de extrato e todas as amostras foram analisadas em triplicados. Para todos os ensaios a avaliação foi feita com o cálculo da área abaixo da curva de oxidação (redução da fluorescência) da fluoresceína.

### 3.5 Avaliação da capacidade antimicrobiana

#### 3.5.1 Preparação dos meios de cultura

Foram utilizados três meios de cultura distintos: o meio *Luria - Bertani* (LB) (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), para o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella* entérica (ATCC 13076), o meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) e *Candida albicans* (ATCC 10231) e o meio TSB enriquecido com extrato de levedura para o crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25953). Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fornecedor.

#### 3.5.2 Avaliação da capacidade antibacteriana

Este ensaio foi realizado utilizando, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* entérica e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25953). Estas bactérias encontravam-se em stock a -80°C.

A avaliação da capacidade antibacteriana dos extratos de holotúrias, consoante as diferentes frações orgânicas, foi realizada através do método de crescimento em placas de 96 poços para cada microrganismo. Foi colocado em cada poço 193  $\mu\text{l}$  de meio (consoante cada microrganismo), ao qual se juntou 2  $\mu\text{l}$  extrato ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) e 5  $\mu\text{l}$  de inóculo (microorganismo). Foi utilizado um fármaco como controlo positivo, o cloroanfenicol à concentração de  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  e foram preparados os brancos para cada amostra. Todas as amostras foram filtradas esterilmente (0.2  $\mu\text{m}$ , Whatman, U.K.) e os ensaios foram realizados em 8 experiências independentes, em condições de esterilidade.

Foram feitas leituras ao tempo zero e ao tempo correspondente a um ponto na fase exponencial de crescimento de cada microrganismo (definido em ensaios preliminares), num leitor de espectrofluorimetria (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek) a 600 nm.

A capacidade antibacteriana foi calculada pela redução do crescimento em relação ao controlo (% do controlo) através da seguinte equação (Equação 3):

## Materiais e Métodos

$$\text{Redução do crescimento (\% Controle)} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle}} \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

Onde:

- Abs<sub>controle</sub>: absorvância do crescimento de cada inóculo (microrganismo), consoante o meio de cultura;
- Abs<sub>amostra</sub>: absorvância do crescimento de cada inóculo na presença dos extratos;
- Abs<sub>branco</sub>: absorvância dos extratos no meio de cultura utilizado.

### 3.5.3 Avaliação da capacidade antifúngica

A capacidade antifúngica dos extratos de holotúrias foi avaliada através da monitorização do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) e *Candida albicans* (ATCC 10231) que se encontravam em *stock* a -80°C. Foram utilizadas duas placas de 96 poços (uma para cada microrganismo) e foram feitos 8 ensaios independentes com um volume de 200 µl por poço (193 µl de meio YPD + 2 µl de cada extrato + 5 µl de inóculo). Foi preparado o controlo positivo em que foi utilizado o fármaco Anfotericina B à concentração de 250 µg ml<sup>-1</sup> e os brancos de cada amostra. As placas foram incubadas a 30°C (*S. cerevisiae*) e 37 °C (*C. albicans*) a 400 rpm durante 20 horas e 8 horas, respetivamente. Estes tempos estão de acordo com os observados para as curvas de crescimento realizadas em ensaios preliminares, denotando a fase exponencial de crescimento de cada microrganismo. Antes da incubação foi realizada uma leitura ao tempo zero. Findo este período as placas foram lidas num leitor de espetrofluorimetria (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek) a um comprimento de onda de 600 nm. As condições de esterilidade foram sempre garantidas.

A capacidade antifúngica foi calculada pela redução do crescimento em relação ao controlo (% do controlo) através da seguinte equação (Equação 4):

$$\text{Redução do crescimento (\% Controle)} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle}} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

Onde:

- Abs<sub>controle</sub>: absorvância do crescimento de *S. cerevisiae* ou *Candida albicans*, em meio YPD;
- Abs<sub>amostra</sub>: absorvância do crescimento de *S. cerevisiae* ou *C. albicans* na presença dos extratos;
- Abs<sub>branco</sub>: absorvância dos extratos no meio YPD.

Para as frações que demonstraram um maior potencial sobre redução do crescimento dos microrganismos relativamente ao controlo (≥50%), realizaram-se ensaios de dose-resposta (dependência da concentração) de maneira a definir o IC<sub>50</sub>, incubando-se as células com diferentes concentrações de extrato (30µg ml<sup>-1</sup> e 1000µg ml<sup>-1</sup>) durante os respetivos tempos de incubação e temperaturas para cada microrganismo.

### 3.6 Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação do potencial citotóxico (proliferação celular e toxicidade) dos diferentes extratos de holotúrias foi testada em duas linhas celulares tumorais humanas, as células MCF-7 e as células HepG-2. O modelo celular proveniente do carcinoma da mama (células MCF-7) foi obtido através do Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche (DSMZ nº ACC 115). Relativamente ao carcinoma hepatocelular de fígado humano (células HepG-2) as células foram obtidas através da American Type Culture Collection (ATCC HB-8065).

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma, U.S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, U.S.A) e 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma, U.S.A), para a linha celular Hepg-2. Relativamente à linha celular MCF-7, as células foram também cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma, U.S.A.) e foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, U.S.A), 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma, U.S.A), 5 ml de MEM (aminoácidos não essenciais), 5 ml de piruvato de sódio a 1 mM e 0.5 ml de insulina humana a 10 µg ml<sup>-1</sup>. O meio de cultura foi sempre mudado 12 horas após as células serem semeadas e posteriormente de três em três dias para ambas as linhas celulares.

As células foram mantidas em cultura numa incubadora de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> Unitherm) com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humidade e uma temperatura constante de 37 °C.

#### 3.6.1 Ensaio de proliferação celular e viabilidade celular nas células MCF-7 e HepG-2

A avaliação do efeito dos extratos de holotúrias sobre a proliferação celular e viabilidade celular das células MCF-7 e HepG-2 foi adaptado do método realizado por Yuan e Walsh (2006). As células MCF-7 e HepG-2 foram semeadas em placas de 25 cm<sup>2</sup> com meio RPMI 1640 (placas diferentes para linhas celulares diferentes), demorando cinco a seis dias até atingir a confluência total das placas. Após este período, as células presentes nas placas de 25 cm<sup>2</sup> foram levantadas com tripsina (Sigma, U.S.A) e semeadas em placas de 96 poços, adicionando-se 20 µl de suspensão celular e 180 µl de meio RPMI 1640 com soro em cada poço.

Para testar o efeito dos extratos de holotúrias na proliferação celular das linhas celulares em estudo, os extratos (dissolvidos em DMSO e consoante as diferentes frações orgânicas) foram preparados em meio de cultura sem FBS e meio de cultura com FBS. Após 36h das células serem semeadas em placas de 96 poços, removeu-se o meio destas e adicionou-se 100 µl de meio com FBS (para assegurar o crescimento celular) e 100 µl de meio sem FBS com extratos de holotúrias, previamente filtrados (0.2 µm, Whatman, U.K.). Todas as frações testadas foram incubadas à concentração de 1mg ml<sup>-1</sup> durante 24 horas.

Para avaliar o efeito dos extratos de holotúrias sobre a viabilidade celular das linhas celulares em estudo foi necessário esperar cerca de 5 a 6 dias até que as placas de 96 poços

## Materiais e Métodos

---

atingissem a confluência total. Os extratos, dissolvidos em DMSO, e consoante as diferentes frações orgânicas, foram dissolvidos em meio sem FBS e filtrados esterilmente (0.2  $\mu\text{m}$ , Whatman, U.K.). Após as placas atingirem a confluência celular total em todos os poços, removeu-se o meio de cultura e de seguida adicionou-se 200  $\mu\text{l}$  da solução anteriormente preparada (meio sem soro + extrato de holotúria). Todas as frações foram testadas à concentração de  $1\text{mg ml}^{-1}$  e incubadas durante 24 horas.

Para os extratos que demonstraram maior atividade sobre a inibição da proliferação celular ou redução da viabilidade celular das linhas celulares em estudo, realizaram-se ensaios de dose-resposta (dependência da concentração) de maneira a definir o  $\text{IC}_{50}$ , incubando-se as células com diferentes concentrações de extrato ( $10\mu\text{g ml}^{-1}$  e  $1000\mu\text{g ml}^{-1}$ ) durante 24 horas.

O efeito das diferentes frações de holotúrias sobre as linhas celulares em estudo foi revelado pelo método de MTT e pelo método de calceína-AM. O procedimento para o método de MTT e para o método da calceína-AM encontra-se descrito nos pontos 3.6.1.1 e 3.6.1.2, respetivamente.

### 3.6.1.1. Método de 3-[4. 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

Este método baseia-se na redução de sais tetrazólicos de MTT por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas em cristais de formazan. Posteriormente, estes cristais são dissolvidos num solvente orgânico de modo a serem medidos espectrofotometricamente, permitindo constatar uma relação com o número de células viáveis, pois quanto maior a quantidade de células viáveis maior o número de cristais formados (Rotter *et al.*, 1993; Castell e Gómez-Lechón, 1997).

Após o período de experiência definido, aspirou-se o meio contendo os extratos de holotúrias e lavou-se as células com 200  $\mu\text{l}$  de tampão Hank's. Após esta lavagem adicionou-se 100 $\mu\text{l}$  de MTT (1.2mM) (Sigma, Germany), previamente dissolvido em tampão Hank's (composição do meio em mM: NaCl 137, KCl 5,  $\text{MgSO}_4$  0.8,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.33,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.44,  $\text{CaCl}_2$  0.25;  $\text{MgCl}_2$  1.0, Tris HCl 0.15 e butirato de sódio 1.0, pH=7.4) e filtrado esterilmente (0.2  $\mu\text{m}$ , Whatman, U.K.). De seguida, as células foram incubadas 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ , com 5%  $\text{CO}_2$ , em atmosfera humidificada (95%). Para solubilizar os cristais de formazan resultantes da reação, adicionou-se a todos os poços 100  $\mu\text{l}$  de isopropanol (Panreac, Espanha) contendo 0.04M HCl, homogeneizando com o auxílio de uma micropipeta. Este processo foi realizado em gelo. Posteriormente as células foram incubadas 1 hora, à temperatura ambiente, protegidas da luz.

Finalmente os resultados foram lidos num leitor de espectrofluorimetria (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek) a um comprimento de onda de 570 nm.

### 3.6.1.2. Método de calceína – AM

Este método tem por base o fluoróforo da calceína-AM. A calceína na sua forma natural apresenta fluorescência, no entanto

## Materiais e Métodos

---

uma vez esterificada perde esta característica mas ganha a capacidade de penetrar na membrana da célula. No interior desta, as esterases existentes no citoplasma quebram as ligações estères, voltando a calceína à sua forma natural, emitindo fluorescência. Para as esterases terem uma atividade normal, as células têm de estar viáveis, logo quanto maior for a fluorescência maior será o número de células viáveis (Hayes, 1997).

Assim, findo o período de experiência definido, as células foram lavadas duas vezes com 200µl de tampão Hank's. De seguida, foi adicionado a cada poço 100µl de uma solução de calceína 2µM (previamente preparada em tampão Hank's), exceto nos poços definidos para avaliar a autofluorescência celular, nos quais se adicionou 100µl de tampão Hank's. As placas de 96 poços foram incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz, durante 30 minutos. Após este período os resultados foram obtidos pela leitura de fluorescência num leitor de espectrofluorimetria, utilizando como comprimento de onda de excitação 485 nm e um comprimento de onda de emissão 530 nm.

Os resultados do efeito dos extratos de holotúrias sobre a proliferação e a viabilidade celular das células MCF-7 e HepG-2 são apresentados em percentagem do controlo, sendo calculados através da seguinte equação (Equação 5):

$$(\% \text{ do controlo}) = \frac{F_{\text{amostra}}}{F_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde  $F_{\text{controlo}}$  corresponde à fluorescência do controlo (células cultivadas em meio de cultura contendo o controlo) e a  $F_{\text{amostra}}$  corresponde à fluorescência da amostra em teste (células cultivadas em meio de cultura contendo os extratos de holotúrias).

### 3.7 Quantificação da gordura total e avaliação do perfil em ácidos gordos das espécies em estudo

Para a quantificação da gordura total foi necessário pesar 10g de amostra numa balança analítica (Mettler Toledo, d=0.1mg) e adicionar 30ml de metanol:clorofórmio (2:1) (Fisher Scientific, HPLC grade/Analytical reagent grade), com homogeneização posterior durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se 4ml de uma solução saturada de cloreto de sódio em agitação contínua, 10 ml de clorofórmio e 10ml de água (Fisher Scientific, HPLC grade). A mistura foi homogeneizada durante 5 minutos e colocada num banho de ultra-sons (VWR – 45 KHz, 130 W) durante o mesmo tempo. O conteúdo existente foi filtrado através de papel de filtro (Whatman, n.º 40) e o filtrado foi transferido para uma ampola de decantação. A fase orgânica foi recolhida para um papel de filtro (Whatman, n.º40) com sulfato de sódio anidro (Panreac, Reag. USP; PA-ACS-ISO) e filtrado para um *vial* previamente pesado. O solvente orgânico existente na mistura foi evaporado num rotavapor (Heidolph Laborotta 4000-efficient) à temperatura máxima de 40°C. Este processo deu-se por concluído aquando da pesagem rigorosa do *vial* com a gordura extraída (Manirakiza *et al.*, 2001; Bandarra *et al.*, 2006).

## Materiais e Métodos

---

A percentagem de gordura total foi então calculada segundo a equação (Equação 6) descrita abaixo. Todos os ensaios foram realizados em triplicados.

$$\text{Gordura total (\%)} = \frac{V_f - V_i}{P} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

- $V_f$ : Peso do *vial* final (gramas);
- $V_i$ : Peso do *vial* inicial (gramas);
- P: Peso da amostra (gramas).

A avaliação do perfil lipídico através da análise dos ácidos gordos para as três espécies de holotúrias foi realizada a partir da adaptação do método de Lepage e Roy (1986). Começou-se por pesar 300 mg de biomassa fresca. De seguida, adicionou-se 5 ml de uma solução previamente preparada de metanol e cloreto de acetilo (20:1) (Acros, 98%; Fisher Scientific, HPLC Grade) para tubos de vidro roscados. A mistura formulada da etapa anterior foi homogeneizada em vórtex durante 30 segundos, sendo de seguida os tubos colocados em banho - maria a 80°C durante 1 hora. Findo este período, estes foram deixados a arrefecer em gelo. De seguida, acrescentou-se 2 ml de n-heptano (Fluka, ≥99.5%) e 1 ml de água de HPLC (Fisher Scientific, HPLC gradient grade). Agitou-se no vórtex durante 1 minuto. As amostras foram então centrifugadas a 2875 rpm durante 10 minutos a 4 °C, para separação das fases aquosa e orgânica. A fase superior foi removida com uma micropipeta para uma coluna de sulfato de sódio anidro e filtrada para *vials* com *micro-insert* (Thermo Unicam), previamente pesados.

O conteúdo lipídico existente nas amostras foi analisado em cromatógrafo gasoso Finnigan Trace GC Ultra com Autosampler AS 3000 da marca *Thermo Electron Corporation*. A coluna cromatográfica Trace TR-FAME acoplada ao cromatógrafo possui as seguintes dimensões: 30m de comprimento, 0.25mm de diâmetro interno e 0.25µm de espessura do filme da marca *Thermo Electron Corporation* (Anexo IV). Todos os ensaios foram realizados em triplicados.

### 3.8 Análise estatística

Os dados obtidos referentes ao Índice Gonadossomático (GI) e ao peso (eviscerado) de ambas as espécies em estudo foram analisados através de uma análise de variância de 2 fatores (ANOVA) (Zar, 2009). Esta análise teve como objetivo averiguar se haveriam diferenças estatisticamente significativas no GI, quando comparados ambos os sexos, assim como as estações do ano (uma vez que o número de réplicas de macho e fêmea por meses do ano, em alguns meses foi menor que 5 indivíduos, optou-se por efetuar a análise agrupando os dados em estações do ano, evitando-se assim limitações ao estudo). O mesmo procedimento foi tido em conta relativamente ao peso (eviscerado) dos espécimes. Todos os pressupostos inerentes à ANOVA - 2 fatores foram devidamente validados e sempre que adequado



## Materiais e Métodos

---

realizou-se o teste de comparações múltiplas de *Bonferroni* (Zar, 2009).

Os dados obtidos relativos à capacidade antimicrobiana e antitumoral foram analisados mediante uma ANOVA - 1 fator, seguida pelo teste de *Dunnnett* (Zar, 2009) (por forma a comparar os dados experimentais com os do grupo controlo).

De igual modo se procedeu para os dados obtidos para a percentagem de gordura total nas 3 espécies em estudo tendo igualmente sido garantido todos os pressupostos inerentes à referida análise.

Por último, relativamente aos dados obtidos para o perfil em ácidos gordos para as 3 espécies em estudo, pretendeu-se perceber se existiram diferenças estatisticamente significativas entre os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, e por conseguinte foi realizada uma ANOVA - 2 fatores. De salientar que, muito embora para esta análise o requisito relativo homogeneidade de variâncias não tenha sido garantido, o desempenho do método não é profundamente afetado por desvios moderados aos seus pressupostos. Tal justifica-se pelo fato da amostra em análise apresentar um planeamento equilibrado, pelo que não haverá comprometimento dos resultados (Underwood, 1997). Uma vez mais, e sempre que adequado, o teste de comparações múltiplas de Bonferroni foi realizado (Zar, 2009).

Foi realizado o teste do Qui - quadrado ( $X^2$ ) relativamente à razão macho/fêmea total obtido para ambas as espécies durante as amostragens, no sentido de avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas em relação à unidade.

Em todas as análises efetuadas, os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ). Todos os resultados foram obtidos mediante a utilização do *software* IBM SPSS Statistics 20.





## **Resultados**



## Resultados

### 4.1 Amostragem biológica e Índice Gonadossomático das duas espécies em estudo

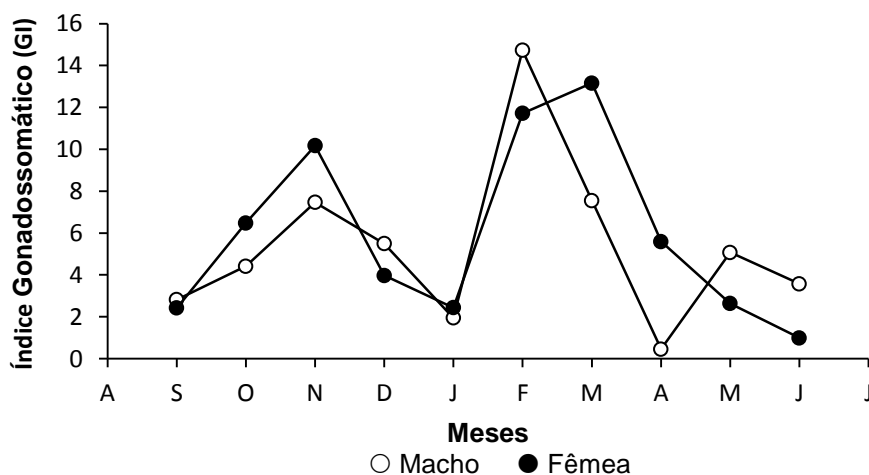
Das 137 holotúrias amostradas da espécie *Holothuria forskali*, 56 indivíduos eram fêmeas, 35 eram machos e 46 não continham gónada pelo que foi impossível definir o sexo. A razão macho/fêmea foi de aproximadamente 1 macho para 2 fêmeas (razão=0.625), sendo este valor estatisticamente significativo em relação à unidade ( $X^2_{(1)} = 4.85$ ,  $p < 0.05$ ).

Relativamente à espécie *Holothuria mammata*, do total de 73 indivíduos amostrados, 22 eram machos, 29 eram fêmeas e 22 não continham gónada. A razão macho/fêmea foi de 3 machos para 4 fêmeas (razão=0.758) e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à unidade ( $X^2_{(1)} = 0.961$ ,  $p > 0.05$ ).

O padrão de maturação da gónada ao longo dos meses para a espécie *Holothuria forskali* apresentou 2 valores máximos (picos) de maturação. O primeiro correspondeu ao mês de novembro e o segundo ao mês de fevereiro, sendo ainda possível observar um terceiro valor, apenas para as fêmeas no mês de março.

Como é possível observar na figura 3, os indivíduos de *Holothuria forskali* apresentaram sincronismos no período de maturação da gónada, correspondendo a percentagens de GI de 10.17% (novembro), 11.72% (fevereiro) e 13.16% (março) para fêmeas e 7.46% (novembro) e 14.73% (fevereiro) para machos.

Pelos resultados alcançados, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas no GI, quando comparados os géneros, estações do ano e os géneros em simultâneo com as estações do ano (ANOVA,  $F_{\text{géneros}(1,85)} = 0.038$ ,  $F_{\text{estações do ano}(2,85)} = 1.001$ ;  $F_{\text{géneros*estações do ano}(2,85)} = 1.877$ ,  $p > 0.05$ ).

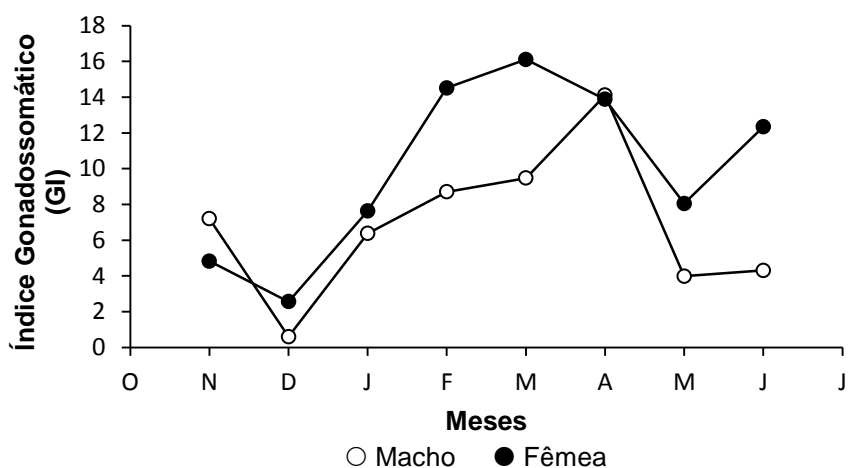


**Figura 3.** Variação mensal do Índice Gonadossomático (GI) da espécie *Holothuria forskali*, com os correspondentes valores máximos de maturação. Os valores apresentados encontram-se em % média de GI por mês para cada género  $\pm$  desvio padrão (SD) correspondendo às barras verticais (não sendo possível visualizar uma vez que o seu valor é muito pequeno) ( $n=91$ ).

## Resultados

Relativamente à segunda espécie em estudo, *Holothuria mammata*, o padrão de maturação da gónada ao longo dos meses apresentou 1 único valor máximo de maturação (pico) (figura 4). Este valor foi evidente no mês de abril, quando foram observados Índices Gonadossomáticos elevados de 13.87% e 14.11% para fêmeas e machos, respetivamente. É possível verificar a existência de um padrão de sincronismo na maturação sexual, onde em fevereiro, março e junho as fêmeas exibiram um GI elevado, demonstrando a maturação sexual, no entanto o mesmo foi verificado para os machos mas com menor percentagem de GI.

Pela análise realizada conclui-se que não existem diferenças estatisticamente significativas para o GI, quando comparados ambos os géneros, assim como as estações do ano e a combinação entre estações do ano e géneros (ANOVA,  $F_{\text{géneros}(1,45)} = 0.009$ ,  $F_{\text{estações do ano}(2,45)} = 2.238$ ;  $F_{\text{géneros*estações do ano}(2,45)} = 0.363$ ,  $p > 0.05$ ).



**Figura 4.** Variação mensal do Índice Gonadossomático (GI) para a espécie *Holothuria mammata*, com o correspondente valor máximo de maturação. Os valores apresentados encontram-se em % média de GI por mês para cada género  $\pm$  desvio padrão (SD) correspondendo às barras verticais (não sendo possível visualizar uma vez que o seu valor é muito pequeno) (n=51).

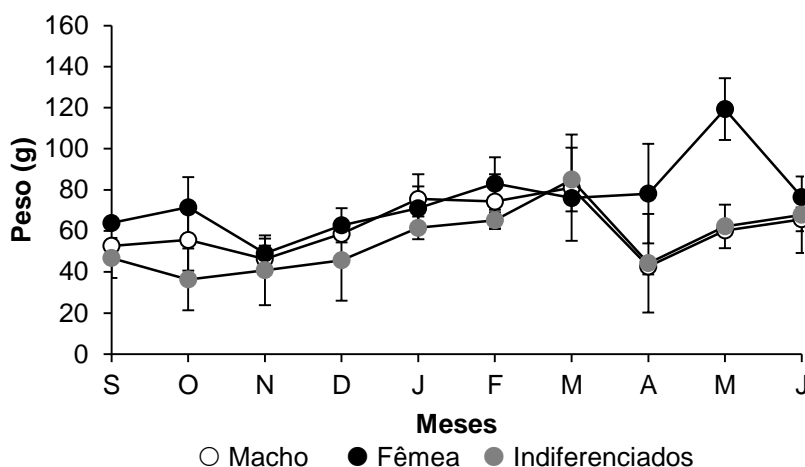
Na figura 5 é possível observar a variação de peso (eviscerado) mensal dos indivíduos da espécie *Holothuria forskali*, assim como o peso dos espécimes que não continham gónada, pelo que foram considerados indiferenciados.

Como é possível visualizar não se verificaram grandes discrepâncias de peso entre machos e fêmeas, à exceção do mês de maio onde se observou um valor máximo de peso para as fêmeas. Relativamente ao peso dos indivíduos indiferenciados, é possível verificar que o seu peso mensal é ligeiramente inferior ao verificado para fêmeas e machos, à exceção do mês de março.

Contudo, pela análise realizada obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas quando comparados os géneros e as estações do ano, relativamente ao peso (eviscerado) dos indivíduos (ANOVA,  $F_{\text{géneros}(1,84)} = 6.518$ ,  $F_{\text{estações do ano}(2,84)} =$

## Resultados

13.046,  $p < 0.05$ ). No entanto, a combinação entre o género dos indivíduos e as estações do ano, não detetou diferenças estatisticamente significativas (ANOVA,  $F_{\text{géneros*estações do ano}(2,84)} = 2.426$ ,  $p > 0.05$ ).



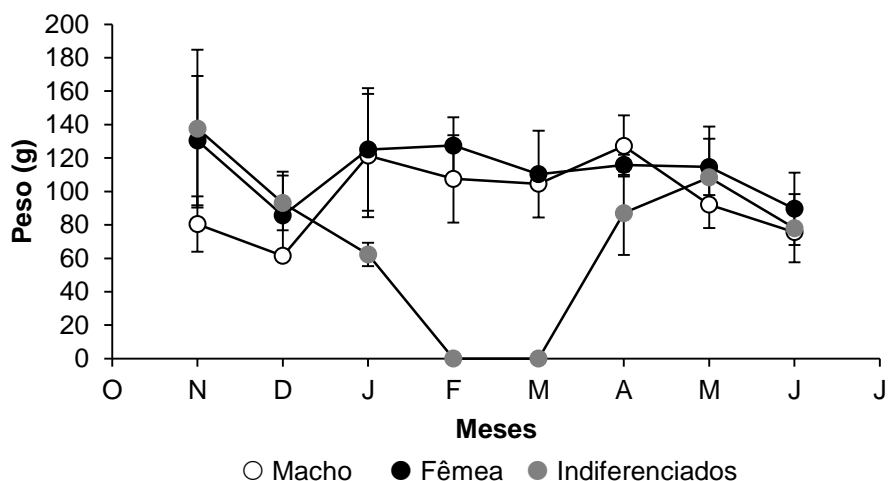
**Figura 5.** Variação mensal do peso (gramas) para machos e fêmeas e para os indivíduos indiferenciados de *Holothuria forskali*. Os valores apresentados encontram-se em média de peso por mês  $\pm$  desvio padrão (SD) correspondendo às barras verticais ( $n=137$ ).

Na figura 6 observa-se a variação de peso (eviscerado) mensal de machos e fêmeas da espécie *Holothuria mammata*, assim como o peso dos espécimes que não continham gónada (indiferenciados).

Não foram verificadas grandes discrepâncias de peso entre os valores encontrados para machos e fêmeas, à exceção dos meses de novembro e dezembro onde o peso dos machos foi menor que o peso das fêmeas. Relativamente ao peso dos indivíduos indiferenciados, é possível verificar que o seu peso mensal apresenta grandes oscilações, comparativamente ao peso dos machos e fêmeas. Foi detetado ainda que no mês de fevereiro e março não foram encontrados indivíduos sem gónada.

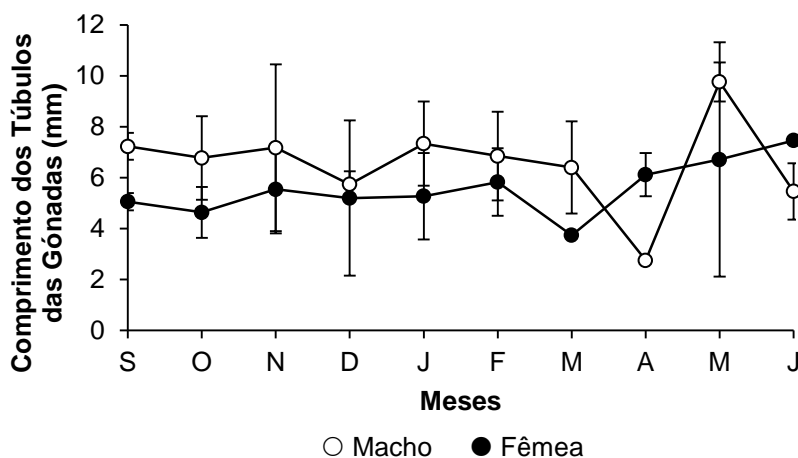
A análise efetuada permitiu observar a existência de diferenças estatisticamente significativas no género relativamente ao peso (eviscerado) dos indivíduos (ANOVA,  $F_{\text{género}(1,45)} = 5.325$ ,  $p < 0.05$ ). No entanto, para as estações do ano, assim como para a combinação de estações do ano com o género dos indivíduos, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas (ANOVA,  $F_{\text{estações do ano}(2,45)} = 0.138$ ;  $F_{\text{género*estações do ano}(2,45)} = 2.655$ ,  $p > 0.05$ ).

## Resultados



**Figura 6.** Variação mensal do peso (gramas) para machos e fêmeas e para os indivíduos indiferenciados de *Holothuria mammata*. Os valores apresentados encontram-se em média de peso por mês  $\pm$  desvio padrão (SD) correspondendo às barras verticais (n=73).

A variação mensal do comprimento dos túbulos das gónadas da espécie *Holothuria forskali* também foi avaliada como está presente na figura 7. Analisando esta figura, verificou-se que o comprimento dos túbulos do macho foi superior relativamente ao comprimento dos túbulos das fêmeas, à exceção do mês de abril e junho, em que se observou o contrário. De referir ainda que o mês de maio apresentou um valor máximo no comprimento dos túbulos para os machos, sendo a variação mensal do comprimento dos túbulos das fêmeas relativamente semelhante.

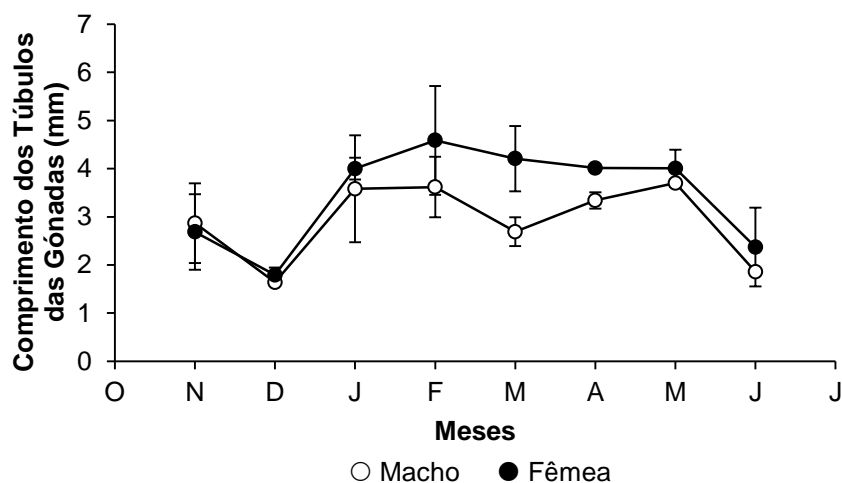


**Figura 7.** Variação mensal do comprimento (milímetro) dos túbulos das gónadas para machos e fêmeas da espécie *Holothuria forskali*. Os valores apresentados encontram-se em média de comprimento dos túbulos por mês  $\pm$  desvio padrão (SD) correspondendo às barras verticais (n=91).

No que diz respeito à espécie *Holothuria mammata*, a variação mensal do comprimento dos túbulos das gónadas para machos e fêmeas também foi analisada como é possível visualizar na figura 8. Nesta figura, verifica-se que o comprimento dos túbulos das fêmeas foi superior relativamente ao comprimento dos

## Resultados

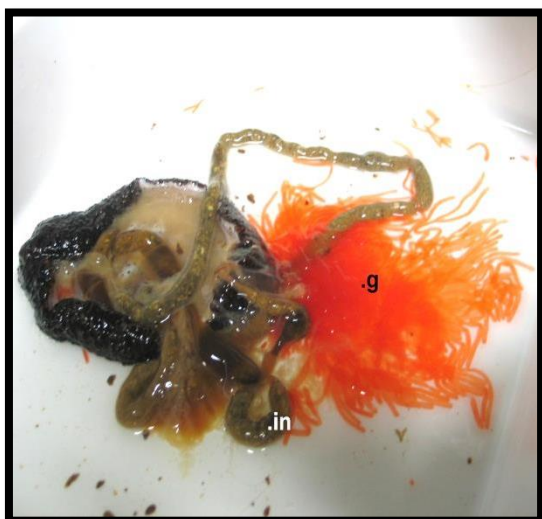
túbulos dos machos, à exceção dos meses de novembro e dezembro, em que os comprimentos foram praticamente iguais.



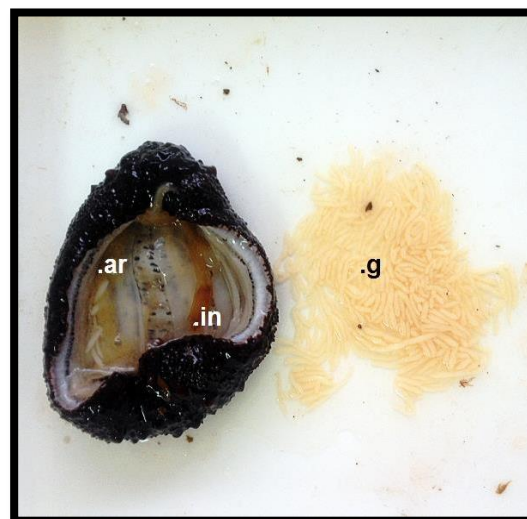
**Figura 8.** Variação mensal do comprimento (milímetro) dos túbulos das gónadas para machos e fêmeas da espécie *Holothuria mammata*. Os valores apresentados encontram-se em média de comprimento dos túbulos por mês  $\pm$  desvio padrão (SD) correspondendo às barras verticais (n=51).

### 4.2 Morfometria dos Túbulos das Gónadas e Análises Histológicas

As gónadas de *Holothuria forskali* e *Holothuria mammata* apresentam a conformação de um único tufo com numerosos túbulos ramificados, do lado direito do mesentério dorsal, como é possível visualizar na figura 9 e 10.



**Figura 9.** Morfologia dos túbulos das gónadas de *Holothuria forskali* dissecada (fêmea), com a presença de gónada (g) e intestino (in).



**Figura 10.** Morfologia dos túbulos das gónadas de *Holothuria mammata* dissecada (macho), com a presença das árvores respiratórias (ar), intestino (in) e gónada (g).

## Resultados

---

Em geral, os túbulos desenvolveram-se uniformemente, para ambas as espécies, segundo os 5 estágios de maturação designados. Apenas para o estágio I (indeterminado) não foram identificados indivíduos.

De referir, visualizando as duas espécies em conjunto, que o peso da gónada de *Holothuria mammata* é superior ao peso da gónada de *Holothuria forskali*. Em relação ao comprimento dos túbulos, a espécie *Holothuria mammata* apresentou um comprimento dos túbulos ligeiramente superior ao observado para a espécie *Holothuria forskali* e relativamente à cor observada nas gónadas de ambas as espécies a diferença centra-se nos machos, cor de salmão para *Holothuria forskali* e branco creme para *Holothuria mammata*. Observando o tamanho dos oócitos (medido através do seu diâmetro), verifica-se que não existem diferenças substanciais entre as duas espécies em estudo consoante os 5 estágios de maturação presentes.



**Tabela III.** Cinco estágios de maturação da gónada, no ciclo reprodutivo de *Holothuria forskali*, baseado na morfologia dos túbulos da gónada

Estado de maturação, sexo	Peso da gónada (g)	Túbulos			Condição	Cor
		Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Ramificações		
<u>I - Indeterminado</u>		Não foram encontrados indivíduos neste estágio				
<u>II – Crescimento</u>						
Fêmea	1.3 – 6.5	42.3 – 50.9	1 – 2.1	Sim	Oócitos em desenvolvimento (61.2 – 80.6 µm) Espermatócitos em desenvolvimento	Laranja claro
Macho	1.1 – 5.9	51 – 73.3	0.7 – 1.6			Branco transparente
<u>III – Maduro</u>						
Fêmea	4.2 – 16.3	62 – 105.7	2 – 3.96	Sim	Oócitos visíveis através dos túbulos (112 – 129.4 µm) Túbulos preenchidos com espermatozoa (espermatócitos maduros) e aspeto opaco	Laranja vivo
Macho	5.3 – 13.8	82.6 – 110.8	1.6 – 2.26			Salmão
<u>IV – Parcialmente desovado</u>						
Fêmea	3.12 – 5.74	41.8 – 95.8	2.1 – 2.86	Sim	Túbulos reduzem de tamanho. Regiões vazias do lúmen visíveis. Possível observar alguns oócitos maduros Túbulos reduzem de tamanho. Possível ver alguns espermatozoa	Laranja vivo
Macho	2.19 – 3.92	28.2 – 81.8	2 – 2.5			Salmão claro
<u>V – Desovado</u>						
Fêmea	0.76 – 2.09	14 – 34.6	0.18 – 1	Sim	Túbulos de reduzido tamanho. Oócitos vestigiais presentes Túbulos de reduzido tamanho. Espermatozoa vestigial presente	Laranja claro e transparente
Macho	0.12 – 1.48	22.7 – 71.6	0.16 – 0.24			Rosa claro

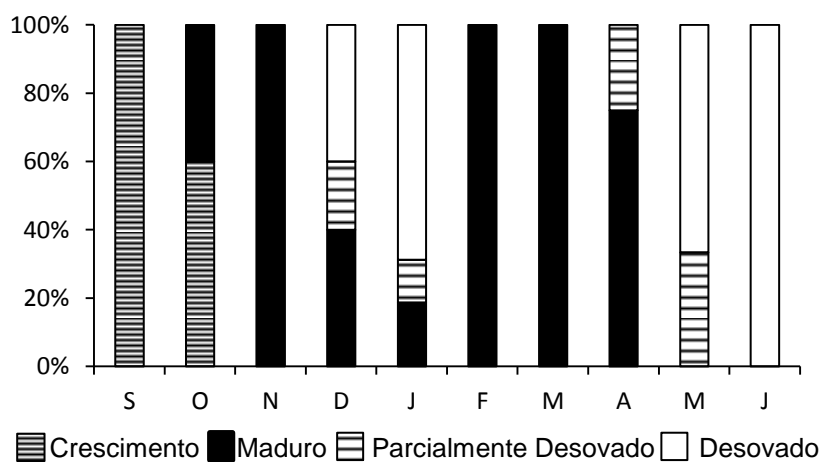
**Tabela IV.** Cinco estágios de maturação da gónada, no ciclo reprodutivo de *Holothuria mammata*, baseado na morfologia dos túbulos da gónada.

Estado de maturação, sexo	Peso da gónada (g)	Túbulos			Condição	Cor
		Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Ramificações		
<u>I - Indeterminado</u>		Não foram encontrados indivíduos neste estágio				
<u>II – Crescimento</u>						
Fêmea	98.4 – 117.5	29.8 – 43.6	1.86 – 2.04	Sim	Oócitos em desenvolvimento (32.3 – 50.6 µm)	Laranja claro
Macho	75.7 – 116.2	34 – 40.4	0.3 – 1.68		Espermatócitos em desenvolvimento	Transparente
<u>III – Maduro</u>						
Fêmea	105.9 – 188.5	36.4 – 50.6	2.08 – 2.22	Sim	Oócitos visíveis através dos túbulos (108 – 122 µm)	Laranja vivo
Macho	86 – 145.3	35.2 – 41.7	2.34 – 3.46		Túbulos preenchidos com espermatozoa e aspeto opaco	Branco creme
<u>IV – Parcialmente desovado</u>						
Fêmea	75.4 – 137.7	38.6 – 43.9	1.76 – 2.04	Sim	Túbulos reduzem de tamanho. Regiões vazias do lúmen visíveis. Possível observar alguns oócitos maduros	Laranja vivo
Macho	79.7 – 135.2	29 – 41.6	2.04 – 2.32		Túbulos reduzem de tamanho. Possível ver alguns espermatozoa	Branco
<u>V – Desovado</u>						
Fêmea	65.2 – 115.1	16.2 – 18.6	2.3 – 2.45	Sim	Túbulos de reduzido tamanho. Oócitos vestigiais presentes	Laranja claro e transparente
Macho	36.5 – 61.5	16.4 – 22.3	2.39 – 3.25		Túbulos de reduzido tamanho. Espermatozoa vestigial presente	Transparente

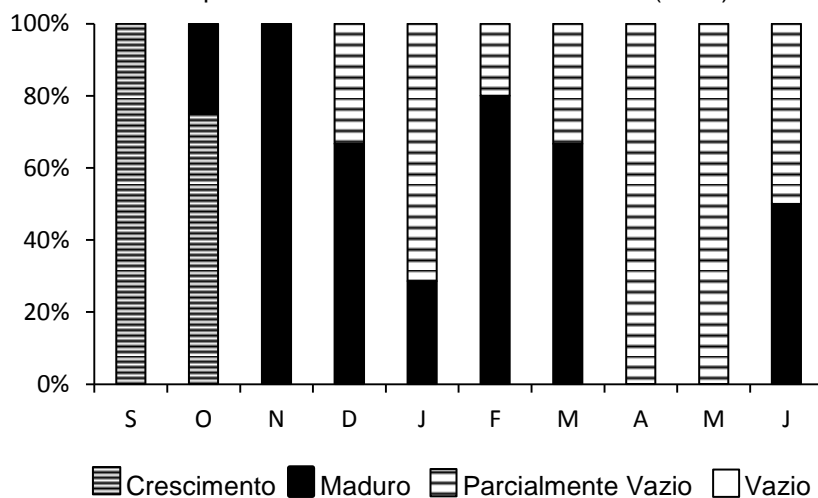
## Resultados

Analisou-se a maturação dos túbulos da gónada de *Holothuria forskali* em cada mês como é possível visualizar nas figuras 11 e 12 para fêmeas e machos, respetivamente e para a espécie *Holothuria mammata*, figuras 13 e 14 (fêmeas e machos respetivamente).

Observa-se mais do que um estágio de maturação da gónada em alguns meses. No entanto, para as fêmeas (figura 11) no mês de setembro apenas se observou espécimes com a gónada em crescimento (estágio II). Em novembro, fevereiro e março, as fêmeas colectadas apresentavam uma gónada madura (estágio III) e por fim, no mês de junho, só foram obtidas fêmeas com os túbulos desovados (estágio V). Relativamente aos machos (figura 12), uma vez mais no mês de setembro apenas se obteve espécimes com a gónada em crescimento (estágio II). Em novembro todos os indivíduos amostrados apresentavam uma gónada madura (estágio III) e nos meses de abril e maio só foram encontrados túbulos das gónadas parcialmente vazios (estágio IV).



**Figura 11.** Percentagem de estágios de maturação dos túbulos da gónada, consoante os diferentes meses em estudo para as fêmeas de *Holothuria forskali* (n=56).

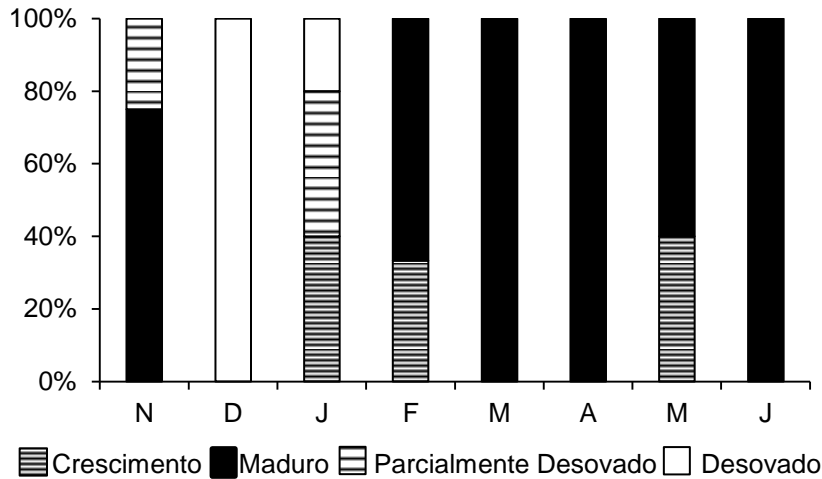


**Figura 12.** Percentagem de estágios de maturação dos túbulos da gónada, consoante os diferentes meses em estudo para os machos de *Holothuria forskali* (n=35).

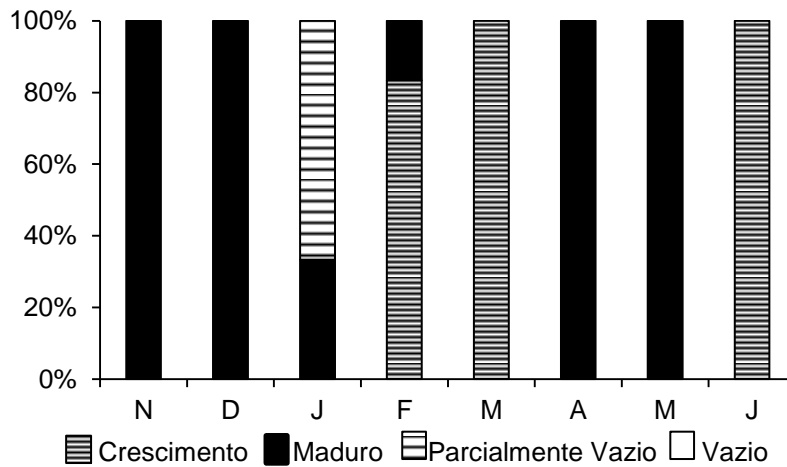
## Resultados

Assim, é possível referir que, para as fêmeas, obteve-se um total de 14.28% de indivíduos no estágio de crescimento (II), 48.22% no estágio III, 8.93% no estágio IV e 28.57% no estágio V. Relativamente aos machos, obteve-se um total de 14.28% de indivíduos no estágio de crescimento II, 51.43% no estágio III, 37.14% no estágio IV e 0% no estágio V.

Relativamente à espécie *Holothuria mammata*, uma vez mais foi observado mais do que um estágio de maturação da gónada em alguns meses. Para as fêmeas (figura 13) no mês de dezembro apenas se observou espécimes com a gónada desovada (estágio V) e em março, abril e junho, as fêmeas colectadas apresentavam uma gónada madura (estágio III). Relativamente aos machos (figura 14), no mês de novembro, dezembro, abril e maio apenas se obtiveram espécimes com a gónada madura (estágio III) e nos meses de março e junho todos os indivíduos amostrados apresentavam uma gónada em crescimento (estágio II).



**Figura 13.** Percentagem de estágios de maturação dos túbulos da gónada, consoante os diferentes meses em estudo para as fêmeas de *Holothuria mammata* (n=29).

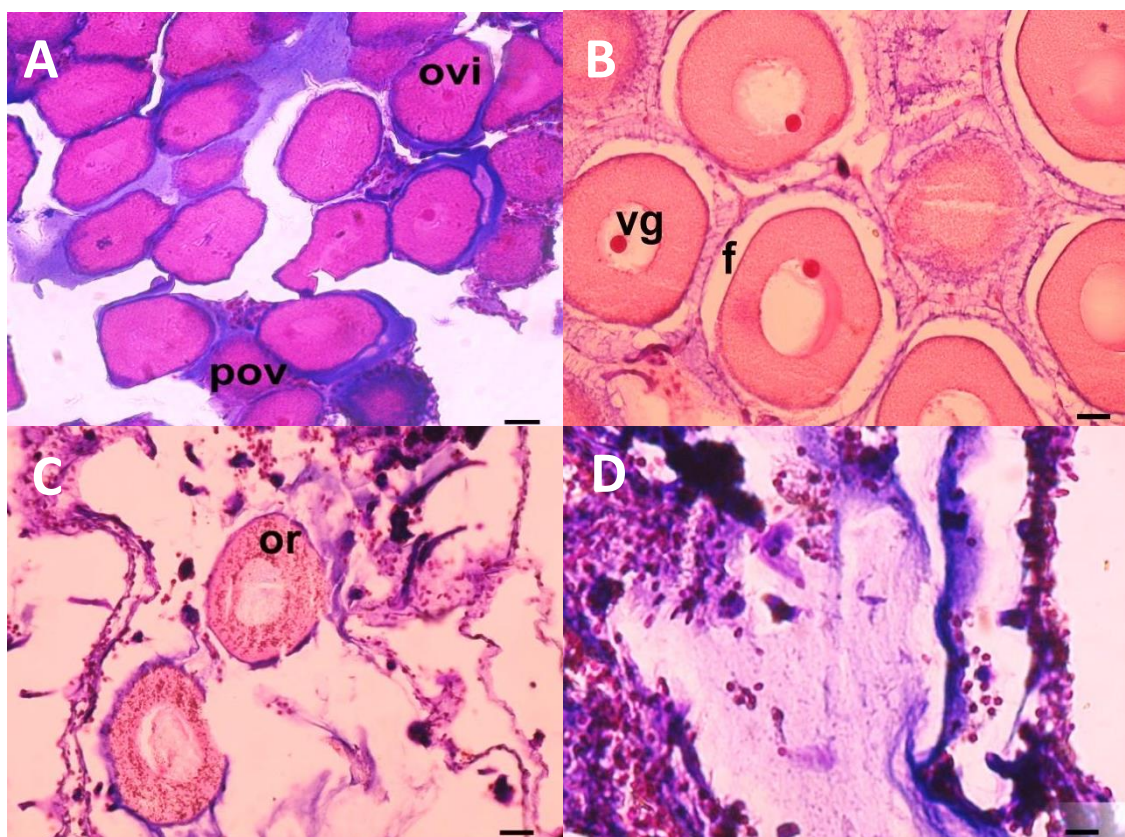


**Figura 14.** Percentagem de estágios de maturação dos túbulos da gónada, consoante os diferentes meses em estudo para os machos de *Holothuria mammata* (n=22).

## Resultados

Assim, é possível referir que, para as fêmeas, obteve-se um total de 17.24% de indivíduos no estágio de crescimento (II), 58.62% no estágio III, 10.35% no estágio IV e 13.79% no estágio V. Relativamente aos machos, obteve-se um total de 36.36% de indivíduos no estágio de crescimento, 54.55% no estágio III, 9.09% no estágio IV e 0% no estágio V.

Relativamente às análises histológicas efetuadas, na figura 15, é possível observar diferentes etapas da oogénese, ou seja, o desenvolvimento dos oócitos das fêmeas de *Holothuria forskali*. Nesta figura observa-se os 4 estados de oógenese: crescimento (A), maduro (B), parcialmente desovado (C) e desovado (D). Não foi observado o primeiro estado (recuperação).



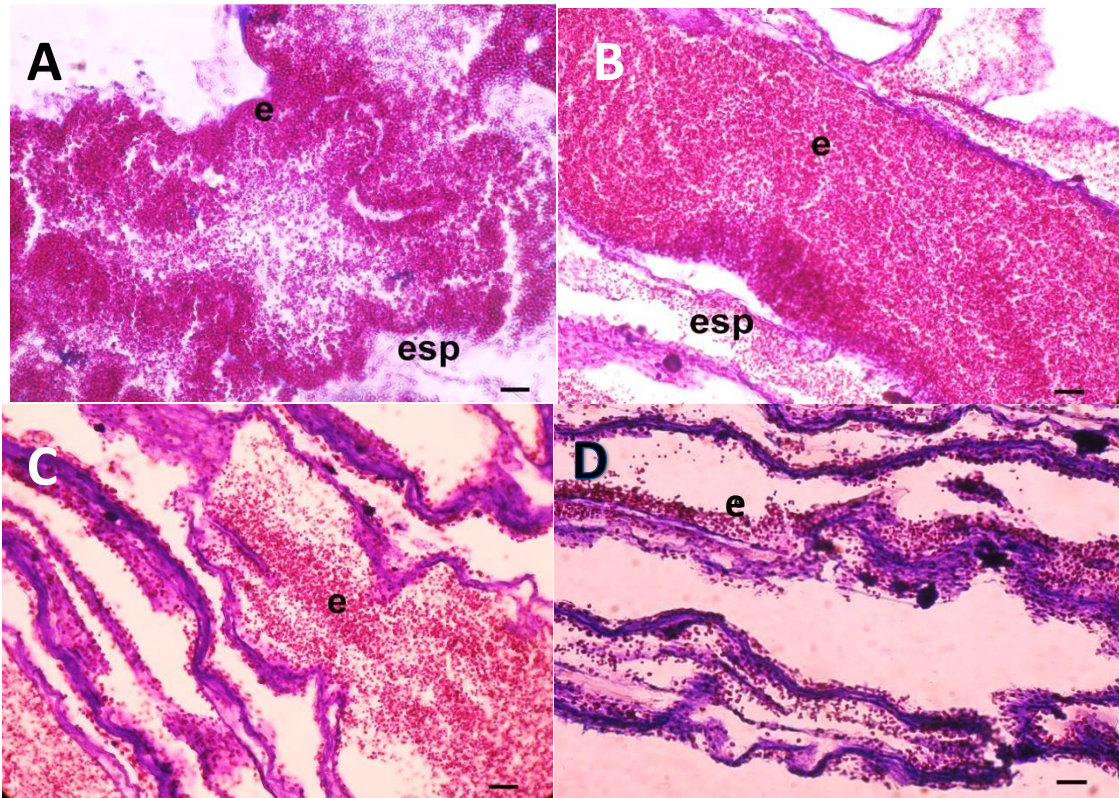
**Figura 15.** Observação dos 4 estados de oogénese nas fêmeas de *Holothuria forskali*. **A** – Ovário com oócitos em crescimento e presença de primeiros oócitos vitelogénicos (pov) e oócitos vitelogénicos intermédios (ovi). **B** – Ovário com oócitos maduros, com presença de folículos (f) e vesícula germinal (vg). **C** - Ovário parcialmente desovado, presença de oócitos residuais (or). **D** - Ovário desovado, sem presença de oócitos. **A:** 27.1  $\mu\text{m}$ , **B:** 113  $\mu\text{m}$ ; **C:** 76.4  $\mu\text{m}$ , **D:** 24.8  $\mu\text{m}$ .

Na figura 16, podem observar-se diferentes etapas da espermatogénese, ou seja, o desenvolvimento dos espermatócitos dos machos de *Holothuria forskali*. Nesta figura é possível observar os 4 estados de espermatogénese: crescimento (A),



## Resultados

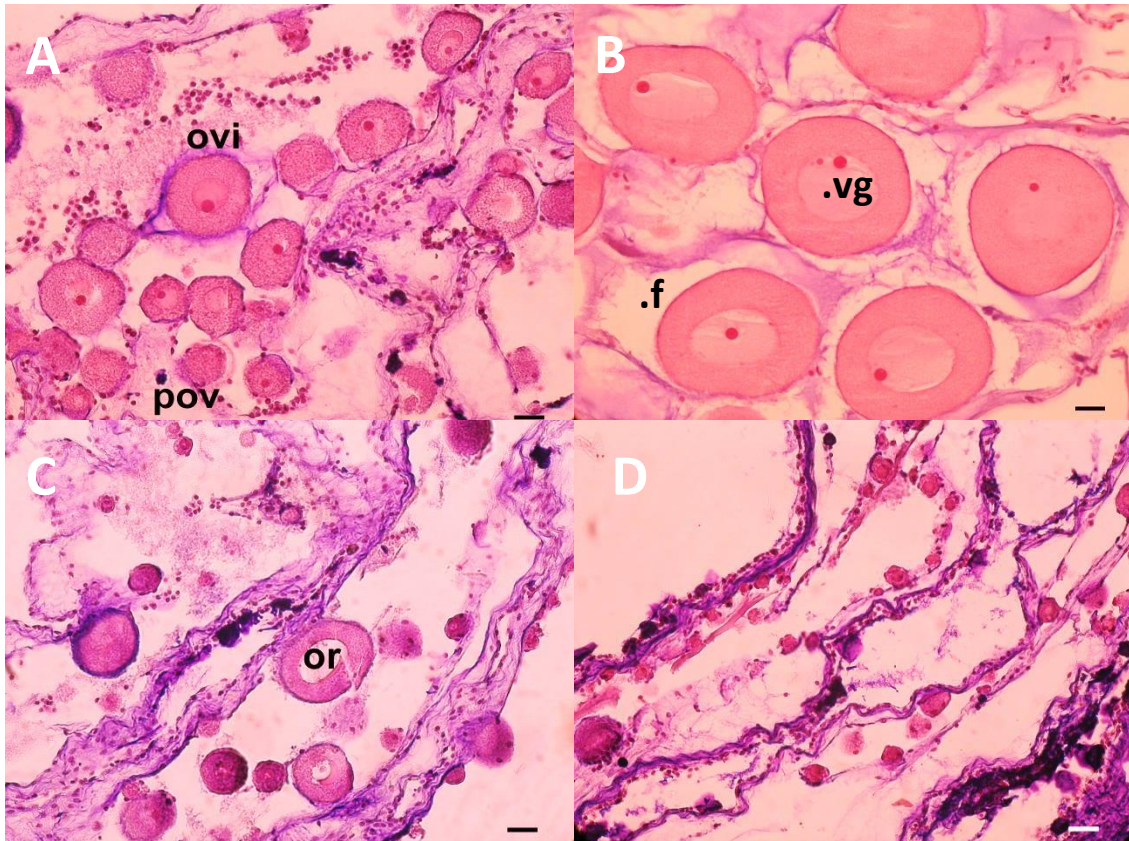
maduro (B), parcialmente vazio (C) e vazio (D). Não foi observado o primeiro estado (recuperação).



**Figura 16.** Observação dos 4 estados de espermatogênese nos machos de *Holothuria forskali*. **A** – Espermatócitos (esp) em crescimento tardio (acumulação de espermatozoa (e) nos túbulos. **B** - Presença de espermatozoa (espermatócitos (esp) evidentes). **C** - Testículos parcialmente vazios e presença de espermatozoa (e). **D** - Testículos vazios (podem conter espermatozoa não libertado (e) Escala – **A**: 30.1  $\mu\text{m}$ ; **B**: 97.7  $\mu\text{m}$ ; **C**: 46.2  $\mu\text{m}$ ; **D**: 20.3  $\mu\text{m}$ .

Na figura 17, observa-se diferentes etapas da oogênese, ou seja, o desenvolvimento dos oócitos das fêmeas de *Holothuria mammata*. Nesta figura observa-se os 4 estados de oógenese: crescimento (A), maduro (B), parcialmente desovado (C) e desovado (D). Não foi observado o primeiro estado (recuperação).

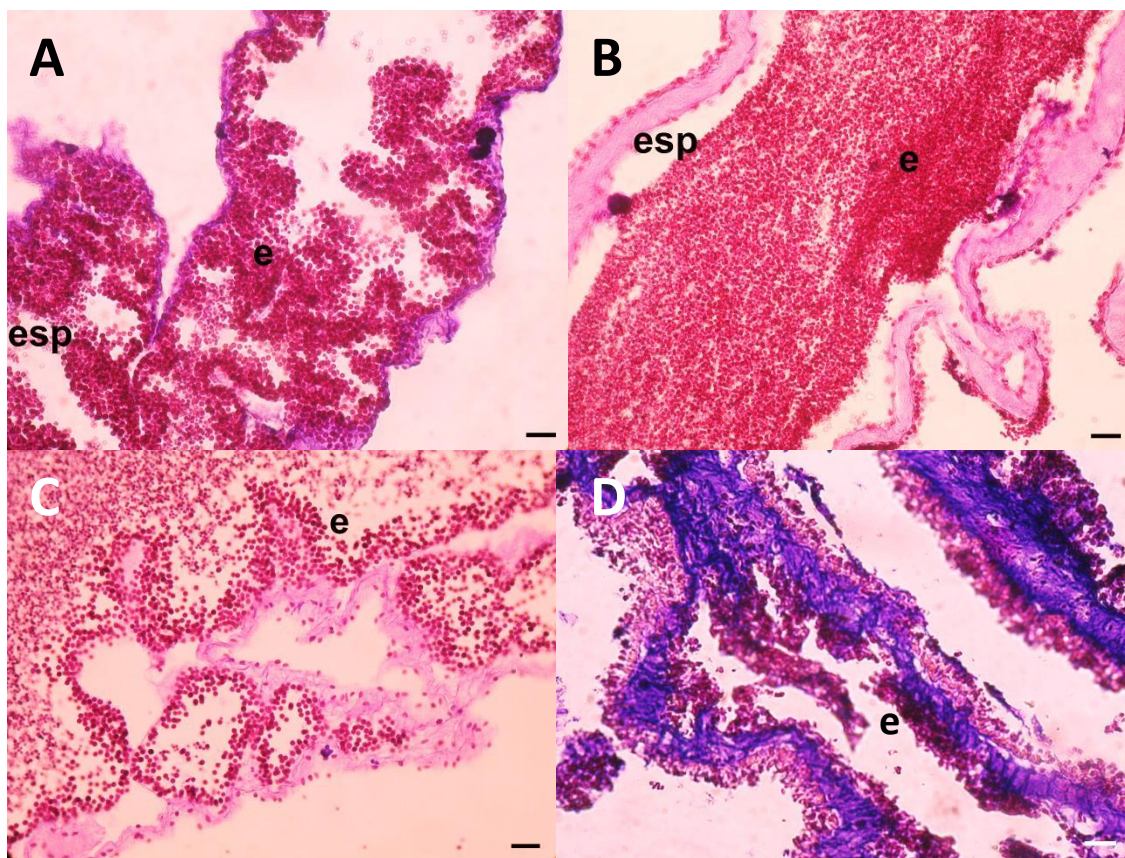
## Resultados



**Figura 17.** Observação dos 4 estados de oogénese nas fêmeas de *Holothuria mammata*. **A** – Ovário com oócitos em crescimento e presença de primeiros oócitos vitelogénicos (pov) e oócitos vitelogénicos intermédios (ovi). **B** – Ovário com oócitos maduros, com presença de folículos (f) e vesícula germinal (vg). **C** - Ovário parcialmente desovado, presença de oócitos residuais (or). **D** - Ovário desovado, sem presença de oócitos. **A:** 35.1  $\mu\text{m}$ , **B:** 125.6  $\mu\text{m}$ , **C:** 86.3  $\mu\text{m}$ , **D:** 43.7  $\mu\text{m}$ .

Na figura 18, visualiza-se o estado de espermatogénese, ou seja, o desenvolvimento dos espermátocitos dos machos de *Holothuria mammata*. Nesta figura é possível observar os 4 estados de espermatogénese: crescimento (A), maduro (B), parcialmente vazio (C) e vazio (D). Não foi observado o primeiro estado (recuperação).





**Figura 18.** Observação dos 4 estados de espermatogênese nos machos de *Holothuria mammata*. **A** – Espermatócitos (esp) em crescimento tardio (acumulação de espermatozoa (e) nos túbulos. **B** - Presença de espermatozoa (espermatócitos (esp) evidentes). **C** - Testículos parcialmente vazios e presença de espermatozoa (e). **D** - Testículos vazios (podem conter espermatozoa não libertado (e). Escala – **A**: 18.6 µm; **B**: 55.4 µm; **C**: 32.1 µm; **D**: 23.8 µm.

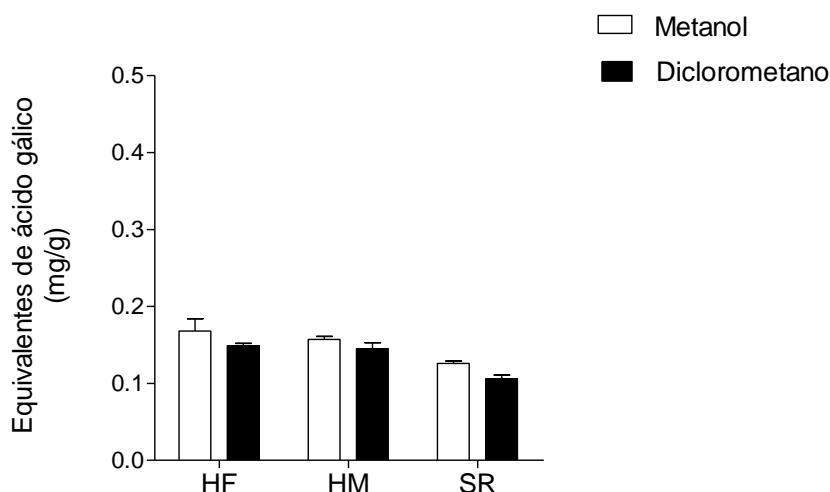
### 4.3 Avaliação da capacidade Antioxidante

#### 4.3.1 Quantificação Total de Polifenóis

A quantificação total de polifenóis das três espécies de holotúrias em estudo foi realizada através do método de *Folin – Ciocalteu*, tendo sido obtido os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ( $\text{mg EAG g}^{-1}$  de extrato) (figura 19).



## Resultados

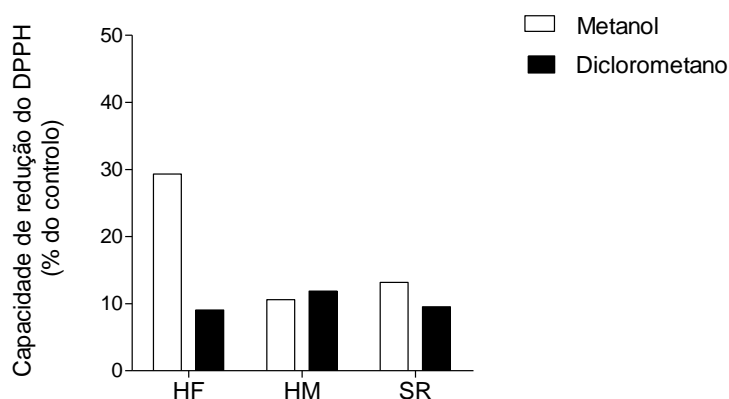


**Figura 19.** Quantidade Total de Polifenóis (QTP) em mg EAG g<sup>-1</sup> de extrato, nas diferentes frações de cada holotúria em estudo. Os valores correspondem à média ± Erro padrão da média (SEM) (n=3). HF – *Holothuria forskali*, HM – *Holothuria mammata*, SR – *Stichopus regalis*

Através da análise da figura 19 é possível observar que na fração metanólica a espécie *Holothuria forskali*, apresentou um conteúdo superior em polifenóis (0.168 ± 0.016 mg EAG g<sup>-1</sup> de extrato), seguida da espécie *Holothuria mammata* (0.157 ± 0.004 mg EAG g<sup>-1</sup> de extrato). Relativamente à fração diclorometano, uma vez mais a espécie *Holothuria forskali* foi a que apresentou um conteúdo superior em polifenóis (0.149 ± 0.003 mg EAG g<sup>-1</sup> de extrato), seguida também pela espécie *Holothuria mammata* (0.145 ± 0.008 mg EAG g<sup>-1</sup> de extrato).

### 4.3.2 Capacidade de redução do radical DPPH

A capacidade de redução do radical DPPH demonstrada pelos extratos das holotúrias em estudo encontra-se representada na figura 20.



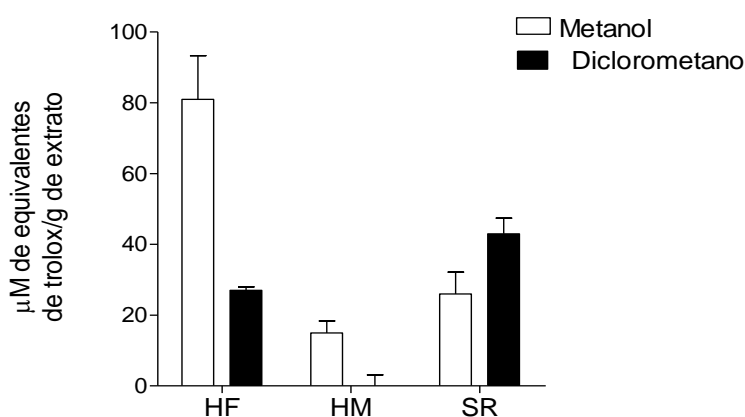
**Figura 20.** Capacidade de redução do radical DPPH de todas as espécies em estudo a 1 mg ml<sup>-1</sup>, consoante as frações orgânicas (metanólica ou diclorometano). Os valores correspondem à percentagem de redução relativamente ao controlo ± Erro padrão da média (SEM) (não sendo possível visualizar as barras verticais uma vez que o seu valor é muito pequeno) (n=3). HF – *Holothuria forskali*, HM – *Holothuria mammata*, SR – *Stichopus regalis*.

## Resultados

Através da análise da figura 20 é possível verificar que, na fração metanólica, a espécie *Holothuria forskali* foi a que claramente demonstrou uma maior percentagem de redução do radical DPPH ( $29.33\% \pm 0.005$ ), seguida da espécie *Stichopus regalis* ( $13.16\% \pm 0.002$ ). Relativamente à fração diclorometano, a espécie *Holothuria mammata* foi a que apresentou uma maior percentagem de redução ( $11.88\% \pm 0.001$ ), seguida da espécie *Stichopus regalis* ( $9.54\% \pm 0.004$ ).

### 4.3.3 Capacidade de captação do radical peróxido ( $ROO^\circ$ ) - Método ORAC.

A capacidade de captação do radical peróxido ( $ROO^\circ$ ) - Método ORAC, demonstrada pelos extratos das holotúrias em estudo encontra-se representada na figura 21.



**Figura 21.** Capacidade de captação do radical peróxido ( $ROO^\circ$ ) - Método ORAC em  $\mu\text{M}$  de equivalentes de trolox por grama de extrato, nas diferentes frações de cada holotúria em estudo. Os valores correspondem à média  $\pm$  Erro padrão da média (SEM) ( $n=3$ ). HF – *Holothuria forskali*, HM – *Holothuria mammata*, SR – *Stichopus regalis*

Na figura 21, é possível verificar que na fração metanólica, a espécie *Holothuria forskali* foi a que demonstrou um maior conteúdo de equivalentes de trolox ( $81.0 \pm 3.38 \mu\text{M g}^{-1}$  de extrato), seguida da espécie *Stichopus regalis* para a fração diclorometano ( $43.0 \pm 4.42 \mu\text{M g}^{-1}$  de extrato).

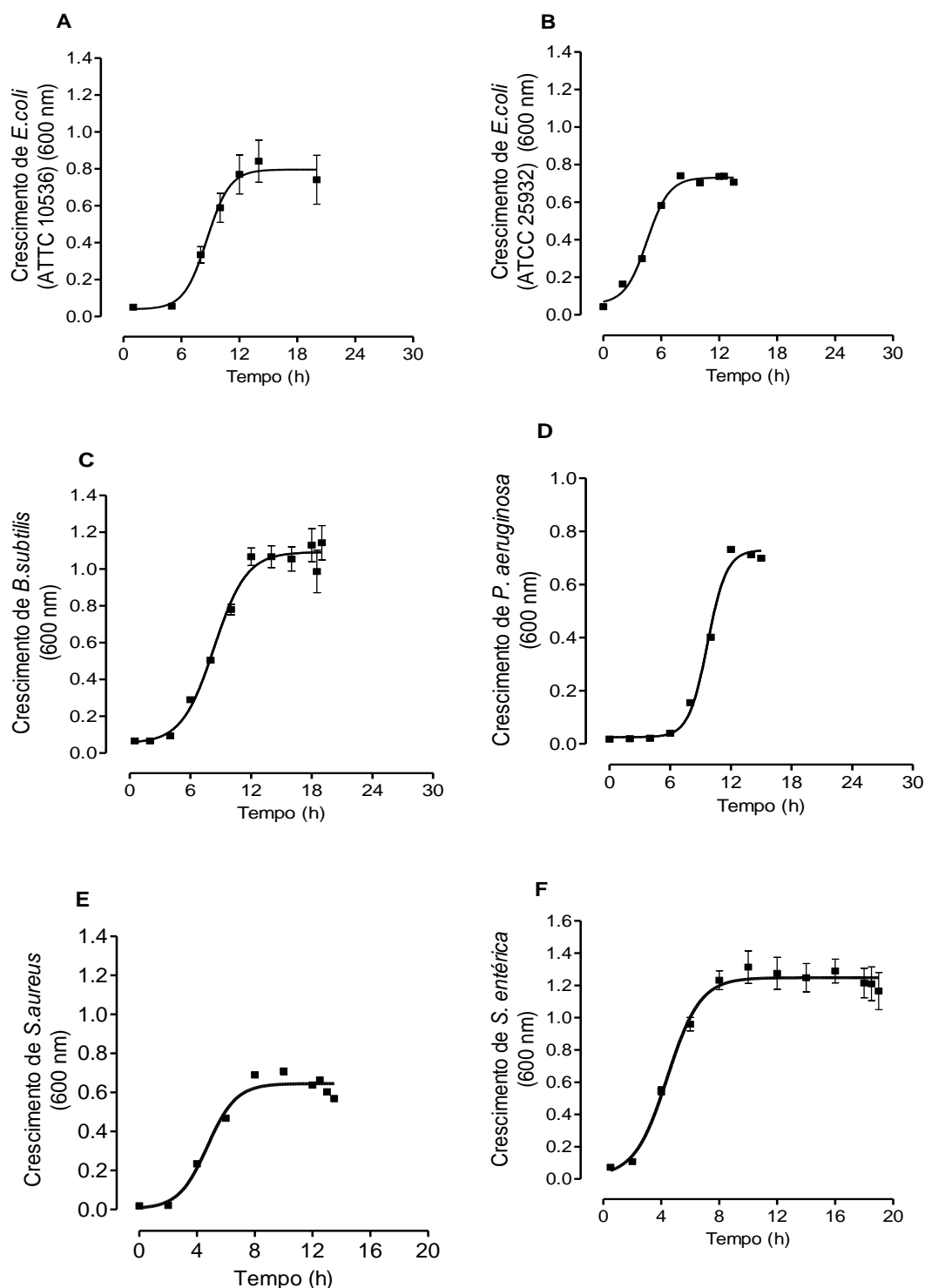
## 4.4 Avaliação da capacidade antimicrobiana

### 4.4.1 Capacidade antibacteriana

Para a avaliação da capacidade antibacteriana dos extratos de holotúrias, foram utilizadas várias bactérias gram positivas e gram negativas de referência, de forma a perceber para quais as holotúrias apresentavam um maior potencial de redução do crescimento. Assim, foram realizados testes à concentração máxima ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) para *E. coli* ATCC (25922), *E. coli* ATCC

## Resultados

(10536), *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* entérica. Foi escolhido um ponto na curva de crescimento para cada microrganismo correspondente à sua fase exponencial de crescimento (figura 22).

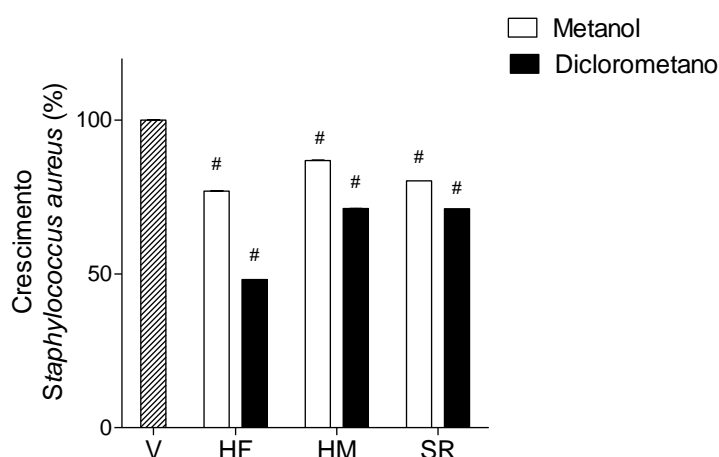


**Figura 22.** Curva de crescimento para os microrganismos em estudo. As linhas verticais indicam o Erro padrão da média (SEM). **A:** *E. coli* (ATCC 10536), **B:** *E. coli* (ATCC 25932), **C:** *B. subtilis*, **D:** *P. aeruginosa*, **E:** *S. aureus*, **F:** *S. entérica*.

## Resultados

Relativamente à capacidade de redução do crescimento dos microrganismos em estudo, pela presença dos extratos de holotúrias, apenas se observou resultados positivos para *S. aureus* para as três espécies de holotúrias e em ambas as frações orgânicas. Assim, a espécie *Holothuria forskali*, fração diclorometano, foi a espécie que proporcionou um maior decréscimo no crescimento deste microrganismo, em relação ao controlo ( $51.85\% \pm 0.01$ ). Para *Holothuria mammata* as percentagens de redução do crescimento de *S. aureus* relativamente ao controlo foram de  $13.11\% \pm 0.02$  (fração metanólica) e  $28.78\% \pm 0.02$  (fração diclorometano). A espécie *Stichopus regalis* induziu uma redução do crescimento de  $19.73\% \pm 0.02$  (fração metanólica) e  $28.84\% \pm 0.01$  (fração diclorometano).

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo, ao nível de significância de 5%, para as três espécies em ambas as frações orgânicas em estudo (ANOVA,  $F_{(6,41)}=48.39$ ,  $p<0.05$ ) (figura 23).

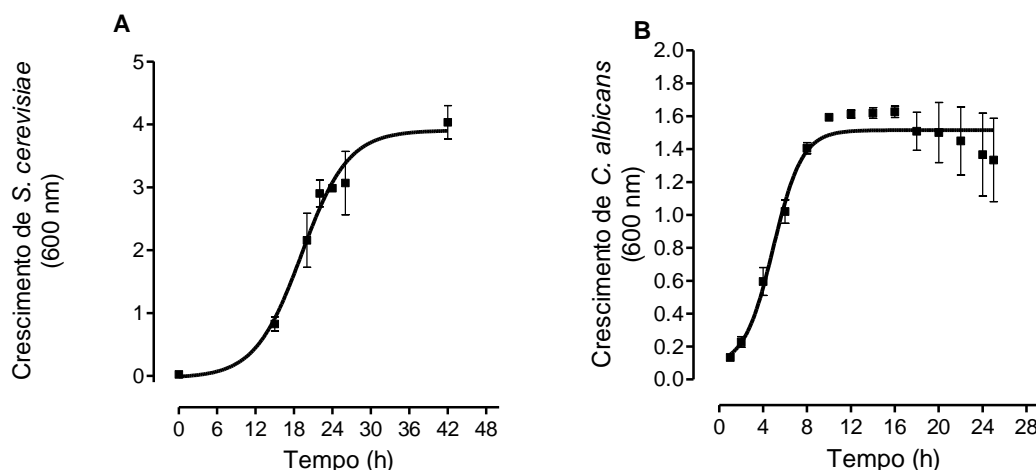


**Figura 23.** Efeito dos extratos de holotúrias de ambas as frações orgânicas ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) no crescimento de *S. aureus*. As linhas verticais indicam o Erro padrão da média (SEM) (não sendo possível visualizar as barras verticais uma vez que o seu valor é muito pequeno). # -  $p<0.05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. (n=8). V – Veículo, HF – *Holothuria forskali*, HM – *Holothuria mammata*, SR – *Stichopus regalis*

### 4.4.2 Capacidade Antifúngica

Para avaliar a capacidade antifúngica foram utilizadas a *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Inicialmente seguiu-se o crescimento da *S. cerevisiae* ao longo do tempo (0-42 horas) pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm. Relativamente a *C. albicans*, o crescimento foi seguido durante 15 horas. Foi escolhido um ponto na curva de crescimento correspondente à sua fase exponencial de crescimento (figura 24).

## Resultados



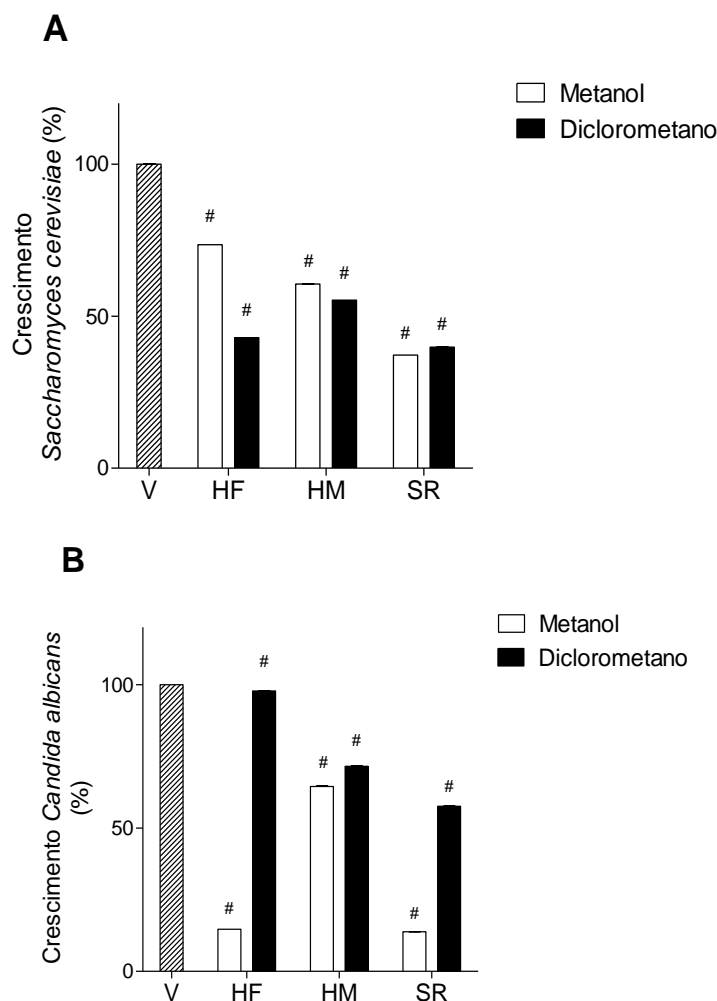
**Figura 24.** Curva de crescimento para *S. cerevisiae* (A) e *C. albicans* (B). As linhas verticais indicam o Erro padrão da média (SEM) (n=8).

Relativamente à capacidade de redução do crescimento do microrganismo, para *S. cerevisiae*, foi possível observar que todos os extratos de holotúrias, de todas as frações orgânicas apresentaram um potencial de redução do crescimento, sendo a espécie *Stichopus regalis*, fração metanólica, a espécie que apresentou um maior decréscimo no crescimento em relação ao controlo, de  $62.80\% \pm 0.02$ . No que diz respeito às restantes espécies, para *Holothuria mammata* as percentagens de redução do crescimento de *S. cerevisiae* relativamente ao controlo foram de  $39.44\% \pm 0.02$  (fração metanólica) e  $44.71\% \pm 0.01$  (fração diclorometano). Para a espécie *Holothuria forskali*, as percentagens de redução foram de  $26.51\% \pm 0.02$  (fração metanólica) e  $57.06\% \pm 0.01$  (fração diclorometano).

Para *Candida albicans* foi também verificado que todos os extratos apresentaram um potencial de redução de crescimento, sendo uma vez mais a espécie *Stichopus regalis*, fração metanólica, a espécie que apresentou um maior decréscimo no crescimento em relação ao controlo, de  $86.20\% \pm 0.03$ . No que diz respeito às restantes espécies, para *Holothuria mammata* as percentagens de redução do crescimento relativamente ao controlo foram de  $35.48\% \pm 0.09$  (fração metanólica) e  $28.44\% \pm 0.05$  (fração diclorometano). Para a espécie *Holothuria forskali*, as percentagens de redução foram de  $85.32\% \pm 0.01$  (fração metanólica) e  $2.19\% \pm 0.06$  (fração diclorometano).

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo para os dois microrganismos em estudos, ao nível de significância de 5% (ANOVA,  $F_{(6,41)}=48.39$  para *S. cerevisiae* e  $F_{(6,32)}=57.45$ ,  $p<0.05$  para *C. albicans*), nas três espécies em ambas as frações orgânicas, à exceção da fração diclorometano da espécie *Holothuria forskali* para *C. albicans* (figura 25).

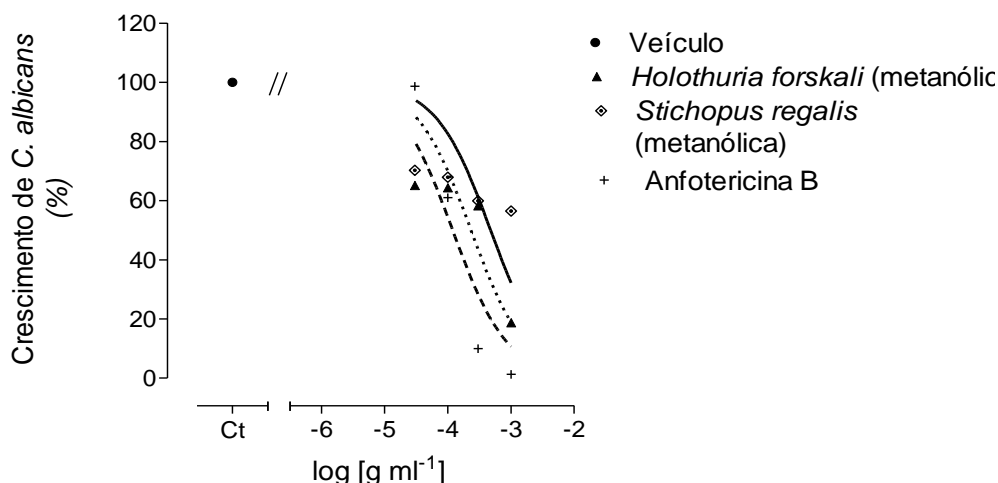
## Resultados



**Figura 25.** Efeito dos extratos de holotúrias de ambas as frações orgânicas ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) no crescimento de *S. cerevisiae* (A) e *C. albicans* (B). As linhas verticais indicam o Erro padrão da média (SEM) (não sendo possível visualizar as barras verticais uma vez que o seu valor é muito pequeno). # -  $p < 0.05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. V – Veículo, HF – *Holothuria forskali*, HM – *Holothuria mammata*, SR – *Stichopus regalis*

De modo a avaliar a potência dos efeitos verificados pelas frações que demonstraram uma percentagem de inibição superior ou igual a 50%, para a concentração máxima testada ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) no crescimento de *C. albicans*, decidiu-se avaliar a dependência da concentração dos efeitos obtidos. Assim, avaliou-se a dependência de concentração ( $30\text{-}1000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) dos extratos metanólicos das espécies *Holothuria forskali* e *Stichopus regalis*. Os resultados encontram-se expressos na figura 26.

## Resultados



**Figura 26.** Crescimento de *C. albicans* a 37°C (10 horas) na presença dos extratos da fração metanólica das holotúrias *Holothuria forskali* e *Stichopus regalis* (30-1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) e Anfotericina B (3-100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Os símbolos representam a média de 3 experiências independentes; as linhas verticais indicam o Erro padrão da média (SEM).

Pela análise da figura 26, a dependência de concentração realizada para as espécies *Holothuria forskali* e *Stichopus regalis*, fração metanólica, demonstrou que existiu a redução do crescimento de *C. albicans* de uma forma dependente da concentração, sendo este facto mais evidente para *Holothuria forskali* do que para *Stichopus regalis*.

A realização destes ensaios permitiu definir a concentração de extrato necessária para reduzir 50% do crescimento deste fungo ( $\text{IC}_{50}$ ), estando os valores de  $\text{IC}_{50}$  representados na tabela V.

**Tabela V.** Determinação dos valores de  $\text{IC}_{50}$  para a fração metanólica de *Holothuria forskali* e *Stichopus regalis* na redução do crescimento de *C. albicans*, 37 °C, 10 horas.

Holotúrias	Metanol $\text{IC}_{50}(\mu\text{g ml}^{-1})$
<i>Holothuria forskali</i>	233.2 (168.2 – 323.4)
<i>Stichopus regalis</i>	475.4 (271.0 – 834.0)

\*Anfotericina B (controlo positivo)  $\text{IC}_{50} = 119.3 \mu\text{g ml}^{-1}$  (89.8-158.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Os valores representam médias de triplicados com um grau de confiança de 95%.

### 4.5 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de holotúrias sobre os modelos celulares MCF-7 e HepG-2

#### 4.5.1. Efeitos de toxicidade dos extratos de holotúrias nas linhas celulares MCF-7 e HepG-2

A avaliação da toxicidade dos extratos de holotúrias sobre a viabilidade celular das linhas celulares em estudo foi realizada após a confluência total nas placas de cultura. Findo este período

## Resultados

---

de 5 a 6 dias, incubou-se as células com os extratos de holotúrias correspondentes à fração metanólica e diclorometano, à concentração de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  (concentração máxima). Os resultados obtidos demonstraram o efeito das duas frações testadas na viabilidade celular das células MCF-7 (A) e HepG-2 (B), após 24 horas de incubação, e consoante os dois métodos de análise, MTT e calceína – AM (Figura 27).

Como é possível verificar pela figura 27, na situação A, ou seja, para a linha celular MCF-7, a espécie *Holothuria forskali* foi a que apresentou uma maior percentagem de redução da viabilidade celular comparativamente ao controlo. Esta redução foi mais notória na fração metanólica através do método de MTT ( $0.00\% \pm 0.32$  de células viáveis), sendo que para o método de calceína – AM, a percentagem de viabilidade celular foi de  $57.90\% \pm 9.23$  de células viáveis. Ainda para a mesma espécie, mas para a fração diclorometano, os resultados foram mais potentes uma vez mais para o método de MTT ( $68.35\% \pm 1.96$  de células viáveis). Para as restantes espécies e suas respetivas frações orgânicas e métodos, apenas a espécie *Stichopus regalis* da fração diclorometano apresentou uma pequena percentagem de redução da viabilidade celular comparativamente ao controlo, para o método de MTT ( $85.87\% \pm 0.88$  de células viáveis).

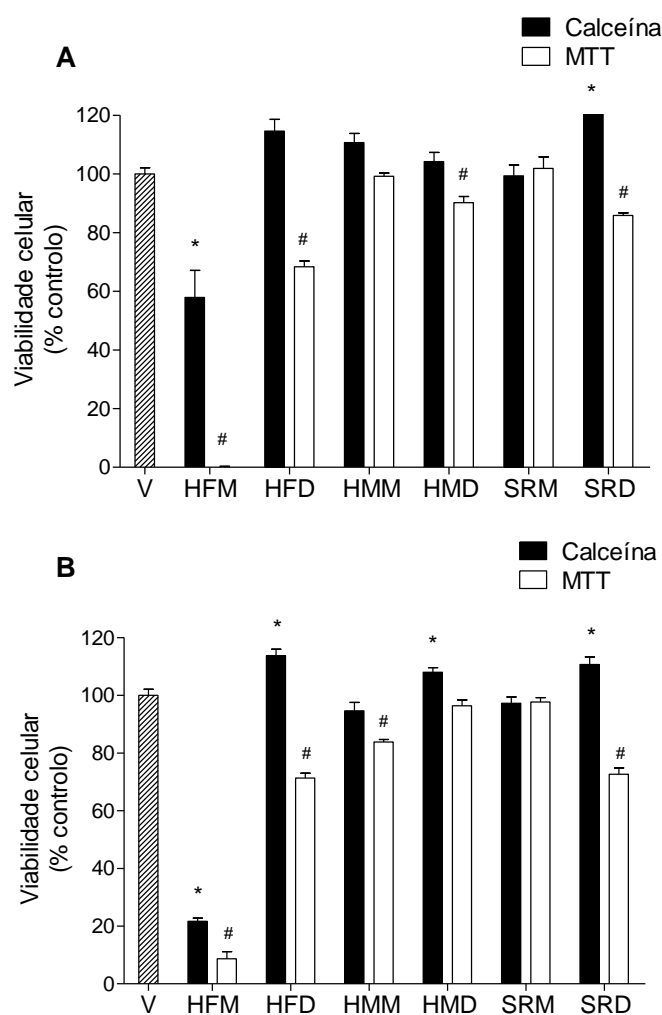
Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas, ao nível de significância de 5%, em relação ao controlo para ambos os métodos e para ambas as espécies à exceção das frações metanólicas das espécies *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis* para o método de MTT e Calceína – AM e *Holothuria forskali* e *Holothuria mammata* na fração diclorometano para Calceína - AM (ANOVA,  $F_{(6,53)}=280.7$ ,  $p<0.05$  para MTT e  $F_{(6,52)}=21.12$ ,  $p<0.05$  para Calceína – AM).

Para a linha celular HepG-2 (Figura 27, situação B), uma vez mais a espécie *Holothuria forskali* foi a que apresentou uma maior percentagem de redução da viabilidade celular comparativamente ao controlo. Esta redução voltou a ser maior na fração metanólica e para o método de MTT ( $8.70\% \pm 2.44$  de células viáveis), sendo que para o método de calceína – AM, a percentagem de viabilidade celular foi de  $21.66\% \pm 1.07$  de células viáveis. Ainda para a mesma espécie, mas para a fração diclorometano, os resultados foram mais potentes uma vez mais para o método de MTT ( $71.29\% \pm 1.72$  de células viáveis).

Relativamente à linha celular, HepG-2 (B), foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo para ambas as espécies e ambos os métodos, à exceção de *Holothuria mammata*, fração diclorometano e *Stichopus regalis*, fração metanólica para o método de MTT e *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis*, ambas na fração metanólica para o método de Calceína – AM (ANOVA,  $F_{(6,53)}=88.63$ ,  $p<0.05$  para MTT e  $F_{(6,53)}=227.8$ ,  $p<0.05$  para Calceína – AM).



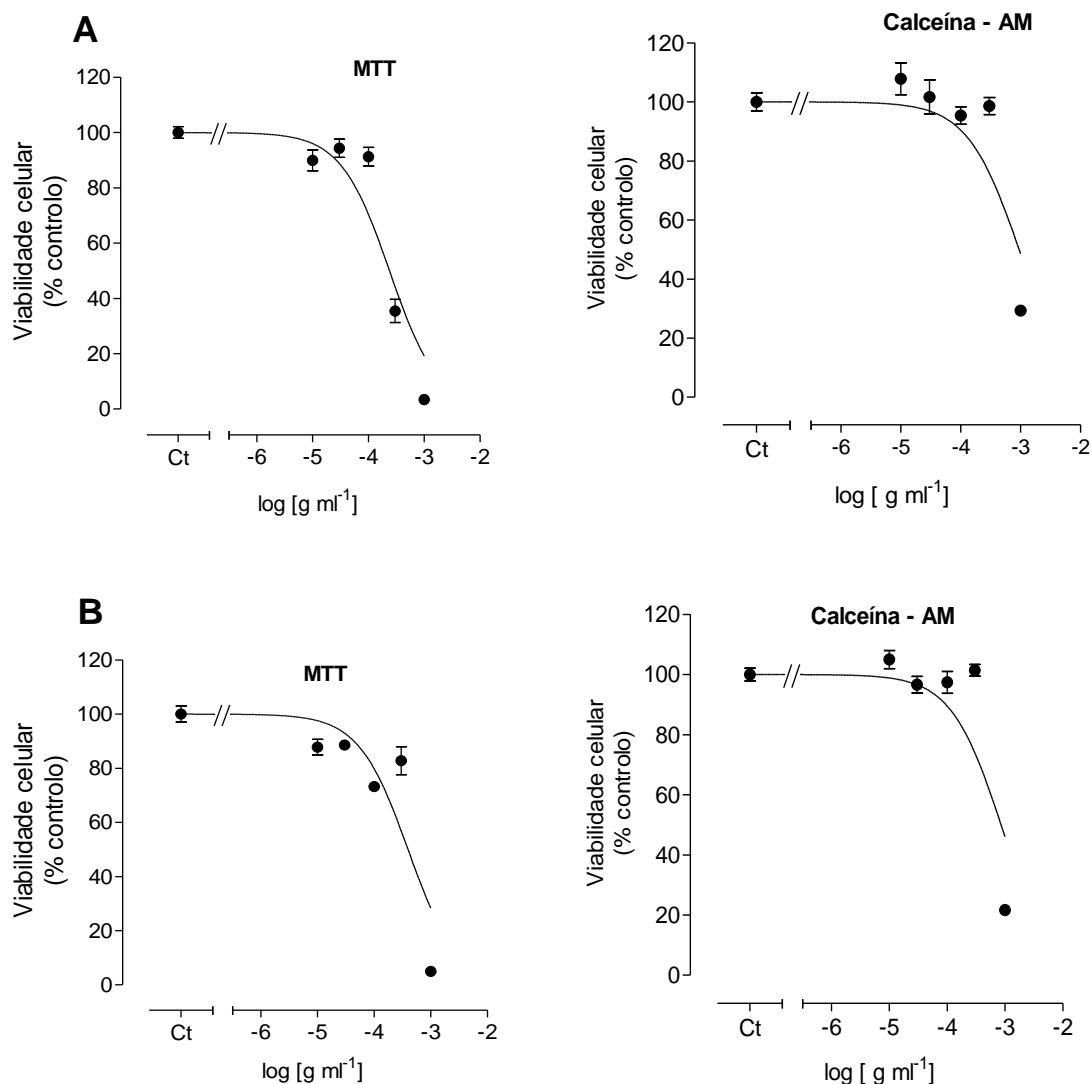
## Resultados



**Figura 27.** Efeito dos extratos de holotúrias ( $1\text{mg ml}^{-1}$ ) para as duas frações orgânicas utilizadas (M- metanol; D- diclorometano), na viabilidade celular das células MCF-7 (A) e HepG-2 (B) (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média  $\pm$  Erro padrão da média (SEM) ( $n=8$ ). # -  $p<0.05$  representa diferenças estatisticamente significativas do método MTT em relação ao controle, \*-  $p<0.05$  representa diferenças estatisticamente significativas do método Calceína – AM, em relação ao controle. V – Veículo, HFM – *Holothuria forskali*, fração metanólica, HFD – *Holothuria forskali*, fração diclorometano, HMM – *Holothuria mammata*, fração metanólica, HMD – *Holothuria mammata*, fração diclorometano, SRM – *Stichopus regalis*, fração metanólica, SRD – *Stichopus regalis*, fração diclorometano.

De modo a perceber se a redução da viabilidade celular ocorreu de um modo dependente da concentração, decidiu-se realizar um ensaio de dependência da concentração em ambas as linhas celulares, para a espécie *Holothuria forskali*, fração metanólica, dado que foi a única que apresentou uma capacidade de redução igual ou superior a 50%, para a concentração máxima testada de  $1\text{ mg ml}^{-1}$  durante 24 horas (Figura 28).

## Resultados



**Figura 28.** Dependência da concentração ( $10 - 1000\mu\text{g ml}^{-1}$ ) da fração metanólica de *Holothuria forskali*, que reduziu ( $\geq 50\%$ ,  $1\text{ mg ml}^{-1}$ ) a viabilidade celular das células MCF7 (A) e HepG-2 (B) em ambos os métodos. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  Erro padrão da média (SEM) ( $n=8$ ).

Pela análise da figura 28, a dependência de concentração realizada para a espécie *Holothuria forskali*, fração metanólica, na situação A, demonstrou que existiu a redução da viabilidade celular de uma forma dependente da concentração, sendo este facto mais evidente para o método de MTT do que para a calceína - AM. Relativamente à situação B, para as células HepG-2, uma vez mais se verificou uma redução da viabilidade celular dependente da concentração, sendo também mais marcado este efeito para o método de MTT.

A realização destes ensaios permitiu definir a concentração de extrato necessária para reduzir 50% da viabilidade celular ( $\text{IC}_{50}$ ), estando os valores de  $\text{IC}_{50}$  representados na tabela VI (MCF-7) e VII (HepG-2).

## Resultados

**Tabela VI.** Determinação dos valores de IC<sub>50</sub> para *Holothuria forskali*, fração metanólica, consoante os dois métodos, na redução da viabilidade celular das células MCF-7.

	MTT IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )	Calceína – AM IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )
<i>Holothuria forskali</i> (fração metanólica)	238.2 (182.3 – 311.4)	945.2 (654.2 – 1366.0)

**Tabela VII.** Determinação dos valores de IC<sub>50</sub> para *Holothuria forskali*, fração metanólica, consoante os dois métodos, na redução da viabilidade celular das células HepG-2.

	MTT IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )	Calceína – AM IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )
<i>Holothuria forskali</i> (fração metanólica)	396.0 (284.7 – 550.8)	855.2 (597.4 – 1224.0)

Para ambas as linhas celulares, o método de MTT foi o que exibiu os valores de IC<sub>50</sub> mais baixos, com os valores de 238.2 µg ml<sup>-1</sup> e 396.0 µg ml<sup>-1</sup>, respetivamente.

#### 4.5.2 Efeito dos extratos de holotúrias sobre a proliferação celular das linhas celulares MCF-7 e HepG – 2

Para avaliar o efeito dos extratos de holotúrias sobre a proliferação celular, procedeu-se à incubação das células com a fração metanólica e diclorometano após 36h do início da cultura. Todos os extratos foram testados à concentração de 1 mg ml<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos encontram-se apresentados em percentagem do controlo e demonstram o efeito dos extratos sobre a proliferação celular das células MCF-7 e HepG-2, após 24 horas de incubação (Figura 29).

Tal como pode ser observado na figura 29, para a situação A (linha celular MCF-7), a espécie *Holothuria forskali*, fração metanólica, apresentou uma redução total (100% ± 0.23) da proliferação celular, pelo método de MTT. Para a mesma espécie, na fração diclorometano e pelo método de calceína - AM, houve também uma redução da proliferação celular em 45.48% ± 1.87. Relativamente às restantes espécies, apenas a *Stichopus regalis*, para a fração diclorometano no método de MTT, demonstrou algum potencial de redução da viabilidade celular (20.32% ± 4.12).

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas, ao nível de significância de 5%, em relação ao controlo para ambos os métodos e para ambas as espécies à exceção das frações metanólicas das espécies *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis* e fração diclorometano para a espécie *Holothuria mammata*, para o método de MTT e frações metanólicas e diclorometano das espécies *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis* para Calceína – AM (ANOVA, F<sub>(6,57)</sub>=144.7, p<0.05 para MTT e F<sub>(6,56)</sub>=22.23, p<0.05 para Calceína – AM).

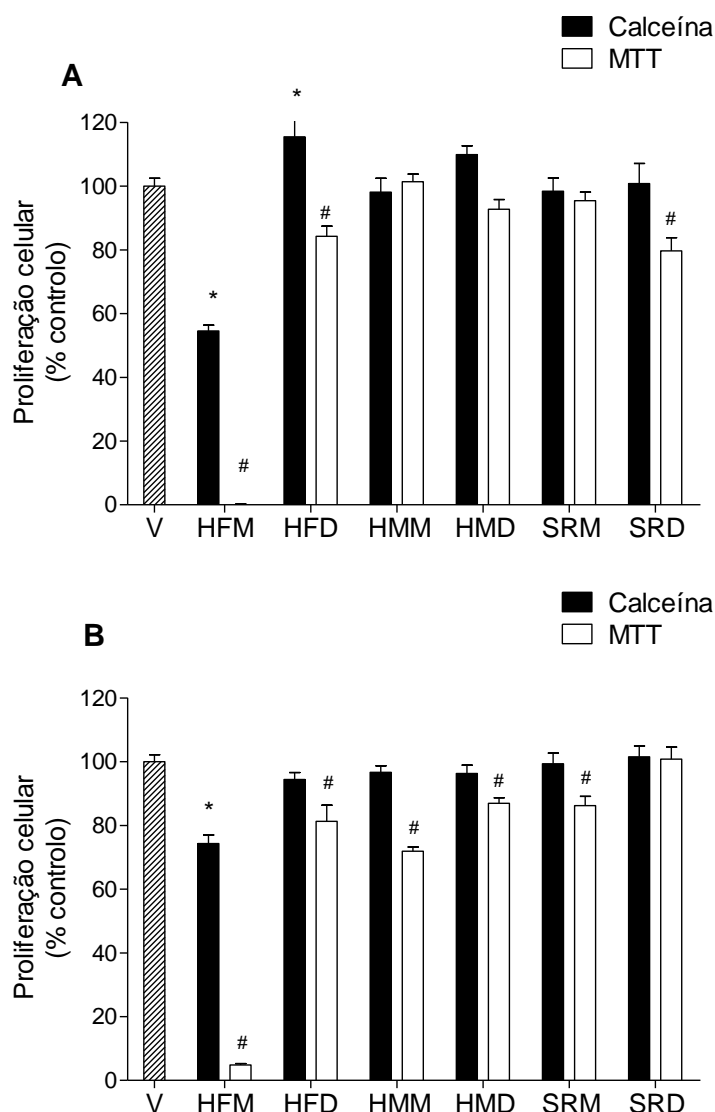
## Resultados

---

Na linha celular HepG-2 (Figura 29, situação B), uma vez mais a espécie *Holothuria forskali*, fração metanólica e método de MTT, foi a que apresentou elevada capacidade de redução da proliferação celular relativamente ao controlo de  $95.15\% \pm 0.38$ . Para a mesma fração mas desta vez para o método de calceína – AM, a redução da proliferação celular foi de  $25.69\% \pm 2.68$ . Relativamente à sua fração diclorometano da espécie *Holothuria forskali*, para o método de MTT a percentagem de redução da proliferação celular relativamente ao controlo foi de  $18.74\% \pm 5.06$ . Por fim, para as restantes espécies, apenas a espécie *Holothuria mammata*, fração metanólica, é que apresentou alguma capacidade de redução da proliferação celular ( $28.08\% \pm 1.30$ ).

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas, ao nível de significância de 5%, em relação ao controlo para ambos os métodos e para ambas as espécies à exceção da fração diclorometano da espécie *Stichopus regalis* para o método de MTT e frações metanólicas e diclorometano das espécies *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis* e fração diclorometano da espécie *Holothuria forskali*, para Calceína – AM (ANOVA,  $F_{(6,57)}=129.9$ ,  $p<0.05$  para MTT e  $F_{(6,57)}=11.10$ ,  $p<0.05$  para Calceína – AM).

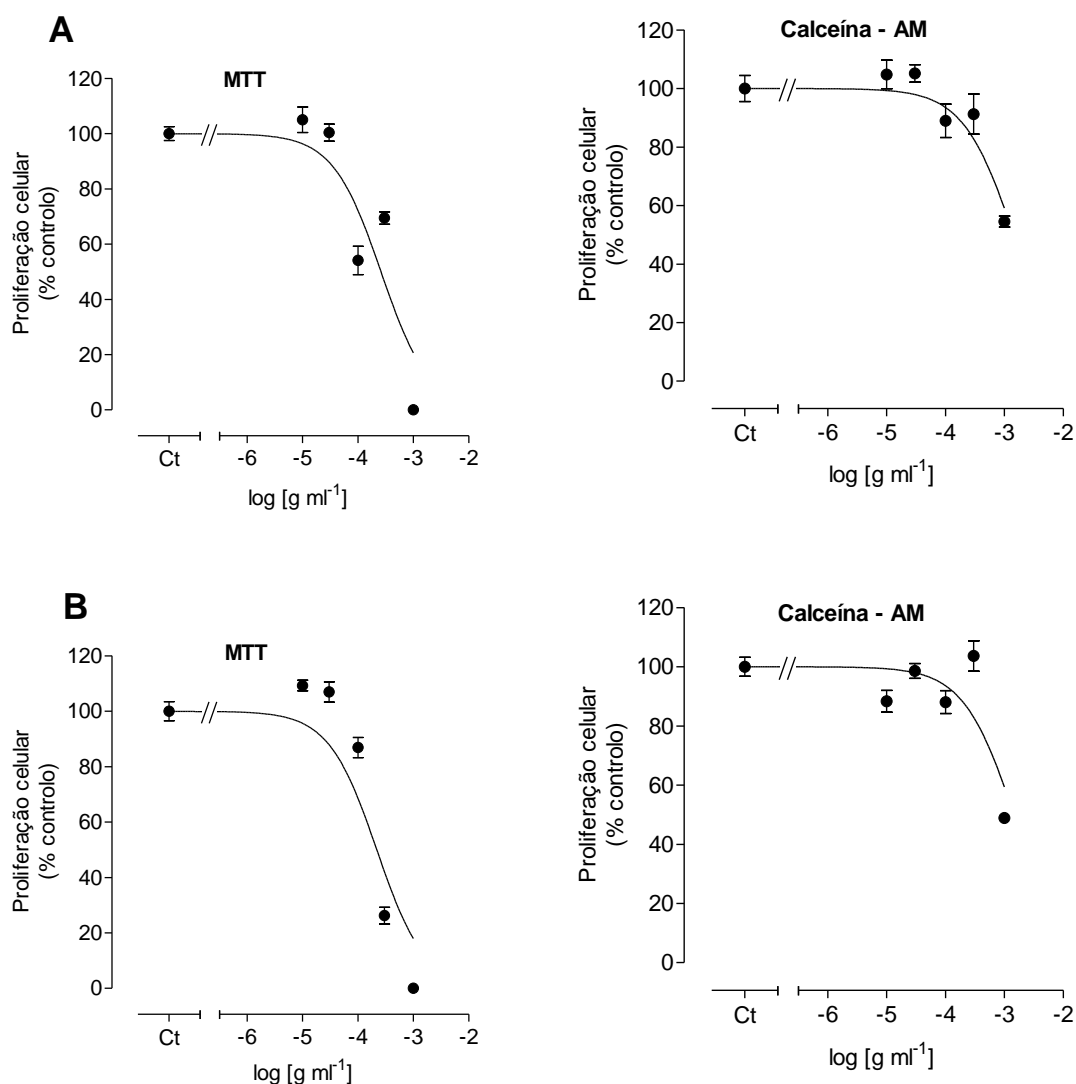
## Resultados



**Figura 29.** Efeitos dos extratos de holotúrias ( $1\text{mg ml}^{-1}$ ) para as duas frações orgânicas utilizadas, sobre a proliferação celular das células MCF-7 (A) e HepG-2 (B) (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média  $\pm$  Erro padrão da média (SEM) ( $n=8$ ). # -  $p < 0.05$  representa diferenças estatisticamente significativas do método de MTT em relação ao controle \* -  $p < 0.05$  representa diferenças estatisticamente significativas do método de calceína - AM em relação ao controle. V – Veículo, HFM – *Holothuria forskali*, fração metanólica, HFD – *Holothuria forskali*, fração diclorometano, HMM – *Holothuria mammata*, fração metanólica, HMD – *Holothuria mammata*, fração diclorometano, SRM – *Stichopus regalis*, fração metanólica, SRD – *Stichopus regalis*, fração diclorometano.

Para a espécie de holotúria, que exibiu uma capacidade de inibição da proliferação celular igual ou superior a 50% para a concentração máxima testada ( $1\text{mg ml}^{-1}$ ) após 24 horas, decidiu-se fazer ensaios de dependência da concentração. Os resultados referentes à fração metanólica da espécie *Holothuria forskali* para ambas as linhas celulares, encontram-se expressos na figura 30.

## Resultados



**Figura 30.** Dependência da concentração ( $10 - 1000\mu\text{g ml}^{-1}$ ) da fração metanólica de *Holothuria forskali*, que reduziu ( $\geq 50\%$ ,  $1\text{ mg ml}^{-1}$ , 24 horas) a proliferação celular das células MCF7 (A) e HepG-2 (B) em ambos os métodos. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  Erro padrão da média (SEM) ( $n=8$ ).

Pela análise da figura 30, a dependência de concentração realizada para a espécie *Holothuria forskali*, fração metanólica, na situação A, demonstrou que existiu a redução da proliferação celular de uma forma dependente da concentração, sendo este facto mais evidente para o método de MTT do que para a calceína - AM. Relativamente à situação B, para as células HepG-2, uma vez mais se verificou uma redução da proliferação celular dependente da concentração, sendo também mais notório este efeito para o método de MTT.

A realização destes ensaios permitiu definir a concentração de extrato necessária para reduzir 50% da proliferação celular ( $\text{IC}_{50}$ ), estando os valores de  $\text{IC}_{50}$  representados na tabela VIII (MCF-7) e IX (HepG-2).

## Resultados

**Tabela VIII.** Determinação dos valores de IC<sub>50</sub> para *Holothuria forskali*, fração metanólica, consoante os dois métodos, na redução da proliferação celular das células MCF-7.

	MTT IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )	Calceína - AM IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )
<i>Holothuria forskali</i> (fração metanólica)	260.3 (186.7 – 362.9)	1445.0 (1011.0 – 2066.0)

**Tabela IX.** Determinação dos valores de IC<sub>50</sub> para *Holothuria forskali*, fração metanólica, consoante os dois métodos, na redução da proliferação celular das células HepG-2.

	MTT IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )	Calceína - AM IC <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )
<i>Holothuria forskali</i> (fração metanólica)	218.7 (149.4 – 320.0)	1462.0 (1002.0 – 2133.0)

Para ambas as linhas celulares, o método de MTT foi onde se obtiveram valores de IC<sub>50</sub> mais baixos, com os valores de 260.3 µg ml<sup>-1</sup> e 218.7 µg ml<sup>-1</sup>, respetivamente.

#### 4.6 Quantificação da gordura total e avaliação do perfil em ácidos gordos das três espécies de holotúrias

Na avaliação do perfil lipídico das três espécies em estudo foi calculada a percentagem de gordura total por espécie. Estes resultados encontram-se expressos na tabela X.

**Tabela X.** Percentagem de gordura total para cada espécie de holotúria. Os valores correspondem à média ± desvio padrão (SD) (n=3). (# - p <0.05) representa diferenças estatisticamente significativas entre cada uma das espécies.

	% Gordura total
<i>Holothuria forskali</i>	4.83 ± 2.33
<i>Holothuria mammata</i>	1.00 ± 2.45
<i>Stichopus regalis</i>	3.63 ± 6.11

É possível verificar que as três espécies possuem um nível baixo de gordura, sendo a espécie *Holothuria mammata* a que possui um teor de gordura total mais baixo, embora não se verifiquem diferenças estatisticamente significativas na gordura total entre espécies, ao nível de significância de 5% (ANOVA, F<sub>(2,6)</sub>=0.236, p > 0.05).

A tabela XI apresenta o conjunto dos ácidos gordos com maior percentagem para cada uma das espécies. Também se encontra patente a razão entre os ácidos gordos n3/n6.

## Resultados

Pela análise da tabela XI é possível verificar que a espécie *Holothuria mammata* foi a que apresentou um conteúdo inferior em ácidos gordos saturados ( $\sum$  SFA) (14.18%  $\pm$  1.68), assim como em ácidos gordos monoinsaturados ( $\sum$  MUFA) (4.48%  $\pm$  0.26). Por outro lado, foi a espécie com valor superior em ácidos gordos polinsaturados ( $\sum$  PUFA) (46.30%  $\pm$  2.18). Relativamente ao teor em ácidos gordos essenciais (EPA, DHA e ARA), a espécie *Stichopus regalis* foi a espécie que apresentou uma percentagem superior de EPA (C 20:5 n3) (12.49%  $\pm$  0.15) e DHA (C 22:6 n3) (7.35%  $\pm$  0.02). No entanto, a espécie que apresentou um conteúdo superior em ARA (C 20:4 n6) foi a espécie *Holothuria forskali* (20.36%  $\pm$  0.14). Relativamente aos ácidos gordos saturados, a espécie *Holothuria forskali* foi a que possuiu um teor elevado do ácido palmítico (C16:0) (9.96%  $\pm$  0.52). Por outro lado, a espécie *Stichopus regalis* apresentou uma elevada percentagem em ácido esteárico (C18:0) (12.43%  $\pm$  0.83). Relativamente aos ácidos gordos monoinsaturados, a maior abundância centra-se no ácido vacénico (C18:1 n-7), com uma percentagem elevada de abundância para *Stichopus regalis* (5.63%  $\pm$  0.33).

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas apenas entre o somatório dos ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, tendo-se verificado que os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) foram os que demonstraram essa diferença ( $F_{\sum \text{ácidos gordos}(2,99)} = 5.518$ ,  $p < 0.05$ ). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as espécies e na combinação de ácido gordo com espécie (ANOVA,  $F_{\text{espécies}(2,99)} = 0.312$ ,  $F_{\text{espécies} \times \text{ácido gordo}(4,99)} = 0.307$ ,  $p > 0.05$ ).

**Tabela XI.** Abundância dos ácidos gordos com maior percentagem por espécie. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão (SD) (n=3). (# -  $p < 0.05$ ) representa diferenças estatisticamente significativas entre cada uma das espécies.

Ácido Gordo	<i>Holothuria forskali</i>	<i>Holothuria mammata</i>	<i>Stichopus regalis</i>
$\sum$ SFA <sup>a</sup>	22.95 $\pm$ 0.84 <sup>#</sup>	14.18 $\pm$ 1.68 <sup>#</sup>	24.92 $\pm$ 1.73 <sup>#</sup>
C 12:0	0.56 $\pm$ 0.00	0.65 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.09
C 14:0	1.20 $\pm$ 0.17	0.88 $\pm$ 0.02	2.90 $\pm$ 0.04
C 16:0	9.96 $\pm$ 0.52	3.74 $\pm$ 0.18	9.43 $\pm$ 0.77
C 18:0	11.23 $\pm$ 0.16	8.91 $\pm$ 1.44	12.43 $\pm$ 0.83
$\sum$ MUFA <sup>b</sup>	6.44 $\pm$ 0.63 <sup>#</sup>	4.48 $\pm$ 0.26 <sup>#</sup>	7.65 $\pm$ 0.69 <sup>#</sup>
C 18:1 n7	3.83 $\pm$ 0.21	2.89 $\pm$ 0.15	5.63 $\pm$ 0.33
C 18:1 n9	2.61 $\pm$ 0.42	1.59 $\pm$ 0.11	2.02 $\pm$ 0.36
$\sum$ PUFA <sup>c</sup>	43.64 $\pm$ 0.80 <sup>#</sup>	46.30 $\pm$ 2.18 <sup>#</sup>	42.11 $\pm$ 0.38 <sup>#</sup>
C 16:3	4.18 $\pm$ 0.03	7.27 $\pm$ 0.13	1.19 $\pm$ 0.01
C 18:3 n3	0.98 $\pm$ 0.09	1.07 $\pm$ 0.19	1.40 $\pm$ 0.02
C 20:2 n6	6.62 $\pm$ 0.24	6.35 $\pm$ 0.17	0.41 $\pm$ 0.04
C 20:4 n6	20.36 $\pm$ 0.14	19.97 $\pm$ 1.30	19.29 $\pm$ 0.14
C 20:5 n3	10.49 $\pm$ 0.21	10.85 $\pm$ 0.37	12.49 $\pm$ 0.15
C 22:6 n3	1.01 $\pm$ 0.09	0.79 $\pm$ 0.02	7.35 $\pm$ 0.02
n3/n6	0.463	0.483	1.078

<sup>a</sup> Saturados. <sup>b</sup> Monoinsaturados. <sup>c</sup> Polinsaturados.



## **9 Discussão e Conclusão**



## Discussão e Conclusão

---

As holotúrias, mais precisamente as espécies de regiões tropicais têm estado na vanguarda da ciência, dada as constantes descobertas de novas aplicabilidades, tanto para a indústria farmacêutica, como para a cosmética. Muitos estudos têm sido reportados na utilização de holotúrias tanto para a cura de feridas, como para o tratamento de doenças degenerativas, cancro, artrites, etc. Aliado a este interesse, está o fator primordial pela qual são intensamente pescadas e cultivadas em aquacultura, a produção de *bêche – de – mer*. Esta, sendo uma tradição com mais de 1000 anos, continua a ser muito apreciada na região asiática, sendo mesmo uma tradição o consumo de várias espécies de holotúrias, em ocasiões especiais. Tal consumo tem vindo a ser expandido muito devido ao elevado valor nutricional destes indivíduos.

Através de técnicas histológicas é possível inferir na maturação das gónadas, avaliando o estado de oogénese (desenvolvimento dos oócitos) e espermatogénese (desenvolvimento dos espermátócitos). A avaliação do Índice Gonadossomático, ainda que de carácter subjetivo (uma vez que o peso real do indivíduo é variável dado o seu alto conteúdo em água, na ordem dos 80-90%, que é perdido aquando de processos de manuseamento), permite avaliar o estado de maturação sexual sazonalmente (Morgan, 2000; Ramofafia *et al.*, 2003; Shiell e Uthicke, 2006; Muthiga *et al.*, 2009).

Embora as espécies *Holothuria forskali* e *Holothuria mammata* apresentem uma grande distribuição geográfica, os dados sobre a sua biologia reprodutiva não se encontram reportados na literatura, à exceção da espécie *Holothuria forskali* segundo apenas um estudo efetuado por Tuwo e Conand, (1992). Os resultados presentes neste trabalho experimental serão comparados com outros dados já reportados para espécies similares do género *Holothuria* ou com outras espécies da ordem Aspidochirotida de outras regiões geográficas (Navarro *et al.*, 2012).

- Razão Macho/Fêmea

A razão macho/fêmea obtida para a espécie *Holothuria forskali* apresentou um total de 1 macho para 2 fêmeas, aproximadamente (razão=0.625). Na maioria das holotúrias da ordem Aspidochirotida, esta proporção geralmente coincide com uma relação equilibrada de 1:1 (Ramofafia *et al.*, 2001; Rasolafonirina *et al.*, 2005; Asha e Muthiah, 2008). No entanto, algumas espécies apresentam uma proporção desequilibrada de 1 macho para 2 fêmeas ou ainda 3 machos para 1 ou 2 fêmeas, ou vice-versa (Shiell e Uthicke, 2006). Este desequilíbrio encontra-se muitas vezes associado a pressões de pesca que afetam a população de uma determinada zona, levando esta algum tempo a se recuperar (Muthiga *et al.*, 2009).

No presente estudo, os locais onde foram realizadas as amostragens não são considerados locais com uma grande afluência de pesca. No entanto, um dos locais (Praia do Portinho da Areia Norte) está sujeito a uma grande agitação marítima (que é considerado outro dos principais fatores que afetam o equilíbrio da razão entre géneros).

## Discussão e Conclusão

---

Relativamente à espécie *Holothuria mammata*, a razão entre géneros obtida apresentou um total de 3 machos para 4 fêmeas (razão=0.758). Este fato pode ser explicado à luz do que foi referido anteriormente e acrescentando que em termos de proteção contra o *stress* resultante de parâmetros abióticos e pressão de pesca, *Holothuria mammata* é possivelmente menos exposta do que a espécie anterior, dado que se refugia por baixo de pedras e rochas (observação pessoal).

O desequilíbrio nas razões obtidas para ambas as espécies poderá também ter sido afetado pelo elevado número de indivíduos sem gónadas colectados (46 para *Holothuria forskali* e 22 para *Holothuria mammata*). A presença de indivíduos sem gónada está associada a dois principais fatores: pressão de pesca (através da recolha de juvenis) e fatores ambientais (frequentemente a temperatura e agitação marítima, que ao induzirem os organismos a uma situação de *stress*, estes acabam por se eviscerar) (Muthiga *et al.*, 2009).

- Índice Gonadossomático (GI) e Peso (eviscerado) das duas espécies em estudo

Segundo Smiley e seus colaboradores, (1991) e outros autores, é tido que espécies de regiões temperadas geralmente apresentam apenas um único período de maturação da gónada (um único pico de desova), na altura da primavera – verão (McEuen e Chia, 1991; Hamel *et al.*, 1993). Pelo contrário, espécies de regiões tropicais apresentam ciclos reprodutivos longos (várias etapas de maturação da gónada), ao longo do ano (Conand, 1993).

A espécie *Holothuria forskali* contrariou a tendência relativa às espécies temperadas, ao apresentar 2 períodos de maturação da gónada para machos e fêmeas, que se traduziram em 2 valores máximos de GI, 10.17% em novembro e 11.72% em fevereiro, para fêmeas e 7.46% em novembro e 14.73% em fevereiro para machos. É tido como valor correspondente a gónadas maduras o intervalo de GI de 5 – 12% (Morgan, 2000; Ramofafia *et al.*, 2003; Shiell e Uthicke, 2006).

Como já foi referido, a maturação da gónada é controlada por fatores endógenos mas é profundamente afetada por fatores exógenos, nomeadamente a temperatura e a agitação marítima (Morgan, 2000; Ramofafia *et al.*, 2003; Shiell e Uthicke, 2006; Muthiga *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2012). Segundo dados oficiais do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) para a região de Peniche (Anexo III), o mês de novembro de 2012 coincidiu com um período de forte agitação marítima, não sendo no entanto um período com uma temperatura média superficial da água anormal para a época. Para além do exposto, e tendo em atenção que a espécie *Holothuria forskali*, dada a sua distribuição geográfica, tolera um intervalo de temperaturas da água do mar considerável e a temperatura média superficial da água do mar na costa de Peniche, no referido período, foi de 16°C, a influência da temperatura nos resultados observados relativos ao mês de novembro, não pode ser garantida. No entanto, em relação à agitação marítima, é sabido que esta afeta profundamente os organismos que habitam a região do intertidal, levando-os muitas vezes a situações de *stress* e acabando estas por se eviscerar,

## Discussão e Conclusão

---

libertando o estômago, intestino e gónadas, como estratégia de sobrevivência (Morgan, 2000). Segundo o reportado por Tuwo e Conand, (1992), num estudo realizado nas Ilhas Glénan (França) para esta espécie, *Holothuria forskali* apresenta um longo período de maturação da gónada, desde outubro a fevereiro, desovando apenas no início da primavera, correspondendo este período a águas calmas e ricas em nutrientes. Observando os resultados, é facilmente dedutível que o verificado no mês de novembro, com consequente decréscimo dos valores de GI para os meses de dezembro e janeiro, se deveu a uma questão de *stress* com consequente libertação dos gâmetas e não a um período típico de maturação da gónada seguida de desova.

No mês de fevereiro registaram-se os valores máximos de GI para ambos os sexos, de 11.72% para fêmeas e 14.73% para machos, denotando o longo período de maturação (desde Setembro que os valores de GI para ambos os sexos foram sempre aumentando, havendo apenas diminuições no seu valor correspondente a períodos de inverno, onde as condições marítimas foram adversas) reportado por Tuwo e Conand (1992) e associado a indivíduos que provavelmente se encontravam menos expostos à forte agitação marítima, não tendo por isso eviscerado. Assim, o pico de GI observado no mês de novembro com consequente decréscimo do seu valor nos meses seguintes, não poderá ser associado a uma altura de desova da espécie em questão, mas sim a uma libertação precoce dos gâmetas associada a fatores ambientais adversos.

Segundo Conand (1993), a explicação para o fato das fêmeas possuírem Índices Gonadossomáticos, em geral, superiores aos dos machos está associado ao seu maior *output* reprodutivo ou por outras palavras ao fato de desovarem durante um maior período de tempo que os machos. Estes, em geral, iniciam a desova (libertam os gâmetas primeiro) e num curto espaço de tempo (aproximadamente 30 minutos), enquanto as fêmeas acompanham este estado por um período que pode ir até às 2 horas de desova. Esta situação foi verificada para as espécies tropicais, *Holothuria nobilus*, *Holothuria fuscogilva*, *Holothuria scabra*, entre outras.

A espécie *Holothuria mammata*, por outro lado, apresentou um padrão típico de maturação da gónada de uma espécie temperada, ao ser observado apenas um único período de maturação (um único pico de desova) no mês de abril, em que foram verificados Índices Gonadossomáticos de 18.87% e 14.11% para fêmeas e machos, respetivamente. Esta espécie co-habita com a espécie *Holothuria forskali*, sendo frequente encontrá-las no mesmo espaço. No entanto, a espécie *Holothuria mammata*, face a situações de *stress*, enterra-se debaixo de pedras e rochas, não estando tão propícia à agitação marítima. Assim, é facilmente entendível a existência de apenas um valor máximo de GI, para ambos os sexos, e, uma vez mais, se verificou um longo período de maturação da gónada (à exceção do mês de dezembro, mas há que ter em atenção que neste mês apenas foram recolhidos 4 indivíduos, dadas as condições meteorológicas adversas verificadas na zona). Com o exposto, é possível inferir numa semelhança no padrão de maturação da gónada para ambas as espécies, possivelmente resultante de habitarem o mesmo espaço.

## Discussão e Conclusão

---

Tal já foi verificado para outras espécies (Morgan, 2000; Ramofafia *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2012).

Relativamente aos valores de GI observados para *Holothuria mammata*, uma vez mais foram verificadas discrepâncias relativamente a machos e fêmeas, com as fêmeas a apresentarem, no geral, Índices Gonadossomáticos mais elevados que os machos.

Quanto aos pesos (eviscerados) para ambos os géneros de ambas as espécies, foram verificadas discrepâncias entre machos e fêmeas, sendo que em geral as fêmeas apresentaram pesos superiores aos dos machos. Estas observações são facilmente explicadas pelas altas taxas de fecundidade das fêmeas, necessitando de um maior armazenamento de nutrientes. No mês de novembro, para *Holothuria forskali*, verificaram-se valores baixos de peso para ambos os géneros, muito possivelmente devido a fenómenos de evisceração por *stress* ambiental. No que diz respeito aos meses de fevereiro e abril, os valores observados para o peso já são mais elevados, possivelmente devido aos elevados valores de GI observados. O valor elevado de peso para as fêmeas, verificado em março para *Holothuria forskali* é explicado não devido a um elevado valor de GI, mas possivelmente devido a um maior conteúdo em água nos indivíduos amostrados (observação pessoal).

No que diz respeito ao peso dos indivíduos indiferenciados, estes em geral foram sempre ligeiramente menores aos pesos verificados para os indivíduos com gónada. Este fato demonstra a importância da gónada no estabelecimento do peso. No entanto, há que referir que os indivíduos sem gónada apresentaram um conteúdo em água superior ao dos indivíduos com género definido, o que está de acordo com o observado para outras espécies (Morgan, 2000; Ramofafia *et al.*, 2003; Asha e Muthiah, 2008; Navarro *et al.*, 2012).

- Morfometria dos Túbulos das gónadas e Histologia

A avaliação mensal do comprimento dos túbulos das gónadas das espécies *Holothuria forskali* e *Holothuria mammata* apresentou discrepâncias entre ambas as espécies e géneros. Em geral, o comprimento dos túbulos dos machos foi superior ao das fêmeas. No entanto, para a espécie *Holothuria mammata* verificou-se o contrário. Constitui um padrão comum nas holotúrias, as fêmeas possuem uma maior quantidade de túbulos (dado o seu maior *output* reprodutivo) do que os machos (Shiell e Uthicke, 2006; Toral e Martínez, 2007). No entanto, é descrito, para várias espécies da ordem Aspidochirotida, como *Holothuria fuscogilva*, *Holothuria nobilis*, *Holothuria scabra*, *Holothuria atra*, etc., que os túbulos dos machos são ligeiramente mais longos em comprimento que os das fêmeas (Conand, 1993). Apesar disso, a espécie *Holothuria mammata* contrariou esta tendência, possuindo uma morfologia da gónada distinta que pode ser uma característica da espécie ou possivelmente pode estar relacionada com a recolha de machos jovens com menos peso, logo com gónadas mais pequenas.

Relativamente ao diâmetro dos túbulos de ambas as espécies em estudo, verificou-se que estas apresentaram um padrão equivalente, consoante o estágio de desenvolvimento,

## Discussão e Conclusão

---

onde no estágio III o intervalo de valores observado para *Holothuria forskali* (2.0 – 3.96 mm para fêmeas e 1.60 – 2.26 mm para machos) e *Holothuria mammata* (2.08 – 2.22 mm para fêmeas e 2.34 – 3.46 mm para machos) encontra-se relativamente concordante com o observado para outras espécies, como por exemplo a espécie tropical *Holothuria whitmaei*, onde o diâmetro médio dos túbulos das gónadas foi de 2.35 mm para fêmeas e 1.82 mm para machos (Navarro *et al.*, 2012).

As análises histológicas efetuadas aos túbulos de ambas as espécies revelaram semelhanças no diâmetro médio dos oócitos em ambas as espécies nos diferentes estágios de maturação. O intervalo de valores do diâmetro dos oócitos no estágio III de oogénese (maduro) foi de 112 – 129.4  $\mu\text{m}$  para *Holothuria forskali* e 108 – 122  $\mu\text{m}$  para *Holothuria mammata*. Estes resultados são ligeiramente inferiores ao intervalo de valores tido como comum para espécies da ordem Aspidochirotida, que correspondem de 150 a 210  $\mu\text{m}$  (Conand, 1993). No entanto, estes valores são concordantes com o observado para a espécie *Holothuria forskali*, no estudo realizado por Tuwo e Conand (1992), onde no estágio III, o intervalo de valores referentes ao diâmetro dos oócitos foi de 90 a 120  $\mu\text{m}$ . Assim, o fato de ambas as espécies serem, comparativamente com as espécies tropicais, inferiores em comprimento (ainda que o comprimento não tenha sido um dos parâmetros registados neste estudo) e peso, poderá ser uma explicação ao menor valor observado no diâmetro dos oócitos.

No estágio IV (parcialmente desovado) foi possível observar, em ambas as espécies, a presença de oócitos maduros residuais, assim como no estágio V (desovado) foram encontrados oócitos vestigiais. Com estes dados é possível inferir que a desova nestas duas espécies temperadas não é total, sendo possível encontrar ao longo de todo o ano oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, tal como o observado para espécies tropicais como, *Holothuria scabra*, *Holothuria atra*, *Holothuria fuscogilva*, entre outras (Ramofafia *et al.*, 2000; Ramofafia *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2012).

Ainda no presente estudo foi possível distinguir os espermatócitos nos túbulos das gónadas masculinas, dado que estes eram superiores em tamanho que o espermatozoa (espermatócitos maduros), uma vez que a cromatina ainda não tinha condensado para a fase final observada nos espermatídeos (Costelleo, 1985).

Em geral, uma vez que o estágio de desenvolvimento dos túbulos apresentou semelhanças com os estágios de gametogénese descritos e resultantes da histologia, é possível inferir que foram observadas diferenças na cor das gónadas, em ambas as espécies, consoante o género e estágio de desenvolvimento. Assim, enquanto para as fêmeas de *Holothuria forskali* e *Holothuria mammata* a cor dos túbulos variou de um laranja pálido para um laranja vivo, relativamente aos machos, para *Holothuria forskali* a cor dos túbulos variou de um rosa pálido quase branco transparente a cor de salmão por vezes vivo, enquanto para *Holothuria mammata* a cor variou de branco transparente a creme.



## Discussão e Conclusão

---

- Potencial biotecnológico das três espécies de holotúrias em estudo

Os invertebrados marinhos, especialmente os que habitam a região intertidal, também designada de “entre-marés”, estão sujeitos a longos períodos de exposição ao ar e sol durante a maré-baixa. Em consequência destas alterações de subida e descida das marés, estes são expostos a condições extremas de salinidade, secura, radiação ultravioleta (UV), entre outros. Apesar disso, os organismos marinhos, especialmente as holotúrias, estão protegidas contra o *stress* oxidativo causado por altos níveis de exposição à radiação UV e radicais livres, principalmente espécies reativas de oxigénio (ROS). Este mecanismo de proteção encontra-se associado à presença de antioxidantes endógenos e/ou metabolitos secundários. Assim, este facto aponta as holotúrias como uma fonte rica em antioxidantes.

A principal fonte de alimento das holotúrias são partículas resultantes da degradação de macroalgas, microalgas e outros organismos fitoplânctónicos. Estes são ricos em compostos fenólicos. Assim, é esperado encontrar-se compostos fenólicos, como flavonóides, taminas, entre outros, nos tecidos das holotúrias, como é reportado no estudo realizado para a espécie atlântica *Cucumaria frondosa* (Mamelona *et al.*, 2007).

A quantidade total de polifenóis (QTP) encontrada nas três espécies de holotúrias foi relativamente semelhante entre si, nas duas frações orgânicas testadas. A espécie *Holothuria forskali* foi a que apresentou uma maior quantidade em polifenóis na fração metanólica. No entanto, estes foram, aproximadamente, dez vezes inferiores aos observados para as espécies *Holothuria scabra*, *Holothuria leucospilota* e *Stichopus chloronotus*, no estudo realizado por Althunibat e seus colaboradores (2009). No estudo realizado por estes autores, a quantidade total de polifenóis encontrada no músculo das três espécies foi ainda significativamente superior quando a extração foi aquosa. Assim, os autores chegaram à conclusão que os compostos fenólicos presentes nas três espécies em estudo eram hidrofílicos, daí os maiores resultados alcançados com a extração aquosa. Estes resultados encontram-se em concordância com os observados por Mamelona e seus colaboradores (2007) para a espécie *Cucumaria frondosa*. Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser explicados à luz das reações ocorrentes entre radicais e antioxidantes, assim como uma possível seletividade por determinados solventes (como foi observado nos estudos acima referidos e que resultaram em quantidades elevadas de polifenóis), sendo o solvente aquoso o que propicia uma maior quantidade de polifenóis.

A correlação entre o conteúdo total de polifenóis e a capacidade de redução de radicais está bem estabelecida e é definida como, quanto maior a quantidade de polifenóis presentes, maior a capacidade de redução do DPPH (Celikler *et al.*, 2009). De facto, todas as espécies de holotúrias apresentaram um conteúdo baixo em polifenóis, o que se traduziu numa reduzida capacidade de redução do radical DPPH. Este facto faz sentido tendo em atenção as características antioxidantes dos polifenóis,



## Discussão e Conclusão

---

que podem atuar como dadores de H<sup>+</sup>, estabilizando assim o radical DPPH (Matsukawa *et al.*, 1997), como observado em várias espécies de algas.

O método ORAC tem sido largamente aplicado na avaliação da capacidade de eliminação dos radicais livres do plasma humano, proteínas, DNA, extratos de plantas e alimentos, entre outros (Prior *et al.*, 1999). O interesse crescente na avaliação da atividade antioxidante em matrizes complexas tem sido apostado como o ponto de partida para o desenvolvimento de novos métodos e/ou para o melhoramento dos existentes.

No presente estudo, foram obtidos, para a espécie *Holothuria forskali*, os valores mais elevados de equivalentes de trolox, nas respetivas frações metanólicas e diclorometano. Analisando os resultados, estes foram inferiores ao verificado no estudo realizado por Mamelona e Pelletier (2010) em subprodutos (trato digestivo e gónadas) do ouriço-do-mar verde (*Strongylocentrotus droebachiensis*) e vísceras da holotúria do Atlântico, *Cucumaria frondosa*.

Os microrganismos são a causa de inúmeras doenças que afetam diversas espécies, não sendo os invertebrados marinhos uma exceção. No entanto, estes desenvolveram sistemas imunitários altamente eficientes na deteção e eliminação de invasores. A resposta do sistema imunitário dos equinodermes envolve efeitos mediados pela presença de fagócitos, incluindo a fagocitose de material estranho ao organismo, primeiramente através de amebócitos que estão presentes no celoma. Também inclui a formação de “corpos castanhos” através da encapsulação das substâncias invasoras e sua consequente degradação, através de enzimas hidrolíticas presentes nas células (Beauregard *et al.*, 2001).

No presente estudo, foi avaliada a capacidade antibacteriana dos extratos das três espécies de holotúrias, consoante as duas frações orgânicas utilizadas, contra as bactérias, *E. coli* (ATCC 25922) estirpe patogénica, *E. coli* (ATCC 10536) estirpe não patogénica, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Salmonella* entérica. Pelos resultados alcançados, apenas ocorreu a redução do crescimento para *S. aureus*, sendo a espécie *Holothuria forskali*, fração diclorometano a que apresentou uma maior percentagem de redução do microrganismo em causa. Estes resultados são concordantes com um estudo realizado por Jawahar e seus colaboradores (2002), em que apenas as espécies tropicais *Actinopyga echinites*, *Actinopyga miliaris*, *Holothuria atra* e *Holothuria scabra* apresentaram sensibilidade (redução do crescimento) para *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus* entre outros microrganismos. Os resultados aqui obtidos são concordantes com o citado por vários autores, no que diz respeito ao facto de que geralmente a atividade antibacteriana é mais frequente em bactérias gram positivas (*Bacillus subtilis* e *S. aureus*) do que em bactérias gram negativas (*E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* entérica) (Ballantine *et al.*, 1987; González del Vale *et al.*, 2001). Tal observação é devido ao facto das bactérias gram negativas possuírem uma membrana celular externa e um espaço periplasmático, que não existe nas

## Discussão e Conclusão

---

bactérias *gram* negativas (Cowan, 1999). Para além disso, o próprio espaço periplasmático contém uma série de enzimas capazes de degradar um vasto número de moléculas, sendo por isso uma forte defesa contra muitos antibióticos (Lambert, 2002; Sofidiya *et al.*, 2009). No entanto, para *Bacillus subtilis* (bactéria *gram* positiva) não foi detetada qualquer capacidade de inibição.

O aumento da incidência de infeções fúngicas tem sido associado ao aparecimento de agentes patogénicos resistentes, e à sua grande disseminação. O esforço científico no sentido da descoberta de potenciais fármacos com capacidade antifúngica tem cada vez mais incidido para os produtos naturais de origem marinha. Desde as últimas décadas, o ambiente marinho tem sido reconhecido como uma fonte excepcional de metabolitos secundários com atividades biológicas e farmacológicas variadas (Badria *et al.*, 1997).

Atualmente, vários autores têm demonstrado o elevado potencial dos glicosídeos triterpénicos, já mencionados, isolados de diferentes espécies de holotúrias. Estes compostos glicosídicos têm vindo a apresentar propriedades antifúngicas, anti-inflamatórias e citotóxicas num grande número de espécies (Chludil *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2007; Ismail *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram o potencial de inibição do crescimento de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, por parte dos extratos das três espécies de holotúrias, em ambas as frações orgânicas. Relativamente à levedura *S. cerevisiae*, observou-se que todos os extratos, em ambas as frações orgânicas, apresentaram um potencial de redução do crescimento da levedura, comparativamente ao controlo, sendo a espécie *Stichopus regalis*, fração metanólica, a que apresentou uma maior percentagem de redução do crescimento.

Não existe na literatura qualquer referência ao estudo da capacidade antifúngica de holotúrias contra *Saccharomyces cerevisiae*, pelo que qualquer tentativa de análise dos resultados poderá conter informações menos precisas para esta levedura. No entanto, tem sido demonstrado por vários autores, que as holotúrias contêm uma variedade de glicosídeos triterpénicos, também conhecidos como saponinas. Estas substâncias são responsáveis por um grande espetro de atividades biológicas, nomeadamente antifúngicas. A capacidade antifúngica tem sido associada à presença destas saponinas, na explicação dos resultados obtidos para espécies como *Holothuria edulis* e *Stichopus chloronotus*, para *Candida albicans* (Hing *et al.*, 2007), *Psolus patagonicus*, para *Cladosporium cladosporoides* (Careaga *et al.*, 2011), *Holothuria polii*, para *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans* (Ismali *et al.*, 2008), entre outros.

Relativamente a *Candida albicans*, foi também observado que todos os extratos apresentaram um potencial de redução do seu crescimento, sendo as espécies *Stichopus regalis* e *Holothuria forskali*, ambas da fração metanólica, a apresentarem as maiores percentagens de redução do crescimento relativamente ao controlo. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para a espécie *Holothuria forskali* e obtidos para a espécie *Stichopus regalis*, revelaram-se inferiores aos verificados por Hing e seus colaboradores (2007),

## Discussão e Conclusão

---

para as espécies *Holothuria edulis* e *Stichopus chloronotus*, contra *Candida albicans*.

Uma vez mais as saponinas presentes no corpo destas duas espécies de holotúrias foram associadas aos resultados observados o que poderá explicar os presentes resultados obtidos.

Abordagens alternativas no tratamento do cancro são importantes, devido ao número crescente de novos casos e ao facto de cada vez mais os tratamentos existentes serem ineficientes para uma doença que todos os anos é responsável por elevadíssimas taxas de mortalidade em todo o mundo. Atualmente, os processos de intervenção no combate aos mais variados tipos de cancro, frequentemente recorrem à cirurgia e quimioterapia, com o objetivo de eliminar os tecidos cancerígenos (Dong *et al.*, 2011). Além disso, tem havido um aumento gradual no número de medicamentos no combate ao cancro, que apresentam um período de efeito clínico (duração da ação do medicamento) curto, o que tem provado ser ineficiente, dada a reincidência da doença em alguns doentes. Portanto, há cada vez mais a necessidade urgente de procurar e desenvolver novos agentes anticancerígenos, que não só sejam seguros, mas que também apresentem uma eficácia comprovada a longo prazo (Shondi *et al.*, 2010; Wijesinghe *et al.*, 2013). Neste sentido, possíveis soluções são cada vez mais procuradas no ambiente marinho. As propriedades terapêuticas e os benefícios para a medicina provenientes das holotúrias estão relacionadas com a presença de uma grande variedade de compostos bioativos, especialmente, saponinas, sulfatos de condroitina, glicosaminoglicanos, polissacarídeos sulfatados, entre outros (Bordbar *et al.*, 2011).

A avaliação da viabilidade celular nas linhas celulares tumorais humanas em estudo revelou um efeito citotóxico associado às frações orgânicas (sendo a fração metanólica a que apresentou resultados mais potentes) da espécie *Holothuria forskali*. Estes foram ainda mais marcados quando a avaliação foi realizada pelo método de MTT, quando comparado com o método de calceína – AM. Foi ainda notória uma redução total (à concentração máxima de 1 mg ml<sup>-1</sup>) da viabilidade celular, na fração metanólica da espécie *Holothuria forskali*, revelada pelo método de MTT, para a linha celular tumoral humana MCF-7 (carcinoma da mama), enquanto para a linha celular HepG-2 (carcinoma hepatocelular do fígado), a redução foi de 91.30%, também pelo método de MTT.

O método de MTT caracteriza-se por uma ação direta nas desidrogenases mitocondriais, enquanto o método de calceína – AM traduz-se numa ação direta ao nível do citoplasma, pelo que, através dos resultados obtidos, é provável que tenha ocorrido uma ação direta dos extratos da espécie de holotúria ao nível mitocondrial.

Dos ensaios de dose – resposta efetuados, verificou-se que o extrato com maior potencial é o da espécie *Holothuria forskali*, na fração metanólica, para ambas as linhas celulares (sendo os resultados mais potentes para a linha celular MCF-7) e pelo método de MTT.

Os glicosídeos triterpénicos, também conhecidos por saponinas ou no caso das holotúrias, holoturinas e mais

## Discussão e Conclusão

---

precisamente holoturinosidas A, B, C e D, assim como desholoturina A, da espécie *Holothuria forskali*, foram das primeiras a serem reportadas na literatura, como sendo possuidoras de uma grande atividade antitumoral (Rodriguez *et al.*, 1991). Segundo estes autores, na linha celular P<sub>388</sub>, a holoturinosida A obteve uma potência de efeitos semelhante à obtida pelo nosso estudo. Segundo um estudo reportados por Van Dyck e seus colaboradores (2009), um número mais elevado de holoturinosidas, detetado por estes autores através de espectrometria de massa, e que revelaram também potentes atividades antitumorais.

Relativamente à espécie *Holothuria forskali*, é entendível a sua elevada capacidade antitumoral, atendendo ao facto desta ser uma espécie rica em diversos tipos de saponinas, como já foi referido. Aliado a este facto está o seu mecanismo de defesa, os Túbulos de *Cuverian*, que são expelidos aquando de situações de *stress* e por forma a proteger esta espécie de potenciais predadores. Estes, segundo Van Dyck e seus colaboradores (2009), possuem um maior número de saponinas do que as encontradas na parede do corpo desta espécie. Assim, e uma vez que esta espécie, das três em estudo, é a única a possuir *Túbulos de Cuverian*, é facilmente entendível os resultados observados.

Como já foi mencionado, os citotóxicos podem exercer atividade por mecanismos de indução de morte celular, por necrose ou apoptose, ou por bloqueio do ciclo celular. Deste modo, é fundamental tentar perceber não só a viabilidade celular, mas também o efeito dos extratos de holotúrias na proliferação celular.

Na avaliação do efeito dos extratos de holotúrias na proliferação celular de ambas as linhas celulares, pelos dois métodos em estudo, foram obtidos resultados mais proeminentes uma vez mais para a espécie *Holothuria forskali*, fração metanólica e pelo método de MTT. À semelhança do que tinha sido observado nos ensaios de viabilidade celular, nestes ensaios de proliferação celular (à concentração máxima de 1 mg ml<sup>-1</sup>) e para o método de MTT, para a linha celular MCF-7 a percentagem de inibição da proliferação celular foi total. Os ensaios de dependência de concentração, para a definição do IC<sub>50</sub>, revelaram uma vez mais que os efeitos são mais potentes para a linha celular MCF-7 pelo método de MTT.

Além do já mencionado para possível explicação dos resultados observados, no que diz respeito aos estudos de viabilidade celular, e que também se aplicam a este estudo de proliferação celular, outros estudos têm sido realizados por diversos autores no sentido de entender o efeito de várias espécies de holotúrias na proliferação celular de um vasto leque de linhas celulares tumorais humanas. Relativamente ao estudo efetuado por Althunibat e seus colaboradores (2009), para as espécies *Holothuria scabra*, *Holothuria leucospilota* e *Stichopus chloronotus*, relativamente ao efeito na proliferação celular das linhas C<sub>33A</sub> (carcinoma cervical) e A<sub>549</sub> (carcinoma pulmonar), foram obtidos os valores de IC<sub>50</sub> substancialmente mais baixos do que os resultados presentes neste estudo, principalmente para a espécie *Holothuria scabra*. Também neste estudo, a grande

## Discussão e Conclusão

---

diversidade de saponinas existentes, associado à presença de polissacarídeos sulfatados e glicoproteínas, foram tidos como os responsáveis pelos resultados observados.

- Holotúrias, um novo recurso alimentar de alto valor nutricional

Os ácidos gordos são essenciais à vida, devido ao seu papel crucial como fonte de energia, constituintes das membranas plasmáticas, assim como mediadores do metabolismo e sinalização. Devido ao seu impacto positivo sobre a saúde humana, fontes alternativas de PUFA têm sido associadas ao consumo de organismos marinhos (Pereira *et al.*, 2013).

O consumo de holotúrias é cada vez mais popular em todo o mundo, especialmente na região asiática, sendo que a comercialização de várias espécies está a aumentar (Lovatelli *et al.*, 2004). É do conhecimento geral, que os sedimentos contêm um nível elevado de ácidos gordos de cadeia ramificada, que se acredita serem de origem bacteriana (Graeme *et al.*, 1988). Uma vez que muitas holotúrias se alimentam de sedimentos presentes no fundo, é de esperar que estes organismos contenham elevados teores em ácidos gordos (Yahyavi *et al.*, 2012). Segundo um estudo efetuado por Chen (2004), sob o ponto de vista nutricional, as holotúrias são um alimento ideal a incluir nas dietas devido ao seu grande valor nutritivo, uma vez que contêm altos níveis de proteínas e baixos níveis de gordura, do que a maioria dos alimentos.

No presente estudo, a percentagem de gordura total obtida para *Holothuria forskali*, *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis* foi maior que para outras espécies tropicais. Segundo um estudo efetuado recentemente por Aydin e seus colaboradores (2011), para as espécies existentes no Mar da Turquia, incluindo a espécie *Holothuria mammata*, os autores obtiveram para esta espécie uma percentagem de gordura total substancialmente mais baixa que os valores obtidos no presente estudo. Tal facto pode ser explicado devido a variações sazonais no comportamento alimentar e variações geográficas (Chang – Lee *et al.*, 1989) e, segundo Ozer e seus colaboradores (2004), os processos de manuseamento também são passíveis de afetar a composição química das holotúrias. Apesar de no estudo de Aydin e seus colaboradores (2011) não ser referido a época do ano em que foram realizadas as amostragens, no presente estudo, todas as holotúrias foram recolhidas, para esta análise, no período outono/inverno. Como é sabido, e particularmente na região de Peniche, esta é uma altura de forte agitação marítima, pelo que as holotúrias tendem a refugiar-se por debaixo de rochas e pedras, apenas saindo destes refúgios quando as condições marítimas melhoram. Assim, estas tendem a armazenar nos seus corpos a gordura necessária às suas funções básicas, daí uma possível explicação para a diferença de resultados alcançados. É importante também referir que, relativamente à espécie *Holothuria forskali* e *Holothuria mammata*, estas apresentam um longo período de maturação das gónadas, como já foi referido. A maturação das gónadas exige comportamentos metabólicos



## Discussão e Conclusão

---

específicos, nomeadamente ao nível de maiores reservas de gordura. Por este motivo, este facto pode também ter contribuído para os resultados observado e, é importante ter em atenção que o Mar da Turquia, que está interligado com o Mar Mediterrâneo, é caracterizado por água calmas e relativamente quentes o ano inteiro.

Relativamente à espécie *Stichopus regalis*, não existe na literatura nenhum estudo relativo à quantificação da sua gordura total. No entanto, um estudo realizado por Betchel e seus colaboradores (2012) para a espécie do Alaska *Parastichopus californicus*, pertencente ao mesmo grupo que *Stichopus regalis* demonstrou que esta possuiu uma percentagem de gordura total elevada. Os autores atribuíram esta elevada percentagem de gordura, ao facto da possível presença de compostos não lipídicos, como por exemplo pigmentos e hidratos de carbono complexos, assim como possíveis moléculas lipídicas associadas a proteínas, sob a forma de lipoproteínas, cuja metodologia de extração apresenta diferenças. A explicação dada por estes autores é passível de também estar associada aos elevados resultados obtidos na percentagem de gordura total das três espécies em estudo, tendo em conta que Chang – Lee e seus colaboradores (1989) definiram um intervalo geral de percentagem de gordura total nas holotúrias de 0.1 – 0.9%.

No estudo realizado por Pereira e seus colaboradores (2013), a espécie *Holothuria forskali* (recolhida na região de Peniche) apresentou um conteúdo em ácido palmítico (C16:0) inferior ao observado no presente estudo, assim como um conteúdo em ARA também inferior. Tal discrepância poderá ser explicada devido às diferentes altura do ano em que ocorreram as capturas. Relativamente ao estudo realizado por Aydin e seus colaboradores (2011), para a espécie *Holothuria mammata*, este apresentou uma percentagem total de ácidos gordos saturados inferiores à do presente estudo. No entanto, as percentagens totais de ácidos gordos monoinsaturados e ácidos gordos polinsaturados, para *Holothuria mammata* da costa de Peniche, foram inferiores ao verificado por Aydin e seus colaboradores (2011). Uma vez mais estas discrepâncias de resultados podem ser explicadas pelo que já foi anteriormente reportado por Chan – Lee e seus colaboradores (1989) e por Ozer e seus colaboradores (2004).

Segundo Croft e seus colaboradores (1987), o alto conteúdo em EPA está associado, na espécie *Stichopus chloronotus*, à reparação de tecidos, dado que este ácido exerce a sua função através de prostaglandinas. No entanto, uma vez que é um ácido gordo de cadeia longa, não é sintetizado naturalmente pelas holotúrias, mas é adquirido por estas através da alimentação por microalgas presentes na coluna de água e que são ricas em EPA, DHA e ARA. Quanto à espécie *Stichopus regalis*, os resultados presentes neste estudo são superiores aos observados por Wen e seus colaboradores (2010), para várias espécies de holotúrias incluindo a espécie *Stichopus herrmanni*, pertencente ao mesmo género que a espécie em causa. Segundo este estudo, a espécie *S. herrmanni*, apresentou níveis muito baixos de EPA, DHA e ARA. Os elevados valores de ácido araquidónico presente nas três espécies em estudo, constitui um resultado importante uma vez

## Discussão e Conclusão

---

que este ácido é responsável pelo combate a inúmeras doenças, como hipertensão arterial, asma, coagulação sanguínea, entre outras. É por esta razão que a espécie *Stichopus chloronotus* tem sido largamente utilizada no tratamento contra cortes e feridas na região asiática (Lo, 2005).

A razão n-3/n-6 é um fator importante na determinação da qualidade lipídica (Piggot e Tucker, 1990). Vários estudos clínicos têm demonstrado que altos valores da razão n-3/n-6 têm resultado num aumento da proteção contra doenças degenerativas e cardiovasculares (Russo, 2009; Smith *et al.*, 2009). Além disso, os produtos tradicionais europeus para a alimentação humana apresentam uma razão n-3/n-6 de aproximadamente 15 a 17/1. Isto é principalmente devido ao baixo consumo de alimentos provenientes do mar e ao aumento do consumo de alimentos ricos em ácidos gordos n-6, provenientes de óleos vegetais. Como consequência, as dietas ocidentais são deficientes em ácidos gordos n-3, pelo que a Organização Mundial de Saúde (OMS) atualmente recomenda o consumo de uma proporção equilibrada de ácidos gordos n-3 e n-6, em que a razão n-3/n-6 não deve ser superior a 10 na dieta (Stabili *et al.*, 2012. Segundo o relatório da FAO (2004), a razão n-3/n-6 deve estar entre 1:8 e 2:5. Assim, uma vez que as razões obtidas para as três espécies foram de 0.463; 0.483 e 1.078, para *Holothuria forskali*, *Holothuria mammata* e *Stichopus regalis*, respetivamente e que são concordantes com o observado para outras espécies tropicais (Orazen *et al.*, 2008), é possível afirmar que estas possuem benefícios para a saúde humana, do ponto de vista nutricional.

Em suma, este estudo permitiu obter valiosos conhecimentos sobre o potencial cultivado em aquacultura e uso na biotecnologia, das três espécies existentes na costa de Peniche. Através do estudo da biologia reprodutiva das espécies *Holothuria forskali* e *Holothuria mammata*, conseguiu-se perceber que possivelmente a altura ideal para a indução da postura é nos meses que antecedem a primavera e durante a primavera (fevereiro – abril). No entanto, há que referir que durante todo o ano é possível encontrar indivíduos com a gónada madura. A nível das análises biotecnológicas efetuadas, estas revelaram uma reduzida capacidade antioxidante e antibacteriana (há exceção da espécie *Holothuria forskali*, fração diclorometano, para *S. aureus*) das espécies em estudo. No entanto, foram obtidos resultados promissores nas análises antifúngicas realizadas para *Candida albicans*, com as espécies *Holothuria forskali* e *Stichopus regalis*, fração metanólica a apresentarem resultados interessantes. Também na capacidade citotóxica, importantes resultados foram alcançados nas linhas celulares MCF-7 e HepG-2, ao ser revelado que tanto na viabilidade celular como na proliferação celular, a espécie *Holothuria forskali*, fração metanólica, demonstrou um elevado potencial. Por último, a quantificação da gordura total, perfil em ácidos gordos e a razão n-3/n-6, demonstrou o potencial das holotúrias em estudo para a dieta humana, dados os seus baixos teores em gordura total e elevadas percentagens em ácidos

## Discussão e Conclusão

---

gordos essenciais (EPA, DHA e ARA) e a razão n-3/n-6 adequada. Embora estes sejam resultados preliminares e sejam necessários mais estudos, este trabalho demonstra o grande potencial das holotúrias da costa de Peniche, outrora desconhecido.



**Perspetivas Futuras**



## Perspetivas Futuras

---

Os resultados obtidos neste trabalho experimental revelaram grandes potencialidades das holotúrias da costa de Peniche, tanto como uma nova espécie de cultivo em aquacultura, como excelentes fontes de compostos bioativos, com importantes aplicações na indústria farmacêutica. No entanto, estes são apenas as primeiras pistas, para o início de um longo trabalho de investigação.

Relativamente às análises histológicas efetuadas seria interessante realizar apenas a biópsia das gónadas, permitindo não só identificar claramente o sexo dos indivíduos, como também evitar-se a elevada mortalidade observada. O mês de novembro de 2012 revelou ser um mês de forte agitação marítima, o que resultou na libertação precoce das gónadas, por parte da espécie *Holothuria forskali*. Uma vez que é sabido que esta espécie apresenta um longo período de maturação da gónada, seria interessante fazer um estudo mais alargado de 2 ou mais anos, para se comprovar, com toda a certeza, esta tendência para a população de Peniche.

Com os resultados obtidos através da biologia reprodutiva, seria do máximo interesse tentar fazer o cultivo das 2 espécies em aquacultura, sendo igualmente interessante avaliar o efeito de dietas alimentares, parâmetros abióticos, indução de postura, entre outros, no crescimento e desenvolvimento das holotúrias.

No que diz respeito às análises biotecnológicas efetuadas, o facto de não se conhecer com precisão as moléculas presentes nas diferentes holotúrias, torna este trabalho um desafio, obrigando à aplicação das mais diversificadas técnicas analíticas, à medida que se vão obtendo resultados. Uma vez que não foram observadas capacidades antioxidantes significativas, e sabendo que as holotúrias são expostas a altos níveis de UV, seria interessante testar esta capacidade para outras substâncias com propriedades antioxidantes já conhecidas. Por outro lado, relativamente às análises antimicrobianas efetuadas, seria provavelmente uma mais-valia, aumentar o número de bactérias e fungos, nomeadamente aqueles que são patogénicos para o homem a fim de observar potenciais propriedades.

As análises efetuadas à capacidade citotóxica das holotúrias apresentaram resultados bastante promissores. Assim, seria não só interessante testar os mesmos efeitos para um maior número de linhas celulares, como também efetuar a extração dos compostos bioativos com diferentes solventes, de modo a perceber se existe alguma interação. Também será de todo uma mais-valia, identificar as moléculas ou os compostos responsáveis pelos resultados alcançados.

Por último, relativamente ao perfil lipídico, seria uma mais-valia, avaliar a variação sazonal da gordura total e perfil em ácidos gordos, assim como descrever a composição nutricional ao nível das proteínas, hidratos de carbono, teor em água e cinzas.

## Perspetivas Futuras

---

Desta forma e tendo em conta os resultados obtidos, é extremamente pertinente a continuidade deste trabalho de investigação, especialmente no que diz respeito à identificação das moléculas bioativas e cultivo em aquacultura. Este será provavelmente, o maior desafio futuro, mas também uma janela de oportunidades, para desenvolver trabalhos científicos relevantes e de elevada qualidade.

## **Bibliografia**



## Bibliografia

---

- Abdille, M.D., Singh, R., Jayaprakasha, G., Jena, B. (2005). Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chemistry*, **90:891-896**.
- Abraham, T.J., Nagarajan, J., Shanmugann, S.A. (2002). Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. *Indian Journal of Marine Sciences*, Vol. **31(2)**, pp. **161–164**.
- Althunibat, O-Y., Hashim, R.B., Haher, M., Daud, J.M., Ikeda, M-A., Zali, B.I. (2009). *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *European Journal of Scientific Research*, Vol. **37(3)**, pp. **376–387**.
- Anderson, S.C., Flemming, J.M., Watson, R., Lotze, H.K. (2011). Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish and Fisheries*, **12:317–339**.
- Asha, P.S., Muthiah, P. (2007). Growth of the hatchery produced juveniles of commercial sea cucumber *Holothuria (Theelothuria) spinifera theel*. *Aquaculture Research*, **38:1082–1087**.
- Asha, P.S., Muthiah, P. (2008). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* (Echinodermata: Holothuroidea) from Tuticorin, Tamil Nadu, India. *Aquaculture Int.*, **16:231–242**.
- Aydin, M. (2008). The commercial sea cucumber fishery in Turkey. *SPC Bêche – de – mer Information Bulletin*, **28:40–41**.
- Aydin, M., Sevgili, H., Tufan, B., Emre, Y., Kose, S. (2011). Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, **46:500–508**.
- Badria, F.A., Guirguis, A.N., El – Nagger, W.A. (1997). Antibacterial and antifungal agents from Egyptian marine organisms. *International Journal of Pharmacology*, **4:284-287**.
- Ballantine, D.L., Gerwick, W.H., Velez, S.M., Alexander, E., Guevara, P. (1987). Antibiotic activity of lipid – soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia*, **151/152:463-469**.
- Bandarra, N., Nunes, M., Andrade, A., Prates, J., Pereira, S., Monteiro, M., Rema, P., Valente, L. (2006). Effect of dietary conjugated linoleic acid on muscle, live and visceral lipid deposition in rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **254:496–505**.
- Battaglione, S.C. (1999). Culture of tropical sea cucumbers for stock restoration and enhancement. *Naga, The ICLARM Quarterly*, Vol. **22, No.4.**, **4-11**.
- Battaglione, S.C., Bell, J.D. (2004). The restocking of sea cucumbers in the Pacific Islands. Pp: **109 – 132**. In: Marine ranching. Bartley, D.M., Leber, K.M. (eds). *FAO Fishery Technical Paper No. 429*. Rome, **222 pp**.
- Beauregard, K.A., Truong, N.T., Zhang, H., Lin, W., Beck, G. (2001). The detection and isolation of a novel antimicrobial peptide from the echinoderm, *Cucumaria frondosa*. *Phylogenetic perspectives on the Vertebrate Immune System*, Kluwer Academic Plenum Publishers, pages **55-56**.
- Bell, J.D., Purcell, S.W., Nash, W.J. (2008). Restoring small – scale fisheries for tropical sea cucumbers. *Ocean and Coastal Management*, **51:589–593**.
- Betchel, P.J., Oliveira, A.C.M., Demir, N., Smiley, S. (2012). Chemical composition of the giant red sea cucumber, *Parastichopus calicornicus*, commercially harvested in Alaska. *Food Science and Nutrition*, **63-73**.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37:911–917**.

## Bibliografía

---

- Bordbar, S., Anwar, F., Saari, N. (2011). High – value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods – A review. *Marine Drugs*, **9:1761–1805**.
- Borrero – Pérez, G.H., González – Wanguemert, M., Marcos, C., Pérez – Ruzafa, A. (2011). Phylogeography of the Atlanto – Mediterranean sea cucumber *Holothuria (Holothuria) mammata*: the combined effects of historical processes and current oceanographical pattern. *Molecular ecology*, **1365–1371**.
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, **14:303-311**.
- Careaga, V.P., Munian, C., Maier, M.S. (2011). Patagonicosides B and C, two antifungal sulphated triterpene glycosides from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. *Chemistry and Biodiversity*, Vol. **8**, pp. **467–475**.
- Castell, J.V., Gómez – Lechón, M.J. (1997). *In vitro* Methods in Pharmaceutical Research. Academic Press. California, United States of America. Pp. **136 – 151**.
- Celikler, S., Vatan, O., Yildiz, G., Bilaloglu, R. (2009). Evaluation of anti – oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, **47:796-801**.
- Chang-Lee, M.V., Price, R.J., Lampila, L.E. (1989). Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumbers (*Parastichopus spp.*). *Journal of Food Science*, **54:567-572**.
- Chen, J. (2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. Pp. **25–38**. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J-F., Mercier, A. (eds) Advances in sea cucumber Aquaculture and Management. *FAO, Rome, Fisheries Technical Paper No. 463–425* pp.
- Chen, S.G., Li, G.Y., Yin, L.A., Huang, W.C., Dong, P., Xu, J., Chang, Y.G., Xue, C.H. (2010). Identification of eight species of sea cucumber chondroitin sulfates by high temperature. *J. Instrum. Anal.*, **29–8**.
- Chludil, H.D., Muniain, C.C., Selder, A.M., Maier, M.S. (2002). Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the Pantagonian sea cucumber, *Hemoiedema spectabilis*. *Journal of Natural Products*, **65:860-865**.
- Conand, C. (1990). The fishery resources of Pacific Island Countries. Part 2: Holothurian. *FAO Fisheries Technical Paper, Rome, 272(2):143 pp*.
- Conand, C. (1993). Reproductive biology of the holothurians from the major communities of the New Caledonia lagoon. *Marine Biology*, **116:439–450**.
- Conand, C. (2004). Present status of world sea cucumber resources and utilization: as international overview. Pp. **13–24**. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J-F., Mercier, A. (eds) Advances in sea cucumber Aquaculture and Management. *FAO, Rome, Fisheries Technical Paper No. 463–425* pp.
- Costelloe, J. (1985). The annual reproductive cycle of the holothurian *Aslia lefevrei* (Dendrochirota: Echinodermata). *Marine Biology*, **88:155-165**.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12:564-582**.
- Croft, K.D., Beilin, L.J., Legge, F.M., Vandongen, R. (1987). Effect of diets enriched in eicosapentaenoic or docosahexanoic acids on prostanoid metabolism in the rat. *Lipids*, **22(9):647-650**.



## Bibliografia

---

- Dávalos, A., Gómez – Cordovés, C., Bartolome, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC – fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.*, **52:48–54**.
- Dong, H., Bai, L.P., Wong, V.K.W., Zhou, H., Wang, J.R., Liu, Y. (2011). The *in vitro* structure – related anticancer activity of Ginsenosides and their derivatives. *Molecular*, **16:10619-10630**.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fraction from a red algae, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, **95:37–43**.
- FAO. (2012). The State of World Fisheries and Aquaculture. *FAO Fisheries Department*. Rome, Italy. **218** pp.
- Friedman, K., Eriksson, H., Tardy, E., Pakoa, K. (2011). Management of sea cucumber stocks: Patterns of vulnerability and recovery of sea cucumber stocks impacted by fishing. *Fish and Fisheries*, **12:75–93**.
- Graeme, A., Dunstan, A.J., Sinclair, K., Naughton, J.M. (1988). The lipid content and fatty acid composition of various marine species from Southern Australian Coastal waters. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91(1):165-169**.
- Hamel, J., Himmelman, J.H., Dufresne, L. (1993). Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). *Biology Bulletin*, **184:125–143**.
- Hing, H.L., Kaswandi, M.A., Azraul – Mumtazah, R., Hamidah, S.A., Shalan, A.Z., Normalawati, S., Samsudin, M.W., Ridzwan, B.H. (2007). Effect of *methanol extracts from sea cucumber Holothuria edulis and Stichopus chloronotus on Candida albicans*. *Microsc. Microan.*, **13 (Suppl.2)**.
- Hua, H., Ling, L.I., Yang – Hua, Y.I., Xiao – Ha, W., Min – Xiang, P. (2012). Triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria scabra* with cytotoxic activity. *Chinese Herbal Medicines*, **4(3):183-188**.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50:4437-4444**.
- Ismail, H., Lemriss, S., Ben Aoun, Z., Mhadhebi, L., Dellai, A., Kacem, Y., Boirom, P., Bouraoui, A. (2008). Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. *Journal of Mycologie*, **18:23-26**.
- Ivy, G., Azari, D., Giraspy, B. (2006). Development of large scale hatchery production techniques for the commercially important sea cucumber *Holothuria scabra* var. *versicolor* (Conand, 1986) in Queensland, Australia. *SPC Bêche – de – mer Information Bulletin*, **24:28–34**.
- Jawahar, A.T., Nagarajan, J., Shanmugam, S.A. (2002). Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. *Indian Journal of Marine Sciences*, **31:161-164**.
- Kijjoa, A., Sawangwong, P. (2004). Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*, **2:73–82**.
- Kumar, R., Chaturuedi, A.K., Shukla, P.K., Lakshmi, V. (2007). Antifungal activity in triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinopyga lecanora*. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **17:4387-4391**.
- Lambert, P.A. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in *gram* positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology, Symposium Supplement*, **92:46-54**.

## Bibliografia

---

- Lepage, G., Roy, C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one – step reaction. *Journal of Lipid Research*, **27:114–120**.
- Liu, Z., Oliveira, A.C.M., Su, Y.C. (2010). Purification and characterization of pepsin – solubilized collagen from skin and connective tissue of Giant red sea cucumber *Parastichopus californicus*. *J. Agric. Food. Chem.*, **58:1270–1274**.
- Lo, T.H. (2005). Valuation of sea cucumber attributes through laddering. *SPC Bêche – de – mer*, **20:34–37**.
- Lovatelli, A., Conand, C. (2004). Advances in sea cucumber aquaculture and management. *FAO Fisheries Technical Paper*, Rome, **463, 425 pp**.
- Mamelona, J., Pelletier, E. (2010). Producing high antioxidant activity extracts from Echinoderm by-products by using pressured liquid extraction. *Biotechnology*, **9(4):523-528**.
- Mamelona, J., Pelletier, E., Girard – Lalancette, K., Legault, J., Karboune, S., Kernasha, S. (2007). Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, **104:1040–1047**.
- Mamelona, J., Pelletier, E., Girard – Lalancette, K., Legault, J., Kermasha, S. (2010). Antioxidants in digestive tract and gonads of green urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Journal of Food Composition and Analysis*. **110:98–108**.
- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P. (2001). Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese – Gottlieb, Bligh and Dyer, and modified Bligh and Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, **14:93–100**.
- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E., Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, **9:29-35**.
- Mayachiew, P., Devahastin, S. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT – Food Science and Technology*, **41: 1153 – 1159**.
- Mayer, A.M.S., Gustafson, K.S. (2008). Marine Pharmacology in 2005 – 2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer*, **44: 2357 – 2387**.
- McEuen, F.S., Chia, F.S. (1991). Development and metamorphosis of two Psolid sea cucumbers, *Psolus chitonoides* and *Psolidium bullatum*, with a view of reproductive patterns in the family Psolidae (Holothuroidea: Echinodermata). *Marine Biology*, **109:267–279**.
- Morgan, A.D. (2000). Aspects of the reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea). *Bulletin of Marine Science*, **66(1):47–57**.
- Muthiga, N.A., Kawaka, J.A., Ndirangu, S. (2009). The timing and reproductive output of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* on the Kenyan coast. *Estuarine, coastal and Shelf Science*, **84:353–360**.
- Navarro, P.G., García – Sanz, S., Tuya, F. (2012). Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). *Scientia Marina*, **76(4):741–752**.
- Ochiewo, J., de la Torre – Castro, M., Muthama, C., Munyi, F., Nthuta, J.M. (2010). Socio – economic features of sea cucumber fisheries in Southern coast of Kenya. *Ocean and Coastal Management*, **53:192–202**.
- Onofrejevová, L., Vasícková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Misurcová, L., Krácmár, S., Kopecký, J., Vacek, J. (2010). Bioactive phenols in algae: The application of pressurized – liquid and solid phase separation

## Bibliografia

---

- techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51:464–470**.
- Ozer, N.P., Mol, S., Varlik, C. (2004). Effect of the handling procedures on the chemical composition of sea cucumber. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **4:71-74**.
  - Pereira, D.M., Valentão, P., Teixeira, N., Andrade, P.B. (2013). Amino acids, fatty acids and sterols profile of some marine organisms from Portuguese waters. *Food Chemistry*, **141:2412-2417**.
  - Piggott, G.M, Tucker, B.W. (1990). Seafood: effects of technology on nutrition. N.Y.: *Marcel Dekker, Inc.* pp. **221–228**.
  - Prior, R.C., Cao, G. (1999). *In vitro* total antioxidante capacity: comparison of diferente analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.*, **27:1173-1181**.
  - Projeto CUMFISH, financiado pela FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia), ao abrigo do CCMAR no Algarve (Centro de Ciência do Mar, pertencente à Universidade do Algarve), tendo como coordenadora do projeto a Doutora Mercedes González – Wanguemert (e-mail: [mwanguemert@ualg.pt](mailto:mwanguemert@ualg.pt)). [www.ccmар.ualg.pt/cumfish/index.html](http://www.ccmар.ualg.pt/cumfish/index.html). Acedido a 26 - 01 – 2013 às 18:05.
  - Purcell, S.W., Hair, C.A., Mills, D.J. (2012). Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: Progress, problems and opportunities – a review. *Aquaculture*, **368–369:68–81**.
  - Purcell, S.W., Samyn, Y., Conand, C. (2012). Commercially important sea cucumbers of the World. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No.6*, **190 pp**.
  - Ramofafia, C., Battaglène, S.C., Bell, J.D., Byrne, M. (2000). Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. *Marine Biology*, **136:1045-1056**.
  - Ramofafia, C., Battaglène, S.C., Byrne, M. (2001). Reproductive biology of *Actinopyga mauritiana* (Echinodermata: Holothuridae) in the Solomon Islands. *Journal of Marine Biology Association*, **81:523–531**.
  - Ramofafia, C., Byrne, M., Battaglène, C.S. (2003). Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. *Marine Biology*, **142:281–288**.
  - Ramón, M., Leonart, J., Massutí, E. (2010). Royal cucumber (*Stichopus regalis*) in the northwestern Mediterranean: Distribution pattern and fishery. *Fisheries Research*, **105:21–27**.
  - Rasolofonirina, R., Vaitilingon, D., Eeckhaut, I., Jangoux, M. (2005). Reproductive cycle of edible echinoderms from the Southwestern Indian Ocean. II: The sandfish *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833) Western Indian Ocean. *Journal of Marine Sciences*, **4(1):61–75**.
  - Reichenbach, N. (1999). Ecology and fishery biology of *Holothuria fuscogilva* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Maldives, Indian Ocean. *Bulletin of Marine Sciences*, **64:103-113**.
  - Rodriguez, J., Castro, R., Riguera, R. (1991). Holothurinosides: New antitumor non sulphated triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Tetrahedron*, **47:4753-4762**.
  - Rotter, B.A., Thompson, B.K., Clarkin, S., Owen, T.C. (1993). Rapid colorimetric bioassay for screening of fusarium mycotoxins. *Natural toxins*, **1: 303 – 307**.
  - Russo, G.L. (2009). Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology*, **77:937–46**.
  - Saldanha, L. (1995). Fauna Submarina Atlântica, 4ª edição. *Publicações Europa – América*, **pág. 223**.

## Bibliografia

---

- Shahidi, F. (2006). Maximizing the value of marine by – products. *Woodhead Publishing Ltd.*, Cambridge, UK, **pp:460**.
- Shiell, G.R., Uticke, S. (2006). Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria whitmaei* (Holothuroidea: Aspidochirotida) in the Indian and Pacific Ocean regions of Australia. *Marine Biology*, **148–973–986**.
- Shondi, S.M., Singh, J., Rani, R., Gupta, P.P., Agrawel, S.K., Saxena, A.K. (2010). Synthesis, anti – inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. *European Journal Medicinal Chemistry*, **45:555-563**.
- Sicuro, B., Levine, J. (2011). Sea cucumber in the Mediterranean: A potential species of aquaculture in the Mediterranean. *Review in Fisheries Science*, **19(3):299–304**.
- Smiley, F.S., McEuen, F.S., Chaffe, C., Krishman, S. (1991). Echinodermata: Holothuroidea. In: Giese, A., Pearse, J., Pearse, V.B. (eds) Reproduction of marine invertebrates, Vol. VI, *Echinoderms and Lophophorates*, *Boxwood Press*, Pacific Grove, C.A., **pp. 663–750**.
- Smit, L., Mozaffarian, D., Willett, W. (2009). Review of fat and fatty acid requirements and criteria for developing dietary guidelines. *Annual Nutritional Metabolism*, **55:44–55**.
- Sofidiya, M.O., Odukoya, O.A., Afolayan, A.J., Familoni, O.B. (2009). *Natural product research*, **23(2):168–177**.
- Spiteller, G. (2003). Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med. Hypotheses*, **60:69-83**.
- Stabili, L., Acquaviva, M.I., Biandolino, F., Cavallo, R.A., De Pascali, S.A., Fanizzi, F.P., Narracci, M., Petrocelli A., Cecere E. (2012). The lipidic extract of the seaweed *Gracilariopsis longissima* (Rhodophyta, Gracilariales): a potential resource for biotechnological purposes? *New Biotechnology*, **29(3):443–50**.
- Stern, J.L., Hagerman, A.E., Steinberg, P.D., Mason, P.K. (1996). Phlorotannin – Protein interactions. *Journal of Chemical Ecology*, **22(10):1878–1899**.
- Su, X., Xu, C., Li, Y., Gao, X., Lou, Y., Ding, J. (2011). Antitumoral activity of Polysaccharides and saponin extracted from sea cucumber. *Clinical and Cellular Immunology*, **2:1**.
- Toral – Granda, M.V., Martínez, P.C. (2007). Reproductive biology and population structure of the sea cucumber *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) (Holothuroidea) in Caamaño, Gálapagos Islands, Ecuador. *Marine Biology*, **151:2091–2098**.
- Tuwo, A., Conand, C. (1992). Reproductive Biology of the holothuriam *Holothuria forskali* (Echinodermata). *J. mar. biol. Ass.*, **72:745–758**.
- Underwood, A.J. (1997). *Experiments in Ecology: Their logical Design and Interpretation using Analysis of Variance*, Cambridge University Press.
- Van Dyck, S., Gerbaux, P., Flammang, P. (2009). Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **152:124-134**.
- Van Dyck, S., Gerbaux, P., Flammang, P. (2010). Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean. *Marine Drugs*, **8:173–189**.
- Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., Heuck, C.C. (2003). *Basic laboratory procedures in Clinical Bacteriology*. *World Health Organization*, Geneva.

## Bibliografia

---

- Vannuccini, S. (2004). Sea cucumbers: A compendium of fishery statistics, pp. 339 – 345. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J-F., Mercier, A. (eds) *Advances in sea cucumber Aquaculture and Management*. FAO, Rome, *Fisheries Technical Paper No. 463 – 425 pp.*
- Wang, Z., Zhang, H., Yuan, W., Gong, W., Tang, H., Liu, B., Krohn, K., Li, L., Yi, Y., Zhang, W. (2012). Antifungal nortriterpene and triterpene glycosides from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Food Chemistry*, **132:295-300**.
- Wen, J., Hu, C., Fan, S. (2010). Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *J. Sci. Food Agric.*, **90:2469–2474**.
- Wijesinghe, W.A.J.P., Jeon, Y.J., Ramasamy, P., Wahid, M.E.A., Vairappan, C.S. (2013). Anticancer activity and mediation of apoptosis in human HL-60 Leukaemia cells by edible sea cucumber (*Holothuria edulis*) extract. *Food Chemistry*, **139:326-331**.
- WorMS (World Register of Marine Species): [www.marinespecies.org](http://www.marinespecies.org). Acedido a 26 – 01 – 2013, às 18:14.
- Yahyavi, M., Afkhami, M., Javadi, A., Ehsanpour, M., Khazaali, A., Khoshnood, R., Mokhlesi, A. (2012). Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilota* from Qeshm Island (Persian Gulf). *African Journal of Biotechnology*, **Vol. 11(12),pp.2862–2869**.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50:1619–1624**.
- Yuan, Y.V., Walsh, N.A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*, **44:1144–1150**.
- Zar, J.H. (2009). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 5th edition.
- Zhang, S-Y., Yi, Y-H., Tang, H-F. (2006). Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria fuscocinifera*. *Journal of Natural Products*, **69:1492–1495**.
- Zhong, Y., Muhammad, A.K., Shahidi, F. (2007). Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55:1188–1192**.

**Anexos**



# Anexo I

## ➤ Processamento de Amostras

### **1. Fixação**

- Fixadores: formol tamponado.
- As peças permanecem no fixador 2 dias.

### **2. Desidratação e Inclusão em Parafina**

Processador de tecidos: a sequência de processamento é a seguinte, de acordo com as dimensões das peças:

- 1- álcool a 30% - 2 a 4 horas
- 2- álcool a 50%- 2 a 4 horas
- 3- álcool a 70% - 2 a 4 horas
- 4- álcool a 96% - 2 a 4 horas
- 5- álcool a 100% - 4 a 6 horas
- 6- álcool a 100% - 6 a 8 horas
- 7 – xilol I – 4 horas
- 8 – xilol II (50% xilol + 50% parafina estufa 58º-60º) – 10 horas
- 9 – parafina líquida – 12 a 18 horas

A sequência de processamento anterior tem o objectivo de desidratar os tecidos passando por uma concentração crescente de alcóois, aclarar os tecidos em xilol e incluir a parafina nos tecidos.

Após a inclusão as peças são incorporadas em blocos de parafina, com orientação desejada, com um dispensador de parafina e uma placa fina.

### **3. Cortes Histológicos**

Os cortes dos blocos de parafina são realizados com uma espessura de 8 micras no micrótomo. Estes cortes são colocados em lâminas limpas. Os cortes colocados nas lâminas são esticados com uma camada de água destilada e posteriormente são introduzidos na estufa a 37°C até a coloração ser realizada.

## **Anexo II**

### ➤ Coloração com Hematoxilina – Eosina

#### **Desparafinação e Re-hidratação I :**

- 1- Histolemon.....5 minutos;
  - 2- Histolemon.....5 minutos;
  - 3- Álcool a 100%.....5 minutos;
  - 4- Álcool a 100%.....5 minutos;
  - 5- Álcool a 85%.....5 minutos;
  - 6- Álcool a 70%.....5 minutos;
  - 7- Álcool a 50%.....5 minutos;
  - 8- Água destilada.....5 minutos.
- 
- 9 - Hematoxilina de Harris.....5 minutos
  - 10 - Eosina.....3 minutos

#### **Desidratação I:**

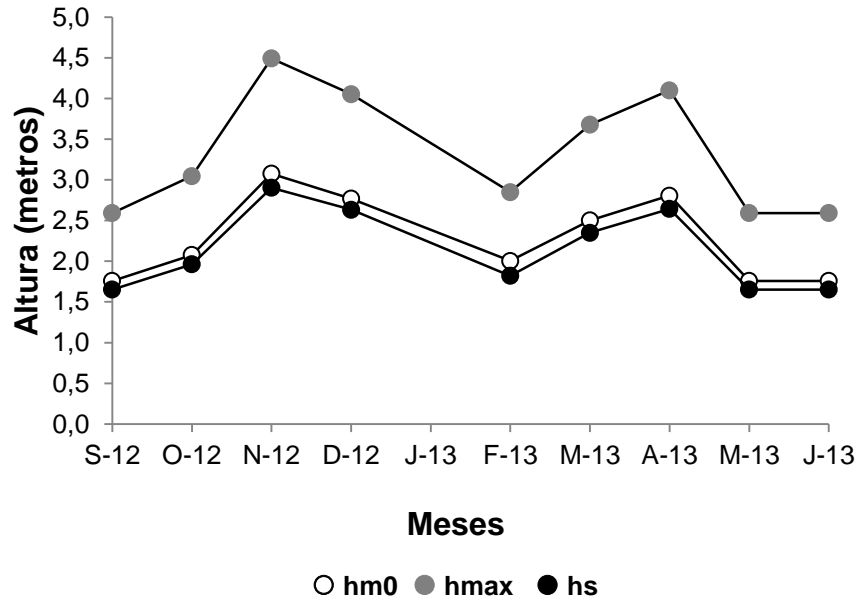
- 11- Álcool a 70%.....1 minuto;
- 12- Álcool a 85%.....1 minuto
- 13- Álcool a 100%.....1 minuto;
- 14- Álcool a 100%.....1 minuto;
- 15- Histolemon.....5 minutos;
- 16- Histolemon.....5 minutos.

No final do processo anterior procede-se à montagem definitiva das lâminas com DPX (Difco) (cola) e deixam-se a secar durante pelo menos 48 horas.

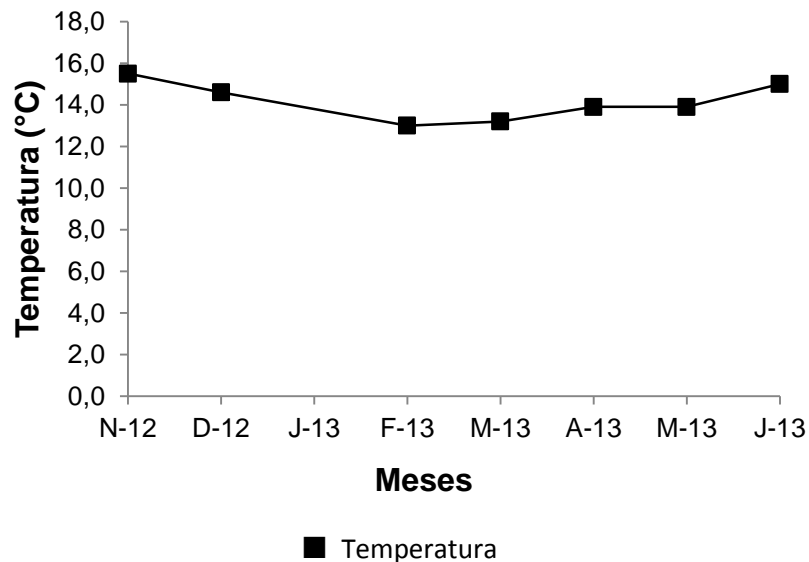


## Anexo III

➤ Dados sobre a Agitação Marítima e Temperatura superficial da Água



**Figura 32.** Dados sobre a Agitação marítima média em Peniche durante o período experimental, cedidos pelo Instituto do Mar e da Atmosfera (IPMA). **hm0**: altura significativa (metros), **hmax**: altura máxima (metros), **hs**: altura significativa (zero ascendente) (metros).



**Figura 33.** Dados sobre a Temperatura superficial média da Água do mar da estação da Nazaré durante o período experimental, cedidos pelo Instituto do Mar e da Atmosfera (IPMA).

## Anexo IV

No software do cromatógrafo gasoso foram adicionadas as seguintes condições de operação:

### **1. Forno:**

- a. Temperatura inicial: 60°C durante 1 minuto.
- b. Rampa 1: aumento de 15°C min<sup>-1</sup> até aos 150°C, manter 1 minuto a essa temperatura.
- c. Rampa 2: aumento de 5°C min<sup>-1</sup> até aos 220°C, manter 10 minutos a essa temperatura.

### **2. Injetor:**

- a. Temperatura: 250°C.
- b. Modo: splitless.
- c. Volume de amostra injetado: 1µL.
- d. Gás de arraste: hélio com um caudal de 1.5mL min<sup>-1</sup>.

### **3. Detetor: FID**

- a. Temperatura: 260°C.
- b. Caudal de ar: 350mL min<sup>-1</sup>.
- c. Caudal de hidrogénio: 355mL min<sup>-1</sup>.

4. Tempo de análise: 35 minutos.